

ACTUALIZACION POR TEMAS

Los péptidos opioides en la integración sensorial y los trastornos perceptuales del dolor en la médula espinal

Francisco Pellicer*, Aurea Alonzo*

Summary

This is a review of the anatomic localization evidences and the role played by opioid peptides in the processing of nociceptive and no nociceptive sensorial information in the spinal cord. Some *per se* constituted mechanisms in complex states generators are analyzed, such as allodynia, that is, no nociceptive sensorial stimuli producing pain. An experimental method is suggested by which prolonged recordings are obtained (more than 2 h.) of unicellular activity of recorded neurons in the dorsal horn of the spinal cord of the complete and anesthetized rat (urethan, 1500 mg/kg). This preparation identifies the recorded neurons by means of the direct activation of the sensorial area. Changes in the sensorial codification are induced by means of the subcutaneous infiltration of carrageenan (200 μ l at 1%) in the same area. Results show an increase in the firing frequency of neurons, which in a control situation respond only to soft tactile stimulation or to hair movement. This increase is what we consider as pain because it reverted with morphine administration (15 mg/kg iv). Naloxone administration (1 mg/kg iv) increased the frequency eighty minutes after carrageenan infiltration. Data has been obtained from this experimental approach, reproducing the allodynia phenomena and indicating that it is mediated by the opioid system.

Resumen

Se revisan las evidencias de la localización anatómica y el papel de los péptidos opioides en el procesamiento de la información sensorial nociceptiva y no nociceptiva en la médula espinal. En particular se analizan algunos de los mecanismos que se constituyen *per se*, en generadores de estados complejos de nocicepción, como la alodinia, es decir estímulos sensoriales no nociceptivos que producen dolor. Se propone un modelo experimental con el cual se obtienen registros prolongados (más de 2 h.) de actividad unicelular, de neuronas registradas en el asta dorsal de la médula espinal de la rata íntegra y anestesiada (uretano, 1500 mg / kg). La preparación permite la identificación de las neuronas registradas, por medio de la activación directa de su campo sen-

sorial. Los cambios en la codificación sensorial se inducen mediante la infiltración subcutánea de carragenina (200 μ l, al 1 %) en el mismo campo. Los resultados muestran un incremento de la frecuencia de disparo de las neuronas, que en situación control responden sólo a estimulación táctil suave o al movimiento del pelo. Este incremento es lo que consideramos dolor, dado que se revirtió con la administración de morfina (15 mg / kg iv). La administración de naloxona (1 mg / kg iv) incrementó la frecuencia, después de 80 min. de infiltrada la carragenina. Se puede concluir que con el abordaje experimental presentado se han obtenido datos que reproducen el fenómeno de la alodinia y que éste se encuentra mediado por el sistema opioide.

Introducción

Los estudios anatómicos, inmunohistoquímicos y neurofarmacológicos sobre las relaciones que tienen las neuronas de la sustancia gris medular así como las sustancias que median la transmisión de las distintas aferencias, han aportado el conocimiento para entender el papel que juegan en la transmisión y modulación de procesos fisiológicos fundamentales como la potenciación, la habituación y el dolor, procesos que dan lugar a la integración de respuestas y conductas complejas.

Algunas de las aportaciones más importantes, de las últimas dos décadas, en las neurociencias, han sido la propuesta de Goldstein -y cols.,(17) acerca de la existencia de sitios estereoespecíficos de unión para los opiáceos, confirmada simultáneamente en 1973 por Terenius (38) en Suiza y por Pert y Snyder (33) en Baltimore, y la existencia de compuestos endógenos parecidos a la morfina, propuestos por Martin (28) e identificados posteriormente por Hughes -y cols., (21) como oligopéptidos, a los que llamaron encefalinas.

Diversas evidencias indican que la médula espinal es un sitio importante del procesamiento de información en el que intervienen los péptidos opioides. Los primeros trabajos fueron la localización de metionina y leucina encefalinas y sus receptores mediante inmunohistoquímica y radioligandos; ubicándolos principalmente en las capas superficiales de la médula es-

*Laboratorio de Neurofisiología, División de Neurociencias, Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calz. México-Xochimilco No. 101, Tlalpan; 14370, México, D.F.

* Tesista de la Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias UNAM y becaria por el CONACYT.

pinal, la lámina I o marginal de Waldeyer y la II y III o sustancia gelatinosa de Rolando (2,15,22,23).

