

Rev. Soc. Esp. Dolor
4: 296-306; 2007

Modelos animales de dolor y electroacupuntura

B. Garrido¹, F. Bosch², G. Garrido³, I. Hernández-Balmaseda⁴, R. Delgado-Hernández⁵

Villanueva V., De la Calle J. L., Perucho A.,
Asensio J., De Andrés J. A., González-Escalada J. R.

Pain animal models and electroacupuncture

SUMMARY

Animal models of pain have permitted in the last decades important advances in neurobiologic research, but biological systems are not exact and there are multiple factors that can lead to contradictory results. Those difficulties are exacerbated in models addressed to electroacupuncture treatment procedures, as a parametric variability exists for the liberation of

¹ Especialista de Primer Grado en Anestesiología y Reanimación. Aspirante a Doctora en Ciencias Médicas.
Calle 10 Núm. 15033 entre 7ma. y D. Altahabana. Teléfono: 447654.

² Especialista de Segundo Grado en Anestesiología y Reanimación. Doctor en Ciencias. Profesora Principal de Medicina Tradicional y Natural del Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana. Presidenta del Comité Académico de la Maestría en Medicina Bioenergética y Naturalista. Jefa de la Clínica del Dolor HDCQ 10 de Octubre.
Calle D Núm. 404 entre 17 y 19. El Vedado. Teléfono: 8324385

³ Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Investigador Auxiliar. Jefe del Laboratorio de Farmacología, Departamento de Investigaciones Biomédicas, Centro de Química Farmacéutica.

⁴ Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Aspirante a investigador. Laboratorio de Farmacología, Departamento de Investigaciones Biomédicas, Centro de Química Farmacéutica.

⁵ Licenciado en Educación en la Especialidad de Química y Licenciado en Bioquímica. Doctor en Ciencias Biológicas. Investigador Titular, Jefe del Departamento de Investigaciones Biomédicas e Investigador del Laboratorio de Farmacología del Centro de Química Farmacéutica.

Clínica del Dolor Hospital Docente Clínico Quirúrgico 10 de Octubre HDCQ Díez de Octubre. Calzada de Díez de Octubre #130 entre Alejandro Ramírez y Agua Dulce. Cerro. Teléfono: Directo Clínica del dolor: 877 6292

Recibido: 05/02/2006
Aceptado: 19/03/2007

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

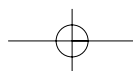
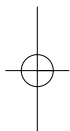
2. OBJETIVOS

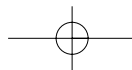
3. DESARROLLO

- a) Efectos antiinflamatorios no dependientes de opiodes de la electroacupuntura a baja frecuencia en un modelo de dolor inflamatorio inducido por carragenina en ratas.
- b) Estudio paramétrico de la electroacupuntura en un modelo de hiperalgesia y expresión de proteína Fos espinal en ratas.
- c) Efecto antihiperalgésico de la electroacupuntura combinada con indometacina en un modelo de dolor inflamatorio en ratas.
- d) Oxido Nítrico y electroacupuntura
- e) La ketamina asociada a la electroacupuntura incrementa su eficacia y retarda el desarrollo de tolerancia a este proceder en ratas.
- f) Potenciación del efecto analgésico de la electroacupuntura asociada a endomorfina-1 en ratas.
- g) Sinergismo de la electroacupuntura con los antagonistas de receptores excitatorios para inhibir la hiperalgesia inducida por carragenina y la expresión de proteína Fos espinal.
- h) Mecanismo de depresión a largo plazo (LTD) a nivel del cuerno posterior y electroacupuntura a 2Hz en ratas.

4. CONCLUSIONES

5. BIBLIOGRAFÍA





mediators, also for the response of biochemical systems manipulated under physiologic or pathological conditions, among other the influence of the stress induced analgesia (SIA). Our purpose is to critically analyze some recent experiments in this field, from authors that have faced these difficulties and still have provided important elements for the clarification of the mechanisms involved in acupuncture analgesia.

Key Words: animal model, pain, nociception, electroacupuncture.

RESUMEN

Los modelos animales de dolor han permitido en las últimas décadas un salto en las investigaciones de su neurobiología, pero los sistemas biológicos no son exactos y hay múltiples factores que pueden determinar resultados contradictorios. Las dificultades se exacerbaban al diseñar modelos en los que se aplique la electroacupuntura, pues existe una variabilidad paramétrica para la liberación de mediadores, también para la respuesta de los sistemas bioquímicos manipulados en condiciones fisiológicas o patológicas, marcada influencia de la Analgesia Inducida por Estrés (SIA), entre otras. Nuestro propósito es analizar críticamente algunos experimentos recientes en este campo, de autores que han enfrentado estas dificultades y aún así, han aportado elementos importantes para el esclarecimiento de los mecanismos involucrados en la analgesia acupuntural.

Palabras Clave: modelo animal, dolor, nocicepción, electroacupuntura.

INTRODUCCIÓN

Estudios recientes en el campo de la electroacupuntura experimental, diseñados en modelos de dolor en circunstancias patológicas, ya fueran inflamatorias o de lesión neural y dirigidos a evaluar las alteraciones del procesamiento nociceptivo (1); lograron promover un cambio dinámico de los elementos que soportaban científicamente la acupuntura y sus técnicas afines, en el mismo sentido que avanza el conocimiento de la biología molecular del dolor. En la actualidad se reconocen los efectos de esta técnica sobre los receptores de aminoácidos excitatorios en interacción con el sistema opioide, este último muy bien documentado en estudios previos, también se considera la influencia que pudiera ejercer sobre el mecanismo de sensibilización central y la plasticidad neuronal, la actividad sobre la vía óxido nítrico sintasa/óxido nítrico/guanosín monofosfato cíclico (NOS/NO/GMPc), los efectos antiinflamatorios no dependientes de opiodes ejercidos a través del control

de la liberación de citocinas y neuropéptidos; hallazgos que sugieren su participación en la regulación de múltiples sistemas biológicos, responsables del dolor observado clínicamente en nuestros pacientes. El desarrollo de estudios dirigidos a estos blancos moleculares, con un método de aplicación electroacupuntural que simule activamente la sistemática clínica, nos conduciría al esclarecimiento de la bioquímica que media en sus acciones.

OBJETIVOS

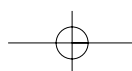
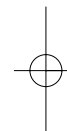
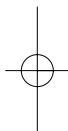
- Promover estudios en el campo de la electroacupuntura experimental, en modelos animales de dolor patológico y con métodos que simulen la sistemática clínica de aplicación de este proceder.
- Actualizar los conocimientos sobre los mecanismos de acción de la analgesia electroacupuntural según reportes recientes en este campo.

