

---

# Estudios experimentales en dolor agudo e inflamatorio: el modelo de la administración intraplantar de formalina en el ratón

---

C.M. Cendán

Departamento de Farmacología e Instituto de Neurociencias,  
Facultad de Medicina, Universidad de Granada.

---

**Resumen:** *La inyección de formalina produce una respuesta dolorosa bifásica, con una primera fase de corta duración (primeros 5 minutos) debida a la activación de los nociceptores de la pata y una segunda fase (10-50 minutos después de la inyección) debida a una respuesta inflamatoria con sensibilización de las neuronas nociceptoras de la médula espinal. Por lo tanto, es un modelo válido y sensible para el estudio de diferentes clases de analgésicos. Se evaluaron fármacos con uso clínico (morfina, diclofenaco, haloperidol y (-)-sulpirida), así como compuestos experimentales. También se realizaron estudios en animales transgénicos (knockout, deficientes en receptores  $\sigma_1$ ) y tratados con oligodesoxinucleótidos antisentido (ODN) frente al receptor  $\sigma_1$ . La administración de haloperidol (antagonista  $\sigma$ ) inhibió, de manera dependiente de la dosis, ambas fases del dolor inducido por formalina. No obstante, este efecto analgésico no parece deberse a un bloqueo dopaminérgico, puesto que la (-)-sulpirida fue inactiva en ambas fases. De los datos de compuestos experimentales de antagonistas de receptores  $\sigma_1$  administrados por vía sistémica, se dedujo que su efecto no se produce en los nociceptores periféricos sino en regiones espinales o supraespinales. Finalmente, los ratones knockout mostraron una menor sensibilidad al dolor inducido por la formalina, mientras que los ODN resultaron ineficaces. Estos resultados sugieren que los receptores  $\sigma_1$  estarían participando en la expresión del dolor inducido por formalina, aunque no sería el único mecanismo implicado.*

**Palabras clave:** Formalina – Receptores  $\sigma_1$  – Analgesia.

---

## El modelo de dolor inducido por la inyección de formalina

---

### *Características generales del modelo*

Generalmente se considera que el modelo de la formalina fue introducido dentro del campo del estudio del dolor por Dubuisson y Dennis,<sup>1</sup> hace 30 años, cuando describieron los efectos conductuales tras la inyección de una solución diluida de formalina (5%) en las

patas delanteras de gatos y ratas. La formalina es una solución de formaldehído al 37% disuelto en agua. Aunque la formalina anteriormente se había utilizado como un estímulo inflamatorio y también nociceptivo,<sup>2</sup> no fue hasta la aparición del trabajo de estos autores cuando su uso se popularizó y extendió.<sup>2-4</sup> El modelo posteriormente fue desarrollado en ratones,<sup>5-7</sup> y aunque los efectos comportamentales se han estudiado en diferentes especies, como gatos, primates, conejos y cobayas, en-

tre otros, las ratas y los ratones han sido las más utilizadas.<sup>2-4</sup>

El modelo de la formalina se diferencia de la mayoría de los modelos basados en estímulos de corta duración (fásicos) y de alta intensidad en que es posible evaluar la manera en que el animal responde a un dolor moderado y continuo (tónico) generado por un daño tisular. Precisamente, esta característica ha sido la que ha incrementado su utilización y popularidad, siendo actualmente el modelo de dolor en investigación básica más utilizado. Así, algunos autores consideran que el modelo de la formalina refleja más fehacientemente algunos estados de dolor clínico que otros que utilizan estímulos mecánicos o térmicos fásicos.<sup>2-4</sup>

Se han publicado numerosos artículos<sup>2-4</sup> que han discutido y revisado varios aspectos a tener en cuenta sobre este modelo, tales como:

- El método de puntuación elegido (valores ponderados o escala categorial frente a parámetro único) o la respuesta dolorosa considerada tras la administración de la formalina, el número de pataleos frente al tiempo de lamido/mordisqueo de la pata inyectada.
- La elección de la inyección en la pata delantera o trasera, y en este último caso si es en la zona dorsal o plantar.
- El volumen y la concentración administrados.
- Otros factores, como la cepa y la especie utilizadas, la edad del animal, circunstancias ambientales como la temperatura de la habitación, el ruido o los olores, y el número de evaluadores.

Puesto que comentar todos los aspectos mencionados supera ampliamente el objetivo de este capítulo, sólo se mencionarán aquellos que resulten necesarios para la exposición de los resultados experimentales.

Por otro lado, la inyección de formalina, aparte de las respuestas comportamentales espontáneas de dolor, induce procesos que implican cambios en el sistema nervioso central, como la expresión del factor de transcrip-

ción c-Fos en las neuronas (lo cual es útil para identificar neuronas implicadas en procesos de sensibilización central) y la activación de células gliales que pueden liberar citocinas, factores de crecimiento y otros mediadores, lo que puede influir en la función neuronal y en los cambios a largo plazo.<sup>2-4</sup> Estos procesos, aun resultando del máximo interés, tampoco serán comentados en este capítulo puesto que trascienden su intención.

