

## Óxido nítrico y dolor

Patricio López-Jaramillo

### RESUMEN

Una serie de estudios sugieren que el óxido nítrico (ON) participa de alguna manera en el proceso de nocicepción, por lo que se propuso que alteraciones en su producción participarían en la modulación del dolor, abriendo la posibilidad de que manipulaciones en la vía L-arginina: ON: GMPc podrían ser útiles en el tratamiento de diferentes estados de dolor. La complejidad de los mecanismos que participan en la regulación de la expresión genética de las diferentes enzimas que constituyen la familia de los óxido nítrico sintasas, la producción cuantitativa diferenciada del ON, dependiente de la enzima y de la célula donde se genera, así como la diferente respuesta de las neuronas excitatorias o inhibitorias ante el ON, ha determinado que no se tenga bien definido el papel exacto del ON en los diferentes estados de dolor. Además, la gran cantidad de estímulos, las diferentes interacciones de estos y la intensidad de los mismos determina que en la regulación del dolor participen e interactúen una variedad de mecanismos que dependen, aparte de la infinidad de estímulos, de otras condiciones asociadas a la enfermedad de base que ocasiona el dolor. En la presente revisión se discute sobre las vías enzimáticas que conducen a la síntesis de ON, así como el eventual papel que tiene el ON en los modelos experimentales y en situaciones clínicas asociadas con dolor. Queda mucho campo por explorar y que para definir el papel del ON en el dolor son necesarias más investigaciones básicas y aplicadas. La definición de los papeles del ON permitirá abordajes terapéuticos efectivos a través de manipulaciones en la vía L-arginina: ON.

MD, PhD. Director Científico, Instituto Colombiano de Investigaciones Biomédicas; Profesor Asociado, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander.

**Correspondencia:** A.A. 384, Bucaramanga, Colombia; e-mail: [ibiomedi@b-manga.cetcol.net.co](mailto:ibiomedi@b-manga.cetcol.net.co)

**Palabras clave:** Óxido nítrico, nocicepción, dolor inflamatorio, dolor neuropático.

## Introducción

El óxido nítrico (ON) es un gas simple formado por un átomo de nitrógeno y un átomo de oxígeno, los dos elementos más comunes de la naturaleza, que cumple diferentes funciones en el organismo humano ya como sustancia vasodilatadora derivada del aminoácido L-arginina y de una molécula de oxígeno, las cuales se convierten en una molécula de ON y otra de L-citrulina por medio de un conjunto de enzimas llamadas Sintetas de Óxido Nítrico (ONS). Para una mejor comprensión del proceso, obsérvese la figura 1.

guanosin monofosfato cíclico (GMPc). El ON puede unirse también a las proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial de forma reversible o irreversible, dependiendo de su concentración y puede ocasionar muerte celular por asfixia o por apoptosis. El ON tiene una vida media efímera de 4 a 5 segundos en condiciones fisiológicas, siendo inactivado fácilmente por oxidación dando lugar a la formación de nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3$ ) o reacciona con el radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Esta última reacción es extremadamente rápida y depende únicamente de las concentraciones existentes de ON y  $\text{O}_2^-$ .<sup>1-4</sup>

