

Efecto de una inyección de morfina sistémica sobre algunos aminoácidos en la corteza cingulada anterior en el dolor agudo.

Elizabeth Silva, Belkis Quiñones, Ximena Páez y Luis Hernández.

Laboratorio de Fisiología de la Conducta y Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina, Universidad de los Andes (ULA). Mérida. Venezuela.

Palabras clave: Corteza cingulada anterior, test de la formalina, aminoácidos, microdiálisis, electroforesis capilar.

Resumen. El objetivo del presente trabajo fue investigar los efectos de una inyección única de morfina intraperitoneal, sobre el nivel extracelular de arginina, glutamato, aspartato y GABA en la corteza cingulada anterior en ratas durante la fase I del test de la formalina. Se usó una combinación de microdiálisis y de Electrophoresis Capilar de Zona con Detección de Fluorescencia Inducida por Láser (CZE-LIFD), para medir los niveles extracelulares de aminoácidos en los microdializados. Las cánulas de microdiálisis fueron implantadas unilateralmente en la corteza cingulada anterior izquierda en ratas que se mueven libremente. Las muestras tomadas cada 30 seg, se derivatizaron con el colorante isotiocianato de fluoresceína y se midió con CZE-LIFD: arginina, glutamato, aspartato y GABA. Durante los primeros minutos del test de la formalina (fase I), se produjo un aumento significativo de arginina ($p < 0,001$) y glutamato ($p < 0,012$). En las ratas pretratadas con morfina el aumento de glutamato después de la formalina fue suprimido, y se observó un aumento transitorio del GABA ($p < 0,001$). Estos experimentos sugieren que hay cambios rápidos de neurotransmisores en los primeros minutos en el dolor agudo, como son el aumento de glutamato encontrado en la corteza cingulada anterior, quizás relacionados con la aversión y el temor. La inyección previa de morfina produce aumento del GABA y elimina el aumento de glutamato inducido por la formalina en los primeros minutos, lo que pudiera estar relacionado con los efectos analgésicos, recompensantes y/o euforizantes de la morfina.

Effect of a simple morphine system injection in some aminoacids in the anterior cingulate cortex during acute pain.

Invest Clin 2008; 49(4): 511 - 522

Key words: Anterior cingulate cortex, formalin test, amino acids, microdialysis, capillar electrophoresis.

Abstract. The aim of this research was to find out the effects of ip morphine pretreatment in the extracellular content of the arginine, glutamate, aspartate and GABA levels in the anterior cingulate cortex in rats, during the formalin test (phase I). A combination of micro dialysis and Capillary Electrophoresis Zone and laser-induced fluorescence detection (CZE-LIFD) technique was used to measure the extracellular levels of amino acids in microdialyzed zones. The microdialysis probes were unilaterally implanted in the left anterior cingulate cortex of freely moving rats. The samples were collected every 30 seconds and derivatized with fluorescein isothiocyanate. The arginine, glutamate, aspartate and GABA levels were measured in the CZE-LIFD device. Arginine ($p < 0.001$) and glutamate levels ($p < 0.012$) were significantly increased in the first few minutes following the formalin test (phase 1). Pretreatment with morphine suppressed the glutamate increase. A transient GABA level increase ($p < 0.001$) was also detected. These experiments suggest that rapid changes in neurotransmitters levels were detected in the first few minutes of acute pain as revealed by the glutamate and arginine level increases in the anterior cingulate cortex. These changes could be related to the emotion of pain processing (fear and aversion). Morphine pretreatment produced an increase in GABA levels and a decrease in glutamate levels in the first few minutes. These findings may be related to euphoria and/or analgesia.

Recibido: 25-10-2007. Aceptado: 08-05-2008.

INTRODUCCIÓN

El dolor es una experiencia que tiene componentes discriminativos, afectivo-motivacionales y cognoscitivos, cada uno de los cuales está mediado y modulado a través de mecanismos cerebrales que actúan a niveles medulares, del tallo cerebral y del cerebro. La corteza cingulada anterior (ACC) recibe aferencias talámicas principalmente de la línea media y de los núcleos intralaminares, más bien que del tálamo anterior. Esto provee una base estructural para las funciones que relacionan el dolor y la ACC (1). Recientemente, un aumento en la can-

tidad de evidencias electrofisiológicas, imágenes funcionales, y estudios conductuales indican que la ACC está envuelta en el procesamiento del dolor, especialmente en la dimensión afectiva del dolor (2-5). En monos, las lesiones de la ACC disminuyen la sensibilidad al dolor (6, 7). La lesión de la ACC alivia el dolor intratable en humanos (8, 9). Los estudios experimentales en ratas muestran que la interrupción de la conducción a través del haz cingulado interrumpe el componente afectivo del dolor tónico (10). Los estudios de imágenes funcionales (MRI) y de resonancia magnética de emisión de positrones (PET) durante la estimu-

lación dolorosa sugieren que la ACC juega un rol en el dolor (11-20). Desde las últimas décadas hay evidencias claras que señalan que el aminoácido excitador glutamato juega un papel en el procesamiento del dolor. Estudios *in vitro* en la ACC señalaron que el neurotransmisor que media la excitación entre las neuronas aferentes del cuerpo calloso y las capas de neuronas piramidales V y VI es el glutamato (21). La acción del glutamato en relación con el dolor, en el cerebro es compleja y localizada; en algunas zonas transmite el dolor como el tálamo (22, 23) y en otras promueve la analgesia como en la sustancia gris periacueductal y la zona bulbar ventro lateral (24, 25).

