

Efectos de la ansiedad (inducida farmacológicamente) sobre la nocicepción

Dra. Guadalupe Jiménez-Velázquez,* Dr. Alonso Fernández-Guasti,* Dr. Francisco Javier López-Muñoz*

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

Solicitud de sobretiros:

Francisco J. López-Muñoz
Departamento de Farmacobiología.
CINVESTAV-Sede Sur,
Calz. Tenorios Núm. 235,
Col. Granjas Coapa,
14330, México, D.F.
Teléfono: (55) 5061 28 51
Fax: (55) 5061 2863
Correo electrónico: flopez@cinvestav.mx,
flopezm@prodigy.net.mx

Recibido para publicación: 14-11-05

Aceptado para publicación: 06-02-06

RESUMEN

Estudios preclínicos y clínicos han reportado una relación entre la ansiedad y la nocicepción. Datos clínicos muestran que la percepción al dolor se ve incrementada en situaciones estresantes, mientras que estudios en animales revelan que diversos estímulos ambientales que generan ansiedad pueden inducir antinocicepción. El objetivo en el presente trabajo fue determinar si existía alguna influencia de la ansiedad (inducida farmacológicamente) sobre la nocicepción evaluada en un modelo de dolor de tipo inflamatorio (modelo PIFIR). Los niveles de ansiedad experimental fueron determinados con la prueba de "Conducta defensiva de enterramiento", para esto se administró yohimbina, una sustancia ansiogénica. Para inducir nocicepción a las ratas se les administró 50 μ l de ácido úrico al 15%, suspendido en aceite mineral en la articulación femoro-tibio-rotular de la extremidad posterior derecha y se registró el índice de funcionalidad de la extremidad administrada. Quince minutos antes de que las ratas recibieran ácido úrico, se les administró 0.5, 1.0 y 2.0 mg/kg, i.p., de yohimbina. Se encontró que en la prueba de conducta defensiva de enterramiento, la yohimbina produjo un aumento en el tiempo acumulativo de enterramiento, lo que indica un aumento en la ansiedad. En el modelo PIFIR se observó que la yohimbina administrada sola, carece de efectos nociceptivos por sí misma. Sin embargo, los resultados mostraron que un aumento en la ansiedad previno la nocicepción inducida por la administración de ácido úrico. Este estudio muestra una interesante interacción entre la ansiedad y la nocicepción.

Palabras clave: Ansiedad, nocicepción, antinocicepción, yohimbina.

SUMMARY

Preclinical and clinical studies have reported relationships between anxiety and nociception. Clinical data have shown that the perception of pain increases under stress, whereas studies in animals revealed that diverse environmental stimuli that generate anxiety-like behaviors induce antinociception. This study was conducted to investigate the potential influence of pharmacologically induced-anxiety on nociception by using a model of inflammatory pain (PIFIR model). To induce experimental anxiety, yohimbine was administered to rats and its effect was measured through the rat burying behavior test. Nociception was induced by an intra-articular injection of 15% uric acid into the knee joint of the right hind limb. Yohimbine (0.5, 1.0 and 2.0 mg/kg, i.p.) was administered 15 min before the uric acid and the ability of the rat to use the injured hind limb was recorded. The burying behavior test showed that yohimbine caused a dose-dependent increase in the cumulative time of burying, which in turns indicates an increase in anxiety. Yohimbine, administered alone, was unable to produce nociception in the PIFIR model but effectively prevented the nociceptive actions of uric acid. The results showed an influence of anxiety on nociception since increased-anxiety (by yo-

himbine) prevented nociception. This study shows an interesting interaction between anxiety and nociception.

Key words: Anxiety, nociception, antinociception, yohimbine.

INTRODUCCIÓN

Estudios preclínicos y clínicos han encontrado una relación entre la ansiedad y la nocicepción. Esta propuesta ha sido abordada desde ambas perspectivas, es decir, a) el impacto de la nocicepción sobre conductas relacionadas a la ansiedad y b) la influencia de la ansiedad sobre la nocicepción. Los resultados enfocados a la segunda propuesta son variados y contradictorios. Estudios en humanos muestran una relación directa entre la ansiedad y la percepción del dolor⁽¹⁻⁴⁾. Múltiples estudios han confirmado un efecto de la ansiedad sobre pacientes con dolor agudo⁽⁵⁻⁷⁾ o dolor crónico⁽⁸⁻¹¹⁾. Mientras que estudios en animales muestran que una variedad de estímulos ambientales que generan ansiedad activan diferentes tipos de antinocicepción⁽¹²⁻²²⁾.