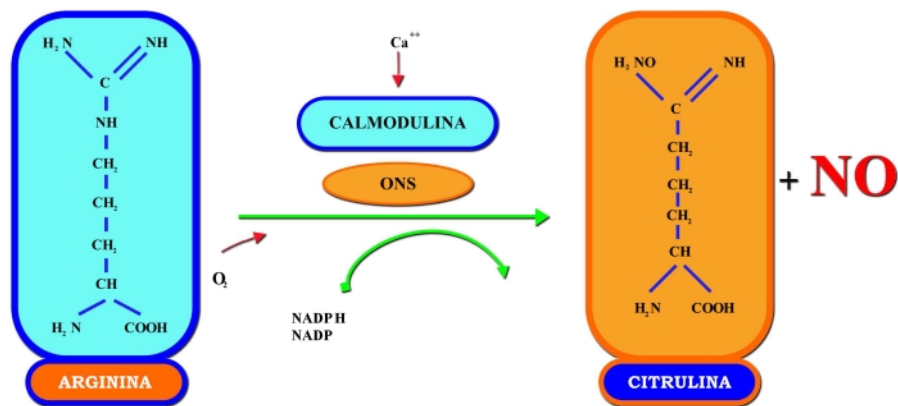


Figura 1. Vía óxido nítrico: L-arginina

Las ONS son denominadas como endotelial (ONS III), neuronal (ONS I) y tipo macrófago (ONS II) por el tejido donde fueron inicialmente caracterizadas. Las dos primeras se encuentran normalmente expresadas en esos tejidos, por lo que se les conoce también como constitutivas, su actividad es dependiente de calcio y producen ON en cantidades picomolares por tiempo corto. La ONS tipo macrófago normalmente no se encuentra expresada, para hacerlo necesita un estímulo inmunológico/inflamatorio, es decir, la presencia de lipolisacáridos (LPS) o de citoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, e IF- $\gamma$ . Una vez expresada la ONS inducible es independiente de calcio y produce ON en cantidades mayores, en el orden nanomolar, por períodos prolongados.

Una vez sintetizado, el ON difunde fácilmente a los tejidos vecinos donde se une a la guanilato ciclasa soluble para activarla y catalizar entonces la transformación de guanosin trifosfato (GTP) en

Es importante insistir, para una adecuada comprensión de la actividad del ON en el dolor, en el doble papel que tiene el ON en la mayoría de tejidos que depende de su concentración; así, el ON generado por las enzimas constitutivas es producido en muy pequeñas cantidades y por corto tiempo en tanto que el ON producido por la enzima inducible en respuesta a estímulos inflamatorios e infecciosos se genera en cantidades mil veces mayores y por largo tiempo.<sup>5</sup>

## Dolor y óxido nítrico

Ferreira y cols realizaron trabajos experimentales pioneros que sugerían la participación de la vía L-arginina: ON en la modulación del dolor, específicamente en la analgesia periférica y central. Ellos establecieron que la acetilcolina, sustancia que estimula la liberación de ON constitutivo, antagoniza la hiperalgesia inducida en ratas por

prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y carragenina, así como las contorciones inducidas en ratones por ácido acético.<sup>6-9</sup> Además, demostraron que los donadores exógenos de ON como nitroprusiato sódico, nitroglicerina y SIN-I antagonizan la hiperalgnesia inducida por un estímulo inflamatorio como la carragenina o la PGE<sub>2</sub> o por inflamación neurogénica, efectos que son bloqueados por azul de metileno y por un inhibidor de GMPc, lo que sugiere que el efecto antinociceptivo del ON en estas condiciones experimentales es mediado a través de la estimulación de GMPc.<sup>10-13</sup> En soporte de esto, ellos observaron que durante la inflamación experimental inducida por la carragenina la administración local de L-arginina produce antinocicepción, la cual es bloqueada por inhibidores de la ONS como L-NMMA. Estas observaciones, que fueron recientemente confirmadas por estudios de otros autores,<sup>14-15</sup> establecieron una importante polémica con varios grupos que sugerían que el ON tiene más bien un papel pronociceptivo en los estados de dolor inducidos por estímulos como carragenina, capsaicina, glutamato, formalina o estímulos mecánicos.<sup>16-22</sup>