*Carácter bifásico del modelo:  
dolor agudo y dolor tónico*

La inyección intraplantar de formalina produce una respuesta dolorosa bifásica, la cual se compone de una fase temprana (primera fase), durante los primeros cinco minutos tras la inyección de la formalina, y una segunda fase tardía que comienza a los 10-15 minutos de la inyección y dura de 30 a 50 minutos. Tradicionalmente se ha considerado que la primera fase se debe a la activación directa de los nociceptores periféricos, y que la segunda es consecuencia de una respuesta inflamatoria con sensibilización de las neuronas nociceptoras de la médula espinal (sensibilización central).<sup>2-4</sup> Por lo tanto, el modelo de la formalina se usa normalmente como un modelo de dolor agudo y tónico.

A continuación se detallan algunos aspectos específicos para cada una de las fases, haciendo referencia también al periodo de inactividad entre ambas, conocido como "interfase".

LA PRIMERA FASE: DOLOR AGUDO

La primera fase tras la administración de formalina se ha propuesto que se debe a la activación directa de los nociceptores de las neuronas aferentes. Esta hipótesis se ha fundamentado en el hecho de que la inyección local de formalina dentro, o inmediatamente adyacente, del campo receptivo de nervios aislados en la pata trasera de la rata produce una activación de fibras C y Aδ en los primeros 10 minutos.<sup>8</sup> Además, la inyección periférica de anestésicos locales antes de la formalina produce una su-

presión total de las conductas nocifensivas de la primera fase,<sup>9,10</sup> así como el bloqueo de la primera fase de actividad de las neuronas multirreceptivas en la médula espinal.<sup>11</sup> En cuanto a los mecanismos por los cuales la formalina activa los nervios sensoriales, se ha comprobado que la administración de antagonistas de la bradicinina,<sup>7</sup> la serotonina y la histamina,<sup>12,13</sup> y de trifosfato de adenosina (ATP),<sup>14</sup> puede inhibir las respuestas de esta fase. Recientemente se ha demostrado que la formalina activa las neuronas sensoriales aferentes primarias mediante la acción específica y directa del receptor TRPA1, un miembro de la familia de los canales iónicos del potencial receptor transitorio o TRP (*Transient Receptor Potential*) que está altamente expresado en una subpoblación de nociceptores de las fibras C.<sup>15,16</sup>

#### LA SEGUNDA FASE: DOLOR TÓNICO

La segunda fase de dolor parece ser dependiente de la combinación de una reacción inflamatoria del tejido periférico y de cambios funcionales en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal, la cual llega a estar sensibilizada ante estímulos nociceptivos.<sup>17</sup> Se ha comprobado que las respuestas conductuales son inhibidas por la administración de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), los cuales interfieren con la producción de prostaglandinas, así como por inhibidores de otros mediadores inflamatorios (bradicinina, serotonina, histamina, ATP).<sup>7,12-14,18-21</sup> También se ha demostrado que la administración espinal de anestésicos locales,<sup>22</sup> opioides,<sup>23</sup> antagonistas del receptor de *N*-metil-D-aspartato (NMDA)<sup>11,17,24</sup> o antagonistas del receptor para la sustancia P,<sup>25,26</sup> inhibe las respuestas conductuales y en el asta dorsal de la médula espinal de la segunda fase cuando se administran antes, pero no después, de que se produzca la primera fase del modelo.<sup>2-4</sup> Esto sugiere que la actividad generada durante la fase temprana es capaz de producir cambios en la función del SNC, es decir, produce una sensibilización central, la cual a su vez afecta a los procesos ocurridos durante la fase tardía o segunda fase. Sin embargo, a este respecto hay datos con-

tradictorios. También se considera que las respuestas de la fase 2 podrían reflejar una continua activación de aferentes sensoriales, así como los aspectos de la sensibilización central resultante de tal actividad. De este modo, se ha observado una constante actividad o disparo de fibras A $\delta$  y C (pero no A $\beta$ ) en neuronas aisladas que inervan la pata del animal cuando se ha administrado formalina dentro de su campo receptivo o muy cerca de él.<sup>8</sup> Además, existen algunos trabajos en que se ha observado que la inyección periférica de anestésicos locales después de la primera fase puede suprimir completamente las conductas de la segunda,<sup>9,27</sup> los cambios en la tasa cardíaca y la presión sanguínea,<sup>27</sup> así como la activación de las neuronas convergentes (rango dinámico amplio) del asta dorsal espinal.<sup>28</sup> Por tanto, estos últimos resultados demuestran que ambas fases de la respuesta nociceptiva a la formalina dependen de la activación de aferentes primarios y, por consiguiente, que la segunda fase no podría ser mediada exclusivamente por la sensibilización central. En estudios llevados a cabo en ratones deficientes en el receptor TRPA1 se ha encontrado que la segunda fase se halla reducida significativamente, confirmando que este receptor media la respuesta dolorosa inducida por la formalina.<sup>15,16</sup>