Se ha reportado también la existencia de estos péptidos en neuronas espinales relacionadas con la transmisión y modulación de la información sensorial nociceptiva y no nociceptiva. En este contexto, utilizando una técnica combinada de inmunohistoquímica y marcado retrógrado con peroxidasa de rábano (HRP), Ruda (34) encontró que las células de la lámina V, que proyectan al tálamo, presentan terminaciones encefalinérgicas en su soma. Estas observaciones demostraron que el principal sitio sináptico de modulación encefalinérgica, en la transmisión de información nociceptiva, es la lámina V y que se ejerce de manera postsináptica. Asimismo, Fields -y cols., (14) reportaron que dos tipos de receptores a opiáceos: el μ , con afinidad mayor por la morfina y el δ , con afinidad mayor por las encefalinas, se encuentran en los aferentes primarios de pequeño diámetro, apoyando la idea de la existencia de dos poblaciones separadas de receptores, una pre y otra postsináptica, con una proporción más grande del δ en los elementos postsinápticos. En un estudio comparativo de varias especies, realizado con la técnica de RIA, se reporta la distribución de varios péptidos, incluyendo la met-enkefalina, y se encuentra que, en los segmentos lumbosacros de todos los animales estudiados, existe una relación de 2:1 y 3:1 de met-enkefalina entre la parte dorsal y la ventral. Estos resultados concuerdan con la distribución de péptidos opioides obtenidos por inmunohistoquímica (43).

Hasta aquí se han descrito algunas de las primeras evidencias de localización y distribución de encefalinas en la médula espinal; a continuación, nos ocuparemos de estos péptidos y sus análogos sintéticos en la función espinal de la integración sensorial.

Varios investigadores han demostrado que los opioides ejercen un efecto directo en el proceso de la información sensorial y motora de la médula espinal. La administración sistémica de opiáceos, a dosis bajas, reduce selectivamente los reflejos de la raíz ventral, evocados por la estimulación térmica nociceptiva y por fibras A- δ y C (3) así como la disminución de la actividad inducida por la estimulación de aferentes de umbral bajo, A- β (10,42).

La aplicación local de opiáceos (morfina o levorfanol, etc.) y de péptidos opioides (met- y leu- encefalinas y dinorfina) en el asta dorsal inhibe la actividad evocada por estímulos nociceptivos, térmicos o mecánicos, aplicados en campos sensoriales cutáneos, (5,6,36). En la mayoría de estos estudios la naloxona, antagonista de los opiáceos, administrada sistémicamente o por iontoforesis, revierte la supresión producida por opiáceos y opioides, registrada como aumentos en la amplitud de los reflejos medulares o de la actividad unitaria (16,20,45). Todo esto sugiere el carácter inhibitorio de los opioides endógenos, en la médula espinal.

En este contexto, en varios trabajos realizados en el laboratorio de Augusto Fernández-Guardiola se demostró que la estimulación tetanizante, repetida a intervalos fijos (cada 20 min), en aferentes cutáneos y musculares del gato produce un aumento progresivo

de la respuesta de la raíz ventral mono y polisináptica, la cual se acentúa con la administración sistémica de naloxona, especialmente en los componentes polisinápticos tardíos. Este aumento progresivo de la amplitud es revertido por la administración sistémica de pentazocina, un opiáceo sintético (11,12). En lo que podríamos calificar de un fenómeno fisiológico opuesto a la potenciación, es decir, la habituación de las respuestas espinales por estimulación monótona de sus aferencias; los péptidos opioides también parecen jugar un papel determinante. Estos experimentos se realizaron en gatos espinales agudos en los que se indujo la habituación de las respuestas de la raíz ventral por la estimulación repetida del nervio sural. La actividad de campo multiunitaria, registrada en las láminas IV y V de Rexed, aumentó progresivamente su voltaje y frecuencia durante la estimulación repetida alcanzando su máximo cuando el reflejo presentaba la mínima amplitud en la raíz ventral. La administración sistémica de naloxona durante la habituación máxima produjo deshabituación y la administración previa a la estimulación habituante impidió el proceso de habituación. La microinyección, en la médula espinal, del agonista encefalinérgico D-ala² Met-enkefalina acentuó el proceso de habituación, lo que sugiere un proceso activo encefalinérgico sobre las respuestas motoras (13,31).