Ha sido propuesto que la antinocicepción disparada medio-ambientalmente tiene un valor adaptativo y forma parte del repertorio defensivo de muchas especies de animales. Se ha visto de manera importante, que este tipo de antinocicepción puede bloquearse por un rango de ansiolíticos tradicionales como benzodiacepinas⁽²³⁾, y por otros ansiolíticos como buspirona, gepirona, ipsapirona y 8-hydroxy-2-di-n-propylamino tetralin (8-OH-DPAT, un agonista 5-HT_{1A})⁽¹⁵⁾. Entonces, manipulaciones que son capaces de reducir el miedo o la ansiedad atenúan la antinocicepción inducida por situaciones estresantes. Estas evidencias soportan la hipótesis de que ambos: ansiedad y nocicepción, pueden involucrar mecanismos similares. La yohimbina es un antagonista competitivo selectivo para receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos y también un antagonista de serotonina, y es un agente ansiogénico.

El modelo experimental "Disfunción inducida por dolor en rata", modelo PIFIR por sus siglas en inglés: "Pain-Induced Functional Impairment Model in the Rat"), es un modelo para valorar el efecto de sustancias analgésicas sobre dolor inflamatorio en ratas. Por lo que se genera en las ratas una condición o alteración relacionada con un padecimiento que afecta a parte de la población humana: la artritis de tipo gota⁽²⁴⁾. Además, por sus características metodológicas, este modelo experimental permite analizar la nocicepción siguiendo su curso temporal en un mismo animal por un período de tiempo relativamente largo. Con estos antecedentes, la hipótesis de nuestra investigación fue: "La ansiedad puede modificar la nocicepción generada en la rata en un modelo de dolor de tipo artritis gotosa". Por lo tanto el objetivo en este trabajo fue determinar si la ansiedad inducida por yohimbina (una droga ansiogénica) tiene alguna influencia en el dolor de tipo inflamatorio generado en el modelo experimental PIFIR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

En este estudio, se emplearon ratas Wistar macho con un peso de entre 180-200 g. Todo el desarrollo experimental fue llevado a cabo siguiendo las recomendaciones del Comité de Investigaciones y Ética de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor⁽²⁵⁾ y la Guía de Estándares Éticos para las Investigaciones del Dolor en Animales⁽²⁶⁾ y acordes a un protocolo aprobado por el Comité Local de Ética Animal. El número de animales empleados fue $n = 8$ por punto experimental (en total 72 ratas) y las condiciones de permanencia fueron controladas en un cuarto aclimatado a 22° C y con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno.

Sustancias y fármacos

Se preparó una suspensión de ácido úrico (Sigma. St. Louis MO, USA) al 15% en aceite mineral para ser administrado por vía intraarticular (i.art.). El principio activo yohimbina-HCl (Sigma St. Louis MO, USA), fue administrado por la vía intraperitoneal (i.p.), empleando como vehículo solución salina al 0.9%.

Medición de efectos ansiogénicos

Para evaluar la ansiedad se utilizó el modelo de "Conducta defensiva de enterramiento"⁽²⁷⁾. Cuatro días antes de los experimentos, los animales fueron aislados en cajas individuales. Se utilizaron jaulas de acrílico transparente (27 x 16 x 23 cm) que eran idénticas a las cajas hogar de las ratas. Para evaluar el estado de ansiedad que genera la yohimbina, se utilizó un electrodo de 7 cm de longitud, que se colocó en una de las paredes de la jaula y que sobresalía 2 cm del piso cubierto de aserrín. A través del electrodo se hizo circular una pequeña corriente eléctrica de 0.3 mA. A grupos de 8 animales se les administró 0, 0.5 y 1.0 mg/kg, i.p. de yohimbina, y treinta minutos después son evaluados en la prueba. Se coloca al animal dentro de la jaula, el cual al recibir la descarga, inicia conductas típicas de roedores de ocultar o enterrar un objeto que les resulte no familiar y potencialmente peligroso, en este caso el electrodo. Se observó la conducta de la rata por un período de 10 minutos, durante los cuales se midió el siguiente parámetro: la conducta acumulativa de enterramiento, es decir, el tiempo (seg) que el animal empleó enterrando el electrodo. Este parámetro re-