#### LA INTERFASE

La interfase, el periodo que ocurre entre las dos fases de las respuestas nociceptivas (entre 5 y 15 minutos después de la inyección de formalina), no ha recibido mucha atención puesto que se ha considerado que es un periodo de inactividad. Tal conclusión fue apoyada por el hecho de que en registros de aferentes primarios se observó que la inyección de formalina en el campo receptivo produce una activación bifásica de las fibras A $\delta$  y C, con un curso temporal paralelo a la respuesta conductual inducida por la inyección de formalina.<sup>8,29</sup> Sin embargo, ahora se sabe que la interfase es una fase activa que tiene un componente espinal,<sup>30,31</sup> en el que también participan mecanismos supraespinales.<sup>32</sup> El componente espinal supuestamente implica-

ría un balance entre mecanismos inhibidores y excitadores, dado que la administración espinal de antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub><sup>33</sup> y de agonistas glutamatergicos<sup>17</sup> reduce o suprime, respectivamente, este periodo de inactividad. En estructuras supraespinales, la interfase es abolida completamente por el corte de la unión mesencéfalo-diencefalo.<sup>32</sup>

## Papel de los receptores $\sigma_1$ en el dolor inducido por formalina

### *Antecedentes e hipótesis de trabajo*

Los receptores  $\sigma$  presentan un perfil de sensibilidad a fármacos y una distribución en el SNC característicos,<sup>34</sup> y se ha descrito la existencia de al menos dos subtipos, denominados  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$ .<sup>34,35</sup> Los receptores  $\sigma_1$  se han clonado en varias especies, incluido el ratón, y su secuencia no presenta homología significativa con la de ninguna otra proteína de los mamíferos.<sup>36-38</sup>

Los receptores  $\sigma_1$  se encuentran en altas concentraciones en áreas de gran importancia para la percepción del dolor, como las láminas I y II del asta dorsal de la sustancia gris medular y la sustancia gris periacueductal.<sup>39,40</sup> Por otra parte, la administración de oligodesoxinucleótidos antisentido (ODN) contra el receptor  $\sigma_1$  del ratón aumenta la analgesia opioide mediada por los receptores  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ , lo que sugiere la existencia de un sistema descendente  $\sigma$  tónicamente activo que facilita la percepción del dolor.<sup>41</sup>

La respuesta dolorosa a la formalina se debe en parte a la liberación de aminoácidos excitatorios en la médula espinal capaces de sensibilizar a las neuronas nociceptoras del asta dorsal de la sustancia gris medular.<sup>17</sup> Esto explica que dicha respuesta sea antagonizada por bloqueantes de los receptores de NMDA.<sup>42</sup>

Los ligandos  $\sigma$  modulan distintas respuestas inducidas por el NMDA, tales como la frecuencia de descarga neuronal, siendo ésta potenciada por fármacos agonistas  $\sigma_1$  y antagonizada por antagonistas  $\sigma_1$ .<sup>43</sup> Por tanto, los ligandos  $\sigma$  podrían modificar el dolor inducido

por la administración de formalina en el ratón por su capacidad de modular las respuestas mediadas por NMDA. Además, si en el SNC existe un sistema descendente  $\sigma$  tónicamente activo que facilita la percepción del dolor, podríamos esperar que los ratones *knockout*  $\sigma_1$  y los tratados con ODN frente al receptor  $\sigma_1$  mostrasen una menor sensibilidad al dolor inducido por la formalina.

### *Estudios experimentales*

#### METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La metodología y el procedimiento experimental fueron muy similares en todos los estudios mencionados. Brevemente, después de estudiar el curso temporal del dolor inducido por la inyección de diferentes concentraciones de formalina (0,5% a 5%), observamos que el máximo efecto algógeno se conseguía tras la inyección intraplantar de 20  $\mu$ l de formalina al 2,5% en la pata trasera del animal. El tiempo de lamido o el mordisqueo de la pata inyectada durante 45 minutos fue registrado y se consideró como indicador de la respuesta dolorosa en ratones sin tratamiento o tratados con el solvente de los fármacos. Puesto que observamos que en ambos grupos se producía una respuesta bifásica similar (Fig. 1), decidimos registrar dos periodos diferentes de lamido/mordisqueo de la pata inyectada en los animales tratados con los fármacos. El primer periodo fue registrado de 0 a 5 minutos después de la inyección de formalina y se consideró como indicador de la primera fase de dolor. El segundo periodo fue registrado desde los 15 a los 35 minutos después de la inyección de formalina y se consideró la segunda fase del modelo. Los fármacos evaluados fueron morfina y diclofenaco (como analgésicos de control sin actividad sobre los receptores  $\sigma$ ); haloperidol y sus metabolitos I, II y III; los antagonistas  $\sigma_1$  BD-1047, BD-1063 y NE-100; los agonistas  $\sigma_1$  PRE-084 y (+)pentazocina; y los fármacos (-)sulpirida, (-)pentazocina y naloxona. Asimismo, se emplearon dos ODN frente al receptor  $\sigma_1$ . Los fármacos en estudio se administraron por vía subcutánea (s.c.) en la inmensa mayo-