La arginina es importante por su relación con el óxido nítrico (NO). El NO es sintetizado por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) a partir de la arginina. El NO ha sido implicado en el dolor, pues los inhibidores del NOS atenúan la hiperalgesia térmica (26-28). Parece que la excesiva activación del receptor NMDA aumentando el Ca^{++} contribuye a la neuro toxicidad del glutamato por compromiso de la producción de NO (29). La aplicación por 5 min de NMDA en ausencia de L-arginina, induce la muerte neuronal y la presencia de L-arginina durante la aplicación de NMDA, previene la muerte neuronal por bloqueo de O_2 . La arginina tiene un importante papel como modulador de exocitotoxicidad del glutamato. La arginina, de origen glial, inhibe la formación de radicales tóxicos, la disfunción mitocondrial y la muerte celular; de esta manera las células gliales pueden proteger a la neurona de la toxicidad aportando la L-arginina (30, 31).

Con la técnica de FMRI (imágenes de resonancia magnética funcional), la inyección previa de morfina (5 mg/kg) ev supprime la activación de la ACC, SI, SII, tálamo e hipotálamo que ocurre al aplicar un estímulo doloroso (32).

Con estudios de PET, el fentanil, una droga analgésica que se une a los receptores opioides mu, se ha usado para ubicar los sitios centrales en que actúa (33). Estudios recientes usando [(11) C]-carfentanil, muestran que hay cambios en los opiodes en la unión ligando-receptor debido al dolor agudo experimental (34). Otros estudios con fentanil demuestran la activación de la ACC media, sugiriendo que esta zona de la ACC participa activamente en la analgesia mediada por opiodes (35, 36). Se ha encontrado una importante interacción en los sistemas gabaérgicos y opiodes (37).

El objetivo de estos experimentos fue investigar en la ACC de ratas con dolor agudo inducido por formalina, el efecto de una dosis única de morfina sobre los niveles extracelulares de los aminoácidos glutamato, aspartato, arginina y ácido gama aminobutírico (GABA).

MATERIALES Y MÉTODOS

A 24 ratas Wistar machos de peso corporal comprendido entre 250 g y 280 g, bajo anestesia con Pentobarbital (10 mg/Kg) y Ketalar (25mg/Kg), se les implantó estereotáxicamente, en el lado izquierdo del cerebro una cánula guía de 10 mm hecha de tubo de acero inoxidable de 21 gauge, de acuerdo a las siguientes coordenadas para la ACC: 0,5 mm lateral a la sutura sagital; 2,7 mm anterior al bregma y 4,5 mm ventral a la superficie craneal (38). La cánula guía se cementó a la superficie del cráneo con tornillos y acrílico dental. A los 7 días del post operatorio se realizó la microdiálisis (39,40). Los animales se dividieron en cuatro grupos: a) formalina sola (n=6); b) salina como control (n=6); c) pretratamiento con morfina, 30 min antes de la formalina (n=6) y d) morfina sola (n=6), al que solo se le inyectó morfina, para conocer si la morfina sola tenía algún

efecto sobre la línea base de los cuatro aminoácidos y se midió a los 30 minutos.

Microdiálisis

Las cánulas de diálisis se fabricaron a partir de una de una pieza de fibra hueca de celulosa (200 μm de diámetro externo, con perforaciones que no permiten el paso de moléculas cuyo peso molecular sea superior a 13.000 Daltons), fijada con epoxi al extremo de un tubo de acero inoxidable. En el interior de ambos se colocó un capilar de sílica fundida, cubierta de poliimida, de 76 μm de diámetro interno, y 150 μm de diámetro externo. La cánula de diálisis sobresalía 5 mm del final de la cánula guía, pero la longitud efectiva de la zona de ultrafiltración era de 2 mm. La entrada de la cánula estaba unida a un tubo de polietileno que se conectó a una jeringa llena de líquido céfaloraquídeo artificial (NaCl 134,9 mM; KCl 3,7 mM; CaCl_2 1,2 mM; MgCl_2 1 mM y NaHCO_3 10 mM, a un pH de 7,4) colocada en una bomba que perfundió a un flujo de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. El día anterior al experimento se insertó la cánula de microdiálisis en la guía y se perfundió a un flujo a 0,4 $\mu\text{L}/\text{min}$. Al día siguiente se aumentó el flujo a 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ y se esperó 1 hora. Después se tomaron 9 muestras basales en microtúbulos. En el grupo pretratado con morfina ($n=6$) se les inyectó morfina (10 mg/kg ip) 30min antes de la inyección de formalina. El test de la formalina consistió en inyectar 50 μL de formalina diluida (5%) en la superficie dorsal de la pata derecha de la rata. La duración de la inyección fue de 15 segundos. Después de la inyección de formalina, se siguió recolectando las muestras durante 10 min más. Las muestras se recolectaron cada 30 seg. Después de la inyección de formalina sola, la pata se puso roja, caliente y edematosa; la rata presentó en esta pata el reflejo de retiramiento, evitando pisar con lo que la pata inyectada permaneció la mayor parte del tiempo levantada. En el grupo control, la in-

yección en la pata fue de 50 μL de solución salina. Luego se derivatizó cada muestra siguiendo el protocolo descrito abajo.