fleja los niveles de ansiedad del animal, de tal manera que una reducción o aumento en el tiempo acumulativo de enterramiento se interpreta como una reducción o aumento en los niveles de ansiedad, comparando siempre con animales control que recibieron sólo el vehículo y que fueron evaluados en las mismas condiciones.

Medición de actividad antinociceptiva

Para la evaluación de la actividad nociceptiva se utilizó el modelo experimental PIFIR⁽²⁴⁾. Bajo anestesia a las ratas se les administró 50 μ l de ácido úrico al 15% suspendido en aceite mineral, en la articulación (i.a.) femoro-tibio-rotular de la extremidad posterior derecha. Cuando los animales se recuperaron de la anestesia les fue adherido un electrodo en las plantas de ambas patas posteriores. Después fueron colocadas en un cilindro rotatorio, el cual giraba a 4 rpm, induciéndoles a caminar; registrando el tiempo de contacto de cada pata en el cilindro por un período de 2 minutos, cada media hora, durante 6.5 horas. Quince minutos antes de la administración de ácido úrico a grupos de 8 ratas, se les administró 0.5, 1.0 y 2.0 mg/kg i.p. de yohimbina para modificar el estado de ansiedad de los animales, o su vehículo solución salina. Se determinó el índice de funcionalidad % (IF%) y se graficaron los cursos temporales para obtener el área bajo la curva generada por cada dosis. Los datos que se obtuvieron en la prueba de ansiedad, así como los datos de los cursos temporales y las áreas bajo la curva obtenidos en el modelo PIFIR se analizaron por una ANOVA de una y dos vías, respectivamente, seguidos por la prueba de Dunnet. Cuando se analizaron sólo dos grupos se utilizó una prueba de t-Student. En todos los casos se consideró significancia estadística cuando $p < 0.05$. Los valores de ABC a partir de los cursos temporales fueron obtenidos por la metodología de áreas trapezoidales y tomando en cuenta el área del primer triángulo.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestran los efectos de la administración de yohimbina (0.5 y 1.0 mg/kg, i.p.) probadas en el modelo de "conducta de enterramiento defensivo". Se puede ver que la dosis de 1.0 mg/kg, i.p. produjo un incremento importante del tiempo acumulativo de enterramiento, siendo la diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó con el control ($p < 0.05$). Estos datos indican que la administración de yohimbina produjo un efecto ansiogénico en los animales de experimentación.

Empleando el modelo PIFIR se encontró que cuando se administró el vehículo de yohimbina (solución salina) 15 min antes de la administración de 50 μ l i.a. de aceite mineral (vehículo del ácido úrico: ♦), no se modifica la funcionali-

dad de la extremidad de las ratas, como era de esperar, y esto se evidencia al permanecer la funcionalidad alrededor del 100% a todo lo largo del experimento (6 h de observación). Sin embargo, cuando se administró el vehículo de yohimbina (solución salina) 15 min antes de la administración de 50 μ l de ácido úrico al 15% (□), se indujo una disfunción por nocicepción de la extremidad posterior derecha de la rata, indicando claramente que esta disfunción se produce sólo por el ácido úrico administrado y dicha disfunción se presentó de manera progresiva, alcanzando un grado considerable de disfunción a las 3.5 horas. Estos cursos temporales son mostrados en la figura 2. También en la misma figura se presentan los efectos que generó la yohimbina 0.5 (Δ), 1.0 (○) y 2.0 (*) mg/kg i.p.) cuando fue administrada 15 min antes del aceite mineral i.a., y se muestra que la yohimbina no generó alteración alguna del índice de funcionalidad, generando sólo un perfil de funcionalidad similar al que generó su mismo vehículo administrado antes del aceite mineral i.a. Por lo tanto, la administración i.p. de yohimbina (0.5, 1.0, 2.0 mg/kg) o su vehículo a animales tratados con aceite mineral i.a. no produjo cambios sobre el índice de funcionalidad, indicando que la yohimbina no produce nocicepción por sí misma.