DESARROLLO

Efectos antiinflamatorios no dependientes de opiodes de la electroacupuntura a baja frecuencia en un modelo de dolor inflamatorio inducido con carragenina en ratas.

Es conocida la analgesia opioide-dependiente de la electroacupuntura (EA) con una baja frecuencia de estimulación, así como la inhibición de la expresión de la proteína Fos en el cuerno dorsal espinal (CDE), esta proteína es el producto del gen c-fos, considerado uno de los genes de expresión temprana candidatos para acoplar la excitación neuronal a las modificaciones adaptativas a largo plazo de la transcripción (2,3). La expresión de proteína Fos se utiliza como marcador del incremento de la actividad neuronal en respuesta a la inflamación y a los estímulos nociceptivos.

En este estudio se abolió el dolor con anestesia general y se creó un modelo para estudiar los efectos de la EA sobre la inflamación (2), los resultados demuestran inequívocamente que la inhibición causada por la EA de baja frecuencia sobre el edema inducido por carragenina (CA) y sobre la expresión de proteína Fos no dependen del sistema opioide al estar bloqueado por un antagonista no selectivo como la naloxona (4), que tampoco impidió la inhibición de la actividad neuronal Fos inmunorreactiva (Fos-IR) en láminas superficiales del cuerno dorsal, observada a las cuatro horas que siguieron a la inyección ipsilate-



ral de CA. El incremento en la actividad neuronal que sigue a la injuria o sensibilización central es responsable de la hiperalgesia y la inflamación neurogénica. Se reporta una correlación positiva entre la cuantía del edema y el número de neuronas Fos-IR en el cuerno dorsal (3), hecho que sostiene la existencia de una asociación estrecha entre la severidad de la inflamación periférica y la extensión de la activación neuronal; la interrogante sería si la inhibición de proteína Fos por la EA es secundaria a la reducción del edema o viceversa. Estudios electrofisiológicos, previos demostraron que la inhibición central directa opioide-dependiente de la transmisión nociceptiva por EA o por Neuroestimulación Eléctrica Transcutánea (TENS) en cuerno posterior, es supresora de c fos (2,3,5); en el presente estudio la misma se encuentra bloqueada, por lo que la posibilidad de que el efecto inhibitor sobre la expresión de proteína Fos, al menos en parte, sea secundario a la inhibición de la inflamación periférica, es de considerar.

La actividad del sistema opioide es un fenómeno bien documentado durante la acupuntura (3,4,6,7), pues sus efectos son atenuados por la administración sistémica y la microinyección intracerebral de antagonistas, también se ha encontrado un incremento de opiodes en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de humanos que sigue a su aplicación. La localización adyacente de neuronas contenedoras de Fos y neuronas betaendorfínicas positivas en el lóbulo anterior de la hipófisis, también sugiere que esta es activada por la acupuntura para incrementar la liberación de opiodes; sin embargo se ha observado que los efectos de la acupuntura sobre pacientes con dolor crónico son resistentes a la naloxona; al parecer los opiodes solo contribuyen al efecto pasajero de la acupuntura, mientras que el control que esta ejerce sobre muchos dolores clínicos complejos es no opioide dependiente (2). La observación que hacen los autores sobre la falta de efectividad de la EA aplicada después de establecida la inflamación, y su importante actividad antiinflamatoria al aplicarla 45 minutos antes de la administración intraplantar (i.pl.) de CA; perfiló un importante efecto profiláctico de relevancia clínica, que limitaría su utilización terapéutica. Existen reportes interesantes de la inefectividad del TENS, que posee algunos mecanismos similares a la EA, para reducir la inflamación articular inducida por CA y Kaolín (8), así como la nota clínica interesante sobre la utilización con mayor frecuencia de la EA en el período preoperatorio para tratar el dolor, la náuseas y vómitos del postoperatorio que en el postoperatorio mismo (9).

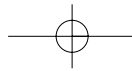
Algunas características del modelo de edema plan-

tar inducido por CA lo catalogan como excelente para la evaluación de drogas antiinflamatorias (10). Es un procedimiento de tamizaje, pues se suceden una serie de complejas reacciones que involucran a múltiples mediadores, entre ellos: histamina, serotonina, metabolitos del ácido araquidónico vía ciclooxigenasa (COX), citocinas, neuropéptidos, y además la producción de especies reactivas de oxígeno está bien establecida (11-13). Durante los primeros 60 minutos después de la inyección de CA, se inicia la fase no fagocítica, caracterizada por injuria citoplasmática de mastocitos y su degranulación, lesión citoplasmática y de organelos de las células endoteliales de los vasos sanguíneos, así como expresión de interleucina 1 (IL-1) que atrae fagocitos al sitio de irritación (10). Un elemento clave en esta fase temprana es el incremento de sustancia P (SP). Posteriormente y secundaria a la fase anterior comienza la fase fagocítica. Más específicamente según el mediador predominante, se describen cuatro fases: una fase inicial en la que se liberan histamina y serotonina, una segunda fase mediada por cininas, una tercera fase (alrededor de las cinco horas) en la cual la liberación prostaglandinas (PGs) es predominante y una cuarta fase vinculada con infiltración local de neutrófilos y activación de ellos (12-17). El hallazgo de que el pre-tratamiento con EA inhiba el edema, es sugestivo de que pueda inhibir algunas de estas reacciones de la fase no fagocítica como la degranulación de los mastocitos, la expresión de IL-1 y el incremento de SP (14,18,19). Existen reportes de disminución de SP en la periferia, CDE, núcleo trigeminal, así como la reducción de IL-1 β en tejido sinovial y células del Bazo (15) en modelos de artritis en los que se aplicó la EA (Fig. 1).



Fig. 1. Medición del edema de la pata trasera de la rata inducido con carragenina.

Laboratorio de Farmacología del CQF.



Estudio paramétrico de la electroacupuntura en un modelo de hiperalgesia y expresión de proteína Fos espinal en ratas.