Al final de cada experimento, cada rata se sacrificó con exceso de anestésico y se perfundió transcardíacamente con una solución al 0,9% de NaCl, seguida de formalina al 5%. Se disecó cada cerebro dejándolo en solución de formalina al 10%, durante 2 días para su fijación. Luego se hicieron cortes de 40 μm de grosor con un micrótomo de congelación; los cortes no teñidos se observaron en un microscopio del luz con el método birrefringente, para localizar la posición de las cánulas guías. Se incluyeron en el trabajo sólo las ratas con las cánulas en la posición correcta (Fig. 1).

Derivatización de las muestras

Los dializados fueron mezclados con 0,5 μL de la solución derivatizante hecha de buffer carbonato 20 mM a un pH de 9,5 y una solución $2,5 \times 10^{-5}$ M del isómero I de isotiocianato de fluoresceína (FITC) en acetona en una proporción de 1:1 (vol:vol). Seguidamente la mezcla se centrifugó y se dejó en un sitio oscuro por lo menos durante 18 horas para permitir la reacción de los aminoácidos con el FITC. Posteriormente cada muestra fue diluida con 5 μL de agua desionizada y centrifugada. Los estándares de arginina, glutamato, y aspartato fueron derivatizados con el mismo protocolo.

Análisis por electroforesis capilar con detección por láser

La detección de arginina, glutamato, aspartato y GABA fue realizada utilizando el Instrumento R2D2-1 CZE-LIFD (Meridialysis®, Mérida, Venezuela) el cual está equipado con un capilar de sílica fundida de 40 cm de longitud, 350 μm de diámetro externo y 25 μm de diámetro interno. Las muestras y los estándares de arginina, glutamato, aspartato y fueron inyectados hidrodinámicamente en el extremo anódico del capi-

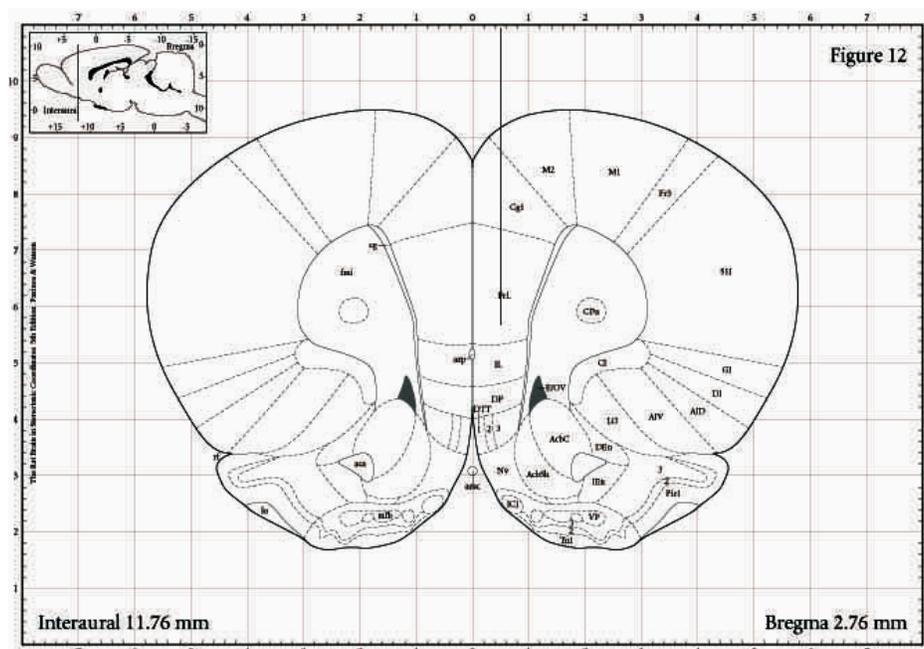


Fig. 1. Localización de la cánula de microdiálisis en la ACC. La posición de las cánulas se dibujó en una sección representativa del cerebro de rata tomado del atlas de Paxino & Watson (38).

lar por efecto de una presión negativa de 19 psi aplicada durante 200 ms en el extremo catódico del capilar. Luego fueron aplicados 21 kV entre los dos extremos del capilar. El voltaje generó una corriente de $7 \mu\text{A}$. Después de correr la muestra, el capilar fue lavado con NaOH 1M por 2 min, luego con agua de $18 \text{ M}\Omega$ durante 1 min y por último con el buffer carbonato por 2 min. Cada corrida completa demoró 15 min, más los tiempos de lavado.

En cada muestra, los picos del glutamato, el aspartato y la arginina fueron identificados por el tiempo de migración y por la altura de la espiga. La presencia de estos aminoácidos fue comprobada realizando el "spiking" de los aminoácidos respectivos. Una vez corridas todas las muestras, se determinó la altura de los picos y se calculó la concentración.

Medición de GABA

Se usó el mismo equipo anterior, pero con una solución de buffer borato (23 mM) con sodio dodecyl sulfato (SDS, 120 mM) y

metanol (1%) (41), para separar el GABA por la técnica de micrografía miscelar electrocinética (MEKC). Se aplicó 26 kV entre los dos extremos del capilar y se generó una corriente de $20 \mu\text{A}$.