Para determinar el efecto del estado de ansiedad sobre la nocicepción, la administración de las mismas dosis de yohimbina mencionadas anteriormente, pero ahora en forma previa a la administración de ácido úrico, sí previno o retardó la aparición de la disfunción de la extremidad de manera parcial. Estos resultados se observan claramente en la figura 3, que muestra los cursos temporales de los efectos de la administración de yohimbina (0.5, 1.0, 2.0 mg/kg, i.p.) en animales bajo nocicepción (ácido úrico al 15%), así como el efecto que tuvo el vehículo de yohimbina sobre la nocicepción generada por el ácido úrico en la misma condición experimental.

Dado que el área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales representa adecuadamente los efectos globales a través de las 6 horas de observación, en la figura 4 se muestran nuevamente los efectos globales mostrados ahora como el área bajo la curva (ABC) obtenidos de los cursos temporales. La comparación entre los grupos que recibieron sólo aceite mineral intraarticular y los que recibieron ácido úrico mostró diferencias altamente significativas ($p < 0.001$), mostrando que la nocicepción la produce el ácido úrico. Mientras que la comparación entre los grupos que recibieron ácido úrico y yohimbina con el grupo que recibió ácido úrico sin yohimbina, y sólo con el vehículo de yohimbina, mostraron también diferencias significativas ($p < 0.01$), estableciendo claramente que el estado de ansiedad (producido por el agente ansiogénico yohimbina) modifica la manifestación de nocicepción en estas condiciones experimentales en la rata. El análisis de ANOVA de dos vías

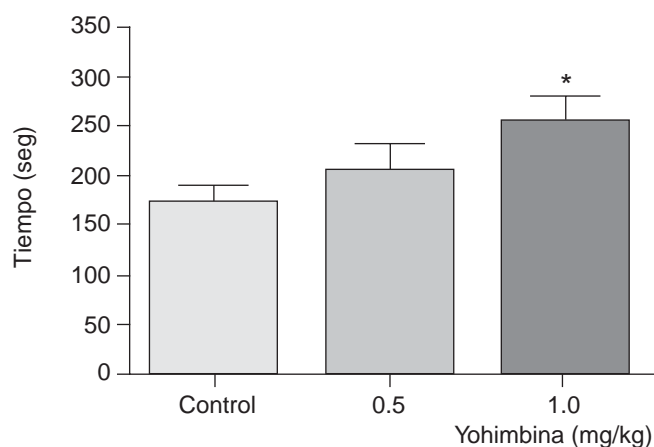


Figura 1. Efectos dosis-dependiente de yohimbina (0.5 y 1.0 mg/kg, i.p.) en el modelo experimental de "Conducta acumulativa de enterramiento" (ANOVA de una vía seguida de Dunnett* $p < 0.05$). Se puede ver que la dosis de 1.0 mg/kg, i.p. produjo un incremento importante del tiempo acumulativo de enterramiento, siendo la diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó con el control ($p < 0.05$), lo que indica que la administración de yohimbina produjo un efecto ansiogénico en esos animales de experimentación.

consideró el estado de nocicepción (aceite mineral o ácido úrico) y el estado ansiogénico (tratamiento con yohimbina) y la interacción entre estas variables mostró diferencias estadísticas significativas: para la nocicepción ($F(1,70) = 326.637$, $p < 0.001$), estado ansiogénico ($F(3,70) = 9.026$, $p < 0.001$) y para la interacción ($F(3,70) = 7.952$, $p < 0.001$). Estos resultados, ponen de manifiesto una posible relación entre la ansiedad y la nocicepción.