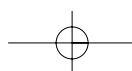
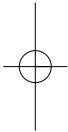
La relevancia de este experimento radica en la aplicación de un método electroacupuntural con el animal conciente, no restringido, sin anular el fenómeno doloroso para determinar el efecto antihiperalgésico y estudiar los parámetros ideales de estimulación (frecuencia de pulso, intensidad de corriente, duración del tratamiento, onda de pulso) en condiciones patológicas. Se realizó en un modelo de dolor inflamatorio persistente, inducido por adyuvante completo de Freund (CFA) unilateralmente en la pata trasera (20), condiciones que mimetizan el dolor crónico. Este estudio irrumpe dialécticamente sobre muchos criterios pre-establecidos en la neurobiología de la analgesia electroacupuntural, pues la mayoría de los experimentos anteriores que informaron sobre la parámetro-dependencia de esta, se realizaron en animales sanos, que no expresaban la sensibilización de los nociceptores periféricos y la hiperexcitabilidad del sistema nervioso central, responsables de la hiperalgesia y alodinea que observamos en nuestros pacientes. También los estudios se llevaron a cabo en animales restringidos e influenciados por la analgesia inducida por el estrés (SIA, por sus siglas en inglés) (21,22) o sedados, en condiciones que pudieron soportar intensidades de estímulo muy superiores a las que puede tolerar un animal conciente y estas terapias se realizan en el humano conciente. Evidentemente con este nuevo método, al extrapolar los resultados obtenidos en animales, a humanos con dolor patológico, de alta incidencia en nuestras clínicas (23), estaremos más cerca de la verdad.

Los autores probaron mediante la latencia de retirada de la pata (PWL, por sus siglas en inglés) ante una fuente de calor, que el efecto antihiperalgésico de la EA fue óptimo a 10 Hz/3 mA/0.1 ms/20 min por un período de observación de 7 días. Con esta frecuencia fue mucho más efectiva la acción inhibitoria a largo plazo, mientras que a 100 Hz es muy potente pero de corta duración; lo que es consistente con estudios en animales no injuriados en los que altas frecuencias (50-200 Hz) inducen una corta analgesia, mientras que bajas frecuencias (2-4 Hz) inducen analgesia prolongada. No obstante es de notar que la mayor extensión de la analgesia, en estos casos, no alcanzó una hora (24). La baja frecuencia típica de 2 Hz demostrada por otros investigadores en animales no injuriados, en este estudio no tuvo efecto antihiperalgésico, esta discrepancia puede explicarse por la utilización

de un rango de intensidades entre 2-3 mA, máximo tolerado por el animal conciente injuriado con incremento de su sensibilidad dolorosa, que también explica mayor sensibilidad a la EA, mientras que otros autores trabajaron con intensidades muy altas de 20-30 mA, en animales no injuriados, restringidos y a veces anestesiados. También por el tipo de prueba aplicada, en este caso la PWL y en los anteriores la de retirada de la cola (TFL, por sus siglas en inglés). Algunos autores (25) describen la ineffectividad de la PWL, para mostrar las variaciones del umbral nociceptivo ante una frecuencia de estímulo de 2-4 Hz, sucede lo contrario con el TFL, por la participación de varios circuitos neuronales que modulan de manera diferente en condiciones de baja frecuencia de EA.

Las discordancias entre la duración del efecto analgésico en este modelo de dolor inflamatorio, con respecto a animales no injuriados, sugieren que la EA puede activar el sistema nervioso central (SNC) o el sistema neuroendocrino de formas diferentes según las condiciones patológicas o de salud del animal. Este hecho es consistente con reportes sobre los efectos analgésicos de los agonistas μ (μ) y delta (δ) opioides, que son potenciados durante la inflamación persistente (26). La EA pudiera activar más extensamente al sistema inhibitorio endógeno y al eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal en modelos inflamatorios, que en animales no injuriados, esto explicaría los efectos terapéuticos prolongados de la acupuntura por días y meses (20). Los autores consideran que la antihiperalgesia inducida por baja y alta frecuencia de EA es mediada por el sistema espinal y supraespinal de opioides, que puede inhibir la actividad de neuronas nociceptivas a través del incremento de opioides espinales (2,4,6,24); también por la reducción de SP (2,18). Está bien establecido que la EA a baja frecuencia induce incremento de endorfinas y hormona adenocorticotrópica (ACTH) desde la hipófisis, aumento del nivel de glucocorticoides plasmáticos, los cuales suprimen la inflamación al deprimir la producción de mediadores pro-inflamatorios (citocinas) periféricamente en el sitio injuriado, lo que pudiera evitar la sensibilización de nociceptores (5,6,7).

En cuanto a la expresión de proteína Fos (20) describen una correlación paramétrica con los estudios funcionales, pues ambas frecuencias 10 Hz y 100 Hz, suprimen significativamente la expresión de esta en la mitad medial de las láminas I-II del cuerno posterior, a donde llegan las aferentes primarias nociceptivas desde sus terminaciones en la pata trasera. Además causan incremento de la expresión de esta proteína en láminas más profundas como la III-IV,



donde las fibras gruesas mielinizadas A α y A β terminan, lo que confirma que la EA inhibe y activa selectivamente subpoblaciones neuronales en el CDE (2,3,5,20). Esto sugiere que la EA pudiera activar estas fibras y su efecto antihiperalgésico dependería de la activación preponderante de las fibras gruesas mielinizadas sobre las finas no mielinizadas. Consecuentemente, los autores plantean la hipótesis de que la EA activaría neuronas espinales que transmitirían la señal acupuntural al cerebro y también estimularía al sistema inhibitorio endógeno, el cual pudiera inhibir la hiperalgesia y la expresión de proteína Fos en la parte medial de las Láminas I-II del cordón espinal (20). Ellos observaron además, que la EA aplicada durante 30 minutos, no tiene efecto sobre la expresión de Fos en la parte medial de las láminas superficiales, pero induce su expresión en la mitad lateral de estas láminas y en todas las regiones de las láminas III-IV, VII-IX y X. Otras investigaciones han establecido que ambos sistemas descendentes, el inhibidor y el facilitador, modulan la transmisión de los impulsos nociceptivos a nivel espinal (5-7,19,21,25). Los autores sugieren que el estímulo prolongado pudiera activar el sistema facilitador descendente atenuando la inhibición del dolor en este modelo de dolor inflamatorio (20) (Fig. 2).