Análisis estadístico

Se calculó para cada rata el promedio de la concentración basal sobre nueve muestras basales (previas al test de la formalina). Los datos normalizados fueron analizados usando el ANOVA de una vía y ANOVA de medidas repetidas y el post test Newman-Keuls. El nivel de significación estadística fue de $p < 0,05$ (programa estadístico SPSS 8.0).

Aspectos éticos

Los experimentos se realizaron de acuerdo en todo con normas éticas de la IASP (Asociación Internacional para el Estudio del Dolor) y las Normas para el Uso de Animales de Laboratorio del Consejo de Desarrollo Científico y Tecnológico de la Universidad de los Andes.

RESULTADOS

Las variaciones porcentuales de los diferentes aminoácidos respecto a su línea base previa se pueden ver en la Tabla I.

Arginina

La concentración basal de arginina fue de $0,55 \pm 0,04 \mu\text{M}$. La arginina aumentó después de la inyección de formalina y permaneció así durante 3 min, comparada con la línea base previa. $F(1/10) = 68,4$; $p < 0,0001$ (Fig. 2).

Glutamato

La concentración basal de glutamato fue de $0,50 \pm 0,06 \mu\text{M}$. El glutamato au-

mentó significativamente 1 min después de la inyección de formalina, pero no con salina o pre tratamiento con morfina. $F(1/10) = 6,518$; $p < 0,029$ (Fig. 3).

Aspartato

La concentración basal de aspartato fue de $0,68 \pm 0,01 \mu\text{M}$. Este aminoácido no fue afectado significativamente por ningún tratamiento. $F(1/10) = 0,66$; $p < 0,615$ ns Fig. 4).

GABA

La concentración basal de GABA fue de $0,15 \pm 0,02 \mu\text{M}$. La inyección de formalina y la inyección de solución salina ($50 \mu\text{L}$) en la pata de la rata, no produjeron cam-

TABLA I
CAMBIOS PORCENTUALES DE AMINOÁCIDOS EN LOS DIALIZADOS DE LA CORTEZA CINGULADA ANTERIOR (ACC) DE RATAS DURANTE EL TEST DE LA FORMALINA

	Formalina	Control (salina)	Pretratamiento con morfina + Formalina	Morfina sola
Arginina	↑ ($p < 0,0001$)	ns	ns	ns
Glutamato	↑ ($p < 0,029$)	ns	Ns	nss
Aspartato	ns	ns	Ns	ns
GABA	ns	ns	↑ ($p < 0,02$)	ns

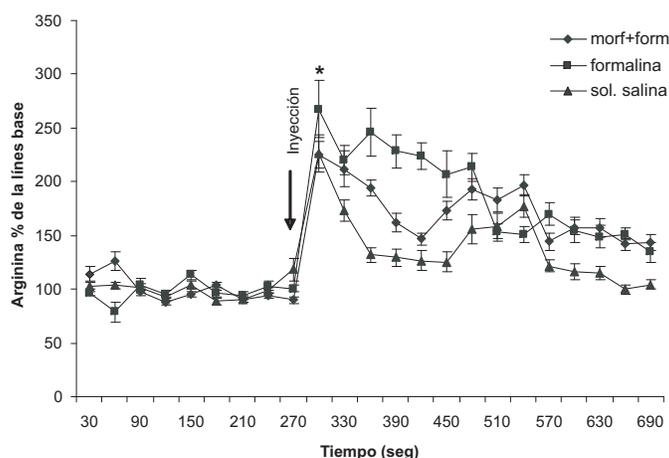


Fig. 2. Arginina en la corteza cingulada anterior. Después de la inyección de formalina (cuadrados negros), el pre tratamiento con morfina (diamantes negros) y solución salina (triángulos negros), la arginina aumentó en forma breve, pero significativas, en relación a su línea básica previa.

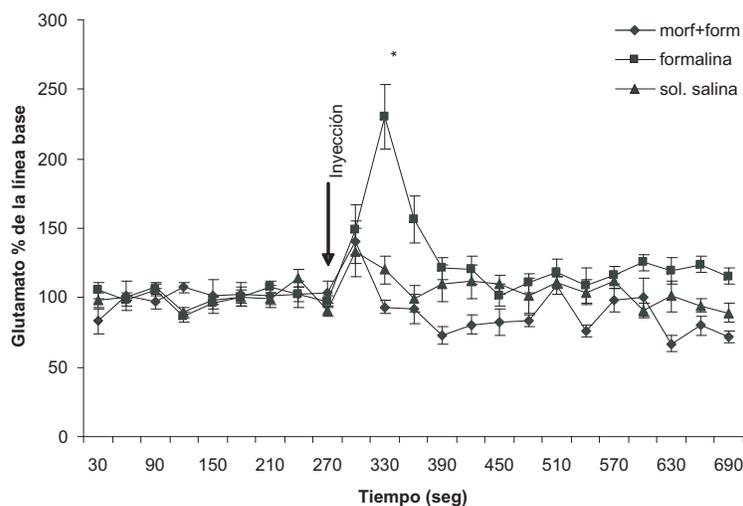


Fig. 3. Glutamato en la corteza cingulada anterior. Después de la inyección de formalina (cuadrados negros), el glutamato aumentó. Sin embargo, en el grupo que recibió salina (triángulos negros) no se observó ningún cambio; el pre tratamiento con morfina (diamantes negros) bloqueó el aumento de glutamato. En el ANOVA de medidas repetidas el glutamato aumentó significativamente después de formalina, en relación a la línea base previa ($p < 0,029$).

