AAQ 9922

TESIS ED2007 M3.

# UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN ESCUELA DE EDUCACIÓN BIOLOGÍA Y QUÍMICA

## ACCIÓN ESPINAL DEL SC 560, UN INHIBIDOR ESPECÍFICO DE LA CICLOOXIGENASA 1 (COX-1), SOBRE LA HIPEREXCITABILIDAD NEURONAL ESPINAL INDUCIDA POR INFLAMACIÓN

Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el titulo de Licenciada en Educación mención Biología y Química



Autora: Patricia Martínez Iglesias.

Tutor: Dr. Enrique Vázquez Rodríguez

#### CARTA DE APROBACIÓN

Por medio de la presente hago constar que acepto ser el tutor de trabajo de grado presentado por la bachiller Patricia Martínez Iglesias, para optar al grado de Licenciada en Educación, Biología y Química cuyo titulo es: Acción espinal del SC 560, un inhibidor especifico de la ciclooxigenasa 1 (COX-1), sobre la hiperexcitabilidad neuronal espinal inducida por inflamación.

En la ciudad de Caracas a los catorce días del mes de marzo del año 2007

Dr. Enrique Vazquez

C.I 10529449

## ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS.	ix
DEDICATORIA	x
INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO I	13
Planteamiento del problema	13
Justificación	14
Objetivo General	15
Objetivos Específicos.	15
CAPÍTULO	
Marco Teórico.	16
El dolor	17
Fisiología del dolor	17
Sistema descendente de modulación del dolor	19
Inflamación	23
Mecanismos periféricos del dolor por inflamación	24
Mecanismos centrales del dolor por inflamación	25
Modelo de inflamación por carragenina.	
Prstaglandinas	y 26
ciclooxigenasas	
AINEs	29
CAPÍTULO III	
Tipo de animal	33

Anestesia	34
Cirugía	35
Registro de neuronas	40
Muestreo de neuronas	41
Inflamación de la pata	41
Protocolo experimental	42
Microinyección	43
Estatística	44
CAPÍTULO IV	
Resultados	45
Inflamación por carragenina	46
Microinyección del SC 560 en la SGPA de animales con inflamación	47
Microinyección del SC 560 en la SGPA de animales sanos	49
Discusión	51
Conclusión	53
BIBLIOGRAFÍA	54

#### LISTA DE TABLAS

TA	ABLA	Página
1	Propiedades fisicoquímicas de la dimetilformamida	
		35

#### LISTA DE FIGURAS

FIGU	Pág	ina
1.	Sistema de analgesia	19
2.	Biosíntesis de las prostaglandinas	27
3.	Tipos de ciclooxigenasas	28
4.	Estructura de las ciclooxigenasas 1 y 2 y su interacción con el acido araquidónico	29
5.	Mecanismo de acción de los AINEs.	30
6.	Ubicación de Bregma.	37

#### LISTA DE IMAGENES

IMA	AGENES	Pág	gina
1	Tipo de animal		33
2	Tipo de animal		34
3	Cirugía		36
4	Cirugía		36
5	Cirugía		36
6	Cirugía		37
7	Cirugía		38
8	Cirugía		38
9	Cirugía		38
10	Cirugía		38
11	Cirugía		39
12	Cirugía		39
13	Cirugía		39
14	Cirugía		39
15	Cirugía		40
16	Inflamación de la pata		42
17	Inflamación de la pata		42

## LISTA DE GRÁFICAS

GRAI	FICAS	ina
1	Control de inflamación, inflamación de la pata con Carragenina. Estímulo	46
	inocuo	
2	Control inflamación, inflamación de la pata con Carragenina. Estímulo	47
	nocivo	
3	SC 560 en la SGPA y carragenina. Estímulo inocuo	48
4	SC 560 en la SGPA y carragenina. Estímulo nocivo	48
5	SC 560 en la SGPA y salina. Estímulo inocuo.	49
6	SC 560 en la SGPA y salina. Estímulo nocivo	50

#### AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) específicamente al Laboratorio de Neurofisiología por permitirme desarrollar en sus instalaciones este trabajo de investigación.

A mi tutor el Dr. Enrique Vázquez por darme la oportunidad de trabajar en este laboratorio y por su ayuda y conocimiento durante el año que tuve la oportunidad de convivir con él en el laboratorio.

A las personas que trabajan en el laboratorio Cristina Ávila y Karla Ramírez por toda la ayuda y el apoyo incondicionales que me prestaron durante mi estadía en el laboratorio, a los tesistas que compartieron conmigo, por su ayuda.