Además de los estudios electrofisiológicos de la participación de neuronas endorfinérgicas, en el proceso de habituación, se realizaron estudios inmunohistoquímicos de Leu- y Met- enkefalina en colaboración con Martha León-Olea y su grupo, en los que se demostraron fibras inmunorreactivas en contacto estrecho con motoneuronas de la lámina IX y con neuronas de las láminas VII y VIII; esto aporta la evidencia anatómica de una amplia modulación endorfinérgica sobre las respuestas motoras espinales (13,26).

Actualmente, nuestras investigaciones se han dirigido por dos caminos en los que los péptidos opioides juegan un papel determinante. Los fenómenos de tolerancia y dependencia a morfina, para lo cual hemos utilizado al ganglio neural del *Helix aspersa*, un sistema nervioso menos complejo que el del mamífero y que nos permite realizar abordajes experimentales más adecuados, en los que hemos determinado, con la colaboración de Miguel Asai, la liberación *in vitro* de met-enkefalina y leu-enkefalina y su dependencia de Ca⁺⁺ (32) así como los cambios en la inmunorreactividad de leu- y met-enkefalina producidos por administración crónica de morfina, en células identificadas. El segundo camino está directamente relacionado con el proceso de la información sensorial, tanto algéscica como no dolorosa de las neuronas de la médula espinal.

El dolor es una señal de alarma y contenido sensorial desagradable, experimentada por todos los seres vivos, con la cual se activan mecanismos que tienden a preservar la integridad física o funcional del individuo. Algunos de estos mecanismos se constituyen, *per se*, en generadores de estados complejos de nocicepción, como la hiperalgesia, correlacionada con los procesos de sensibilización -umbrales bajos y au-

mento de las respuestas a la estimulación supraumbra- (8,23,24), la disestesia -dolor espontáneo- o la alodinia -estímulos sensoriales no nociceptivos que producen dolor- (30). Los estudios sobre los mecanismos neurales que establecen estas entidades se presentan como contradictorios. Se han postulado dos teorías para la génesis de estos trastornos: la periférica, que involucra a los receptores, campos sensoriales y las vías nerviosas que transmiten la información sensorial, A- δ y C como nociceptivas y las A- β , como cutáneas no dolorosas; y la central, que sitúa el proceso en las neuronas de la sustancia gris de la médula espinal (19,27,41). Se han desarrollado varios modelos experimentales para disparar estos estados anormales de la percepción sensorial dolorosa como: la mononeuropatía periférica inducida mediante la ligadura del nervio ciático, propuesta por Bennett y Xie (4), la infiltración de agentes inflamatorios como carragenina (40), el adjuvante de Freund (37) y lesiones isquémicas postraumáticas e isquémicas directas sobre el parénquima de la médula espinal, producidas por métodos fotoquímicos activados con láser de argón, que producen una reacción vascular severa (7,39). Con estos últimos métodos se han probado modelos de hipersensibilidad y alodinia producidos centralmente, en los que se relacionan la participación de agonistas del receptor NMDA (18) y la aparente ineficacia o refractoriedad que presentan los opioides endógenos sobre el control de la nocicepción (44).

Objetivos

Con los antecedentes expuestos realizamos una serie de experimentos para validar un modelo de alodinia animal con el fin de encontrar los mecanismos relacionados y el posible origen, central o periférico, de los cambios de codificación sensorial no dolorosa que se integra como dolorosa, mediante la administración de carragenina en el campo sensorial. Se determinaron los cambios en la excitabilidad, como variaciones en la frecuencia de disparo de neuronas espinales dorsales registrando su actividad unitaria durante tiempos largos de 60-120 min. Se analizó el papel de los péptidos opioides en este estado complejo de nocicepción producido por el proceso inflamatorio agudo mediante agonistas y antagonistas opiáceos, así como los cambios producidos por la administración de anestesia local en el campo sensorial. Parte de los resultados presentados en este capítulo se presentaron en el XXXV CNCF (1).

Material y método

Para los experimentos se utilizaron ratas de la cepa wistar machos de entre 250-320 gr de peso, anestesiadas con uretano (1500-1700 mg / kg, ip). Se introdujo un catéter (U 10) en la vena femoral para la administración de fármacos y soluciones. Los animales se fijaron a un aparato estereotáxico con un sistema de contención para la médula espinal, diseñado en el

laboratorio con el fin de sujetar los segmentos lumbares y sacros con lo que se obtiene una gran estabilidad para el registro eléctrico. Se infiltró con xilocaina al 10 % las áreas de presión para la fijación en el estereotáxico (conductos auditivos). Se practicó una laminectomía a nivel lumbosacro, mediante la cual se quitaron las apófisis espinosas de los segmentos L4 a L6 sin remover las meninges. Los tejidos blandos se cubrieron con aceite mineral para evitar la deshidratación.