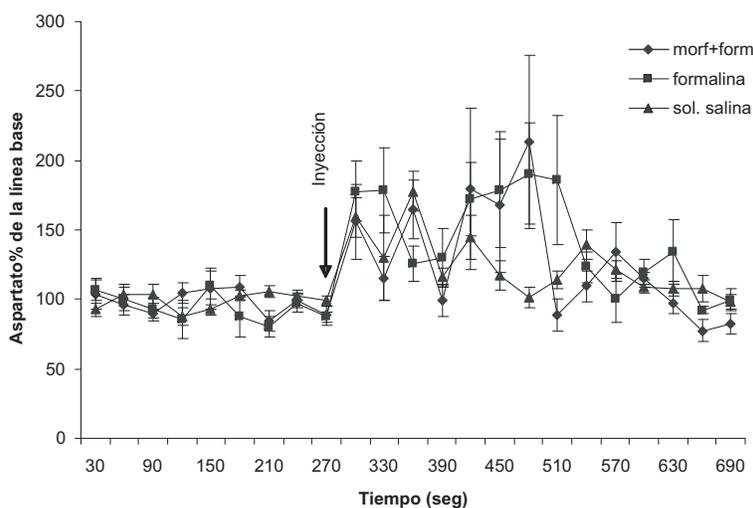


Fig. 4. Aspartato en la corteza cingulada. Después de la inyección de formalina (cuadrados negros), el pre tratamiento con morfina (diamantes negros) y salina (triángulos negros), el aspartato aumentó en forma no significativa (p . ns).

bios significativos en el nivel de GABA. El tratamiento previo con morfina produjo un aumento del GABA durante 2-3 min, después de la inyección de formalina. $F(1/10): 37,30$ ($p < 0,02$) (Fig. 5).

Se estudió también el efecto de la morfina sola en la línea base de los diferentes aminoácidos. La morfina no modificó las lí-

neas bases previas de los aminoácidos p n.s. (Fig. 6).

Se realizó un experimento control con la conducta de flexión de la pata estimulada como respuesta al estímulo nocivo (inyección de formalina) y hubo concordancia entre la liberación del neurotransmisor glutamato y el aumento de la conducta observada (Fig. 7).

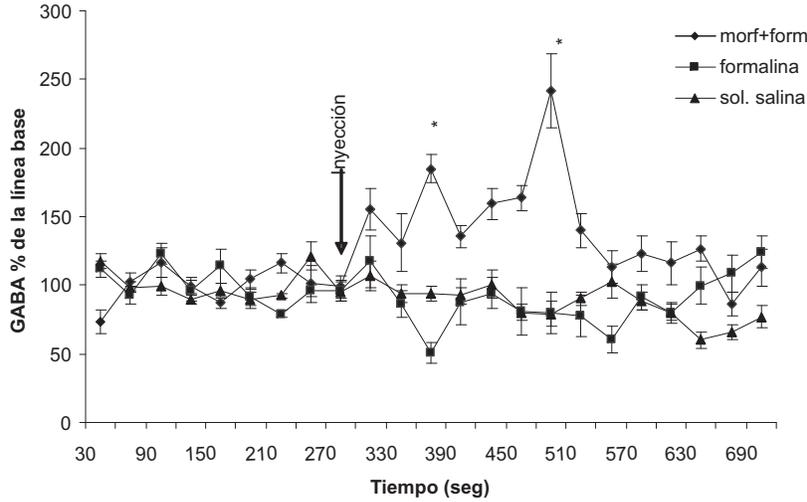


Fig. 5. GABA en la corteza cingulada. Después del pre tratamiento con morfina (diamantes negros), la inyección de formalina (cuadrados negros), produjo un aumento significativo y transitorio de GABA ($p < 0,02$), y con los otros tratamientos no hubo cambios significativos. La inyección de salina (triángulos negros), no produjo ningún cambio en el GABA. La formalina sola (cuadrados negros), produjo una disminución leve, no significativa del GABA 1-2 minutos después de la inyección.

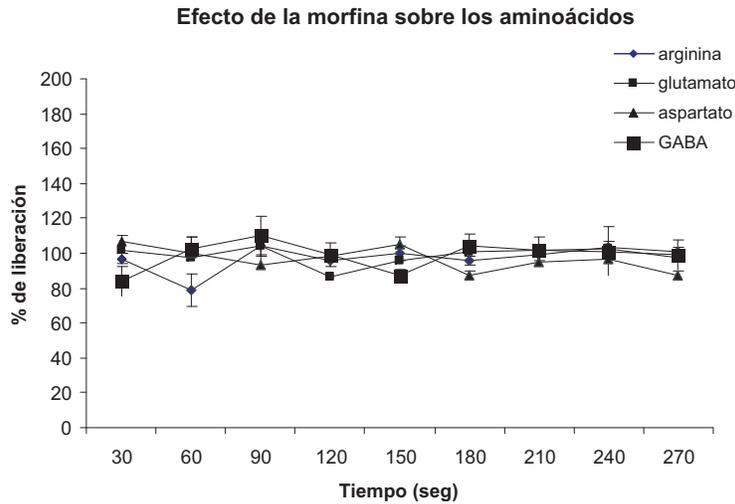


Fig. 6. Efecto de la morfina sola en la línea base de los diferentes aminoácidos: arginina, glutamato, aspartato y GABA. Después de la inyección de una sola dosis de morfina no hubo cambios en las concentraciones de los aminoácidos.