A mis padres, por el apoyo que me brindaron, por la formación, por fomentar en mí el deseo de saber, de conocer lo novedoso y abrirme las puertas al mundo ante mi curiosidad insaciable

A mis amigos: Desirée, Rebeca, Daieé, Geison, Daniel, Daniela y Hemely por su amistad y por la paciencia que me han tenido a lo largo de la carrera así como por su apoyo y ayuda.

A mis profesores ya que sin ellos no hubiera sido posible finalizar esta hermosa carrera, gracias a sus conocimientos, paciencia, ayuda y sobre todo gracias por esa calidad humana que siempre me brindaron.

Gracias a todos.

#### **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo especial de grado a mis padres porque sin ellos no hubiera llegado a ser la persona que soy hoy.

Los quiero mucho

#### INTRODUCCIÓN

El dolor según la International Association for the Study of Pain (IASP) es "una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con una lesión tisular, presente o potencial y descrita en términos de la misma". Es una sensación heterogénea que se puede dividir en tres categorías desde el punto de vista fisiológico: el dolor nociceptivo, el inflamatorio y el neuropático (García et al., 2001). Como veremos más adelante, la percepción del dolor consta de un sistema neural sensitivo (nociceptores) y unas vías nerviosas aferentes que responden a estímulos nociceptivos tisulares (Puebla, 2005).

En la periferia, las prostaglandinas (PGs) tienen un papel muy importante en la percepción del dolor. El desarrollo del proceso de inflamación se acompaña con la liberación de PGs, y estas contribuyen a que se altere la relación entre la intensidad de los estímulos y las respuestas que estos originan. Su aplicación sensibiliza los nociceptores, lo que conlleva a una respuesta dolorosa exagerada frente a estímulos que en otras ocasiones serían ligeramente dolorosos (hiperalgesia). Esta disminución del umbral del dolor (Vanegas *et al.*, 2001), incrementa la capacidad de respuesta de los sujetos a estimulación nociva en comparación con el estado previo sin PGs (Raja *et al.*, 1988).

Para el combate del dolor, se usan los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), que conjugan propiedades antiinflamatorias y analgésicas. Los AINEs inhiben a las enzimas ciclooxigenasas (COX), responsable de la síntesis de las PGs a partir de ácido araquidónico (Torres et al., 2001). Se han descrito al menos dos isoformas de la COX, una denominada COX-1 o "constitutiva" y una segunda isoforma denominada COX-2 o "inducible", que se sobreexpresa en respuesta a un daño tisular inflamatorio y por lo tanto se ha propuesto que participa y/o empeora la respuesta inflamatoria. Esta división, si bien en un primer momento fue muy útil, no es exacta, ya que ambas COX son

constitutivas en el Sistema Nervioso Central (SNC) y la COX-1 puede contribuir de manera importante tanto al dolor asociado como al proceso inflamatorio (Torres *et al.*, 2001).

Recientemente se ha demostrado que el efecto analgésico de los AINEs es también debido a la acción que estos ejercen estructuras del tallo cerebral como la Sustancia Gris Periacueductal (SGPA) y el Núcleo Raphe Magnus (NRM), así como de la Médula Espinal (Vázquez et al., 2005). Este efecto esta mediado, al menos parcialmente, por la liberación de opioides endógeno (Vázquez et al., 2005), pero otros mecanismos de acción, como la inhibición de la síntesis de PGs dentro del sistema nervioso no se descarta.

Esta investigación pretende estudiar el papel de la COX 1 sobre el sistema de modulación descendente del dolor; para ello se va a evaluar electrofisiológicamente la respuesta de neuronas sensoriales espinales de ratas sanas y ratas con una pata inflamada ante la estimulación mecánica de su campo receptivo, antes y durante la microinyección del SC 560 en la SGPA

## CAPÍTULO I EL PROBLEMA

#### Planteamiento del problema

Las Prostaglandinas (PGs) constituyen mediadores locales de una amplia variedad de funciones dentro del Sistema Nervioso Central (SNC), así como en tejidos periféricos.

Últimamente ha emergido una gran cantidad de información sobre el rol que juegan las PGs en el dolor y en la sensibilización central (Vanegas et al, 2001). Por otro lado, las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2), las enzimas que forman las PGs a partir del ácido araquidónico, son expresadas tanto en el ganglio de la raíz dorsal (GRD), en la médula espinal (ME), así como en zonas supraespinales como la SGPA (Willingale et al., 1997; Inoue et al., 1999). Ambas isoformas se expresan de manera constitutiva, pero en particular la COX-2 es marcadamente sobreexpresada durante el desarrollo de inflamaciones periféricas agudas o crónicas (Goppelt et al, 1998; Ebersberger et al., 1999).