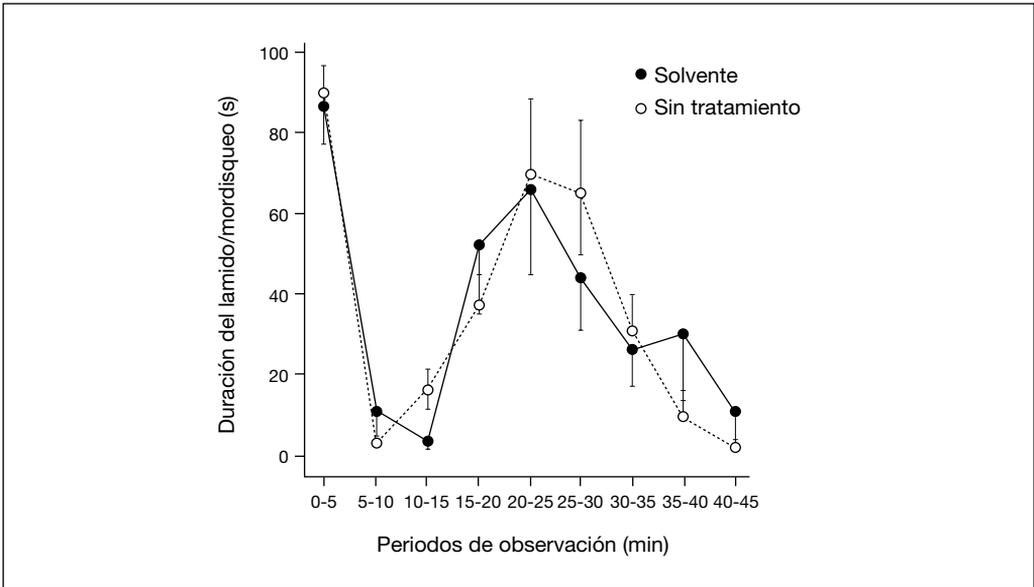


Figura 1. Curso temporal de la respuesta dolorosa (duración del lamido o mordisqueo de la pata tratada) inducida por la inyección intraplantar de formalina al 2,5% en animales sin tratamiento o tratados con el solvente de los fármacos. Cada uno de los puntos y las líneas verticales que los atraviesan representan la media  $\pm$  ESM de los valores obtenidos al menos en ocho animales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en ninguno de los periodos de observación (ANOVA).

ría de los experimentos o por vía intraplantar (i.pl.) 30 minutos antes de inyectar la formalina. Respecto a la administración de los ODN frente al receptor  $\sigma_1$ , ésta fue por vía intracerebroventricular (i.c.v.) en un volumen de 2  $\mu$ l por ratón durante cuatro días consecutivos, y el test de la formalina se realizó el quinto día. Todos los procedimientos descritos se realizaron en ratones hembra de la cepa CD-1, mientras que los estudios con ratones transgénicos (*knockout*) deficientes en receptores  $\sigma_1$  se realizaron en ratones C57BL/6J. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

## Resultados

### CARACTERIZACIÓN DEL MODELO

Como era de esperar y se había comprobado anteriormente, la inyección intraplantar

de formalina produjo un efecto bifásico (Fig. 1), la morfina produjo un efecto analgésico dependiente de la dosis, con una potencia y eficacia similares en ambas fases del modelo, mientras que el diclofenaco sólo produjo analgesia en la segunda fase.

### ESTUDIOS CON ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES $\sigma_1$

En primer lugar evaluamos el efecto del antipsicótico haloperidol (que actúa como antagonista  $\sigma$  y  $D_2$ ) y de una serie de productos derivados de él que muestran afinidad exclusiva por el receptor  $\sigma_1$  (metabolito I), afinidad por los receptores  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$  (metabolito II) o ninguna afinidad por los receptores  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$  (metabolito III)<sup>44-47</sup> (Tabla I). Así, comprobamos que la administración s.c. de haloperidol y de su metabolito II inhibió de forma dependiente de la dosis las dos fases del dolor inducido por la formalina, mientras que el metabolito I sólo produjo analgesia dependiente de la dosis

TABLA I. Afinidad del haloperidol, sus metabolitos y la (-)sulpirida por diferentes receptores ( $K_i$  o  $IC_{50}$ , nM).

