

Sinergismo de la cafeína sobre los efectos antinociceptivos del metamizol

María Irene Díaz-Reval,* Renato Galván-Orozco,*
Francisco Javier López-Muñoz,** Norma Carrillo-Munguía*

Resumen

Introducción: Las combinaciones de analgésicos se han utilizado como una opción conveniente para el tratamiento del dolor, ya que existen algunos tipos de dolor que no son fáciles de aliviar con los analgésicos convencionales. Este tipo de fármacos se combinan con otros de su misma clase o con adyuvantes que no son analgésicos; dentro de estos últimos se encuentra la cafeína. El objetivo de este estudio fue determinar si en el modelo de la formalina, la cafeína es capaz de potenciar el efecto antinociceptivo del metamizol.

Resultados: El metamizol en el modelo de la formalina presentó efecto antinociceptivo dependiente de la dosis, con una $DE_{50} = 329.61$ mg/kg. La cafeína en dosis de 3.16, 10, 17.8 y 31.6 mg/kg también mostró efecto antinociceptivo; al combinar la dosis subefectiva de metamizol (100 mg/kg) con las cuatro diferentes dosis de cafeína, se observó que el efecto antinociceptivo se incrementó, encontrándose potenciación con la combinación metamizol 100 mg/kg + cafeína 3.16 mg/kg y suma con la combinación de metamizol 100 mg/kg + cafeína 31.6 mg/kg; las dos restantes presentaron sinergismo infraaditivo.

Conclusiones: El efecto del metamizol cambia cuando se combina con la cafeína en un modelo de dolor inflamatorio, en el cual la cafeína también efecto antinociceptivo.

Palabras clave: Dolor, metamizol, cafeína, potenciación, antinocicepción.

Summary

Background: Combinations of analgesic drugs have been used as an option for treating pain because some types of pain are difficult to relieve with conventional analgesics. This group of drugs has been combined with analgesics or drugs without analgesic effect and is called adjuvant. One such drug is caffeine. We undertook the present study to analyze if caffeine is able to potentiate the antinociceptive effect of metamizole in the formalin model.

Results: Metamizole produced a dose-dependent antinociceptive effect with $SD_{50} = 329.61$ mg/kg in the formalin model. Caffeine at the following doses (3.16, 10.0, 17.8 and 31.6 mg/kg) also showed antinociceptive effect. When a subeffective dose of metamizole (100 mg/kg) was combined with caffeine (3.16, 10.0, 17.8 or 31.6 mg/kg), higher antinociceptive effects were produced than the corresponding effects produced by metamizole alone. One combination presented potentiation effect; the other combination showed antinociceptive effect that was not different from the effects of metamizole alone. Two combinations showed an effect lower than the corresponding effect produced by metamizole alone.

Conclusions: Adjuvant caffeine is able to change the effect of metamizole in the inflammatory pain model, in which caffeine also presents an antinociceptive effect.

Key words: Pain, metamizole, caffeine, potentiation, antinociception.

Introducción

Si bien el dolor somático o visceral en algunas situaciones puede ser insoportable, es posible tratarlo con un analgésico antiinflamatorio no esteroideo (AINE) como el metamizol. Sin embargo, existen otros tipos de dolor intenso, que por su etiología activan mecanismos diferentes a los del dolor somático o visceral, como puede ser el neuropático, y cuyo manejo es muy difícil con cualquier tipo de analgésico, incluso con opioides, por lo que se recurre a otras alternativas entre las que se encuentran combinaciones de analgésicos o de analgésicos con adyuvantes, que se ha observado son eficaces.¹

Al combinar fármacos se puede obtener cualquiera de los casos de sinergismo, es decir, *aditivo*, *supraaditivo* o *infraaditivo*. El aditivo se refiere a que el efecto alcanzado con la combinación

* Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Colima, Colima.

** Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Sede Sur.

Solicitud de sobretiros:

María Irene Díaz-Reval,
Av. 25 de Julio número 965,
Col. Villa San Sebastián,
28045 Colima, Colima, México.
Tel.: (312) 316 1129, extensión 47407.
Fax: (312) 316 1129.
E-mail: idiazre@uocol.mx

Recibido para publicación: 25-05-2007

Aceptado para publicación: 28-08-2007

es igual a la suma de los efectos de los fármacos cuando se administran por separado; el supraaditivo es aquel donde el efecto de la combinación es mayor que la suma de los efectos de los fármacos en administración individual; el infraaditivo es cuando la combinación presenta un efecto menor al observado con la administración individual de los fármacos.² Estos casos de sinergismo se pueden presentar según los mecanismos de acción que desencadenen los fármacos combinados. Para el tratamiento del dolor lo que generalmente se busca es que las combinaciones den efectos de sinergismo supraaditivo, conocido también como *potenciación del efecto analgésico*.

Un adyuvante utilizado desde hace tiempo combinado con analgésicos es la cafeína, cuya principal actividad es como estimulante del sistema nervioso central; en humanos no se ha reportado que presente actividad analgésica *per se*.^{3,4} Una de las primeras formulaciones empleadas fue la de ácido acetilsalicílico combinado con cafeína, de la que no se sabe con exactitud cuáles fueron las bases para realizarla. Posteriormente, Laska y colaboradores informaron que en humanos la cafeína potencia el efecto de ciertos AINE (ácido acetilsalicílico y paracetamol).⁵ Resultados similares han obtenido otros autores con analgésicos tales como tolmetin,⁶ ibuprofeno,⁷ ácido acetilsalicílico,⁸ paracetamol,⁹ ketoprofeno,¹⁰ en modelos experimentales de dolor. Investigaciones en un modelo de artritis gotosa han determinado que la potenciación se presenta solo para algunas dosis de analgésico y de cafeína, por lo que no puede decirse que al combinar cafeína con AINE siempre se presente potenciación, ya que puede en ciertos casos haber sinergismo aditivo o incluso infraaditivo. El propósito del presente estudio fue determinar si en el modelo de la formalina, la cafeína es capaz de potenciar o modificar el efecto antinociceptivo del metamizol.

Material y métodos

Los experimentos se realizaron con ratas macho Wistar, obtenidas de nuestro bioterio, con un peso promedio de 200 a 220 g, se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y temperatura de 25 °C. A todos los animales se les retiró el alimento 12 horas antes del experimento, pero tuvieron libre acceso al agua. Todos los experimentos se realizaron siguiendo las recomendaciones del Comité de Investigación y Ética de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor,¹¹ los lineamientos y estándares éticos para la Investigación del Dolor Experimental en Animales¹² y las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Secretaría Mexicana de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (NOM-062-ZOO-1999), así como los lineamientos del Comité de Ética Local para Manejo de Animales.

El modelo de la formalina se utilizó para evaluar el efecto antinociceptivo; este modelo consiste en la administración de 50 µl de formalina a 2 % en la región subplantar de una extremidad

traseña de la rata.¹³ Inmediatamente los animales se colocaron en cámaras de observación para registrar las conductas nociceptivas. En esta investigación, las conductas que se evaluaron fueron las sacudidas de la extremidad administrada, registrándose cada cinco minutos en un periodo total de una hora. Este modelo de dolor es bifásico, es decir, inmediatamente después de la administración de la formalina la rata presenta las conductas nociceptivas por un periodo de 0 a 15 minutos, posteriormente hay ausencia de dichas conductas, aproximadamente por 5 minutos, y de los 20 a 60 minutos nuevamente se presentan las sacudidas, esto da como resultado un curso temporal con dos fases. En este estudio solo se analizó el efecto en la segunda fase del modelo de la formalina.