En los tejidos periféricos así como en el SNC se incrementa la liberación de PGs después de la estimulación nociva, producida, por ejemplo, por pulsos eléctricos (Ramwell et al., 1966), calor nocivo (Coderre et al., 1990), la inyección subcutánea de formalina (Malmberg et al, 1995; Hua et al., 1999), y la inflamación periférica (Yang et al., 1996; Ebersberger et al., 1999; Gühring et al., 2000). Dentro del SNC las PGs también ejercen efectos, así tenemos que, la administración intratecal de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) causa alodinia e hiperalgesia en animales despiertos (Taiwo et al., 1988; Minami et al., 1994, 1996; Malmberg et al., 1995; Nishihara et al., 1995). Finalmente, la aplicación de Anti-Inflamatorios No Esteroideos (AINEs) como la indometacina inhiben la

síntesis de PGs no solo en el tejido inflamado sino también en la ME (Vanegas et al., 2001).

Curiosamente, el efecto que las PGs pueden tener sobre el sistema de modulación descendente del dolor ha sido poco estudiado. Existen estudios que demuestran que la administración central de inhibidores específicos de la COX-2 favorece la modulación del dolor, pero es muy poco lo que se sabe acerca de la contribución de la COX-1. Por eso en este trabajo estudiaremos el papel de la COX-1 de la SGPA en la modulación del dolor en situaciones normales y durante el desarrollo de un cuadro inflamatorio periférico.

Es por esta razón que nos planteamos el siguiente problema de investigación: ¿Cuál es la acción del inhibidor específico de la COX-1 SC 560, sobre la hiperexcitabilidad neuronal espinal inducida por inflamación?

#### Justificación de la investigación

Este proyecto de investigación se realiza con la finalidad de estudiar la acción central del SC 560, un inhibidor especifico de la COX-1, sobre el desarrollo de la hiperexcitabilidad neuronal espinal inducida por inflamación. Como se mencionó anteriormente esta enzima se encuentra presente en estructuras claves del Sistema Descendente de Modulación del Dolor, como la Sustancia Gris Peri-Acueductal y es una de las enzimas responsable de la biosíntesis de PGs en el neuroeje.

#### Objetivo General

Estudiar la acción del inhibidor específico de la COX-1 SC 560, sobre la hiperexcitabilidad neuronal espinal inducida por inflamación.

#### Objetivos Específico

- Evaluar electrofisiologicamente la respuesta de neuronas sensoriales espinales de ratas sanas (sin inflamación) y ratas con la pata inflamada y sana a la estimulación mecánica de su campo receptivo antes de la microinyección en la SGPA del SC 560.
- Evaluar electrofisiologicamente la respuesta de neuronas sensoriales espinales de ratas sanas (sin inflamación) y ratas con la pata inflamada y sana a la estimulación mecánica de su campo receptivo durante la microinyección en la SGPA del SC 560.
- Comparar la repuesta de neuronas espinales de ratas con la pata inflamada y sin inflamar a la estimulación mecánica de su campo receptivo antes y durante la microinyección del SC 560.

## CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

A lo largo de las últimas décadas del siglo XX se han logrado avances significativos en la comprensión de los mecanismos del dolor y su tratamiento. En el seno de los sistemas sensoriales, el dolor constituye una señal de alarma para intentar proteger al organismo. Esto desencadena una serie de reacciones con la finalidad de disminuir la causa, y así limitar las consecuencias de la agresión. Dichos mensajes nociceptivos son transmitidos, modulados e integrados en diferentes niveles del sistema nervioso, los cuales, iniciados en la periferia, viajan hacia el asta dorsal de la médula y de ahí a diversas estructuras hasta llegar a centros superiores (Perena et al., 2000).

Entre los conocimientos acumulados en el campo del dolor a lo largo de las últimas décadas, los mecanismos íntimos de la neurotransmisión y/o neuromodulación de la sensación dolorosa son los más importantes. Pese a que el dolor es un mecanismo de defensa, es decir, una señal de alarma para proteger al organismo y aumentar la supervivencia del individuo, en algunas ocasiones se convierte en una fuente de sufrimiento inútil (Romera *et al.*, 2000), que debe ser efectivamente combatido.