Estudios clínicos recientes<sup>23-29</sup> dirigidos a estudiar la participación de la vía L-arginina: ON en pacientes con dolor asociado a diferentes enfermedades, al igual que los estudios experimentales, obtuvieron resultados que demuestran también una absoluta inconsistencia, lo que hace imposible al momento concluir cuál es el papel del ON en nocicepción. Así, algunos autores encuentran una aumentada producción de ON en pacientes con enfermedades lumbodegenerativas, evaluada por las concentraciones de NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub> en el líquido cefaloraquídeo,<sup>24</sup> o en pacientes con migraña en quienes la determinación de NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> y GMPc en plaquetas demuestra una concentración mayor.<sup>27</sup> En estos pacientes con migraña la administración de nitroglicerina, un donador exógeno de ON, agrava el dolor migrañoso.<sup>26</sup> En pacientes con osteoartritis de la articulación temporomandibular en los cuales se cuantificó directamente ON en el líquido sinovial también se observó mayores concentraciones del gas.<sup>29</sup> Otros autores no encontraron diferencias entre los controles y los pacientes con dolor por apendicitis o fracturas, en los cuales se cuantificaron nitritos y nitratos en el líquido cefaloraquídeo.<sup>24</sup> Iguales resultados contradictorios se obtuvieron en estudios en los que se realizaron manipulaciones farmacológicas con inhibidores o donadores de ON.

Así, en pacientes con dolor crónico tipo jaqueca, la administración de L-monometil arginina, un análogo antagonista de la síntesis de ON, disminuyó el puntaje en la escala de dolor,<sup>23</sup> al igual que en pacientes con cistitis intersticial en los que la administración de L-arginina disminuyó la intensidad del dolor.<sup>25</sup>

Estas inconsistencias podrían deberse a múltiples factores de acuerdo con lo recientemente discutido por Luo y Cizkova.<sup>30</sup> Sin embargo, nosotros creemos que se debe a la complejidad de los procesos envueltos en la regulación del dolor. Así, cuando hablamos de nocicepción estamos frente a un fenómeno complejo que envuelve la interacción de una gran variedad de mecanismos que dependen no sólo de una infinidad de estímulos sino también de la intensidad de los mismos y de otras condiciones asociadas a la enfermedad de base que ocasiona el dolor.<sup>31</sup> Y cuando hablamos de ON estamos de frente a un gas ubicuo, fácilmente difusible, que es producido prácticamente en todas las células humanas y cuya actividad va a depender del lugar, de la cantidad y del tiempo durante el cual es producido, además del estado de óxido-reducción del medio en el que va a actuar, siendo de crítica importancia la concentración de radical libre de oxígeno (O<sub>2</sub><sup>•</sup>) que exista, pues de esto va a depender la formación de mayores o menores cantidades de peroxinitrito (ONOO<sup>•</sup>), radical libre oxidante que tiene un papel fundamental en la lesión tisular.<sup>32</sup>

A continuación se pretende dar argumentos que permitan interpretar con cierta lógica los resultados conflictivos que, como hemos citado, existen en la literatura.

## **Lesión tisular, dolor y radicales libres**

La lesión tisular puede estimular dolor a través de mecanismos que inducen primariamente hiperalgnesia y secundariamente alodinia. La hiperalgnesia se entiende como una mayor respuesta al estímulo doloroso o irritante aplicado directamente en el sitio lesionado. La alodinia se manifiesta como una mayor respuesta a estímulos de baja intensidad, no dolorosos, aplicados a tejidos no lesionados vecinos al área lesionada en la cual se induce dolor. Los estados de dolor son, por tanto, el resultado de cambios patológicos en el sitio de la lesión y de alteraciones en las neuronas sensoriales

y espinales de terminales nerviosas aledañas al sitio de lesión, que pueden ocasionar estados de hipersensibilidad agudos (minutos) o crónicos (días o meses) luego de la lesión tisular inicial.