El metamizol se administró por vía oral en dosis de 100, 215, 457.1 y 1000 mg/kg, 30 minutos antes de la formalina; cada dosis se aplicó a un grupo de seis ratas. La cafeína se suministró por vía oral 30 minutos antes de la formalina en dosis de 3.16, 10, 17.8 y 31.6 mg/kg. Posteriormente a otro grupo de ratas se le dio la combinación de ambos fármacos, utilizando el metamizol en la dosis de 100 mg/kg y cafeína en las dosis de 3.16, 10 y 17.8 mg/kg. Para cada uno de los grupos se realizó un control, el cual consistió en la administración de solución salina fisiológica, vehículo con el que se suministraron los fármacos y el cual se aplicó en condiciones similares que el metamizol, la cafeína o la combinación de ambos.

Los resultados se calcularon a partir del curso temporal obtenido al registrar las conductas nociceptivas; de cada curso temporal se calcularon las áreas bajo la curva (ABC) por el método de los trapecios, y finalmente se determinó el porcentaje de máxima respuesta esperada (% MRE), que se considera el porcentaje de efecto antinociceptivo, el cual se calcula de la siguiente forma:

$$\% \text{ MRE} = \left[\frac{ABC_F - ABC_C}{ABC_C} \right] \left[100 \right]$$

Donde:

% MRE = porcentaje de máxima respuesta esperada

ABC_F = área bajo la curva del curso temporal del grupo al que se le administró el fármaco

ABC_C = área bajo la curva del curso temporal del grupo control

Los valores se expresan como la media de seis determinaciones ± error estándar. El análisis estadístico se realizó con t de Student, considerando el resultado estadísticamente significativo con una $p < 0.05$.

Resultados

En este estudio se analizó el efecto antinociceptivo del metamizol y de la cafeína en el modelo de la formalina; los resultados se muestran en la figura 1. Se presentan las curvas dosis respues-

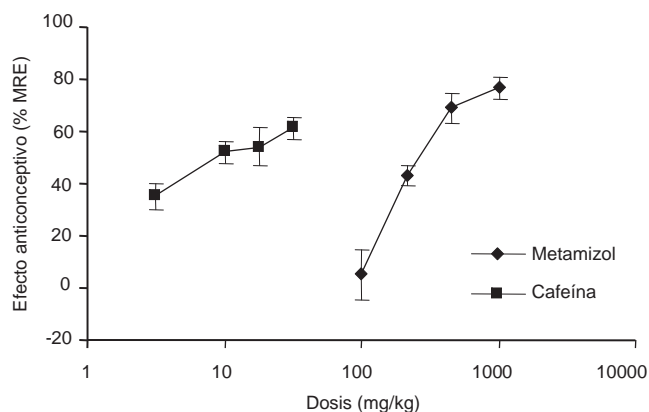


Figura 1. Curvas dosis-respuesta del efecto antinociceptivo expresado como porcentaje de máxima respuesta esperada (% MRE) de metamizol (100, 213.79, 457.10 y 1000 mg/kg) y cafeína (3.16, 10, 17.8 y 31.6 mg/kg). Para el metamizol se observó un efecto dosis-dependiente; la cafeína mostró un efecto que con las dosis de 10 a 31.6 mg/kg fue muy parecido. Cada punto representa el promedio del efecto para cada dosis, con una $n = 6 \pm$ error estándar.

ta para ambos fármacos; el efecto antinociceptivo se calculó como % MRE. El efecto antinociceptivo de metamizol se analizó administrando el medicamento por vía oral en las dosis de 100, 213.8, 457.1 y 1000 mg/kg; a la dosis de 100 mg/kg, el metamizol no presentó efectos antinociceptivos ya que solo se alcanzó % MRE de 5.29 ± 9.67 . Sin embargo, el metamizol tuvo efectos dosis-dependientes, alcanzándose el máximo efecto con 1000 mg/kg (76.86 ± 4.22 %). Cabe aclarar que a esta dosis no se presentaron efectos adversos visibles. En estas condiciones experimentales se obtuvo para metamizol una $DE_{50} = 329.61$ mg/kg. La cafeína administrada en dosis de 3.16, 10, 17.8, y 31.6 mg/kg por vía oral presentó efectos antinociceptivos. La dosis de cafeína más baja presentó un efecto de 35.04 ± 4.86 %, que se incrementó con la dosis de 10 mg/kg a 51.93 ± 4.08 %, sin embargo, no hubo diferencia significativa de efectos entre ésta y las dos