DISCUSIÓN

En este estudio fue empleado el modelo de "Conducta defensiva de enterramiento"⁽²⁷⁾ en rata, ya que ha demostrado en la literatura internacional especializada una correlación muy alta para determinar tanto los niveles de ansiedad en animales de laboratorio, como el efecto farmacológico de diversas sustancias sobre estados de ansiedad. Por lo que es un modelo experimental preclínico ampliamente usado y reportado actualmente en estudios de sustancias ansiogénicas y ansiolíticas. Por otra parte, el modelo experimental PIFIR ha demostrado ser una herramienta metodológica muy adecuada para analizar, evaluar y estudiar tanto el proceso de nocicepción o dolor, como la actividad antinociceptiva de sustancias (de origen sintético o natural) administradas en forma individual o combinada, así como para estudiar los mecanismos de acción involucrados en los efectos anal-

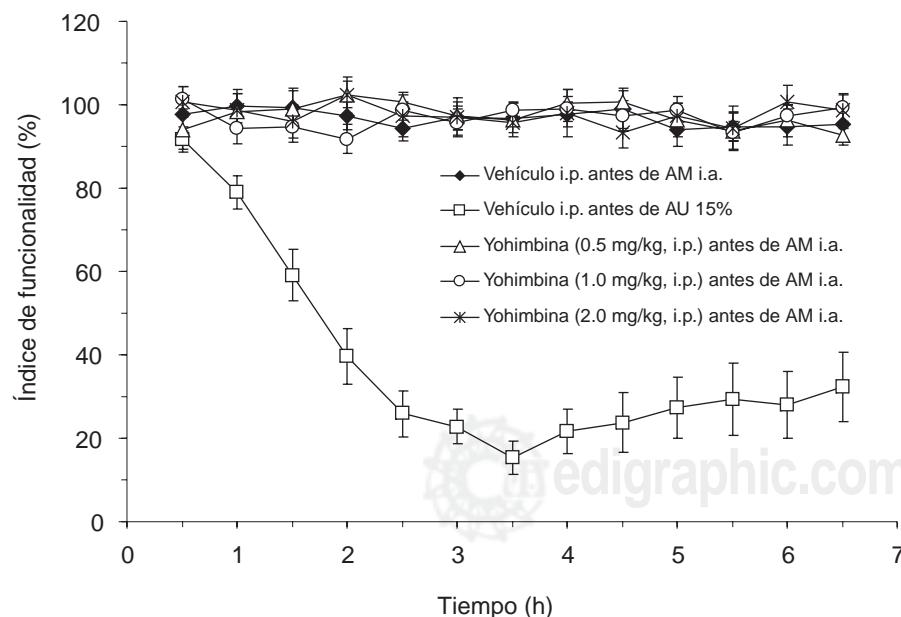


Figura 2. Cursos temporales, obtenidos en el modelo PIFIR, de efectos de las diferentes dosis de yohimbina 0.5 (Δ), 1.0 (\circ) y 2.0 ($*$) mg/kg i.p., y de su vehículo solución salina (\blacklozenge), administradas 15 minutos antes de la inyección i.a. de aceite mineral, así como efecto de ácido úrico i. a. (\square) $n = 8$. Se presenta la media \pm E.E. Cuando fue administrado el vehículo de yohimbina antes de la administración de aceite mineral (vehículo del ácido úrico: \blacklozenge), no se modificó la funcionalidad de la extremidad de las ratas. Cuando se administró el vehículo de yohimbina antes de la administración de ácido úrico (\square), se indujo una disfunción por nocicepción de la extremidad de la rata, indicando que la disfunción se produce por el ácido úrico. Yohimbina administrada antes del aceite mineral i.a., no generó alteración alguna del índice de funcionalidad, indicando que yohimbina por sí misma no produce nocicepción.