En este contexto, los resultados clínicos y experimentales de los que disponemos sugieren que el ON probablemente no tiene una participación importante como mediador de dolor, bajo condiciones fisiológicas de producción endotelial o neuronal por acción de las ONS constitutivas. Sin embargo, en situaciones de lesión tisular, luego de algunas horas de ocurrida la misma, tiempo en el cual se induce expresión de la enzima calcio independiente, que lleva a producción prolongada de grandes cantidades de ON en diferentes células (macrófagos, neuronas, endotelio, células musculares lisas y estriadas, etc.), la sobre producción de ON pasa a tener un importante papel en la hiperalgesia inducida por la propia lesión tisular así como por estímulos químicos. Es en esta última situación en que los inhibidores de la síntesis de ON suprimen la hiperalgesia resultante de la lesión tisular o del estímulo químico. En soporte de esta propuesta se ha demostrado que las concentraciones de las ONS aumentan notablemente en diferentes modelos animales de dolor.<sup>33-35</sup>

La severidad y la duración de la inflamación asociada a la lesión tisular, el tipo y la concentración de las citoquinas liberadas producto de la lesión o del estímulo químico o mecánico, pueden llevar a expresión de la ONSi y producción de grandes cantidades de ON que en presencia de estrés oxidativo, ocasionado por diferentes estímulos asociados a la lesión tisular, determinan mayor formación de ONOO<sup>-</sup> radical que perpetúa la lesión. En el desarrollo de la respuesta inflamatoria, los macrófagos residentes y las células migratorias tienen un papel amplificador pues son fuente de ON, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y ONOO<sup>-</sup>. La sensibilización de los receptores del dolor es un mecanismo común a todos los tipos de dolor inflamatorio y que clínicamente se manifiestan por hiperalgesia. En estas condiciones, el ON tiene un papel pronociceptivo.

Por otro lado, existe una serie de evidencias que indican que la activación aferente nociceptiva, como lo que se observa en la lesión de nervios periféricos y en su inflamación, da como resultado una mayor excitabilidad de las neuronas espinales, fenómeno conocido como sensibilización central. Estudios

farmacológicos sugieren que la sensibilización central es parcialmente mediada por activación de receptores de ácido N-metil-D-aspartato (NMDA), el cual se relaciona con producción de ON neuronal, a través de la liberación presináptica de glutamato el cual produce flujo transmembrana de calcio y activación de la ONSn. Basados en estas observaciones se propuso que el ON neuronal puede modular la hiperexcitabilidad de neuronas dorsales y jugar por tanto un papel pronociceptivo en estados de dolor.

En soporte de esta propuesta, recientemente<sup>22</sup> se demostró que el tratamiento intratecal con inhibidores de la ONS en concentraciones que bloquean por completo la producción de ON estimulada por receptores de NMDA, bloquea concomitantemente el comportamiento relacionado con dolor en animales, lo que demuestra que la activación de los receptores espinales de NMDA están relacionados con producción de ON y aumento de GMPc, el cual puede llevar a liberación posterior de neurotransmisores excitatorios, resultando en un proceso de retroalimentación positiva que conduce a hiperexcitabilidad neuronal dorsal. Estos resultados implican que el ON puede tener un papel mediador de las neuronas exitatorias.

También se ha propuesto que el ON puede regular la hiperexcitabilidad de las neuronas espinales por reducir la inhibición tónica espinal. Esta hipótesis se basa en experimentos que demostraron que la administración intradérmica de capsaicina aumenta la liberación espinal de ON y sensibiliza a células del tracto espinotalámico en la profundidad del asta dorsal a la estimulación mecánica periférica. La sensibilización espinal puede ser mimetizada por el tratamiento con un donador exógeno de ON y prevenida por la administración de un inhibidor de la síntesis de ON, lo que sugiere que el ON tiene un papel en la sensibilización central.<sup>17, 36, 37</sup>

Los efectos desinhibitorios del ON en células del tracto espinotalámico son mediados por receptores de aminoácidos inhibitorios y pueden ser atenuados por el tratamiento espinal con inhibidores de la guanilato ciclasa, lo que demuestra que este efecto desinhibitorio del ON se ejerce a través del GMPc.<sup>36, 37</sup>

En su conjunto estos resultados sugieren que la modulación de los receptores de aminoácidos inhibitorios en el asta dorsal espinal a través de la

vía L-arginina: ON: GMPc contribuye a la sensibilización central, a través de un mecanismo de desinhibición.