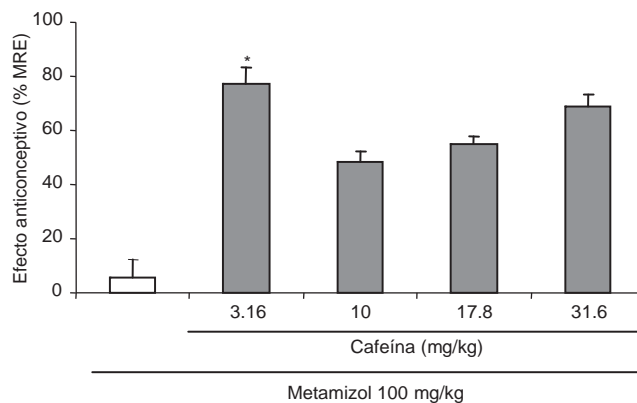


Figura 2. Efecto antinociceptivo expresado como porcentaje de máxima respuesta esperada (% MRE) para metamizol (100 mg/kg) y las combinaciones de metamizol + cafeína (3.16, 10, 17.8, 31.6 mg/kg). Comparando el efecto del metamizol solo con las combinaciones, éstas mostraron un gran incremento, sin embargo, solo la primera tuvo efecto de potenciación. Se grafica el promedio de seis determinaciones \pm error estándar.

dosis subsecuentes (54.08 ± 7.42 y 61.41 ± 4.3 % para 17.8 y 31.6 mg/kg, respectivamente). La cafeína también fue administrada a un grupo de animales en dosis de 100 mg/kg (datos no presentados), pero a esta dosis la actividad motora fue muy intensa, por lo que el efecto no se consideró antinociceptivo.

En la figura 2 se muestra el efecto alcanzado por los diferentes grupos de animales a los cuales se les administró la combinación de 100 mg/kg de metamizol con cada una de las dosis de cafeína utilizadas; el metamizol se administró en la dosis subefectiva debido a que se pretendía encontrar potenciación o adición de los efectos. En todos los casos el efecto del metamizol aumentó visiblemente en comparación a cuando se administró solo. Para la combinación metamizol 100 mg/kg + cafeína 3.16 mg/kg se obtuvo un efecto de 77.4 ± 6 %; para metamizol 100 mg/kg + cafeína 10 mg/kg el efecto fue de 48.06 ± 3.76 %; para metamizol

Cuadro I. Análisis de sinergismo de las combinaciones metamizol + cafeína

Fármaco	Dosis (mg/kg)	Efecto %	Suma teórica	Efecto experimental	Potenciación %
Cafeína	3.16	35.0 ± 4.8	40.33	77.4 ± 6	91.9
	10.0	51.9 ± 4.1	57.22	48.06 ± 3.7	0*
	17.8	54.1 ± 7.4	59.37	54.78 ± 3.2	0*
	31.6	61.4 ± 4.3	66.70	68.77 ± 4.6	0**
Metamizol	100.0	5.29 ± 9.6			

Suma teórica = suma algebraica de los efectos de los fármacos en administración simple.

Efecto experimental = efecto al administrar a las ratas las combinaciones.

*Combinaciones que presentaron antagonismo (efecto menor que la suma algebraica).