La temperatura del animal se controló mediante un sistema termorregulado de agua circulante.

La actividad unitaria se registró en el segmento lumbosacro de la hemimédula derecha, por medio de micropipetas de vidrio de borosilicato llenas de solución de pontamina al 4 % en KCl 1M, con una resistencia de entre 8 y 10 M Ω , el registro se realizó mediante dispositivos de micromanipulación electrohidráulicos con una resolución de 1 μ m.

Registro y procesamiento de señales

Las señales eléctricas registradas se amplificaron mediante un sistema Grass P511K y un multímetro e inyector de corriente AM- System con el que se obtuvo la resistencia del electrodo de registro dentro del tejido (8-19 M Ω). Posteriormente las señales se digitalizaron, los potenciales unitarios extracelulares se visualizaron en un osciloscopio de rayos catódicos Tektronix y se grabaron en un sistema digital de FM. Las señales fueron procesadas en una computadora con un programa de procesamiento de señales bioeléctricas *ad hoc* y posteriormente se graficó automáticamente como histogramas de frecuencia (Hz).

Al final del experimento se marcó el sitio de registro mediante microiontoforesis, por medio de corriente anódica creciente (0-20 μ A) durante 20 min con el fin de marcar el sitio de registro. Posteriormente se aplicó a los animales una dosis suplementaria de anestésico y se perfundieron, vía intracardiaca con formaldehído al 10 %. El segmento medular lumbosacro se disecó y se procesó mediante la técnica del procedimiento rápido (35).

Análisis de resultados

A partir de la grabación digital de la actividad unitaria la señal fue cuantificada mediante gráficas de frecuencia contra tiempo. Se realizaron promedios de la frecuencia de disparo tomada durante 2 min para cada muestra experimental; se obtuvieron el error y la desviación estándar y se aplicó estadística no paramétrica (prueba de F) para obtener el grado de significancia de los resultados que se explicitarán posteriormente.

Grupos y tratamientos experimentales

Se identificó el tipo de respuesta sensorial mediante la activación de receptores cutáneos que codificaban información no nociceptiva (movimiento del pelo y tacto suave mediante un pincel) en los campos sensoriales en las áreas de la cola y la pata trasera dere-

TABLA 1
Incremento de la frecuencia de disparo por carragenina

T min	C	1*	5**	10**	20**	40**	60**	80**
Hz	8.2	10.52	13.25	10.26	9.43	11.99	13.48	21.5
%	100	128.2	161.5	125.1	115	146.2	168.2	262.1
n	1552	1611	1307	862	1497	1248	1166	762

nE = 19
* p < 0.2
** p < 0.000

cha, mismos que se delimitaron en su área. Las neuronas que respondieron a presión profunda y dolor producido por pinzamiento fueron descartadas. Para todos los casos se tomó un control que consistió en estimular el campo sensorial durante 2 min, posteriores a los cuales se administró en el campo sensorial 200 μ l de carragenina al 1 % subcutánea (n = 19) las tomas subsiguientes se hicieron a los 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 min durante 2 min.

De acuerdo al modelo anterior, se tomó un control durante 2 min, posteriormente a los cuales se administró la carragenina y se siguió el esquema anterior, posteriormente se aplicó xilocaína 100 μ g al 2 % subcutánea, en el campo sensorial y se registró la actividad unitaria en los 10 min posteriores a la administración (n = 4).

Con el fin de probar la acción de la morfina sobre la respuesta evocada por receptores no dolorosos infiltrados con carragenina en su campo sensorial se realizaron experimentos (n = 4) en los que se administró sulfato de morfina (15 mgr / kg iv) y se probó la excitabilidad a los 1, 5 y 10 min, a dos de los cuales se les aplicó una segunda dosis registrando los mismos tiempos.

Con el objeto de precisar el papel de los péptidos opioides en el proceso de la codificación sensorial evocada por estimulación no nociceptiva se realizaron otros experimentos (n = 5) utilizando el modelo anterior en los que después de los 80 min de la administración de carragenina se administró clorhidrato de naloxona (1 mgr / kg, iv) con pruebas de la frecuencia de disparo a los 1, 5, 10, 20 y 40 min de su administración, finalmente se aplicaron 15 mgr / kg, iv de sulfato de morfina y se probó su frecuencia de disparo a los 1, 5, 10 y 20 min.