Por tanto, las discrepancias de estos trabajos con los resultados iniciales que mostraron que el ON tiene efectos antinociceptivos y no pronociceptivos de frente a estímulos como la carragenina o la inflamación crónica, puede deberse no sólo a las diferencias en la cantidad y tiempo de producción de ON por la enzima ONSn y la ONS inducible, sino que podría deberse también a una regulación diferenciada del ON en fibras nerviosas aferentes o a que el ON actúa como un mensajero molecular diferenciado en las diferentes neuronas, dependiendo del carácter excitatorio o inhibitorio en una vía nociceptiva dada. Si actúa sobre neuronas excitatorias el efecto resultante será hiperalgesia, en tanto que si el ON induce activación de neuronas inhibitorias el efecto resultante será hipoalgesia. Este doble papel del ON en el sistema nervioso ha sido descrito en la actividad neuronal. Así, el ON aumenta la actividad neuronal espinal frente a inflamación<sup>41</sup> pero la deprime frente a un estímulo doloroso.<sup>42</sup> Además, el efecto del ON producido en una neurona y que difunde a las neuronas vecinas puede ser excitatorio o inhibitorio dependiendo del tipo de neuronas en la que va a actuar.

## Papel del ON en el dolor crónico

Se ha propuesto que alteraciones en la vía L-arginina: ON también pueden participar en la generación y perpetuación del dolor crónico asociado con lesión de tejido nervioso. Así, se observó que la actividad de la ONSn está aumentada en los ganglios de la raíz dorsal pero disminuida en la médula espinal de ratas con dolor neuropático resultante de lesión de nervios periféricos.<sup>43-45</sup> Se conoce también que la administración de inhibidores de la síntesis de ON bloquea el desarrollo de hiperalgesia térmica inducida por lesión constrictora crónica<sup>46</sup> y la alodinia táctil inducida por ligadura de los nervios espinales L5/L6,<sup>47</sup> efecto este último que es revertido por la administración de L-arginina en una forma dependiente de la dosis del sustrato del ON. Estos datos sugieren que el ON tiene un papel funcional en la génesis y modulación del dolor neuropático.

Al igual que en otros estados dolorosos, en el dolor neuropático el papel del ON depende de la enzima

que está involucrada en su síntesis lo que va a determinar la cantidad de ON generado. En el dolor neuropático parece que la ONSn es la que está principalmente involucrada pues datos experimentales demuestran que la ONSe y la ONSi no son detectables en la médula espinal y en los ganglios de la raíz dorsal luego de ligadura del nervio y en el momento en que se ha manifestado plenamente el dolor neuropático.<sup>45</sup> Sin embargo, recientemente se reportó un aumento en la expresión de la ONSi y la ONSe en el nervio ciático comprimido,<sup>48</sup> aumento que fue atribuido a la expresión de las enzimas en macrófagos activados y en células de Schwann, respectivamente en respuesta a la inflamación secundaria ocasionada por la lesión del nervio.<sup>49</sup> Pero además, la relación causa-efecto de la expresión de la ONSn en la generación y mantenimiento del dolor también es cuestionada. Así, si bien la ligadura del nervio induce una moderada expresión de la ONSn en los ganglios de la raíz dorsal que precede a la alodinia, la expresión de la ONSn permanece elevada a pesar de la total recuperación de la alodinia y, aún más, se eleva en animales que no desarrollen alodinia.<sup>44</sup> En ratas con diabetes experimental y neuropatía inducida no se observa la sobreexpresión de la ONSn y el tratamiento con L-NAME en estas ratas no es efectivo para inhibir la hiperalgesia mecánica.<sup>50</sup> En su conjunto, estos resultados sugieren que el ON producido por la sobreexpresión de la ONSn puede ser importante en la neuroplasticidad necesaria luego de la lesión de un nervio periférico, pero no soportan la visión de que el ON sea un mediador directo de la alodinia neuropática. Al igual que en el dolor inflamatorio, se ha propuesto que el ON podría tener en el dolor neuropático un papel desinhibitorio.<sup>51</sup>