Fármacos	$\sigma_1^*$	$\sigma_2^{**}$	$D_2^{**}$
Haloperidol	$5,2 \pm 0,4$	$54 \pm 10$	$2,8 \pm 0,6$
Metabolito II	$12,2 \pm 0,6$	$46 \pm 6$	$239 \pm 49$
Metabolito I	$243,9 \pm 20$	$>10.000$	$>10.000$
Metabolito III	$>10.000$	$>10.000$	$>10.000$
(-)Sulpirida	$>10.000$	$>10.000$	$6 \pm 0,9$

\*Los datos se han obtenido en nuestro laboratorio, en ratones.

\*\*Estos valores proceden de varios autores y están recogidos en Cendán et al.<sup>44</sup>

en la segunda fase, siendo menos potente y efectivo en la primera.<sup>44</sup> En cambio, el metabolito III no mostró ningún efecto analgésico. Por tanto, el orden de potencia de estos fármacos para producir su efecto analgésico (haloperidol > metabolito II > metabolito I > metabolito III inactivo) se correlaciona con su afinidad por los receptores  $\sigma_1$  (Tabla I y Fig. 2).<sup>44</sup> En cambio, los efectos analgésicos del haloperidol y su metabolitos no parecen deberse a un bloqueo dopaminérgico, ya que la (-)sulpirida (un bloqueante dopaminérgico sin

afinidad por los receptores  $\sigma$ ) fue inactiva en ambas fases (Tabla I y Fig. 2).<sup>44</sup> Los efectos analgésicos del haloperidol y sus metabolitos tampoco se deben a la activación directa de los receptores opioides ni a la potenciación del efecto de un sistema endógeno opioide tónicamente activo, puesto que la naloxona (un antagonista opioide) no antagonizó sus efectos analgésicos.<sup>44</sup>

También estudiamos los efectos de BD-1047, BD-1063 y NE-100 en este modelo y observamos que la administración s.c. de es-

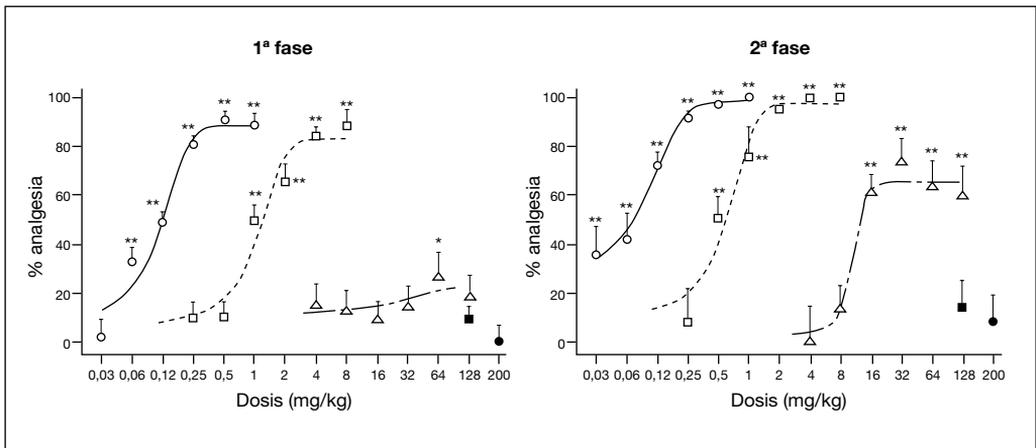


Figura 2. Comparación del efecto analgésico inducido por la administración s.c. de haloperidol (0,03-1 mg/kg) (○), su metabolito II (0,25-8 mg/kg) (□), su metabolito I (4-128 mg/kg) (△) y su metabolito III (128 mg/kg) (■), y de (-)sulpirida (200 mg/kg) (●), en el modelo de la formalina en el ratón. Cada uno de los puntos y las líneas verticales que los atraviesan representan la media  $\pm$  ESM de los valores obtenidos al menos en ocho animales por dosis. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo tratado con solvente: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (ANOVA seguido del test de Newman Keuls).

tos antagonistas de los receptores  $\sigma_1$ <sup>45-47</sup> produjo un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis en ambas fases de la respuesta dolorosa inducida por la inyección de formalina, siendo mayor el efecto en la segunda fase.<sup>48</sup> Estos resultados están en total concordancia con los obtenidos con el haloperidol y sus metabolitos.

Sin embargo, la administración local (intraplantar) de BD-1063 no tuvo ningún efecto sobre la respuesta dolorosa inducida por la inyección de formalina en la misma pata, mientras que la morfina, usada como control, inhibió ambas fases ipsilateralmente, pero no cuando fue inyectada en la pata contralateral.<sup>49</sup> Estos datos indican que el efecto de los antagonistas  $\sigma_1$  administrados por vía sistémica no se produce en los nociceptores periféricos sino en los nociceptores situados en estructuras espinales o supraespinales, y en áreas espinales o supraespinales. De hecho,

otros autores han comprobado que la administración espinal de antagonistas  $\sigma_1$  bloquea las respuestas dolorosas en la segunda fase, pero no la primera, señalando la importancia de los receptores  $\sigma_1$  espinales en la segunda fase del dolor inducido por formalina.<sup>50</sup>