**Combinación que presentó adición (efecto no estadísticamente diferente de la suma algebraica).

10 mg/kg + cafeína 17.8 mg/kg el efecto antinociceptivo fue de 54.78 ± 3.27 %; para metamizol 100 mg/kg + 31.6 mg/kg se obtuvo 68.77 ± 4.66 %.

No obstante los efectos con estas combinaciones, solo se consiguió una potenciación, dos antagonismos y una suma (cuadro I), debido principalmente a que en este modelo experimental la cafeína sí presenta efecto antinociceptivo (como se observa en la figura 1 y como se estableció en el protocolo experimental); si el efecto de la combinación es igual a la suma de los efectos de los fármacos en administración simple tiene efecto aditivo; si el efecto de la combinación es mayor a la suma se considera potenciación; si el efecto es menor, el efecto se considera de antagonismo.

En la figura 3 se muestra la combinación con la cual se obtuvo potenciación del efecto antinociceptivo. En estas condiciones experimentales, el metamizol en la dosis de 100 mg/kg alcanzó un efecto de 5.29 ± 9.67 %, la cafeína en la dosis de 3.16 mg/kg alcanzó 35.04 ± 4.86 % y con la combinación el efecto se incrementó a 77.4 ± 6 %, que fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) comparado con el del metamizol solo y también mucho mayor que la suma teórica del efecto de las dos sustancias en administración simple (40.33 %), lo cual indica que el efecto fue de potenciación (de 91.9 %). Así mismo, se debe hacer notar que el efecto alcanzado con esta combinación fue similar al obtenido con la dosis más alta de metamizol que se administró en este estudio (1000 mg/kg), la cual presentó un efecto de 76.86 ± 4.22 %.

Discusión

El modelo de la formalina es representativo del dolor inflamatorio;¹³ la respuesta evaluada fue la sacudida de la extremidad administrada. En este modelo existe la característica de que se

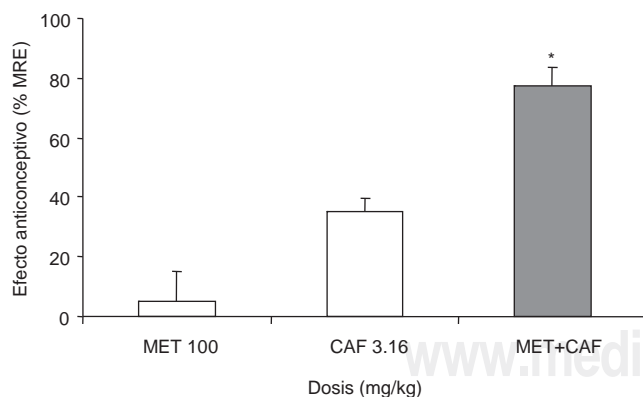


Figura 3. Efecto antinociceptivo (% MRE) de metamizol (100 mg/kg) y cafeína (3.16 mg/kg) en administración simple y de la combinación de ambos en las mismas dosis. Los efectos de los fármacos solos es mínimo, y cuando se administran en combinación aumentan significativamente, encontrándose una potenciación de 91.9 %.

presenta una serie de conductas inmediatamente después de la administración de formalina, debido a la estimulación directa de los nociceptores; hay un periodo de reposo aproximadamente entre los minutos 10 y 15 después de la administración de formalina y nuevamente aparecen las conductas a partir del minuto 15 hasta los 60 minutos, tiempo total de observación. Se ha reportado que en esta segunda fase hay liberación de mediadores inflamatorios y del dolor,¹⁴ por lo que es aquí cuando principalmente se observa el efecto de los AINE. Por esta razón, los resultados presentados corresponden únicamente a la segunda fase del modelo.