#### El dolor

Como se mencionó en la introducción en 1979 la International Association for the Study of Pain (IASP) definió al dolor como "una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con una lesión tisular, presente o potencial o descrita en términos de la misma". Aquí debemos agregar que esta sensación es una experiencia sensorial muy compleja dado sus contenidos psicofisiológicos y afectivos. Los componentes psicofisiológicos de la sensación dolorosa tienen que ver con su localización, intensidad, carácter y duración. Los componentes afectivos por otro lado, tienen que ver con los sentimientos de rechazo y de disconformidad que son parte integral de la experiencia nociceptiva. (Talbot et al., 1991).

#### Fisiología del dolor

#### El sistema nociceptivo

#### Componentes periféricos

Los estímulos de una intensidad tan alta que son capaces de provocar daño tisular (estímulos nocivos) activan a los nociceptores o receptores de alto umbral (Perl, 1971). Los nociceptores son los terminales nerviosos periféricos de las neuronas aferentes primarias nociceptivas.

El soma de estas neuronas es pequeño y se ubica en los ganglios de la raíz dorsal y los núcleos de los nervios trigéminos (Jessell et al. 1991). Las neuronas

aferentes primarias además de tener un proceso periférico que inerva a los tejidos, tienen otra prolongación que va hacia la medula espinal y que hace sinapsis con neuronas espinales. Así la información sensorial es llevada desde los tejidos periféricos al sistema nervioso central (SNC).

Existen dos tipos de fibras aferentes nociceptivas:

- Fibras Aδ: responden a estímulos térmicos y mecánicos intensos. Se caracterizan por ser de pequeño diámetro y poco mielinizadas.
- Fibras C o nociceptores polimodales: responden tanto a estímulos mecánicos y térmicos como a estímulos químicos. Son de pequeño diámetro y amielinizada.

#### Componentes centrales

Las fibras  $A\delta$  y C, al entran a la medula espinal, ascienden y descienden unos cuantos segmentos como parte del tracto Lissauer, para luego hacer sinapsis con neuronas espinales de segundo orden, ubicas en su mayoría en la lamina I (zona marginal), II (sustancia gelatinosa) y V (Jessell et al, 1991; Willis, 1985).

Las neuronas espinales pueden clasificarse en dos grupos de acuerdo a su patrón de respuesta ante estímulos nocivos.

- Neuronas nociceptivas especificas (NE): son aquellas cuya entrada sensorial proviene principalmente de aferentes nociceptivos y por ende solo responden a estímulos nocivos aplicados en su campo receptivo (Fields, 1987).
- Neuronas de amplio rango dinámico (ARD): reciben información sensorial de aferentes primarios nociceptivos y de aferentes de bajo umbral, y por eso muestran un aumento en su frecuencia de

disparo cuando se aplican dentro de su campo receptivo estímulos tanto inocuos como nocivos (Fields, 1987).

La mayoría de los axones de las neuronas de segundo orden NE y ARD, cruzan la línea media de la medula espinal por la comisura gris central y ascienden por la sustancia blanca del cuadrante anterolateral contralateral (Fields, 1987).

#### Sistema descendente de modulación del dolor

La intensidad necesaria para que una persona responda ante un estimulo dolosos es muy variable. Esto se debe a la capacidad que tiene el encéfalo de suprimir la entrada de los impulsos dolorosos al sistema nervioso mediante la activación de un sistema de control o inhibición del dolor que produce analgesia.

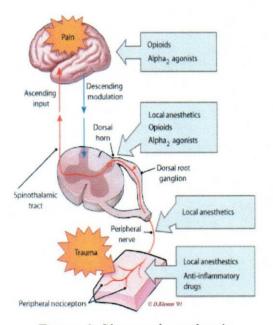


Figura 1: Sistema de analgesia.

#### Estructuras del sistema de modulación del dolor

En las ultimas dos décadas ha habido un considerable progreso en el conocimiento de los mecanismos que modulan el dolor en el SNC. Buena parte del ímpetu que permitió dicho progreso se deriva de la postulación hecha por (Wall, 1967), de un mecanismo de inhibición tónico, de origen supraespinal, de las aferencias cutáneas que llegan a la médula espinal llevando información nociceptiva. Entre los hallazgos experimentales que permitieron la postulación de un sistema de modulación descendente destacan, por un lado la analgesia por estimulación eléctrica, y por otro, el descubrimiento de los péptido opioides endógenos. Ambos mecanismos están asociados al sistema descendente de modulación del dolor con sede en el tallo cerebral que incluye, como veremos la sustancia gris periacueductal (SGPA) y el núcleo raphe de magnus (NRM) y un complejo inhibitorio situado en las asta posteriores de la ME.