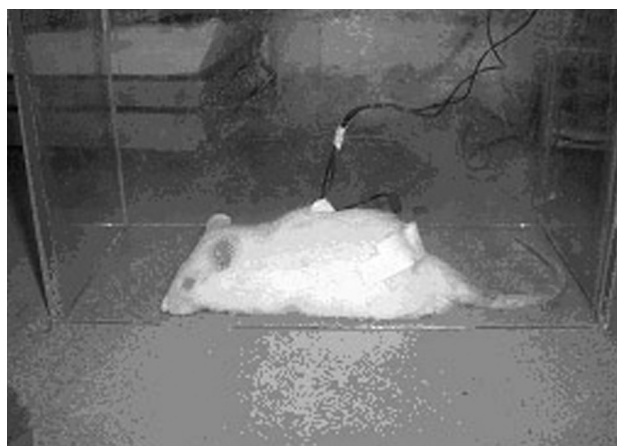


Fig. 2. Método de Lao y colaboradores para aplicación de la EA en ratas.

Laboratorio de Farmacología del CQF.

Efecto antihiperalgésico de la electroacupuntura combinada con indometacina en un modelo de dolor inflamatorio en ratas.

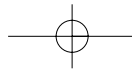
La EA a 10 Hz y a 100 Hz, combinada con indometacina a dosis subanalgésicas en un modelo de inflamación inducida con CFA en ratas (27), manifestó

una acción sinérgica ostensible, pues el efecto antihiperalgésico, probado mediante PWL de la combinación, fue muy superior al efecto de ambos agentes por separado. Los AINE como inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), al disminuir los prostanoideos y la sensibilización de nociceptores en la periferia, también por sus efectos a nivel subcortical al causar descenso de los niveles de prostaglandinas E2 (PGE2), además de influir sobre otros sistemas centrales inhibitorios (28-30) y la EA por su mecanismo opioide dependiente, que determina un balance inhibitorio en CDE sobre los aminoácidos excitatorios. También por disminución de SP, determinado por técnicas inmunorreactivas, puede reducir la respuesta electrofisiológica de las neuronas en los circuitos espinales (2,17-19) y evidentemente la participación de varios mecanismos biológicos explicaría el efecto sinérgico de esta combinación.

Oxido Nítrico y Electroacupuntura

En los últimos años se han acumulado evidencias de que el óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) tiene un importante papel en la sensibilización central (30-34). Al parecer, la vía postsináptica receptor NMDA-NO-GMPc (receptor N-metil-D-aspartato/óxido nítrico/ guanosín monofosfato cíclico) está comprometida en el proceso, aunque es de señalar que los efectos *in vitro* del NO, en ocasiones, no se correlacionan con los *in vivo*. Algunos estudios reportan que bajo régimen electroacupuntural el incremento del NO es el mecanismo primario que aumenta la microcirculación en la articulación de la rodilla en ratas Wistar, bloqueado en presencia de nitro-L-arginina methyl ester (L-NAME) (35). Otros reportan que tras el estímulo electroacupuntural del punto E 36 se induce la expresión de la óxido nítrico sintasa neuronal (NOSn) en los núcleos gracilis y del tracto solitario que incrementa la producción ON, el cual contribuye a la regulación de la función cardiovascular y al efecto hipotensor de la EA (36). En modelos de Diabetes inducida en ratas con estreptozotocina, la EA disminuye la expresión de la NOS en la sustancia gris periacueductal (SGP), importante estructura suprasegmentaria antinociceptiva (37-41).

Un estudio de los niveles de NO neuronales en hipocampo de ratas, a las que se administraron sobredosis de penicilina para inducir convulsiones, mostró incremento marcado del mismo. Estos animales fueron estimulados con EA y se logró un efecto anticonvulsivante, correlacionado con el descenso de la tasa



de NO; la variabilidad de respuestas puede obedecer a diferencias en los modelos experimentales, pero guarda correspondencia con la multiplicidad biológica del NO (31,32).

La regulación funcional de los nociceptores depende del balance entre las concentraciones de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc), respectivos segundos mensajeros del sistema nervioso simpático y parasimpático. El estado de analgesia se restablece con su equilibrio (27,29). El NO como mediador de los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), aumenta los niveles de GMPc a través de la vía L-Arginina/NO/GMPc y mantiene el equilibrio. Este puede tener acciones paradójicas que dependen de la fuente del mismo, la existencia de una familia de genes para las isoformas de NOS (óxido nítrico sintasa) involucradas, el estado redox de las células y su microambiente, la posibilidad de difundir y actuar sobre diferentes poblaciones celulares, su concentración, etcétera (30-33). Durante la inflamación, se libera desde las células endoteliales y/o terminaciones nerviosas; provoca vasodilatación, altera la permeabilidad vascular y estimula a la COX-2, a través IL1 β ; es disparado por mediadores inflamatorios y puede aumentar la liberación del péptido relacionado al gen de la calcitonina (PRGC) y SP, desde los nervios, para autoperpetuar el proceso (32). La vía del NO-GMPc, evidentemente, tiene un papel tanto positivo como negativo en la regulación del dolor y la hiperalgesia y la influencia de la EA sobre esta pudiera ser importante.

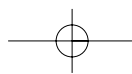
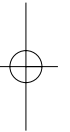
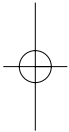
La ketamina asociada a la electroacupuntura incrementa su eficacia y retarda el desarrollo de tolerancia a este proceder en ratas.

La asociación de la ketamina con la EA a alta frecuencia (100 Hz) en ratas, produjo un incremento de la eficacia antinociceptiva de esta técnica, corroborada por TFL y también retardó el desarrollo del fenómeno de tolerancia, que puede aparecer después de su administración prolongada (38). Son conocidas las interacciones entre los receptores NMDA y los receptores opioides durante el procesamiento nociceptivo espinal, donde se encuentran distribuidos ampliamente en la lámina II del cuerno posterior; pero esta interacción es muy particular y ha causado discrepancias en múltiples estudios. Existen reportes de que la ketamina y el dextrometorfan pueden potenciar los efectos antinociceptivos de los agonistas de receptores μ , pero no de los agonistas δ o kappa (κ) en la prueba del plato caliente

en ratones, mientras otros autores refieren efectividad para incrementar los efectos de agonistas μ y κ . Las diferencias en las dosis utilizadas, las vías de administración, las pruebas funcionales, los animales y las condiciones en que fueron creados los modelos, son algunos de los factores que pueden explicar estas discrepancias (38). La EA a alta frecuencia produce aumento preponderante de dinorfina en ratas normales, que actúa con mayor afinidad sobre los receptores κ . Los investigadores especulan que la ketamina pudiera potenciar la antinocicepción de la EA a través del antagonismo NMDA (38,39). El retardo de la tolerancia crónica pudiera deberse al mismo efecto. Se ha documentado la importancia de otros neurotransmisores, como el glutamato y de sus interacciones con las vías opioides en el mecanismo de tolerancia a la morfina, así como su bloqueo mediante la utilización de antagonistas competitivos y no competitivos del receptor NMDA, estos antagonistas carecen de efectos sobre la potencia de la morfina en animales que no habían recibido previamente el fármaco, por lo que su efecto no puede atribuirse solamente a la simple potenciación de las acciones de los opioides (38,41). El bloqueo del sitio regulador de glicina en el receptor NMDA tiene efectos similares al bloqueo de la tolerancia (39), este dato sugiere que el citado receptor juega un papel en el desarrollo de la tolerancia a opioides y según los hallazgos de este experimento, también en el desarrollo de la tolerancia crónica a la EA.