DISCUSIÓN

En estos experimentos, en la ACC, la inyección de formalina aumentó significativamente la arginina y el glutamato, pero no modificó los niveles extracelulares del aspartato ni el GABA. La inyección de morfi-

na 30 min antes de la inyección de formalina no cambió los niveles de arginina, pero suprimió el aumento de glutamato obtenido después de la formalina sola. La morfina previa a la formalina produjo un aumento significativo de GABA, a los 2 o 3 min después de formalina.

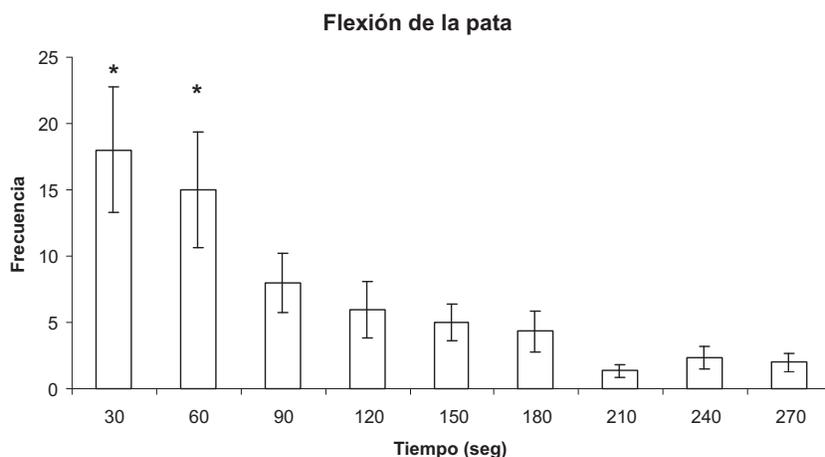


Fig. 7. Efecto conductual de la inyección de formalina (test de la formalina) en la pata de la rata. Se observó que la frecuencia de flexión de la pata aumentó en los primeros minutos mostrando concordancia con la liberación de glutamato y luego disminuyó gradualmente hasta llegar a la línea base alrededor de los 9 a 10 min.

La ACC no solo está involucrada en la transmisión de la sensación de dolor, sino también desempeña un papel en el proceso de las emociones relacionadas con el dolor (42). La ACC está preferencialmente involucrada en el procesamiento de la dimensión afectiva del dolor (43). La ACC media la emoción negativa que acompaña al dolor y también el aprendizaje que provoca el estímulo de dolor (3). La ACC está conectada ampliamente con zonas relevantes del sistema de modulación descendente. La activación de la ACC puede facilitar la nocicepción espinal a través de los receptores glutamatérgicos NMDA (44). La estimulación directa de la ACC en ratones, provoca respuestas de temor (como el tiritamiento) e induce memoria a largo plazo del temor. La actividad excitadora de la ACC contribuye a la memoria del temor producida por el dolor y también a la modulación facilitada descendente en la médula espinal (45).

En la ACC se encuentran receptores glutamatérgicos y de GABA (A) en concentraciones significativamente más altas que la de los receptores muscarínicos y alfa adrenérgicos (46). La proyección talámica a la ACC es glutamatérgica, actuando espe-

cialmente a través de los receptores AMPA y la respuesta de las neuronas de la ACC a la estimulación talámica está regulada por el GABA, actuando a través de los receptores GABA A y GABA B (47). El glutamato es un importante mediador en la neurotransmisión, potenciación y la sensación desagradable asociada al dolor. Los receptores glutamatérgicos NMDA contribuyen a la respuesta sináptica en la ACC y su contribución es más importante cuando se estimulan a alta frecuencia (48).

El tratamiento agudo o crónico con morfina disminuye los niveles extracelulares de glutamato en la ACC, lo que sugiere que el glutamato en la ACC está envuelto en la acción central de la morfina (49).

Nuestros resultados muestran incremento del glutamato en la ACC con el dolor agudo (test de la formalina, fase I) en el primer minuto. La morfina previa anuló este aumento, de manera similar al hallazgo de otros investigadores (22, 49). El nivel de GABA extracelular no se modificó con el dolor agudo en la ACC, pero con el tratamiento previo de morfina se produjo un aumento transitorio del GABA. Este incremento pudiera estar relacionado con los efectos analgésicos de la morfina.

En conclusión, en la ACC, con el test de la formalina, fase I, hubo un aumento de glutamato y arginina, cambios que pudieran estar relacionados con la aversión y el temor en el procesamiento de la parte afectiva del dolor. Por otro lado, el pre-tratamiento con morfina aumentó el GABA y disminuyó el glutamato, estos cambios pueden estar relacionados con los efectos recompensantes, euforizantes y analgésicos la morfina. Se necesitan más experimentación en esta área para aclarar en profundidad el significado de estos cambios funcionales iniciales y transitorios del dolor agudo.