#### Sustancia Gris Periacueductal (SGPA)

La SGPA fue la primera estructura encefálica implicada en la modulación supraespinal del dolor. En 1969 Reynolds demostró que la estimulación eléctrica de la porción ventro-lateral de la SGPA de ratas, selectivamente suprimía la respuesta a la estimulación dolorosa, sin afectar la locomoción ni la capacidad de respuesta de los animales a la estimulación inocua. A esto se le conoce con el nombre de analgesia por estimulación eléctrica (AEE) y su importancia fue confirmada cuando algunos neurocirujanos colocaron estimulación en zonas homólogas en el mesencéfalo de pacientes y provocaron una reducción selectiva del dolor clínico severo que estos sufrían (Fields, 1987). Un efecto similar al de la AEE se produce cuando se microinyecta en la SGPA aminoácidos excitatorios como el glutamato, indicando que la analgesia producida se debe a la excitación local de los cuerpos neurales o de dendritas y no a la de fibras de paso (Jensen *et al.* 1992).

Yaksh et al. (1979) realizaron un mapeo extensivo del encéfalo de la rata para tratar de revelar los sitios que eran más sensibles a la microinyección de morfina. Encontró que cuando las microinyecciones se realizaban en la SGPA ventrolateral (mismo sitio identificado por Reynolds), se conseguían las mayores elevaciones en el umbral de los reflejos nocidefensivos (analgesia). Este efecto analgésico de la morfina mostraba ser dependiente de la dosis y era completamente revertido por la aplicación sistémica de la naloxona, un antagonista de receptores de opioides. Actualmente se ha demostrado usando varias técnicas que la SGPA cuenta con una importante concentración de péptidos opioides y sus receptores.

Las proyecciones desde SGPA hasta las estaciones de relevo sináptico nociceptivo en la médula espinal son escasas, y existen muchas evidencias de que el efecto analgésico de la SGPA es canalizado a través del núcleo raphe de magnus.

#### Núcleo Raphe de Magnus (NRM)

La inhibición de la entrada de información nociceptiva en la médula espinal producida por la activación de las neuronas de la SGPA se efectúa a través de un relevo en la NRM. Este relevo parece constituir un elemento eferente obligatorio del sistema de modulación nociceptiva.

Es posible lograr la antinocicepción mediada por estimulación eléctrica de la NRM o al microinyector morfina en ella (Akaike et al., 1978; Azami et al., 1982; Dickenson et al., 1979). Los axones que parten de NRM hasta el asta dorsal de la médula espinal cursan a lo largo del funículo dorsolateral (Basbaum et al., 1978; Basbaum y Fields, 1984) y su integridad es necesaria para la producción de analgesia (Basbaum y Fields, 1984; Dickenson et al., 1979). La lesión de la NRM o su bloqueo por anestésicos locales, atenúan significativamente la inhibición nociceptiva descendente desde SGPA (Gebhart et al., 1983; Sandkuhler et al., 1984).

Fields *et al.* (1983) encontraron en la NRM de las ratas, neuronas que muestran cambios súbitos en su frecuencia de descarga justo antes de la ejecución de un reflejo nocidefensivo o protector, conocido como reflejo de sacudida de la cola (RSC). Estas neuronas fueron denominadas células *off* y *on*, y se cree que tienen roles opuestos en la modulación de la nocicepción.

#### Tipos de dolor

En los años recientes se ha clasificado al dolor en término de los mecanismos patofisiológicos que lo originan.

Dolor nociceptivo producido por la estimulación de tejidos y estructuras sanas (Schaible et al., 2000). Este tipo de dolor también es conocido como dolor agudo o fásico (Millan, 1999) ya que su duración es generalmente de minutos, aunque esta medida es muy variable y depende de la fuente consultada. Este tipo de dolor es simultáneo con el estímulo nocivo que lo causa, y proporcional a este, ya que nociceptor es activado transitoriamente. También es altamente adaptativo y preventivo ya que dispara conductas de retirada o escape que aleja del estímulo nocivo la parte dañada o potencialmente dañable. Un ejemplo de este tipo de dolor es el contacto de la mano con una superficie caliente (Millan, 1999)

Dolor nociceptivo originado en tejidos o estructuras inflamadas (Schaible et al., 2000), que puede convertirse en un dolor crónico (Millan, 1999). Aparecen cuando los tejidos o las estructuras están inflamadas o dañadas esta modalidad de dolor se caracteriza por acompañarse clínicamente de:

 Hiperalgesia, un incremento en el dolor producido por estímulos nocivos (Millan, 1999). Esta puede ser primaria, cuando el dolor se origina en el área dañada, o secundaria, cuando se origina en adyacencias de esta área.