#### ESTUDIOS CON AGONISTAS DE LOS RECEPTORES $\sigma_1$

Como agonistas de los receptores  $\sigma_1$  se emplearon (+)pentazocina y PRE-084.<sup>45-47</sup> Ni la administración s.c. de (+)pentazocina ni la de PRE-084 produjo efecto analgésico en ninguna de las fases. Como fármaco control de la estereoselectividad de la (+)pentazocina hacia el receptor  $\sigma_1$  evaluamos varias dosis s.c. de (-)pentazocina, que muestra afinidad por el receptor opioide  $\kappa$ , pero no por el  $\sigma_1$ ,<sup>51</sup> y como era de esperar produjo una reducción en el tiempo de lamido de la pata inyectada en ambas fases del modelo.

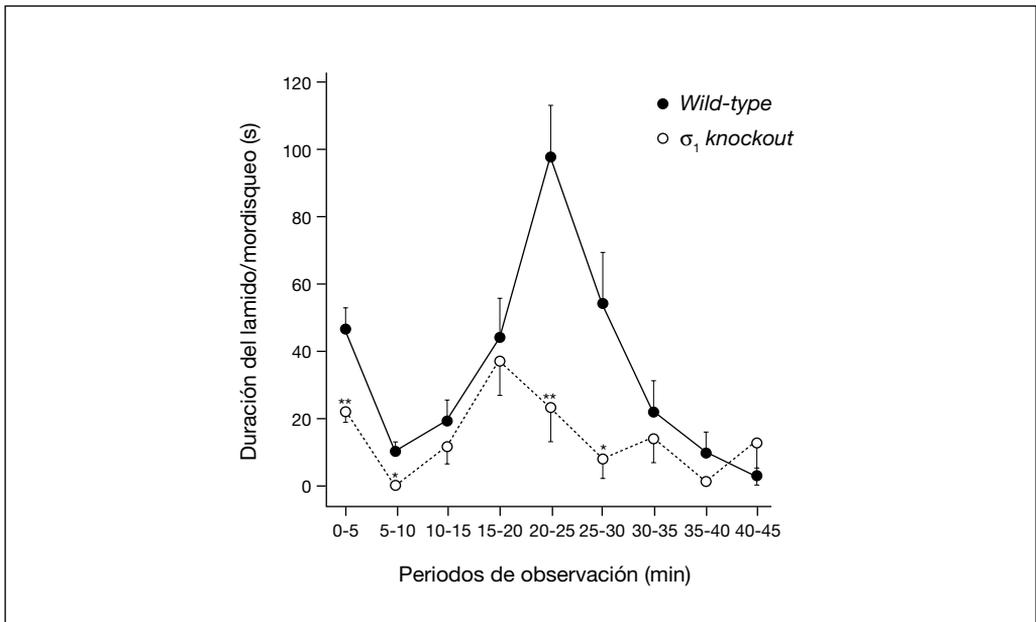


Figura 3. Curso temporal de la respuesta dolorosa (duración del lamido o mordisqueo de la pata tratada) inducida por la inyección intraplantar de formalina al 1,25% en animales deficientes en el receptor  $\sigma_1$  (knockout) y en animales salvajes (wild-type). Cada uno de los puntos y las líneas verticales que los atraviesan representan la media  $\pm$  ESM de los valores obtenidos al menos en ocho animales por grupo. Diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas en los dos genotipos de ratones: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (test de la t de Student).

ESTUDIOS EN ANIMALES DEFICIENTES EN RECEPTORES  $\sigma_1$  Y TRATADOS CON ODN FRENTE AL RECEPTOR  $\sigma_1$

Los datos anteriormente expuestos sugieren que el bloqueo de los receptores  $\sigma_1$  podría ser una estrategia adecuada para el control de ciertos tipos de dolor tónico, y permite hipotetizar que los ratones tratados con ODN frente al receptor  $\sigma_1$  mostrarían una menor sensibilidad al dolor inducido por la formalina. Los mismos resultados serían previsible en los ratones desprovistos (*knockout*) de receptores  $\sigma_1$ , salvo que se desarrollen mecanismos adaptativos que compensen el déficit crónico de los receptores  $\sigma_1$ .

Así, cuando administramos formalina a ratones *knockout*  $\sigma_1$  encontramos que la respuesta dolorosa en ambas fases se reducía en un 55%, aproximadamente, en comparación con los animales salvajes<sup>52</sup> (Fig. 3), y que la administración de ODN frente al receptor  $\sigma_1$  no modificaba el efecto de la formalina en ninguna de las dos fases.<sup>49</sup> Por tanto, estos resultados en animales *knockout*  $\sigma_1$  sugieren que los receptores  $\sigma_1$  participan en la expresión del dolor inducido por formalina, pero que además tiene que haber otros mecanismos implicados; y la falta de eficacia de los ODN para reducir la respuesta dolorosa señalaría que los receptores  $\sigma_1$  espinales son más importantes que los supraespinales.