## Conclusiones

De los estudios pioneros de Sergio Ferreira y su grupo<sup>52</sup> y de una variedad de reportes actuales<sup>53</sup> se concluye que existe una correlación entre alteraciones en la expresión de las ONS y en la producción de ON con sensaciones anormales, por lo que se ha sugerido un papel del ON en la nocicepción. Aunque ha habido una gran cantidad de trabajos demostrando la relación ON-dolor, el papel exacto que cumple el ON no está al momento totalmente definido, en especial por la complicada regulación que los distintos factores asociados con

el aparecimiento del dolor tienen sobre las ONS, la que depende del tipo de células y de la intensidad y especificidad del estímulo.

En verdad, parece claro que la participación del ON en el dolor inflamatorio es diferente del papel del ON en el dolor neuropático, posiblemente por las diferencias en las enzimas que participan en su síntesis, lo que determine diferencias marcadas en las concentraciones tisulares alcanzadas. Creemos que son necesarios más estudios que definan el papel del ON en la regulación del dolor en diferentes situaciones, en las cuales no se debe descuidar de analizar el estado de óxido-reducción tisular.

## Summary

A series of morphologic, physiologic and pharmacological studies suggest that Nitric Oxide (NO) participates in some way in the process of nociception, reason for what it was proposed that the alterations in its production would participate in the modulation of pain, opening the interesting possibility that the manipulation of the via L-arginine:NO:GMPc could be useful in the treatment of different states of pain. The complexity of the mechanisms that participate regulating the genetic expression of the different enzymes that compose the family of the Nitric Oxide Sintases (NOS), the quantitative production of NO dependant of the enzyme and the cell from which it's generated, as well as the different responses of the different excitatory and inhibitory neurons in the presence of NO, has determined that at the moment the exact role of NO in the different states of pain has not been defined. Besides, the great amount of stimuli, their different interactions and their intensity determine that in pain regulation participates and interact a variety of mechanisms that depend, aside from the infinity of stimuli, of other conditions related to the original disease which causes pain. In the present review there is a discussion about the enzymatic that leads to the NO synthesis, its similitudes and differences, as well as the eventual role of NO in different situations associated with pain. More research is needed in this area to define effective therapeutic methods through manipulating the L-arginine: NO: GMPc pathway.