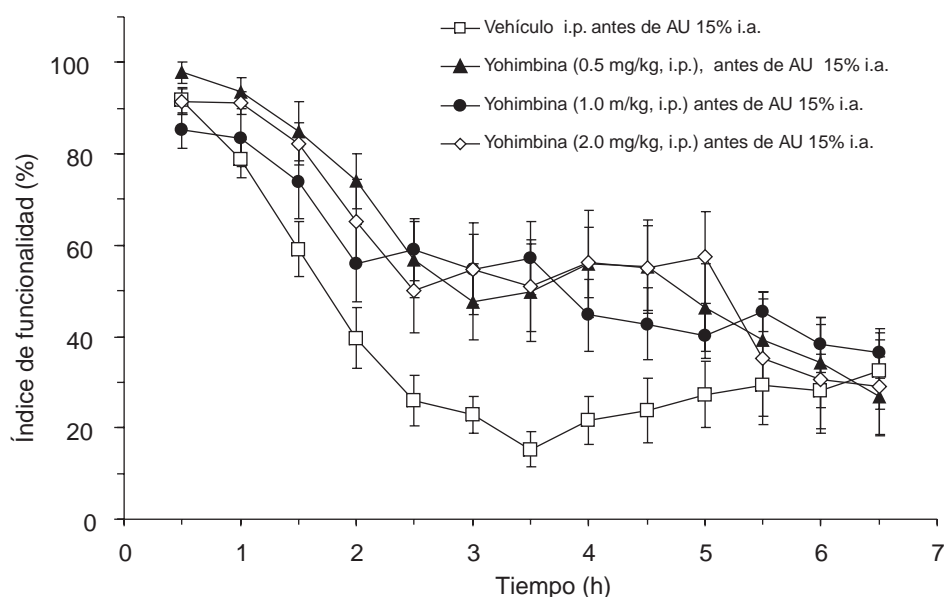


Figura 3. Cursos temporales de efectos de las diferentes dosis de yohimbina 0.5 (▲), 1.0 (●) y 2.0 (○) mg/kg i.p. y de su vehículo solución salina (□), aplicadas 15 minutos antes de la administración de ácido úrico al 15% i. a. $n = 8$. Es presentada la media \pm EE. Para determinar el efecto del estado de ansiedad sobre la nocicepción, la administración de yohimbina en forma previa a la administración de ácido úrico sí previno o retardó la aparición de la disfunción de la extremidad de manera parcial.

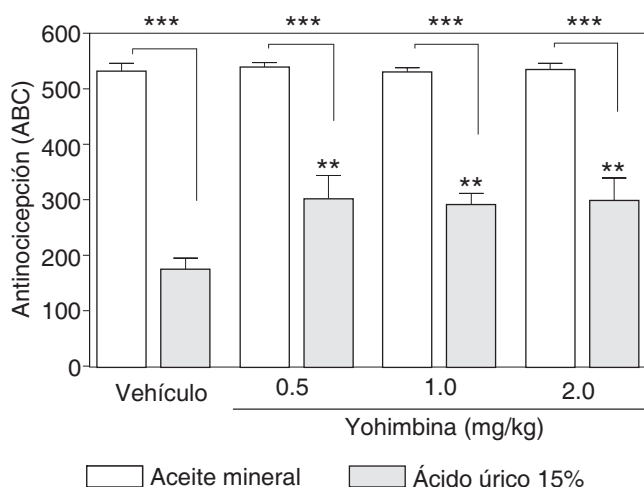


Figura 4. Áreas bajo la curva (ABC) de los efectos de yohimbina sobre la nocicepción inducida por la administración de ácido úrico i.a.. Las barras claras muestran a los animales tratados con aceite mineral (vehículo del ácido úrico) y las diferentes dosis de yohimbina. Las barras oscuras muestran a los grupos tratados con ácido úrico y diferentes dosis de yohimbina, $n = 8$, media \pm EE. El ABC de los cursos temporales representa adecuadamente los efectos globales a través de las 6 horas de evaluación. La comparación entre los grupos que recibieron sólo aceite mineral i.a. y los que recibieron ácido úrico mostraron diferencias, exhibiendo que la nocicepción la produce el ácido úrico. La comparación entre los grupos que recibieron ácido úrico y yohimbina con el grupo que recibió ácido úrico sin yohimbina, mostraron también diferencias significativas, estableciendo que el estado de ansiedad (producido por el agente ansiogénico yohimbina) modifica la manifestación de nocicepción en estas condiciones experimentales en la rata.

gésicos. Siendo uno de los modelos experimentales con mayor validez y confiabilidad, y evitando respuestas de aprendizaje y condicionamiento en los animales de laboratorio.