La cafeína es un estimulante del sistema nervioso central, sin embargo, en algunos modelos experimentales de dolor se ha observado que tiene efecto antinociceptivo intrínseco, como en los de plancha caliente y el de la formalina.¹⁵ En nuestras condiciones experimentales, la cafeína también tuvo efecto antinociceptivo, a diferencia del estudio de Sawynok y colaboradores quienes solo observaron dicho efecto en dosis entre 12.5 y 75 mg/kg; en este estudio se encontró en dosis mucho menor: 3.16 a 31.6 mg/kg. Esto se puede explicar debido a que en esa otra investigación la formalina se administró en una concentración de 5 % y en este estudio fue de 2 %, lo cual indica que el grado de dolor probablemente es mucho menor con esta concentración. Así mismo, se administró la dosis de 100 mg/kg pero, como ya se ha reportado por diversos autores, a dosis altas la cafeína presenta incremento de la actividad locomotora, efecto que también se observó en nuestras condiciones experimentales, lo que imposibilita ver si las conductas nociceptivas realmente se inhiben o solo es que la rata camina mucho. En otros modelos experimentales de dolor como el PIFIR,¹⁰ Randall Sellito¹⁶ o estiramiento abdominal¹⁷ la cafeína no ha tenido efecto antinociceptivo. En humanos se ha encontrado que la cafeína tiene repercusión en el dolor de cabeza, efecto que es difícil de interpretar en modelos animales convencionales; por estas controversias tanto en animales como en humanos se dice que la cafeína es un adyuvante analgésico, que combinado con algunos AINE potencia el efecto de éstos. Tal potenciación en un inicio estuvo en controversia ya que algunos investigadores indicaban que no se presentaba,¹⁸ mientras que otros señalaban lo contrario.¹⁹

Estudios en el modelo PIFIR, en el cual se analizan curvas dosis respuesta de los analgésicos con dos o tres dosis de cafeína, han determinado que la potenciación inducida por cafeína solo es observable en algunas combinaciones, mientras que en otras puede dar efecto de suma o incluso de sinergismo infraaditivo. Estos resultados muestran que depende mucho de las dosis utilizadas para que se presente la potenciación.^{7,10}

El objetivo de analizar el efecto del metamizol en una dosis subefectiva combinado con cuatro diferentes dosis de cafeína fue porque como la cafeína también presenta efecto antinociceptivo en este modelo experimental, existía mayor posibilidad de encontrar potenciación del efecto. Los resultados mostraron una potenciación, una suma y dos antagonismos, que confirman que depende mucho de la relación de combinación para que se pre-

sente o no la potenciación o la suma, ya que este último efecto también es conveniente.

Dentro de las combinaciones de fármacos, otro objetivo de utilizar dosis subefectivas es determinar las dosis menores con la que se mejora el efecto y se reducen los efectos adversos, lo que también es de importancia en los tratamientos clínicos, más cuando se administran por periodos prolongados. En esta investigación, la potenciación se encontró con las dosis más bajas de ambos fármacos (3.16 mg/kg de cafeína + 100 mg/kg de metamizol), sin embargo al utilizar una dosis 10 veces más alta de cafeína con la misma de metamizol se encontró un sinergismo de suma.

Si bien es un tema de interés, en este estudio no se analizaron los efectos adversos; ya se están realizando los experimentos al respecto y más adelante se publicarán resultados. El objetivo tampoco incluyó el estudio de los mecanismos de acción, sin embargo, para algunas de las primeras combinaciones realizadas por otros autores se pensaba que podrían participar mecanismos farmacocinéticos,²⁰ debido a que la cafeína disminuye el pH gástrico y la absorción de los AINE podría verse incrementada al ser ácidos débiles. También se ha informado que la cafeína reduce el flujo sanguíneo hepático, lo que puede disminuir la biotransformación metabólica, estos y otros mecanismos podrían aumentar la disposición de los AINE en el órgano blanco, sin embargo, la cafeína no altera la farmacocinética de algunos AINE,²¹ por lo que actualmente los estudios se están enfocando a analizar mecanismos farmacodinámicos que puedan desencadenarse al combinar AINE con cafeína.²²