**Key words:** Nitric oxide, nociception, inflammatory pain, neuropathic pain.

## Referencias

- Moncada S, López-Jaramillo P. Actividad biológica del endotelio vascular. *Investigación y Ciencia* 1991; 176:60-6.
- Moncada S, Higgs EA, Hodson HF, et al. The L-arginine:Nitric oxide pathway. *J Cardiovas Pharmacol* 1991; 17(Suppl.3):S1-S9.
- López-Jaramillo P. *Bioquímica del endotelio vascular: Implicaciones fisiológicas y clínicas*. Quinta Edición. Horizonte Impresores, Bogotá, 2001.
- López-Jaramillo P, González MC, Palmer RMJ, Moncada S. The crucial role of physiological  $Ca^{2+}$  concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br J Pharmacol* 1990; 101:489-93.
- Berrazueta JR, López-Jaramillo P, Moncada S. El óxido nítrico eira SH. Blockade of the peripheral pain sensory system via the L-arginine: nitric oxide: cyclic GMP pathway. *En: Biology of nitric oxide* 1992; 258-60.
- Duarte IDG, Ferreira SH. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-Nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1992; 221:171-4.
- Duarte IDG, Santos IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the argenine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1992; 217:225-7.
- Ferreira SH, Duarte IDG, Lorenzetti BB. The molecular mechanism of action of peripheral morphine alagesia: stimulation of cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol* 1991; 201:121.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Faccioli LH. Blockade of hyperalgesia and neurogenic oedema by topical application of nitroglycerin a nitric oxide generator. *Eur J Pharmacol* 1992; 217:207-9.
- Ferreira SH, Duarte IDG. Is the molecular mechanism of central morphine analgesia due to activation of the nitric oxide: cyclic GMP pathway via a non-argininergic pathway? *En: Biology of nitric oxide* 1992; 316-7.
- Budzinski M, Mistereck K, Gumulka W, Dorociak A. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in persistent pain. *Life Sci* 2000; 66:301-5.
- Dolan S, Field LC, Nolan AM. The role of nitric oxide and prostaglandin signaling pathways in spinal nociceptive processing in chronic inflammation. *Pain* 2000; 86:311-20.
- Osborne MG, Coderre TJ. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1999; 126:1840-6.
- Lin Q, Palecek J, Paleckova V, et al. Nitric oxide mediates the central sensitization of primate spinothalamic tract neurons. *J Neurophysiol* 1999; 81:1075-85.
- Ferreira J, Santos AR, Calixto JB. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. *Neuropharmacology* 1999; 38:835-42.
- Beirith A, Creczynski-Pasa TB, Bonetti VR, et al. Antinociceptive properties and nitric oxide synthase inhibitory action of new ruthenium complexes. *Eur J Pharmacol* 1999; 369:289-97.
- Chen X, Levine JD. NOS inhibitor antagonism of PGE2-induced mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptors in the rat. *J Neurophysiol* 1999; 81:963-6.
- Urban MO, Coutinho SV, Gebhart GF. Involvement of excitatory amino acid receptors and nitric oxide in the rostral ventromedial medulla in modulating secondary hyperalgesia produced by mustard oil. *Pain* 1999; 81:45-55.
- Kawamata T, Omote K. Activation of spinal N-methyl-D-aspartate receptors stimulates a nitric oxide/cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate/glutamate release cascade in nociceptive signaling. *Anesthesiology* 1999; 91:1415-24.
- Ashina M, Lassen LH, Bendtsen L, et al. Effect of inhibition of nitric oxide synthase on chronic tension-type headache: a randomised crossover trial. *Lancet* 1999; 353:287-9.
- Kimura S, Watanabe K, Yajiri Y, et al. Cerebrospinal fluid nitric oxide metabolites in painful diseases. *Neuroreport* 1999; 10:275-9.
- Korting GE, Smith SD, Wheeler MA, et al. A randomized double-blind trial of oral L-arginine for treatment of interstitial cystitis. *J Urol* 1999; 161:558-65.
- Chistiansen I, Thomsen LL, Daugaard D, et al. Glyceryl trinitrate induces attacks of migraine without aura in sufferers of migraine with aura. *Cephalalgia* 1999; 19:660-7.
- Shimomura T, Murakami F, Kotani K, et al. Platelet nitric oxide metabolites in migraine. *Cephalalgia* 1999; 19:218-22.