Potenciación del efecto analgésico de la electroacupuntura asociada a endomorfina-1 en ratas.

Realmente son pocos los estudios en la literatura, que utilizan la prueba de la formalina para demostrar los efectos antihiperalgésicos de la electroacupuntura (40), a pesar de ser considerado por Dalal y Melzack, como un excelente modelo de dolor prolongado de moderada intensidad, que se asemeja al dolor clínico en humanos, pues desencadena una respuesta bifásica conductual, que en un primer tiempo refleja el dolor nociceptivo en respuesta a la noxa química aguda y en un segundo tiempo refleja el dolor inflamatorio con la sensibilización espinal inducida por la injuria, específicamente a una concentración de 5% (1,4,22); este experimento es uno de ellos. Los autores observaron una potenciación del efecto antinociceptivo de la EA a 2Hz asociada a la administración intratecal de endomorfina-1, un novedoso péptido endógeno, agonista μ (24,40). Estudios previos demostraron incrementos diferenciales de opioides en el CDE de ratas y humanos:



La EA a baja frecuencia (2 Hz) incrementa la liberación de encefalinas y beta endorfina que activan receptores δ y μ en el SNC. El tercer miembro de opiodes sería la endomorfina-1 y la EA a alta frecuencia (100 Hz) induce incremento de dinorfina que actúa en receptores κ en el cuerno posterior. La EA sola no suprime la respuesta conductual nociceptiva inducida por formalina al 5%, en cambio ella es capaz de incrementar la TFL ante el estímulo térmico en animales sanos. Los mismos autores en estudios anteriores demostraron que la DE_{50} (dosis efectiva para producir la reducción del dolor en el 50% del grupo control) de opiodes es significativamente menor en esta prueba de dolor nociceptivo, que en la prueba de formalina, donde deben suprimir alteraciones de los circuitos espinales como la sensibilización central. Los opiodes intratecales pueden suprimir la sensibilización central inducida por formalina (36,37). Estos autores postulan que el incremento de péptidos opiodes endógenos que produce la EA, no es suficiente para suprimir la respuesta nociceptiva conductual inducida por la formalina, pero es capaz de producir antinocicepción en un modelo de dolor agudo, no patológico como la prueba de retirada de la cola (4,37). En cambio al combinar la EA a 2 Hz con la administración intratecal de endomorfina-1, se observó una desviación a la izquierda de la curva dosis respuesta en comparación con la curva para la endomorfina-1 sola, por lo que la EA incrementa sus efectos antinociceptivos (4). La combinación clínica de drogas con la EA en humanos puede aumentar la analgesia y disminuir los efectos indeseables al reducir las dosis utilizadas. De ahí la importancia de los efectos sinérgicos y/o aditivos del proceder con otros fármacos, lo que puede ser de elección en pacientes ancianos y oncológicos (Fig. 3).

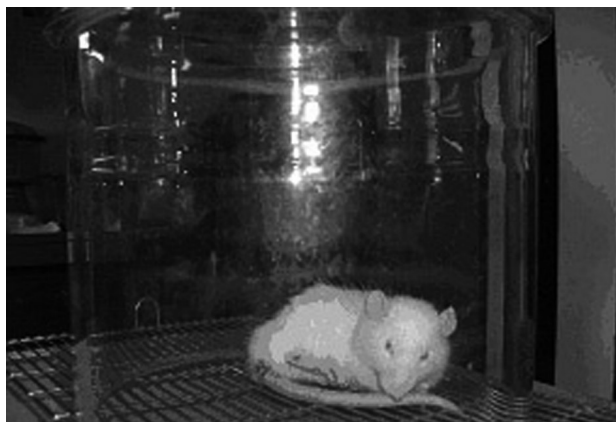


Fig. 3. Observación de la respuesta bifásica conductual de la rata en la prueba de la formalina. Laboratorio de Farmacología del CQF.

Sinergismo de la electroacupuntura con los antagonistas de receptores excitatorios para inhibir la hiperalgnesia inducida por carragenina y la expresión de proteína Fos espinal.

Los autores basaron sus estudios en hallazgos previos, que favorecían la importancia de los receptores de aminoácidos (aa) excitatorios como blancos para el tratamiento del dolor. Entre ellos, la inhibición de la respuesta bifásica inducida por formalina tras la administración de antagonistas NMDA y la supresión de la variabilidad de respuestas nociceptivas ante la injuria nerviosa y la inflamación periférica, causada por estos (41,42). En contraste el uso de antagonistas de receptores ácido2-amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y kainato (KA) tenían resultados conflictivos (43), por lo que se propusieron estudiar comparativamente los efectos del antagonista NMDA (AP5) y el antagonista AMPA/KA (DNQX) en la hiperalgnesia térmica inducida por CA y su repercusión en la expresión de Fos espinal en ratas (41). También determinaron un posible sinergismo en los efectos antinociceptivos de la EA con ambos antagonistas a dosis subanalgésicas. Ellos demostraron una potente reducción de la producción de las concentraciones de glutamato y aspartato en el CDE, tras el estímulo electroacupuntural a 2Hz, y pudieron establecer una relación entre la analgesia electroacupuntural y los receptores de aa excitatorios (41-43).

El AP5 suprimió de manera dosis dependiente la hiperalgnesia térmica inducida por CA a dosis que no interferían las funciones motoras, también redujo de manera significativa la expresión de Fos en las láminas I-II y V-VI. Con el DNQX se logró el mismo resultado pero a dosis muy superiores. Desde 1992, otros estudiosos del tema propusieron una diferenciación funcional entre estos receptores en el procesamiento nociceptivo espinal (43).