En este estudio encontramos que la administración de yohimbina (antagonista α_2 adrenérgico), previno la respuesta nociceptiva inducida por la administración intraarticular de ácido úrico al 15%. Interesantemente, observamos que cuando la yohimbina fue administrada sola, fue incapaz de modificar el índice de funcionalidad, permaneciendo alrededor del 100%. Nuestros datos son consistentes con estudios donde han observado que la yohimbina por sí misma carece de capacidad para producir nocicepción^(28,29). Sin embargo, recientemente otros estudios muestran que la yohimbina puede exhibir efectos analgésicos^(30,31). Estos estudios muestran la posibilidad de que la yohimbina por sí misma puede producir estos efectos analgésicos a través de otros mecanismos, aparte de su acción sobre los receptores adrenérgicos. Ya que la yohimbina también tiene afinidad por los receptores 5-HT_{1A}, se demostró que los efectos antinociceptivos de la misma pueden ser mediados en parte por su acción agonista sobre los receptores 5-HT_{1A} en la prueba de la formalina⁽³⁰⁾. De manera similar, se encontró que este fármaco produce efectos analgésicos, inhibiendo canales de Na⁺ sensibles y resistentes a tetrodotoxina, y al receptor VR1 vanilloide sensible a capsaicina⁽³¹⁾. Sin embargo, en ambos casos estos efectos de la yohimbina, sólo fueron observados cuando fue administrada en dosis altas (2.5-10 mg/kg). Estudios de *binding* sugieren que la yohimbina tiene mucho más afinidad por receptores adrenérgicos que por los canales de Na⁺ o por el receptor VR1 vanilloide⁽³¹⁾. Por lo tanto, la

yohimbina administrada en dosis bajas lleva a cabo sus efectos al actuar sobre los receptores α -adrenérgicos. En este estudio, la dosis más alta fue de 2.0 mg/kg, por lo que podemos sugerir que estos efectos pueden estar relacionados con sus efectos sobre la ansiedad^(32,33). De acuerdo con reportes previos⁽¹²⁻²²⁾, los resultados aquí obtenidos son consistentes con la propuesta antes descrita, y sugieren que la inducción de ansiedad aguda, aun por métodos farmacológicos resulta en efectos antinociceptivos.

CONCLUSIÓN

Estos resultados dan evidencias de que la ansiedad tiene efectos sobre la nocicepción inducida por ácido úrico al 15%. Estos resultados respaldan los datos que señalan que en los animales de experimentación la ansiedad puede producir antinocicepción. Sin embargo, se requieren de investigaciones posteriores que profundicen en los mecanismos involucrados en este tipo de efectos.