- Alodinia, o sea, dolor inducido por estímulos que normalmente son inocuos.
- 3. Dolor espontáneo, es decir, el que se presenta en ausencia aparente de estimulación (Millan, 1999). Este tipo de dolor también tiene un componente adaptativo ya que favorece la inmovilización de la parte inflamada, favoreciendo su recuperación.

Dolo neuropático (Schaible et al., 2000), es aquel se produce cuando nervios o neuronas del sistema nervioso central están dañados.

Este trabajo se desarrollo evaluando la acción del inhibidor específico de la COX-1 sobre el desarrollo del dolor inflamatorio y dolor nociceptivo agudo originado en estructuras sanas.

#### Inflamación

El proceso de inflamación esta compuesto por una serie de eventos bioquímicos y celulares complejos que se desencadenan en respuesta al daño tisular o por la presencia de agentes físicos, químicos o biológicos exógenos. Los signos de inflamación son: rubor, calor, tumor (edema por extravasación), dolor y perdida de la función. El establecimiento de la inflamación favorece la renovación del tejido lesionado o la destrucción del material extraño, y durante su desarrollo se afecta de manera notable el sistema nervioso central y periférico.

Después de un proceso inflamatorio se dan una serie de alteraciones en el sistema somatosensorial, que amplifican las respuestas e incrementan la sensibilidad a estímulos periféricos, de tal manera que el dolor puede ser activado por estímulos de baja intensidad (De la Fuente, 2004).

#### Causas de la inflamación

- 1. Agentes físicos: traumatismos y quemaduras
- 2. Agentes químicos: cáusticos
- 3. Agentes biológicos: bacterias, virus, parásitos, hongos etc.
- Agentes endógenos: oxidantes, isquemia, complejos inmunes, activación de mediadores químicos etc.
- 5. Cuerpos extraños: hilos de sutura, sílice, cristales de urato

## Mecanismos periféricos de dolor por inflamación (Hiperexcitabilidad Periférica)

Como se vio anteriormente, los terminales sensoriales de los nociceptores que detectan estímulos nocivos pueden ser activados y sensibilizados por agentes químicos que son liberados como consecuencia de traumas o del desarrollo de procesos inflamatorios. A la sensibilización de los aferentes primarios se le denomina sensibilización periférica, y por esta se entiende el aumento en las respuestas de los aferentes primarios nociceptivos a estímulos tanto nocivos como inocuos (que previo a esta condición, no los excitaba). Este proceso de sensibilización se establece como consecuencia de la interacción de los nociceptores con los mediadores inflamatorios que se encuentran normalmente en el tejido inflamado tales como las PGs (Coggeshall *et al.*, 1983).

A la sensibilización de los aferentes primarios se le denomina sensibilización periférica, y por esta se entiende el aumento en la respuesta de los aferentes primarios nociceptivos a los estímulos nocivos (lo cual se manifiesta como hiperalgesia) y la aparición de respuesta a los estímulos inocuos a los que previamente eran insensibles (lo cual se manifiesta como alodinia).

## Mecanismos centrales del dolor por inflamación (Hiperexcitabilidad Central)

La sensibilización periférica induce un flujo incrementado de potenciales de acción hacia la ME y los núcleos del trigémino, aquí es relevado por neuronas espinales de segundo orden, que frente al incremento de flujo de información de los aferentes primarios se tornan también hiperexcitables. Este proceso se denomina sensibilización central (Wolf., 1983) y se caracteriza por la aparición de la hipersensibilidad o hiperexcitabilidad central, la alodinia y la expansión de los campos receptivos de las neuronas espinales.

Después de la sensibilización las neuronas espinales muestran respuestas aumentadas a los mensajes nociceptivos que vienen de la periférica. La sensibilización central es un mecanismo que subyace, junto con la periferia, al dolor nociceptivo en situaciones patológicas tales como inflamación. Existe evidencia que muestra que la medula espinal exhibe un alto grado de plasticidad durante el desarrollo de un proceso inflamatorio (Eblen-Zajjur *et al*, 1997). Los cambios en las propiedades de respuestas de neuronas espinales han sido observadas usando el modelo de inflamación por inyección de carragenina (Dougherty *et al.*, 1992).