En cuanto a la combinación con la EA, se observó un potente sinergismo al inhibir la hiperalgnesia inducida por CA y la expresión de Fos espinal. Al parecer la EA responde a varios mecanismos biológicos, como el incremento de diferentes neuropéptidos en el SNC. Se ha reportado que el efecto analgésico de la EA en la rata es equivalente a una baja dosis de morfina de 3mg/kg (41). Hoy existen importantes evidencias a favor de que los aa excitatorios ejercen sus efectos farmacológicos por interacción con el sistema opioide, especialmente en la regulación de la nocicepción (41,42). El pre-tratamiento con antagonistas NMDA y AMPA/KA potencializa y prolonga la analgesia inducida por opiodes (42,43), también un anta-

gonista del sitio de glicina, el 7-chlorokynurenato, incrementa el efecto de la morfina sobre la respuesta repetitiva a la estimulación de la fibras C en el cuerno posterior.

La máxima disminución de aa excitatorios se observó a los 30 minutos después de iniciada la EA, los valores se restablecieron al nivel basal a los 60 minutos después de cesar el estímulo y la preadministración de naloxona bloqueó completamente el efecto (41).

La combinación de la EA y los antagonistas actúa sobre los receptores presinápticos de opioides y los postsinápticos de aa excitatorios. La actividad de los opioides presinápticamente sobre las terminales de fibras C, reduce la liberación del neurotransmisor excitador y puede producir un sinergismo con la inhibición del antagonista sobre el receptor NMDA. Aunque el incremento en la producción de opioides producida por la EA puede no ser alta en la médula espinal, también la activación de las vías centrales descendentes inhibitorias y la actividad de receptores opioides supraespinales inducida por esta, puede contribuir al efecto sinérgico (44,45).

La relevancia clínica de la utilización de combinaciones de bajas dosis de antagonistas, muy neurotóxicos a dosis superiores, con la EA que solo induce una analgesia moderada, radica en su efectividad y en la reducción de los efectos indeseables (41). Una limitación de este estudio pudiera ser la restricción del animal durante el tiempo de estimulación que genera SIA (21,22). También las dificultades con un grupo control para la EA, totalmente carente de efectos analgésicos, en este caso se utilizó una forma de acupuntura simulada no invasiva, pero el acápite del grupo control constituye un conflicto para todas estas investigaciones (2,5,6,19-21,24,27,41).

Mecanismo de depresión a largo plazo (LTD) a nivel del cuerno posterior y electroacupuntura a 2Hz en ratas.

En 1973, investigadores de la Universidad de Oslo descubrieron que las células nerviosas del hipocampo se unen con mayor fuerza cuando son estimuladas por una serie de impulsos eléctricos de alta frecuencia. Este fenómeno, conocido como potenciación prolongada (LTP, por sus siglas en inglés) puede durar horas, días e incluso semanas (46). El hipocampo es una estructura cerebral fundamental para la formación de la memoria en humanos y animales, rica en receptores NMDA. Este forma parte del sistema límbico, de importancia vital para el compo-

nente afectivo de la percepción dolorosa. Estudios posteriores demostraron que estímulos de baja frecuencia aplicados al hipocampo producían disminución prolongada en la fuerza de las conexiones, un fenómeno conocido como depresión prolongada (LTD, por sus siglas en inglés). Actualmente, se sabe que la LTP y la LTD ocurren también en otras regiones cerebrales, como la neocorteza y la amígdala. Posteriormente se demuestra que los cambios sinápticos dependen de los receptores NMDA (46).

Hallazgos recientes en animales, sugieren que los receptores inotrópicos para glutamato están involucrados en la analgesia electroacupuntural a baja frecuencia (2 Hz) por medio del mecanismo de LTD a nivel del cuerno posterior (47). Con anterioridad nos referimos al efecto sinérgico antinociceptivo de la EA combinada con antagonistas de los receptores NMDA y AMPA/KA, en un modelo de hiperalgnesia inducida por CA (41). En este estudio la polémica surgiría del efecto causado por la misma administración conjunta, pero sobre la disminución significativa de la TFL en ratas normales; o sea la inhibición de la analgesia electroacupuntural a 2 Hz. Los autores sugieren que el mecanismo de analgesia de la EA a esta frecuencia pudiera estar mediado por estos receptores de manera similar a la LTD. Sandkühler propuso un mecanismo celular en el CDE, que pudiera explicar la analgesia duradera siguiendo a la EA. El condicionamiento de la estimulación de fibras A δ por la EA, induce el incremento de glutamato en las terminaciones nerviosas en el cuerno posterior, el cual activa a los receptores NMDA y produce un moderado incremento del Ca²⁺ citosólico, éste causaría la activación de la proteína fosfatasa y subsecuentemente la depresión a largo plazo del refuerzo sináptico ocurre como resultado de la desfosforilación de las proteínas sinápticas, entre ellas el receptor AMPA (47).

Ha sido bien documentado el papel del N-metil-D-aspartato (NMDA), como agonista del receptor del mismo nombre, en la señalización del dolor a nivel espinal; en este experimento es aplicado por vía intratecal en ratas y con carácter dosis dependiente, produce manifestaciones conductuales en el animal como vocalización y movimiento de sus miembros. El efecto fue medido por la TFL cada 10 minutos por 1 hora, pero al monitorizar la respuesta a intervalos de 2 minutos por 12 minutos, después de su administración a bajas dosis (0,1-0,6 μ g) produjo un efecto analgésico breve. Este hallazgo interesante permitió postular que la administración de aa excitatorios intratecales generaba ambos efectos, hiperalgésicos y analgésicos (47). Sin embargo esta analgesia temporal del ago-

nista NMDA es diferente a la analgesia duradera causada por EA; al parecer en este caso, podría resultar de continuos tratamientos por períodos de 30 minutos. De ser administrado el agonista a bajas dosis de manera continuada, el resultado podría ser duradero similar a la EA (47).

Estos reportes contradictorios con respecto a la relación de la EA con los aa excitatorios, pueden estar determinados por los modelos animales, de dolor patológico inflamatorio en el estudio anterior y dolor nociceptivo, en animales sanos en el presente. Ambos tienen relevancia clínica y sugieren mecanismos diferentes de interacción de la EA con los receptores de glutamato en condiciones de dolor agudo o persistente.