**Agradecimientos**

Quisiera agradecer a los miembros del grupo Neurofarmacología del Dolor, José Miguel Pujalte, Enrique Cobos, José Manuel Entrena y Francisco Nieto, así como al Dr. Enrique Portillo, su inestimable ayuda en la obtención de muchos de los datos expuestos en este capítulo. Por último, expresar mi agradecimiento al Dr. José Manuel Baeyens por sus útiles comentarios y consejos para la redacción del presente trabajo.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of

morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*. 1977;4:161-74.

2. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992;51:5-17.

3. Porro CA, Cavazzuti M. Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. *Prog Neurobiol*. 1993;41:565-607.

4. Sawynok J, Liu XJ. The formalin test: characteristics and usefulness of the model. *Rev Analg*. 2004;7:145-63.

5. Hunskaar S, Fasmer OB, Hole K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods*. 1985;14:69-76.

6. Murray CW, Porreca F, Cowan A. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. *J Pharmacol Methods*. 1988;20:175-86.

7. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*. 1989;38:347-52.

8. Puig S, Sorkin LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain*. 1996;64:345-55.

9. Dallel R, Raboisson P, Clavelou P, Saade M, Woda A. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. *Pain*. 1995;61:11-6.

10. Wheeler-Aceto H, Cowan A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology (Berl)*. 1991;104:35-44.

11. Haley JE, Sullivan AF, Dickenson AH. Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. *Brain Res*. 1990;518:218-26.

12. Doak GJ, Sawynok J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience*. 1997;80:939-49.

13. Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience*. 2001;102:937-44.

14. Jarvis MF, Wismer CT, Schweitzer E, Yu H, van Biesen T, Lynch KJ, et al. Modulation of BzATP and formalin induced nociception: attenuation by the P2X receptor antagonist, TNP-ATP and enhancement by the P2X(3) allosteric modulator, cibacron blue. *Br J Pharmacol*. 2001;132:259-69.

15. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:13525-30.
16. Macpherson LJ, Xiao B, Kwan KY, Petrus MJ, Dubin AE, Hwang S, et al. An ion channel essential for sensing chemical damage. *J Neurosci*. 2007;27:11412-5.
- 17.Coderre TJ, Melzack R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci*. 1992;12:3665-70.
18. Abbott FV, Hong Y, Blier P. Activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. *Neuropharmacology*. 1996;35:99-110.
19. Chapman V, Dickenson AH. The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. *Eur J Pharmacol*. 1992;219:427-33.
20. Correa CR, Calixto JB. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br J Pharmacol*. 1993;110:193-8.
21. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987;30:103-14.
22. Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res*. 1990;535:155-8.
23. Dickenson AH, Sullivan AF. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain*. 1987;30:349-60.
24. Yamamoto T, Yaksh TL. Comparison of the antinociceptive effects of pre- and posttreatment with intrathecal morphine and MK801, an NMDA antagonist, on the formalin test in the rat. *Anesthesiology*. 1992;77:757-63.
25. Murray CW, Cowan A, Larson AA. Neurokinin and NMDA antagonists (but not a kainic acid antagonist) are antinociceptive in the mouse formalin model. *Pain*. 1991;44:179-85.
26. Yamamoto T, Yaksh TL. Stereospecific effects of a nonpeptidic NK1 selective antagonist, CP-96,345: antinociception in the absence of motor dysfunction. *Life Sci*. 1991;49:1955-63.
27. Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. *J Neurosci*. 1995;15:7575-84.
28. Dickenson AH, Sullivan AF. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. *Neurosci Lett*. 1987;83:207-11.
29. McCall WD, Tanner KD, Levine JD. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neurosci Lett*. 1996;208:45-8.
30. Coderre TJ, Yashpal K, Henry JL. Specific contribution of lumbar spinal mechanisms to persistent nociceptive responses in the formalin test. *Neuroreport*. 1994;5:1337-40.
31. Henry JL, Yashpal K, Pitcher GM, Coderre TJ. Physiological evidence that the 'interphase' in the formalin test is due to active inhibition. *Pain*. 1999;82:57-63.
32. Matthies BK, Franklin KB. Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine. *Pain*. 1992;51:199-206.
33. Kaneko M, Hammond DL. Role of spinal  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors in formalin-induced nociception in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;282:928-38.
34. Walker JM, Bowen WD, Walker FO, Matsumoto RR, De Costa B, Rice KC. Sigma receptors: biology and function. *Pharmacol Rev*. 1990;42:355-402.
35. Guitart X, Codony X, Monroy X. Sigma receptors: biology and therapeutic potential. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004;174:301-19.
36. Hanner M, Moebius FF, Flandorfer A, Knaus HG, Striessnig J, Kempner E, et al. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma<sub>1</sub>-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:8072-7.
37. Seth P, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning and structural analysis of the cDNA and the gene encoding the murine type 1 sigma receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;241:535-40.
38. Pan YX, Mei J, Xu J, Wan BL, Zuckerman A, Pasternak GW. Cloning and characterization of a mouse  $\sigma_1$  receptor. *J Neurochem*. 1998;70:2279-85.
39. Alonso G, Phan V, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, Anoaï M, et al. Immunocytochemical localization of the sigma<sub>1</sub>(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*. 2000;97:155-70.
40. Kitaichi K, Chabot JG, Moebius FF, Flandorfer A, Glossmann H, Quirion R. Expression of the purported sigma<sub>1</sub> ( $\sigma_1$ ) receptor in the mammalian brain and its possible relevance in deficits induced by antagonism of the NMDA receptor complex as revealed using an antisense strategy. *J Chem Neuroanat*. 2000;20:375-87.