Al grupo control (n = 4) se le administró solución salina (200 μ l, sc) en el campo sensorial, se registró la actividad a los 1, 5, 10, 20, 40 y 60 min.

Resultados

Los resultados muestran que la inyección de carragenina induce un incremento en la frecuencia de disparo de las neuronas que, en el control, responden sólo a estimulación táctil suave o al movimiento del pelo. Este incremento progresivo llegó a un valor de 262 % a los 80 min de infiltrada la carragenina, ver tabla 1.

En el grupo en el que se infiltró carragenina y posteriormente se administró morfina (15 mg / kg iv),

encontramos que la frecuencia de disparo disminuyó a valores similares a los controles (fig. 1).

Cuando se infiltró xilocaína (100 μ l al 2 %) en el campo sensorial, la frecuencia se abatió casi a cero (fig. 2).

La administración de naloxona (1 mg / kg iv) aumentó la frecuencia después de 80 minutos de la infiltración de carragenina, la administración posterior de morfina revirtió el efecto (fig. 3).

El grupo control consistió en registrar la actividad del mismo tipo de aferencias no dolorosas, inyectando solución salina fisiológica (200 μ l) en el campo sensorial y registrando en los mismos tiempos. Estos registros no presentaron cambios significativos en la frecuencia de disparo durante 60 min (tabla 2).

Conclusiones

No queda duda del papel inhibitorio del sistema opioide y con esto me refiero a los péptidos que lo conforman, a sus receptores y a las interacciones anatómicas y funcionales con otros sistemas peptídicos no opioides como la sustancia P, la colecistocinina, los aminoácidos excitadores incluyendo los no peptídicos como la serotonina, en lo que se ha de-

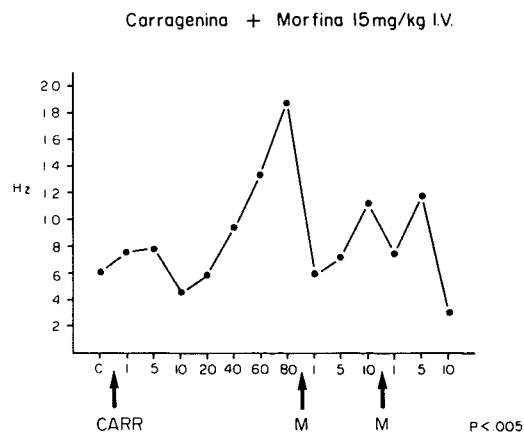


Figura 1. Muestra la frecuencia (ordenadas) y el tiempo después de la infiltración de carragenina (CARR) y de morfina (M). Nótese el incremento en la frecuencia por la carragenina y la disminución hasta valores control con la administración de morfina, una segunda dosis de morfina acentuó el efecto. La significación estadística es p < .000* para la prueba de F.

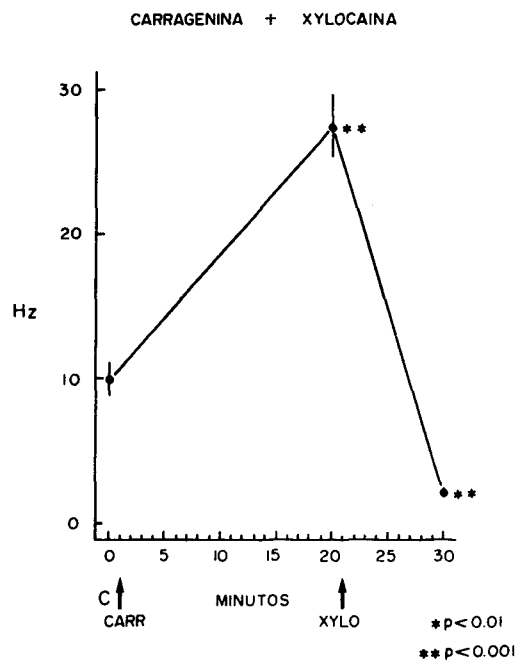


Figura 2. La gráfica representa la frecuencia de disparo en situación control (C), a los 20 min. de la infiltración con carragenina y después de 10 min de infiltrar xilocaína (100 µl 2%) en el campo sensorial. Nótese la disminución de la frecuencia casi a cero.

nominado el sistema antialgésico, específicamente localizado en los primeros relevos sinápticos de la médula espinal.