En los estados de sensibilización central, por continuo bombardeo de la SP y otras tacininas sobre los receptores neurocinina 1 y 2 (NK1 y NK2) y de glutamato en los receptores AMPA y KA, se produce también un aumento de la concentración intracelular del Ca^{2+} y un rechazo electrostático del ión Mg^{2+} que elimina el bloqueo sobre el canal del receptor NMDA y aumenta de manera elevada la corriente de entrada de Na^{2+} y Ca^{2+} (48,49). Este último activa una cascada de segundos mensajeros, como la proteína cinasa C, que fosforila a múltiples proteínas, entre ellas al propio receptor y reduce el bloqueo de Mg^{2+} e incrementa la sensibilidad al glutamato. También se produce la activación del sistema NOS/NO/GMPc (50). El resultado es un cambio en la transmisión sináptica que altera, incrementa y prolonga la actividad en los circuitos espinales, similar al refuerzo sináptico observado en la LTP, para algunos una verdadera memorización del dolor. Si la EA de baja frecuencia produjera disminución de las concentraciones de aspartato y glutamato (41), pudiera tener un papel al evitar el establecimiento de estos cambios. Participan los mismos sistemas neurotransmisores-receptores y el Ca^{2+} citosólico es protagónico como cofactor enzimático en estos procesos, pero la EA pudiera ejercer su acción sobre estos sistemas según las condiciones subyacentes fisiológicas o patológicas y regular el balance de mediadores químicos hacia la recuperación de la homeostasis corporal. La actividad neuromoduladora de este proceder, le abre un espacio en el tratamiento del dolor patológico en asociación a otros fármacos con acciones sobre estos blancos moleculares.

CONCLUSIONES

- La electroacupuntura posee efectos antiinflama-

torios no dependientes de opiodes profilácticos y puede activar el sistema neuroendocrino de manera diferente en condiciones de salud o enfermedad.

- Su efecto antihiperalgésico es parámetro-dependiente y fue óptimo a 10 Hz/3 mA/0.1 ms/20 min en un estudio con animales injuriados, conscientes y no restringidos.
- La combinación de indometacina a dosis subanalgésicas, con la EA presentó efecto sinérgico antihiperalgésico en un modelo de dolor inflamatorio.
- La combinación con antagonistas de receptores de aminoácidos excitatorios presentó efecto sinérgico antihiperalgésico, también en un modelo de dolor inflamatorio.
- La electroacupuntura a 2Hz puede disminuir la concentración de aminoácidos excitatorios en cuerno posterior, el efecto es máximo a los 30 minutos de estímulo.
- Un nuevo péptido opioide se suma al incremento de encefalinas y beta endorfina con el estímulo electroacupuntural a baja frecuencia; la endomorfina-1.
- La ketamina aumenta la eficacia y retarda la tolerancia a la EA de alta frecuencia (100 Hz) que induce incremento de dinorfina en el cuerno posterior.
- Bajo régimen electroacupuntural se ha observado aumento de las tasas de óxido nítrico periféricamente y disminución a nivel central en hipocampo y en la sustancia gris periacueductal.
- Los receptores inotrópicos para glutamato están involucrados en la analgesia electroacupuntural a 2 Hz, por medio del mecanismo de depresión a largo plazo (LTD) a nivel del cuerno posterior en animales no injuriados.

CORRESPONDENCIA

e-mail: beatriz.garrido@infomed.sld.cu

Financiación: Ninguna

Conflictos de intereses: No declarados

BIBLIOGRAFIA

1. Ortega A, Roca A, Micó JA. Modelos animales de dolor. Una visión crítica. Rev. Soc. Esp. Dolor 2002; 9: 447-453.

2. Zhang SP, Zhang JS, Ken KL, Zhang HQ. Non-opioid-dependent anti-inflammatory effects of low frequency electroacupuncture. *Brain Research Bulletin* 2004; 62: 327-334.
3. Buritova J, Besson JM. Dose-related anti-inflammatory/analgesic effects of lornoxicam: a spinal c-fos protein study in the rat. *Inflamm. Res.* 1998, 47: 18-25
4. Pomeranz, B, Chiu, D. Naloxone blockade of acupuncture: endorphin implicated. *LifeSci.* 1976; 19: 1757-62.
5. Lao L, Zhang G, Wei F, Berman B, Ren K. Effect of electroacupuncture on hyperalgesia and Fos protein expression in rats with persistent inflammation- a new animal model. *Clin. Acupunct. Orient. Med* 2000; 1: 112-113.
6. Zhang RX, et al. Involvement of opioid receptors in electroacupuncture produced anti-hyperalgesia in rats with peripheral inflammation. *Brain Research* 2004; 1020: 12-17.
7. Han JS. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. *Trends Neurosci.* 2003; 26: 17-22.
8. Sluka KA, Bailey K, Bogush J, Olson R, Ricketts A. treatment with either high or low frequency TENS reduces the secondary hyperalgesia observed after injection of kaolin and carrageenan into the knee joint. *Pain* 1998; 77: 97-102.
9. Kotani N, et al. Preoperative intradermal acupuncture reduces postoperative pain, nausea and vomiting, analgesic requirement and sympathoadrenal responses. *Anaesthesiology* 2001; 95: 349-356.
10. Vinegar R, Truax JF, Selph JL, Johnson PR, Venable AL, MacKenzie KK. Pathway to carrageenan induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed. Proc.* 1987; 46: 118-126.
11. Zamora R, Vodovotz Y and Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* 2000; 6: 347-373.
12. Smith MJH, Ford-Hutchinson AW, Elliot PNC and Bolam J. Prostaglandin in the anti-inflammatory activity of a human plasma fraction in carrageenan-induced paw oedema in the rat. *J Pharm Pharmacol* 1974; 26: 692.
13. Wang LM and Mineshita S. Preventive effects of Unsei-in and Oren-gedoku-to, chinese traditional medicines, against rat paw oedema and abdominal constriction in mice. *J Pharm Pharmacol* 1996; 48: 327-331.
14. Garrido G, González D, Lemus Y, García D, Lodeiro L, Quintero G, Delporte C, Núñez-Sellés AJ, Delgado R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG®). *Pharmacological Research* 2004; 50 (2): 143-149.
15. Ferreira J, Triches KM, Medeiros R, Calixto JB. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. *Pain* 2005; 117: 171-181.
16. Tao F, et al. Differential roles of neuronal and Endothelial nitric oxide synthases during Carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia. *Neuroscience* 2004; 128: 421-430.
17. Natura G, et al. Calcitonin gene-related peptide enhances TTX-resistant sodium currents in cultured dorsal root ganglion neurons from adult rats. *Pain* 2005; 116: 194-204.
18. Zelenka M, et al. Intraneural injection of interleukin-1 β and TNF α into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. *Pain* 2005; 116: 257-263.
19. Koo ST, Park YI, Lim KS, Chung K, Chung JM. Acupuncture analgesia in a new rat model of ankle sprain pain. *Pain* 2002; 99: 423-431.
20. Lao L, Zhang RX, Zhang G, Wang X, Berman BM, Ren K. A parametric study of Electroacupuncture on persistent hyperalgesia and Fos protein expression in rats. *Brain Research* 2004; 1020: 18-29.
21. Yang CH, et al. Effect of electroacupuncture on response to immobilization stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2002; 72: 847-855.
22. Aloisi AM, et al. Behavioural and hormonal effects of restraint stress and formalin test in male and female rats. *Brain Research Bulletin* 1998; 47 (1): 57-62.
23. Bosch F, et al. Pain Clinic: The impact of Traditional and Natural Medicine [en línea] 2003 [consultado 1 de septiembre 2003]; V(1): URL disponible en: www.Medicc.org/medicc%20review/V/1/cmr.html.
24. Han Z, et al. Endomorphin-1 mediates 2Hz but not 100Hz electroacupuncture analgesia in the rat. *Neurosci. Lett.* 1999, 274: 75-78.
25. Romita VV, Henry JL. Intense peripheral electrical stimulation differentially inhibits tail vs. limb withdrawal reflexes in the rat. *Brain Res.* 1996; 720: 45-53.
26. Hurley RW, Hammond DL. The analgesic effects of supraspinal mu and delta opioid receptor agonists are potentiated during persistent inflammation. *J Neurosci.* 2000; 20: 1249-1259.
27. Zang RX, Lao L, Wang KR, Bernir BB. Electroacupuncture combined with indomethacin enhances antihyperalgesia in inflammatory rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2004; 78: 793-797.
28. Ventura R, et al. Peripheral involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the indomethacin induced antinociception in rat. *European Journal of Pharmacology* 2004; 503: 43-48.
29. Reichert JA, Daughters RS, et al. Antinocicepción pe-