AGRADECIMIENTOS

Estos experimentos se hicieron gracias al financiamiento otorgado por el CDCHT en los proyectos M-821-05-03-A y M-823-05-03-B.

REFERENCIAS

1. **Vogt BA, Rosene DL, Pandya DN.** Thalamic and cortical afferents differentiate anterior from posterior cingulate cortex in the monkey. *Science* 1979; 204 (4389):205-207.
2. **Shibasaki H.** Central mechanisms of pain perception. *Suppl Clin Neurophysiol* 2004; 57:39-49.
3. **Johansen JP, Fields HL.** Glutamatergic activation of anterior cingulate cortex produces an aversive teaching signal. *Nat Neurosci* 2004; 7(4):398-403.
4. **Farrell MJ, Laird AR, Egan GF.** Brain activity associated with painfully hot stimuli applied to the upper limb: a meta-analysis. *Hum Brain Mapp* 2005; 25(1):129-139.
5. **Ploner M, Schnitzler A.** Cortical representation of pain. *Nervenarzt* 2004; 75(10): 962-969.
6. **Brown S, Schäfer EA.** An investigation into the functions of the occipital and temporal lobes of the monkey brain. *Phil Trans R Soc Lond* 1888; 179: 303-327.
7. **Horseley VA, Schäfer EA.** A record of experiments upon the functions of the cerebral cortex. *Phil Trans R Soc Lond* 1888, 179 B:1-45.
8. **Foltz EL, White LE.** Pain "relief" by frontal cingulotomy. *J Neurosurg* 1962; 19: 89-100.
9. **Hurt RW, Ballantine HT.** Stereotaxic anterior cingulate lesions for persistent pain: a report of 68 cases. *Clin Neurosurg* 1973; 21:334-351.
10. **Vacarino AL, Melzack R.** Analgesia produced by injection of lidocaine into the anterior cingulate bundle of the rat. *Pain* 1989; 39:213-219.
11. **Devinsky O, Morrell MJ, Vogt BA.** Contributions of anterior cingulate cortex to behavior. *Brain* 1995; 118(Pt1): 279-306.
12. **Talbot JD, Marrett S, Evans AC, Meyer E, Bushnell MC, Duncan GH.** Multiple representations of pain in human cerebral cortex. *Science* 1991; 251(4999): 1335-1338.
13. **Jones AK, Liyi Q, CunningahamVV, Brown DV, Ha-Kawa S, Fujiwara T, Friston K, Silva S, Luthra SK, Jones T.** Endogenous opiate response to pain in rheumatoid arthritis and cortical and subcortical response to pain in normal volunteers using positron emission tomography. *Int J Clin Pharmacol Res* 1991; 11: 261-266.
14. **Jones AK, Brown WD, Friston KJ, Qi LY, Frackowiak RS.** Cortical and subcortical localization of response to pain in man using positron emission tomography. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1991; 244 (1309): 39-44.
15. **Vogt BA, Finch DM, Olson CR.** Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions. *Review Cereb Cortex* 1992; 2(6): 435-443.
16. **Coghill RC, Talbot JD, Evans AC, Meyer E, Gjedde A, Bushnell MC, Duncan GH.** Distributed processing of pain and vibration by human brain. *J Neurosci* 1994; 14 (7), 4095-4108.
17. **Svensson P, Minoshima S, Beydown A, Morrrow TJ, Casey KL.** Cerebral processing for acute skin and muscle pain in hu-