En las combinaciones de fármacos cuando se encuentra un sinergismo de potenciación generalmente ocurre porque cada fármaco está contribuyendo con diferentes mecanismos para que se presente ese efecto, aunque también existe la posibilidad de que la combinación active mecanismos diferentes a los generados por los fármacos solos, es decir, que se generen mecanismos nuevos que contribuyen a que el efecto se mejore. En el metamizol + cafeína, al no haber determinado experimentalmente los mecanismos por los cuales se presenta la potenciación, podemos analizarlos individuales de cada sustancia. Para metamizol está bien establecido que inhibe la síntesis de prostaglandinas, además de que es capaz de activar la vía Arg-ON-GMPc.²³

Los mecanismos activados por cafeína para generar las respuestas observadas en el sistema nervioso central están bien estudiados y comprenden el antagonismo sobre los receptores de adenosina (A₁ y A₂),^{3,4,24} además de inhibir las fosfodiesterasas e inducir la liberación de Ca²⁺.^{3,4,24}

Respecto al efecto antinociceptivo, se ha mencionado que la cafeína es un adyuvante analgésico porque no en todas las condiciones de dolor (ya sea en humanos o animales) presenta efectos antinociceptivos intrínsecos; en los modelos de plancha caliente y prueba de la formalina, la cafeína presenta efecto antinociceptivo. Sawynok y colaboradores¹⁵ reportaron que en el modelo de la plancha caliente intervienen vías noradrenérgicas

descendentes, mientras que en el de la formalina participan vías adrenérgicas y serotoninérgicas.²⁵ Por otra parte, en un modelo de dolor neuropático se informa efecto antinociceptivo con cafeína a altas concentraciones; se determinó que el receptor A_{2A} era el responsable.²⁶

Existen pocas evidencias sobre los mecanismos farmacodinámicos que generan la potenciación antinociceptiva. Se ha mencionado que la combinación de ketorolaco + cafeína activa la vía Arg-ON-GMPc, ya que al administrar el inhibidor de la sintasa del óxido nítrico (SON), la potenciación se revirtió.²² Estos estudios sugieren que ciertamente se están activando mecanismos farmacodinámicos para que se presente la potenciación, por lo que es de interés analizar los mecanismos participantes en combinaciones específicas.

En conclusión, el efecto antinociceptivo del metamizol cambia cuando se combina con la cafeína en un modelo de dolor inflamatorio, en el cual la cafeína también presenta efecto antinociceptivo.

Agradecimientos

Este proyecto fue apoyado por el programa de mejoramiento al profesorado (PROMEP), y fue desarrollado como parte de la tesis de licenciatura del químico farmacobiólogo Renato Galván Orozco, de la Universidad de Colima.

Referencias

1. Brandes JL, Kudrow D, Stark SR, O'Carroll CP, Adelman JU, O'Donnell FJ, et al. Sumatriptan-naproxen for acute treatment of migraine: a randomized trial. *JAMA* 2007;297:1443-1454.
2. Tallarida RJ. Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:865-872.
3. Sawynok J, Yaksh TL. Caffeine as an analgesic adjuvant: a review of pharmacology and mechanisms of action. *Pharmacol Rev* 1993;45:43-75.
4. Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Rev* 1992;17:139-170.
5. Laska EM, Sunshine A, Mueller F, Elvers WB, Siegel C, Rubin A. Caffeine as an analgesic adjuvant. *JAMA* 1984;251:1711-1718.
6. Flores-Acevedo DM, Flores-Murrieta FJ, Castañeda-Hernández G, López-Muñoz FJ. Potentiation of the analgesic effect of tolmetin, a potent non-steroidal anti-inflammatory drug by caffeine in the rat. *Pharm Sci* 1995;1:441-444.
7. Medina-López JL, Domínguez-Ramírez AM, Jung CH, Bravo G, Díaz-Reval MI, Déciga-Campos M, et al. Enhancement of antinociception by co-administration of ibuprofen and caffeine in arthritic rats. *Eur J Pharmacol* 2006;544:31-38.
8. Castañeda-Hernández G, Castillo-Méndez MS, López-Muñoz FJ, Granados-Soto V, Flores-Murrieta FJ. Potentiation by caffeine of the analgesic effect of aspirin in the pain induced functional impairment model in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1994;72:1127-1131.
9. Granados-Soto V, López-Muñoz FJ, Castañeda-Hernández G, Salazar LA, Villarreal JE, Flores-Murrieta FJ. Characterization of the analgesic effects of paracetamol and caffeine in the pain-induced functional impairment model in the rat. *J Pharm Pharmacol* 1993;45:627-631.