- riférica y anticipada en un modelo de dolor visceral en ratas. *Pain* 2001; 89: 221-277.
30. Duarte, I.D., Dos Santos, I.R., Lorezenti, B. B., Ferreira, S.H. Analgesia by Direct Antagonism of Nociceptor Sensitization involves the Arginine-Nitric Oxide-cGMP Pathway. *EUR J.PHARMACOL.* 1990; 217: 225-7.
 31. Lane, P., Gross, S.S. Oxido Nítrico: Múltiple y Ambiguo. *Science and Medicine* 2002 Mar; 96-107.
 32. Ceraso, O. Oxido Nítrico y Dolor Inflamatorio. *Dynia* 2001; 2: 8-15.
 33. Ferreira, S.H. El papel de las interleuquinas y el óxido nítrico en la mediación del dolor inflamatorio y su control con Analgésicos periféricos. *Drugs* 1993; 46: 1-9.
 34. Sakurada Ch et al. Antinociceptive effect of spinally injected L-NAME on the acute nociceptive response induced by low concentrations of formalin. *Neurochemistry International* 2001; 28 (5): 417-423.
 35. Loiza LA, Yamaguchi S, Ito M, Ohshima N. Electroacupuncture stimulation to muscle afferents in anesthetized rats modulates the blood flow to the knee joint through autonomic reflexes and nitric oxide. *Autonomic Neuroscience. Basic and Clinical* 2002; 97: 103-109.
 36. Xing Ma S, Ma J, Moise G, Yan Li X. Resposes of neuronal nitric oxide synthase expresión in the brainstem to electroacupuncture Zusanli (ST 36) in rats. *Brain Research* 2005; 1037: 70-77.
 37. Jang MH, Shiu EH, Koo GS, Lee ChY, Kim EH, Kim ChJ. Acupuncture decreases nitric oxide synthase expression in Periaqueductal gray area of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Neuroscience Letters* 2003; 337: 155-158.
 38. Huang Ch, Long H, Shi YS, Han JS, Wan Y. Ketamine enhances the efficacy and delays the development of tolerance to electroacupuncture induced antinociception in rats. *Neuroscience Letters* 2005; 375: 138-142.
 39. Wu LZ et al. Suppression of morphine withdrawal by electroacupuncture in rats: dynorphin and k opioid receptor implicated. *Brain Research* 1999; 851: 290-296.
 40. Hao S, Takahata O, Iwasaki H. Electroacupuncture potentiates the antinociceptive effect of intrathecal endomorphin-1 in the rat formalin test. *Neuroscience Letters* 2000; 287: 9-12.
 41. Zhang Y et al. Excitatory amino acid receptor antagonists and electroacupuncture synergetically inhibit carrageenan-induced behavioral hyperalgesia and spinal fos expression in rats. *Pain* 2002; 99: 525-535.
 42. Nishiyama T. Interaction between intrathecal morphine and glutamate receptor antagonists in formalin test. *Eur. J.Pharmacol.* 2000; 395: 203-210.
 43. Ren et al The intrathecal administration of excitatory amino acid receptor antagonists selectively attenuated carrageenan-induced behavioral hyperalgesia in rats. *Eur. J.Pharmacol.* 1992b; 219: 235-243.
 44. Young, K., Myung, K., Chon, A. Effect of High or Low frequency EA of the cellular activity of catecholaminergic neurons in the Brain Sistem. *Acup.* 2000; 25: 27-36.
 45. Kim HW, Kwon YB, Han HJ, Yang IS, Beitz AJ, Lee JH. Antinociceptive mechanisms associated with diluted bee venom acupuncture (apipuncture) in the rat formalin test: involved of descending adrenergic and serotonergic pathways. *Pharmacological research* 2005; 51: 183-188.
 46. Tsien, J.Z. Construyendo un ratón más cerebral. *Scientific American Abr.* 2000, p. 42-48.
 47. Choi BT, Lee JH, Wan j, Han S. Involvement of ionotropic glutamate receptors in low frequency electroacupuncture analgesia in rats. *Neuroscience Letters* 2005; 377: 185-188.
 48. Sjölund BH. Acupuncture or acupuncture. *Pain* 2005; 114: 311-312.
 49. Gao X, Kee H, Chung JM, Chung K. Enhancement of NMDA receptor phosphorylation of the spinal dorsal horn and nucleus gracilis neurons in neuropathic rats. *Pain* 2005; 116: 62-72.
 50. Ceraso OL. Dolor Crónico. Diagnóstico, pronóstico y orientaciones terapéuticas. *Dynia* 2000; 3: 7-30.