REFERENCIAS

1. Ploghaus A, Narain C, Beckmann CF, Clare S, Banticks S, Wise R, Matthews PM, Rawlins JNP, Tracey I. Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. *J Neurosci* 2001;21:9896-9903.
2. Schanberg LE, Sandstrom MJ, Starr K, Gil KM, Lefebvre JC, Keefe FJ, Affleck G, Tennen H. The relationship of daily mood and stressful events to symptoms in juvenile rheumatic disease. *Arthritis Care & Res* 2000;13:33-41.
3. Hadjistavropoulos HD, Asmundson GJG, Kowalyk KM. Measures of anxiety: is there a difference in their ability to predict functioning at three-month follow-up among pain patient? *Eur J Pain* 2003;1:11.
4. Das DA, Grimmer KA, Sparnon AL, Mcrae SE, Thomas BH. The efficacy of playing a virtual reality game in modulating pain for children with acute burn injuries: A randomized controlled trial. *BMC Pediatric* 2005;5:1-10.
5. Meagher MW, Arnau RC, Rhudy JL. Pain and emotion: effects of affective picture modulation. *Psychos Med* 2001;63:79-90.
6. Marchand S, Arsenault P. Odors modulate pain perception: a gender-specific effect. *Physiol Behav* 2002;76:251-256.
7. Villemure C, Slotnick BM, Bushnell MC. Effects of odors on pain perception: deciphering the roles of emotion and attention. *Pain* 2003;106:101-108.
8. Cornwall A, Donderi DC. The effect of experimentally induced anxiety on the experience of pressure pain. *Pain* 1988;35:105-113.
9. Jones A, Zacharie R, Arendt-Nielsen L. Dispositional anxiety and experience of pain: gender-specific effects. *Eur J Pain* 2003;7:387-395.
10. Vickers ER, Boocock H. Chronic orofacial pain associated with psychological morbidity and negative personality changes: a comparison to the general population. *Aust Dent J* 2005;50:21-30.
11. Christie W, Moore C. The impact of humor on patients with cancer. *Clin Oncol Nurs* 2005;9:211-218.
12. Kavaliers M, Innes D. Male Scent-Induced Analgesia in the Deer Mouse, *Peromyscus maniculatus*: Involvement of Benzodiazepine Systems. *Physiol & Behav* 1988;42:131-135.
13. Rodgers RJ, Randall JI. Benzodiazepines ligands, nociception and "defeat" analgesia in male mice. *Psychopharmacol* 1987 a;91:305-315.
14. Helmstetter FJ. Stress-induced hypoalgesia and defensive freezing are attenuated by application of diazepam to the amygdala. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;44:433-438.
15. Rodgers RJ, Shepherd JK. 5-HT_{1A} agonist, 8-hydroxy-2-(DI-n-propylamino)tetrinalin (8-OH-DPAT), inhibits non-opioid analgesia in defeated mice: influence of route of administration. *Psychopharmacol* 1989;97:163-165.
16. Teskey GC, Kavaliers M, Hirst M. Social conflict activates opioids analgesic and ingestive behaviors in male mice. *Life Sci* 1984;35:303-315.
17. Rodgers RJ, Lee C, Shepherd JK. Effects of diazepam on behavioral and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacol* 1992;106:102-110.
18. Lee C, Rodgers RJ. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacol* 1990;102:507-513.
19. Bellgowan PS, Helmstetter FJ. Neural systems for the expression of hypoalgesia during nonassociative fear. *Behav Neurosci* 1996;110:727-736.
20. Nunes-De-Souza RL, Canto-De-Souza A, Da-Costa M, Fornari FG, Péla IR. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacology* 2000;150:300-310.
21. Tershner SA, Helmstetter FJ. Antinociception produced by mu opioid receptor activation in the amygdala is partly dependent on activation of mu opioid and neurotensin receptors in the ventral periaqueductal gray. *Brain Res* 2000;865:17-26.
22. Vendruscolo LF, Pamplona FA, Takahashi RN. Strain and sex differences in the expression of nociceptive behavior and stress-induced analgesia in rats. *Brain Res* 2004;1033:277-283.
23. Rodgers RJ, Randall JI. Are analgesic effects of social defeat mediated by Benzodiazepine Receptors? *Physiol Behav* 1987 b;41:279-289.
24. López-Muñoz FJ, Castañeda-Hernández G, Villareal J, Salazar LA. A new model to assess analgesic activity: Pain-induced functional impairment in the rat (PIFIR). *Drug Dev Res* 1993;28:169-175.
25. Covino BG, Dubner R, Gybels J, Kosterlitz HW, Liebeskind JC, Stembach RA, Vyclicky L, Yamamura H, Zimmermann M. Ethical standards for investigations of experimental pain in animals. *Pain* 1980;9:141-143.
26. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-110.
27. Treit D. Animal models for study of anti-anxiety agents: A review. *Neurosci Biobehavior Rev* 1985;9:203-222.
28. Rowland M, Tozer TN. *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and applications*. 2nd Ed. Lea & Febiger: Philadelphia 1989.
29. Uchihashi Y, Kamei M, Fukuda I, Nakai T, Karasawa F, Satoh T. Effects of alpha adrenoreceptor antagonists, prazosin and yohimbine, on intrathecal lidocaine-induced antinociception in mice. *Acta Anaesthesiol Scand* 2000;44:1083-1086.
30. Dogrul A, Uzbay T. Topical clonidine antinociception. *Pain* 2004;111:385-391.
31. Shannon HJ, Lutz EA. Yohimbine produces antinociception in the formalin test in rats: involvement of serotonin (1A) receptors. *Psychopharmacol* 2000;149:93-97.
32. Dessaint J, Yu W, Krause JE, Yue L. Yohimbine inhibits firing activities of rat dorsal root ganglion neurons by blocking Na⁺ channels and vanilloid VR1 receptor. *Eur J Pharmacol* 2004;11:20.
33. Tanaka M, Yoshida M, Emoto H, Ishii H. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *Eur J Pharmacol* 2000;405:397-406.
34. Shah AA, Treit D. Infusion of midazolam into the medial prefrontal cortex produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze and shock-probe burying tests. *Brain Res* 2004;996:31-40.