Los resultados expuestos en la última parte del trabajo presentan un diseño experimental adecuado para detectar cambios en la excitabilidad de neuronas a las que se les puede determinar tanto su campo sensorial como la modalidad a la que responden. El dispositivo experimental facilitó el registro de estas neuronas por tiempos mayores a 100 minutos, lo que permite seguir la evolución de estos procesos más allá del suceso agudo.

En este sentido, cada vez hay más evidencias de la existencia de varias modalidades de nocicepción, relacionadas a su temporalidad, su intensidad y su calidad sensorial. Lo que ha determinado, al menos, tres fases: 1) la que procesa estímulos nocivos breves, 2) nocicepción normal bajo estimulación prolongada, como: procesos inflamatorios o daño tisular, 3) estados

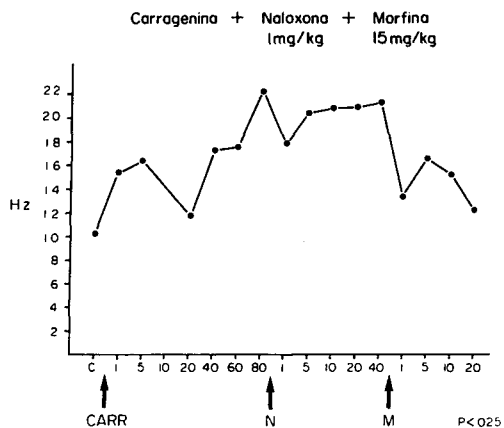


Figura 3. La gráfica representa los cambios de la frecuencia de disparo bajo los diversos tratamientos experimentales (C) control, (CARR) carragenina, (N) naloxona, (M) morfina.

anormales de percepción dolorosa, como: neuropatías periféricas, alodinia o dolor central (9). Esto plantea varias interrogantes como la existencia de mecanismos múltiples tanto para la codificación como para el procesamiento de la nocicepción.

De lo anterior podemos elaborar algunas alternativas conceptuales, como la inoperabilidad de la teoría de los patrones; es difícil sustentar la especificidad de las vías sensoriales así como la codificación sensorial mediante códigos (frecuencia y ritmicidad) o por su umbral de evocación. Es posible rescatar el concepto de la teoría de la compuerta al dolor (29) para la fase 1.

Podemos concluir que los datos presentados reproducen el fenómeno de la alodinia. Es decir, el receptor sensorial no doloroso se activa con estímulos específicos (desplazamiento del pelo o tacto ligero) y codifica hasta cierta frecuencia, que es la frecuencia máxima de activación para esta modalidad sensorial y, en ningún caso, se incrementa por la activación reiterada ni por la infiltración de solución salina fisiológica en el campo sensorial. Por el contrario en los experimentos control se observa el fenómeno de adaptación. En cambio, al infiltrar la carragenina se induce un proceso inflamatorio algógeno que se ha relacionado con modificaciones simpáticas eferentes que modifica la codificación sensorial del campo receptor y que se traduce como un aumento progresivo en la frecuencia de disparo en neuronas espinales sensibilizadas. Este incremento de la frecuencia se codifica como dolor

TABLA 2
Solución salina

T min	C	1ss	5ss	10ss	20ss	40ss	60ss
Hz	5	7.16	6.4	4.5	5	5.6	5.7
%	100	143.2	128	90	100	112	124
n	272	272	272	272	272	272	272

nE = 4
* p < 0.005

pues la administración de morfina, disminuye la frecuencia hasta valores control. Este mismo fármaco no modifica la excitabilidad de neuronas activadas por información táctil no dolorosa. Otro indicio de la activación del sistema opioide endógeno está dado por el hecho de que, al administrar naloxona a los 80 minutos de la infiltración con carragenina, se incrementó aún más la frecuencia, lo que habla de la interrupción del sistema inhibitorio endorfinérgico por el antagonista. *Faltan por realizar más estudios que vinculen estos trastornos perceptuales dolorosos con la acti-*

vación de sistemas relacionados con sustancia P y receptores a aminoácidos excitadores.

Agradecimientos

Estos trabajos fueron parcialmente financiados por CONACyT, mediante los proyectos: PCSABNA-022624, P228CCOX-880257, P228CCOX-891549 y 0920N9111. Agradecemos el trabajo de ilustración y fotografía a Raúl Cardoso.