10. Díaz-Reval MI, Ventura-Martínez R, Hernández-Delgadillo GP, Domínguez-Ramírez AM, López-Muñoz FJ. Effect of caffeine on antinociceptive action of ketoprofen in rats. *Arch Med Res* 2001;32:13-20.
11. Covino BG, Dubner R, Gybels J, et al. Ethical standards for investigations of experimental pain in animals. *Pain* 1980;9:141-143.
12. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-110.
13. Wheeler-Aceto H, Porreca F, Cowan A. The rat formalin test: comparison of noxious agents. *Pain* 1990;40:229-238.
14. Malmberg AB, Yaksh TL. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E₂ and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J Neurosci* 1995;15:2768-2776.
15. Sawynok J, Reid AR, Doak GJ. Caffeine antinociception in the rat hot plate and formalin test and locomotor stimulation: involvement of noradrenergic mechanisms. *Pain* 1995;61:203-213.
16. Engelhardt G, Mauz AB, Pairet M. Role of caffeine in combined analgesic drugs from the point of view of experimental pharmacology. *Arzneimittelforschung* 1997;47:917-927.
17. Filiap J, Porteix A, Marty H, Eschliet A, Duchéne-Marullaz. Lack of importance of caffeine as an analgesic adjuvant of dipyrone in mice. *Arch Int Pharmacodyn* 1989;302:86-96.
18. Moertel CG, Ahmann DL, Taylor WF, Schwartz N. Relief of pain by oral medications. A controlled evaluation of analgesic combinations. *JAMA* 1974;229:55-59.
19. Forbes JA, Beaver WT, Jones KF, et al. Effect of caffeine on ibuprofen analgesia in postoperative oral surgery pain. *Clin Pharmacol Ther* 1991;49:674-684.
20. Granados-Soto V, López-Muñoz FJ, Hong E, Flores-Murrieta FJ. Relationship between pharmacokinetics and the analgesic effect of ketorolac in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:352-356.
21. Hoyo-Vadillo C, Pérez-Urizar JT, García I, Villalón CM, Terrón JA, López-Muñoz FJ. Relationship between plasma levels of naproxen and analgesic efficacy in rats: synergism with caffeine. *Proc West Pharmacol Soc* 1994;37:91-92.
22. López-Muñoz FJ, Castañeda-Hernández G, Flores-Murrieta FJ, Granados-Soto V. Effect of caffeine coadministration and of nitric oxide synthesis inhibition on the antinociceptive action of ketorolac. *Eur J Pharmacol* 1996;308:275-277.
23. Duarte IDG, Dos Santos IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1992;217:225-227.
24. Serafin WE. Drugs used in the treatment of asthma. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, eds. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. New York: McGraw-Hill; 1996. pp. 659-679.
25. Sawynok J, Reid A. Neurotoxin-induced lesions to central serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems modify caffeine-induced antinociception in the formalin test and locomotor stimulation in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;277:646-653.
26. Wu WP, Hao JX, Fredholm BB, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ. Effect of acute and chronic administration of caffeine on pain-like behaviors in rats with partial sciatic nerve injury. *Neurosci Lett* 2006;402:164-166.