25. Lauretti GR, de Oliveira R, Reis MP, et al. Transdermal nitroglycerine enhances spinal sufentanil postoperative analgesia following orthopedic surgery. *Anesthesiology* 1999; 90:734-9.
26. Takahashi T, Kondoh T, Ohtani M, et al. Association between arthroscopic diagnosis of temporomandibular joint osteoarthritis and synovial fluid nitric oxide levels. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 88:129-36.
27. Luo ZD, Cizkova D. The role of nitric oxide in nociception. *Current Pain Rev* 2000; 4:459-66.
28. Luo DZ. Molecular dissection of pain mediators. *Pain Rev* 2000; 7:37-64.
29. López-Jaramillo P. Balance óxido nítrico/superóxido en la génesis de las enfermedades cardiovasculares. *Hospital Practice* 2000; 4:17-8.
30. Leong S, Liu H, Yeo J. Nitric oxide synthase and glutamate receptor immunoreactivity in the rat spinal trigeminal neurons expressing Fos protein after formalin injection. *Brain Res* 2000; 855:107-15.
31. Przewlocka B, Mika J, Capone F, et al. Intrathecal oxotremorine affects formalin-induced behavior and spinal nitric oxide synthase immunoreactivity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1999; 62:531-6.
32. Rodella L, Rezzani R, Agostini C, Bianchi R. Expression of NADPH-diaphorase and colocalization with Fos in the brain neurons of the rat following visceral noxious stimulation. *Brain Res* 1999; 834:173-7.
33. Lin Q, Wu J, Peng YB, et al. Nitric oxide-mediated spinal disinhibition contributes to the sensitization of primate spinothalamic tract neurons. *J Neurophysiol* 1999; 81:1086-94.
34. Lin Q, Wu J, Peng YB, et al. Inhibition of primate spinothalamic tract neurons by spinal glycine and GABA is modulated by guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate. *J Neurophysiol* 1999; 81:1095-103.
35. Callsen-Cencic P, Hoheisel U, Kaske A, et al. The controversy about spinal neuronal nitric oxide synthase: under which conditions is it up-or downregulated? *Cell Tissue Res* 1999; 295:183-94.
36. Bogdanov MB, Wurtman RJ. Possible involvement of nitric oxide in NMDA-induced glutamate release in the rat striatum: an *in vivo* microdialysis study. *Neurosci Lett* 1997; 221:197-201.
37. Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Rustioni A, Schmidt HH. Nitric oxidesynthase and GABA colocalize un lamina II of rat spinal cord. *Neurosci Lett* 1992; 148:6-10.
38. Haley JE, Dickenson AH, Schachter M. Electrophysiological evidence for a role of itric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology* 1992; 31:251-8.
39. Zhuo M, Meller ST, Gebhart GF. Endogenous nitric oxide is required for tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission. *Pain* 1993; 54:71-8.
40. Choi Y, Raja SN, Moore LC, Tobin JR. Neuropathic pain in rats is associated with altered nitric oxide synthase activity in neural tissue. *J Neurol Sci* 1996; 138:14-20.
41. Luo ZD, Chaplan SR, Scott BP, et al. Neuronal nitric oxide synthase mRNA upregulation in rat sensory neurons after spinal nerve ligation: lack of a role in allodynia development. *J Neurosci* 1999; 19:9201-8.
42. Goff JR, Burke AR, Goff DJ, Jasmin L. Reorganization of the spinal dorsal horn in models of chronic pain: correlation with behaviour. *Neuroscience* 1998; 82:559-74.
43. Yamamoto T, Shimoyama N. Role of nitric oxide in the development of thermal hyperesthesia induced by sciatic nerve constriction injury in the rat. *Anesthesiology* 1995; 82:1266-73.
44. Yoon YW, Sung B, Chung JM. Nitric oxide mediates behavioral signs of neuropathic pain in an experimental rat model. *Neuroreport* 1998; 9:367-72.
45. Levy D, Zochodne DW. Local nitric oxide synthase activity in a model of neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 1998; 10:1846-55.
46. Levy D, Höke A, Zochodne DW. Local expression of inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 1999; 260:207-9.
47. Fox A, Eastwood C, Gentry C, et al. Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Pain* 1999; 81:307-16.
48. Marsala J, Marsala M, Vanicky I, Taira Y. Localization of NADPHd-exhibiting neurons in the spinal cord of the rabbit. *J Comp Neurol* 1999; 406:263-84.
49. Ferreira SH. Hiperalgnesia inflamatoria, óxido nítrico y control periférico del dolor. *Revista Latinoamericana de Dolor* 1995; 1(2):6-17.
50. Moon C, Fraser SP, Djamgoz MB. Protein kinase and phosphatase modulation of quail brain GABA(A) and non-NMDA receptors co-expressed in *Xenopus oocytes*. *Cell Signal* 2000; 12:105-12.