REFERENCIAS

- ALONZO-VALENCIA A, CONDES-LARA M, PELLICER F: Modificación de la respuesta sensorial cutánea en neuronas de la médula espinal de la rata por administración de carragenina: Un modelo de alodinia experimental. *XXXV Soc Mex Cien Fisiol* C51, 1992
- ARONINI N, DIFIGLIA M, LIOTTA A S, MARTIN JB: Ultrastructural localization and biochemical features of immunoreactive leu-enkephalin in monkey dorsal horn. *Neuroscience*, 1:561-577, 1981.
- BELL JA, MARTIN WR: The effect of narcotic antagonists naloxone, naltrexone and nalorphine on spinal cord C-fiber reflexes evoked by electrical stimulation or radiant heat. *Eur J Pharmacol*, 42:147-154, 1977.
- BENNETT GJ, XIE Y-K: A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33:87-107, 1988.
- CALVILLO O, HENRY JL, NEUMAN R S: Effects of morphine and naloxone on dorsal horn neurons in the cat. *Can J Physiol Pharmacol*, 52:1207-1211, 1974.
- CALVILLO O, HENRY JL, NEUMAN RS: Actions of narcotic analgesics and antagonists on spinal units responding to natural stimulation in the cat. *Can J Physiol Pharmacol*, 61:652-663, 1979.
- CAMERON T, PRADO R, WATSON BD, GONZALEZ-CARVAJAL M, HOLETS V: Photochemically induced cystic lesion in the rat spinal cord. I. Behavioral and morphological analysis. *Exp Neurol*, 109:214-223, 1990.
- CAMPELL JN, MEYER RA, LAMOTTE RH: Sensitization of myelinated afferents that innervate the monkey hand. *J Neurophysiol*, 42:1669-1679, 1979.
- CERVERO F, LAIRD JMA: One pain or many pains? A new look at pain mechanisms. *News in Physiological Sciences*, 6:268-273, 1991.
- EINSPAHR FJ, PIERCEY MF: Morphine depresses dorsal horn neuron responses to controlled noxious and non-noxious cutaneous stimulation. *J Pharmacol Exp Ther*, 213:456-461, 1980.
- FERNANDEZ-GUARDIOLA A, PELLICER F, CALVO J M: Sensitization and habituation in cutaneous polysynaptic pathways of the cat spinal cord. Possible role of enkephalinergic processes. En: A Gorio y cols. (Eds.), *Development and Plasticity in Mammalian Spinal Cord*. Springer Verlag Berlin, pp. 70-71, 1984.
- FERNANDEZ-GUARDIOLA A, CALVO J M, PELLICER F: Long term synaptic potentiation and burst response increment could be due to enkephalinergic disinhibition: Experiments on the spinal cord and amygdaloid kindling. En: J Wada, (Ed.), *Kindling 3*. Raven Press, pp. 157-172, Nueva York 1986.
- FERNANDEZ-GUARDIOLA A, PELLICER F, LEON-OLEA M, ASAI M, SANCHEZ-ALVAREZ M: Habituation and dehabituation of the spinal polysynaptic reflex responses: Modification by naloxone and opiates and their anatomical correlates. *Neuropeptides*, 14:115-120, 1989.
- FIELDS HL, EMSON PC, LEIGH BK, GILBERT RFT, IVERSEN LL: Multiple opiate receptor sites on primary afferent fibers. *Nature*, 284:351-353, 1980.
- GLAZER EJ, BASBAUM AI: Immunohistochemical localization of leucine-enkephalin in the spinal cord of the cat: Enkephalin-containing marginal neurons and pain modulation. *J Comp Neurol*, 169:377-389, 1981.
- GODFARB J, HU JW: Enhancement of reflexes by naloxone in spinal cats. *Neuropharmacol*, 15:785-792, 1976.
- GOLDSTEIN A, LOWNEY I, PAL K: Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener, levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68:1742-1747, 1971.
- HAO JX, XU XJ ALDSKOGIUS H, SEIGER A, WIESENFELD-HALLIN Z: The excitatory aminoacid receptor antagonist MK-801 prevents the hypersensitivity induced by spinal cord ischemia in the rat. *Exp Neurol*, 113:182-191, 1991.
- HARDY JD, WOLFF HG, GOODELL H: Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J Clin Invest*, 29:115-140, 1950.
- HENRY JL: Naloxone excites nociceptive units in the lumbar dorsal horn of the spinal cat. *Neuroscience*, 4:1485-1491, 1979.
- HUGHES J, SMITH T, KOSTERLITZ H, FOTHERGILL L, MORGAN B, MORRIS H: Identification of two related peptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 255:577-579, 1975.
- HUNT SP, KELLY JS, EMSON PC, KIMMEL JR, MILLER RJ, WU JY: An immunohistochemical study of neuronal population containing neuropeptides or aminobutyrate within the superficial layers of the rat dorsal horn. *Neuroscience*, 6:1883-1898, 1981.
- LAMOTTE C, CANDACE B, SOLOMON H: Opiate receptor binding in primate spinal cord: Distribution and changes after dorsal root section. *Brain Res*, 112:407-412, 1976.
- LAMOTTE RH, THALHAMMER JG, TOREBJORK HE, ROBINSON C J: Peripheral neural mechanisms of cutaneous hyperalgesia following mild injury by heat. *J Neurosci*, 2:765-781, 1982.
- LAMOTTE RH, THALHAMMER JG, ROBINSON CJ: Peripheral neural correlates of magnitude of cutaneous pain and hyperalgesia: a comparison of neural events in monkey with sensory judgements in humans. *J Neurophysiol*, 50:1-26, 1983.
- LEON-OLEA M, SANCHEZ-ALVAREZ M, MARTINEZ-SERVIN M, PELLICER F: Demostración inmunohistoquímica de terminales encefalinérgicas sobre motoneuronas de la médula espinal del gato. *XXXI Soc Mex Cien Fisiol*, O5, 1988.
- LEWIS T: Experiments relating to cutaneous hyperalgesia and its spread through somatic nerves. *Clin Sci*, 2:373-423, 1936.
- MARTIN WR: Opioid antagonist. *Pharmacol Rev*, 19:463-521, 1967.
- MELZACK R, WALL P D: Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150:971-979, 1965.
- MERSKEY H: Pain terms: a current list with definitions and notes on usage. *Pain (Suppl. 3)*:S215-S221, 1986.
- PELLICER F: Los opioides endógenos en el proceso de habituación. *Salud Mental*, 12:1-8, 1989.