#### Modelo de inflamación por carragenina

El modelo inflamatorio desarrollado en este trabajo de grado es el de la inyección subcutánea de carragenina en la pata de la rata. La carragenina (*cripus de Chodrus*) es un alga marina rojo púrpura pequeña (hasta 22 centímetros de largo) encontradas en orillas rocosas y en piscinas. Se utiliza en diversos alimentos como productos lácteos y en carne procesada como engrosador y

estabilizador. Se puede hallar en productos tales como helado, crema batida, pudín y yogurt. La carragenina es un producto vegetal irritante e inmunogénico (Joris *et al.*, 1990).

El modelo consiste en inducir la inflamación inyectando subcutáneamente en una de las patas traseras de las ratas experimentales 100 microlitros de una solución al 2% de carragenina.

#### PROSTAGLANDINAS Y CICLOOXIGENASAS

#### Prostaglandinas

Las PGs constituyen una familia de ácidos grasos con un anillo de ciclopentano entre dos cadenas laterales, una de las cuales posee un grupo carboxiterminal. Estas moléculas están relacionadas con una gran cantidad de procesos biológicos tales como el control del crecimiento y diferenciación celular y la homeostasis y juegan un papel en el desarrollo y el mantenimiento de los procesos de inflamación, así como de la hiperexcitabilidad periférica y central que de este se deriva.

Las PGs provienen de acido araquidónico, el cual es separado de los fosfolípidos de la membrana celular por la acción de fosfolipasas. El ácido araquidónico es convertido en PGs por la acción de dos isoformas de la ciclooxigenasa COX; COX-1 y COX-2

Figura 2: Biosíntesis de las prostaglandinas.

#### Ciclooxigenasas (COX)

A la fecha, se han descrito al menos dos isoformas de la COX, una denominada COX-1 o "constitutiva" y descrita como la responsable de la biosíntesis de PGs importantes en la homeostasis y ciertas funciones fisiológicas (ejemplo; PGs que participan en la protección; principalmente en el tubo gastrointestinal o en la regulación del flujo sanguíneo renal). Otra denominada COX-2 o "inducible", que aparece en el escenario en respuesta a un daño tisular o estímulo inflamatorio y por lo tanto se ha propuesto que participa y/o empeora la respuesta inflamatoria.

La identificación de estas dos isoformas ha motivado el desarrollo de nuevos AINEs con mayor selectividad sobre la COX-2. Los AINEs tradicionales son relativamente no selectivos (Torres *et al.*, 2001). Sin embargo, diversas evidencias recientes han complicado el paradigma "La COX-1 es la buena y la COX-2 es la mala". Evidencias genéticas; ratones que carecen del gen para la

enzima COX-2 presentan respuesta inflamatoria similar a la observada en ratones normales (Torres *et al.*, 2001), mientras los ratones que carecen del gene COX-1 presentan una respuesta inflamatoria disminuida. Adicionalmente, en una serie de trabajos realizados sobre inflamación se ha observado que la COX-1 se sobreexpresa en situaciones de inflamación (Hawkey. 1999). Por lo tanto, se sugiere que la COX-1 puede contribuir de manera importante tanto a la respuesta inflamatoria como al dolor asociado al proceso inflamatorio.

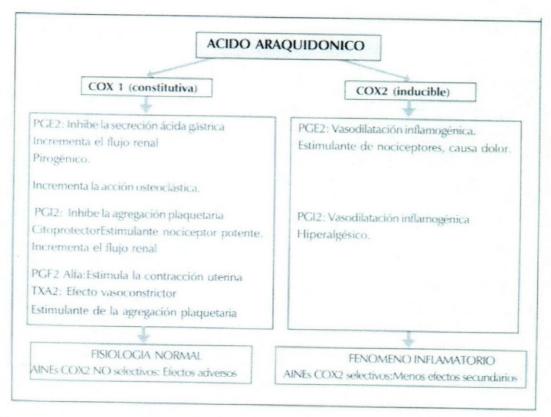


Figura 3: Tipos de Ciclooxigenasas.

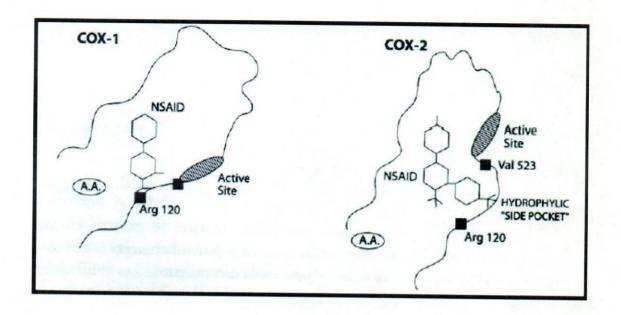


Figura 4: Estructura de las ciclooxigenasa 1 y 2 y su interacción con el acido araquidónico.