41. Mei J, Pasternak GW.  $\sigma_1$  receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;300:1070-4.
42. Chaplan SR, MalMBERG AB, Yaksh TL. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;280:829-38.
43. Monnet FP, Debonnel G, Bergeron R, Gronier B, De Montigny C. The effects of sigma ligands and of neuropeptide Y on N-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation of CA<sub>3</sub> dorsal hippocampus neurones are differentially affected by pertussin toxin. *Br J Pharmacol.* 1994;112:709-15.
44. Cendán CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Baeyens JM. Antinociceptive effects of haloperidol and its metabolites in the formalin test in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2005;182:485-93.
45. Cobos EJ, Baeyens JM, Del Pozo E. Phenytoin differentially modulates the affinity of agonist and antagonist ligands for  $\sigma_1$  receptors of guinea pig brain. *Synapse.* 2005;55:192-5.
46. Cobos EJ, Lucena G, Baeyens JM, Del Pozo E. Differences in the allosteric modulation by phenytoin of the binding properties of the  $\sigma_1$  ligands [<sup>3</sup>H](+)-pentazocine and [<sup>3</sup>H]NE-100. *Synapse.* 2006;59:152-61.
47. Cobos EJ, Del Pozo E, Baeyens JM. Irreversible blockade of sigma-1 receptors by haloperidol and its metabolites in guinea pig brain and SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 2007;102:812-25.
48. Pujalte JM, Cendán CM, Baeyens JM. Antinociceptive effects of  $\sigma_1$  receptor antagonists in the formalin test. *Meth Find Exp Clin Pharmacol.* 2002;24:111.
49. Kroner A, Arce A, Nieto FR, Cendán CM, Pujalte JM, Baeyens JM. Effects of  $\sigma$  receptor ligands and  $\sigma_1$  receptor antisense oligodeoxynucleotides in the formalin test in mice. *Meth Find Exp Clin Pharmacol.* 2004;26:129.
50. Kim HW, Kwon YB, Roh DH, Yoon SY, Han HJ, Kim KW, et al. Intrathecal treatment with  $\sigma_1$  receptor antagonists reduces formalin-induced phosphorylation of NMDA receptor subunit 1 and the second phase of formalin test in mice. *Br J Pharmacol.* 2006;148:490-8.
51. Chien CC, Pasternak GW. (-)-Pentazocine analgesia in mice: interactions with a sigma receptor system. *Eur J Pharmacol.* 1995;294:303-8.
52. Cendán CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Montoliu L, Baeyens JM. Formalin-induced pain is reduced in  $\sigma_1$  receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol.* 2005;511:73-4.

## DISCUSIÓN

**M.J. SANZ:** Respecto a la potenciación observada entre antagonistas  $\sigma_1$  y morfina, ¿habéis probado combinar dosis subóptimas de morfina y haloperidol para conseguir un mayor efecto inhibitorio?

**J.M. BAEYENS:** Sí, pero en el modelo de retirada de la cola (*tail flick*), no en el de la formalina. Utilizamos dosis de morfina de 1 mg/kg, que prácticamente no tienen efecto analgésico, junto con dosis muy bajas de haloperidol, y observamos la potenciación.

**M.J. SANZ:** Respecto a los oligonucleótidos antisentido, no he visto casi ningún modelo que haya funcionado, por su dificultad, porque son sustancias muy solubles...

**C.M. CENDÁN:** En el modelo de la formalina no han mostrado buenos resultados. Sin embar-

go, en alodinia mecánica inducida por capsaicina han sido muy efectivos.

**M.J. SANZ:** ¿Cómo penetran en la célula? ¿Mediante liposomas?

**C.M. CENDÁN:** Mediante una inyección intracerebroventricular.

**A.M. PLANAS:** ¿Evaluásteis si la concentración de proteína estaba reducida para verificar que los oligodesoxinucleótidos hubiesen funcionado?

**C.M. CENDÁN:** No, porque otros autores ya lo habían demostrado previamente utilizando los mismos oligodesoxinucleótidos a las mismas dosis. Al ser efectivos en otros modelos, las diferencias observadas tenían que deberse al modelo de la formalina.