32. PELLICER F, ASAI M, LEON-OLEA M, SANCHEZ-ALVAREZ M: In vitro release of immunoreactive met- and leu-enkephalins in whole periesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol*, 104C:323-325, 1993.
33. PERT C, SNYDER S: Opiate receptor demonstration in nervous tissue. *Nature*, 179:1011-1014, 1973.
34. RUDA M A: Opiates and pain pathways: Demonstration of enkephalin synapses on dorsal horn projection neurons. *Science*, 215:1523-1524, 1982.
35. SANCHEZ-ALVAREZ M, LEON-OLEA M, CONDESLARA M, BRIONES M, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Localization of the microelectrode TIP combining a rapid procedure method and marking with pontamine sky blue. *Ref Bol Estud Med Biol Mex*, 36:55-59, 1988.
36. SATOH M, KAWAJIRI S I, UKAI Y, YAMAMOTO M: Selective and non-selective inhibition by enkephalins and noradrenaline of nociceptive responses of lamina V type neurons in the spinal dorsal horn of the rabbit. *Brain Res*, 177:384-389, 1979.
37. SCHAIBLE H G, SCHMIDT R F: Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. *J Neurophysiol*, 54:1109-1122, 1985.
38. TERENIUS L: Stereospecific interactions between narcotic analgesic and synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol*, 32:317-320, 1973.
39. WATSON BD, PRADO R, DIETRICH WD: Photochemically induced spinal cord injury in the rat. *Brain Res*, 367:296-300, 1986.
40. WINTER CA, RISLEY HA, NUSS GW: Carageenan induced edema in hind paw of a rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*, 111:544-547, 1962.
41. WOLFF CJ: Evidence of a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature Lond*, 306:686-688, 1983.
42. YAKSH TL: Inhibition by entorphine of the discharge of dorsal horn neurones: Effects upon the neuronal response to both high- and low-threshold sensory input in the decerebrate spinal cat. *Exp Neurol*, 60:23-40, 1978.
43. YAKSH TL, MICHENER SR, BAILEY JE, HARTY GJ, LUCAS DL, NELSON DK, RODDY DR, GO LW: Survey of distribution of substance P, vasoactive intestinal polypeptide, cholecystokinin, neurotensin, met-enkephalin, bombesin and PH1 in the spinal cord of cat, sloth and monkey. *Peptides*, 9:357-372, 1988.
44. YAKSH T L: Behavioral and autonomic correlates of a tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory aminoacid antagonists. *Pain*, 37:111-123, 1989.
45. ZIEGLGANSBERGER W, TULLOCH I F: The effects of metionine- and leucine-enkephalin on spinal neurons of the cat. *Brain Res*, 167:53-64, 1979.