- mans. *J Neurophysiol* 1997; 78(1):450-460.
18. **Lorenz J, Casey KL.** Imaging of acute versus pathological pain in humans. *Eur J Pain*. 2005; 9(2):163-165.
 19. **Derbyshire SW, Jones AK, Devani P, Friston KJ, Feinmnni C, Harris M, Pearce S, Watson JD, Frackowiak RS.** Cerebral responses to pain in patients with atypical facial pain measured by positron emission tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57(10):1162-1172.
 20. **Hsieh JC, Stahle-Backdahl D, Hagermark O, Stone-Elander S, Rosenquist G, Ingvar M.** Traumatic nociceptive pain activates the hypothalamus and the PAG: a positron emission tomography study. *Pain* 1996; 64(2):303-314.
 21. **Sah P, Nicoll RA.** Mechanism underlying potentiation of synaptic transmission in the rat anterior cingulate cortex in vitro. *J Physiol* 1991; 433c:615-630.
 22. **Abarca C, Silva E, Sepulveda J, Oliva P, Contreras E.** Neurochemical changes after morphine, dizocilpine or riluzole in the ventral posterolateral thalamic nuclei of rats with hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 2000; 403(1-2):67-74.
 23. **Silva E, Quiñones B, Freund N, Gonzalez LE, Hernandez L.** Extracellular glutamate, aspartate and arginine in the ventral posterolateral thalamic nucleus during nociceptive stimulation. *Brain Res* 2001; 923: 45-49.
 24. **Silva E, Hernandez L, Contreras Q, Guerrero F, Alba G.** Noxious stimulation increased glutamate and arginine in the periaqueductal gray matter in rats: a microdialysis study. *Pain* 2000; 80(2): 131-135.
 25. **Fundyus ME.** glutamate receptors and nociception. Implications for the drug treatment of pain. Review article. *CNS Drugs* 2001; 15(1):29-57.
 26. **Meller ST, Gebhart GF.** Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 1993; 52: 127-136.
 27. **Granados-Soto V, Terán-Rosales F, Rocha-González HI, Reyes-García G, Medina-Santillan R, Rodríguez-Silverio J, Flores-Murieta FJ.** Riboflavin reduces hyperalgesia and inflammation but not táctil allodynia in the rat. *Eur J Pharmacol* 2004; 492(1):35-40.
 28. **Watanabe C, Okuda KJ, Sakurada C, Ando R, Sakurada T, Sakurada S.** Evidence that nitric oxide-glutamate cascade modulates spinal antinociceptive effect of morphine: a behavioral and microdialysis study in rats. *Brain Res* 2003; 990(1-2): 77-86.
 29. **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A.** Nitric oxide. Physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
 30. **Grima G, Benz B, Do KQ.** Glutamate-induced release of the nitric oxide precursor, arginine, from glial cells. *Eur J Neurosci* 1997; 9(11):2248-2258.
 31. **Grima G, Benz B, Do KQ.** Glial-derived arginine, the nitric oxide precursor, protects neurons from NMDA-induced excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 2001; 14(11):1762-1770.
 32. **Chang C, Shyu BC.** A fMRI study of brain activations during non-noxious and noxious electrical stimulation of the sciatic nerve of rats. *Brain Res* 2001; 897(1-2): 71-81.
 33. **Herz A, Albus K, Metys J, Schubert P, Teschmacher H.** On the central sites of the antinociceptive action of morphine and fentanyl. *Neuropharmacology* 1970; 9:539-551.
 34. **Sprenger T, Berthele A, Platzer S, Boecker H, Tolle TR.** What to learn from in vivo opioidergic brain imaging? *Eur J Pain* 2005; 9(2):117-121.
 35. **Casey KL, Svensson P, Morrow TJ, Raz J, Jone C, Minoshima S.** Selective opiate modulation of nociceptive processing in the human brain. *J Neurophysiol* 2000; 84(1):525-533.
 36. **Adler LJ, Gyulai FE, Diehl DJ, Mintun MA, Winter PM, Firestone LL.** 1997. Regional brain activity changes associated with fentanyl analgesia elucidated by positron emission tomography. *Anesth Analg* 84(1):120-126.
 37. **Rocha L, Tatsukawa K, Chugani HT, Engel J Jr.** Benzodiazepine receptor binding following chronic treatment with naloxone, morphine and met-enkephalin in

- normal rats. *Brain Res* 1993; 612(1-2): 247-252.
38. **Paxinos G, Watson C.** The rat brain in stereotaxic coordinates, Second Ed. 1986, Academic Press, San Diego. USA.
39. **Hernandez L, Stanley BG, Hoebel BG.** A small removable microdialysis probe. *Life Sci* 1986; 39:2629-2637.
40. **Hernandez L, Tucci S, Guzman N, Paez X.** *In vivo* monitoring glutamate in the brain by microdialysis in the laser induced fluorescence detection. *J Chromatography* 1993; 625:393-398.
41. **Rada P, Tucci S, Teneud L, Paez X, Perez J, Alba G, García Y, Sacchettoni G, Del Corral J, Hernandez L.** Monitoring γ -aminobutyric acid in human brain and plasma microdialysates using micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 1999; 735:1-10.
42. **Gao YJ, Ren WH, Zhang YQ, Zhao ZQ.** Contributions of the anterior cingulate cortex and amygdale to pain and fear-conditioned place avoidance in rats. *Pain* 2004; 110: 343-353.
43. **Lei LG, Sun S, Gao YJ, Zhao ZQ, Zhang YQ.** NMDA receptors in the anterior cingulate cortex mediate pain-related aversion. *Exp Neurol* 2004 Oct; 189(2): 413-421.
44. **Zhang L, Zhang Y, Zhao ZQ.** Anterior cingulate cortex contributes to the descending facilitatory modulation of pain via dorsal reticular nucleus. *Eur J Neurosci* 2005; 22(5):1141-1148.
45. **Tang J, Ko S, Ding HK, Qiu CS, Calejesan AA, Zhuo M.** Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex. *Mol Pain* 2005; 1(1): 6.
46. **Bozkurt A, Zilles K, Schleicher A, Kamper L, Arigita ES, Uylings HB, Kotter R.** Distributions of transmitter receptors in the macaque cingulate cortex. *Neuroimage* 2005; 25(1):219-229.
47. **Gigg J, Tan AM, Finch DM.** Glutamatergic excitatory responses of anterior cingulate neurons to stimulation of the mediodorsal thalamus and their regulation by GABA: an *in vivo* iontophoretic study. *Cereb Cortex* 1992; 2(6):477-484.
48. **Liauw J, Wang GD, Zhuo M.** NMDA receptors contribute to synaptic transmission in anterior cingulate cortex of adult mice. *Sheng Li Xue Bao* 2003; 55(4): 373-380.
49. **Hao Y, Yang JY, Guo M, Wu CF, Wu MF.** Morphine decreases extracellular levels of glutamate in the anterior cingulate cortex: an *in vivo* microdialysis study in freely moving rats. *Brain Res* 2005; 1040(1-2): 191-196.