### Antiinflamatorios no Esteroideos (AINEs)

Los AINEs son sustancias químicas con propiedades antiinflamatorias y antipiréticas, con efectos que son similares a los de los corticoides pero sin las consecuencias secundarias. Actúan bloqueando la síntesis de prostaglandinas (Vane, 1999) y activando el sistema descendente de modulación del dolor (Vázquez et al., 2005).

#### Acción farmacológica

Como se mencionó este grupo de fármacos presenta una serie de acciones farmacológicas bien establecidas, las cuales son según

- Analgésica y Antipirética: que se relaciona con el uso clínico a dosis bajas, generalmente durante periodos cortos de tiempo.
- Antiinflamatoria: que se manifiesta a dosis mayores y de forma pautada y continuada.
- Antiagregante plaquetario: acción no compartida en la misma medida por todos los AINEs, como consecuencia de la inhibición de la COX-1. (Núñez et al, 2001):

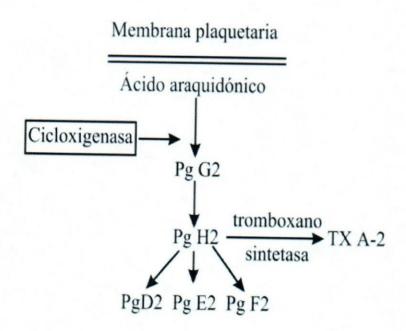


Figura 5: Mecanismo de acción de los AINEs.

## Sistema Descendente de Modulación del Dolor como Sitio de Acción de los AINES

Por más de 100 años los farmacólogos han tratado de definir el sitio de acción de los compuestos analgésicos y han llegado a la conclusión de que la percepción del dolor puede ser inhibida por efecto a nivel de los receptores, por efecto a nivel de la ME y otros sistemas que procesan la información nociceptiva, por una acción conjunta en estos dos niveles, y por una activación del Sistema Descendente de Modulación del Dolor. Este último mecanismo se había tenido como exclusivo de los opiáceos pero hallazgos recientes indican que los AINEs también pueden activar el sistema descendente de modulación nociceptiva (Brune, 1987; Fitzgerald, 1986; Vázquez et al. 2005; Yash et al., 1976; Zimmermann, 1984).

Inicialmente los experimentos clásicos de Lim et al. (1964) habían dividido a los roles analgésicos en dos grupos: uno constituido por los opioides, que actuarían solo centralmente (es decir sobre estructuras del sistema nervioso central), con la morfina como principal representante, y un segundo grupo (formado por los AINEs), que actuarían solamente en la periferia (fuera del SNC), donde destacan el salicilato de sodio, el acido acetilsalicílico (ASA,), el N-acetyl-p-aminofenol (paracetamol), la indometacina, el ibuprofen, etc.

Vane (1971) demostró que en presencia de concentraciones bajas de AINEs como la aspirina y la indometacia, se suprimía casi completamente la síntesis de PGs. Así, durante mucho tiempo ha persistido la idea de que los AINEs eliminan el dolor y la hiperalgesia exclusivamente por vía del bloqueo del desarrollo del proceso inflamatorio, inhibiendo la síntesis de PGs producidas a nivel periférico. Sin embargo, más tarde se demostró que la inyección intracerebroventricular de AINEs como paracetamol, acetilsalicilato, fenacetina o indometacia disminuía el comportamiento hiperalgésico que provocaba en ratas la inyección de carragenina en una de las patas posteriores (Ferreira *et al.*, 1978). En ese mismo trabajo se demuestra que la inyección intracerebroventricular de estos

AINEs actúa de manera sinérgica en la producción de antinocicepción si son inyectados además en la pata hiperalgésica (Ferreira et al., 1978).

## CAPÍTULO III METODOLOGÍA

#### Tipo de animal

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, de 200 a 250g de peso, criadas en el bioterio del IVIC.

A lo largo de la cirugía y el experimento los animales se mantuvieron profundamente anestesiados (ausencia total de reflejos). Las normas bioéticas para el manejo de animales se siguieron a lo largo de todo el trabajo.



Imagen 1



Imagen 2

#### Materiales

#### Anestesia

Los animales fueron anestesiados con dosis de tiopental sódico intraperitonealmente (i.p). La temperatura del animal se mantuvo a lo largo del experimento entre 37º C a través de una manta térmica.

El nivel de anestesia fue comprobado por la ausencia de reflejos corneal y de retirada de la pata ante la aplicación de estímulos nocivos. Se realizaron inyecciones de tiopental sódico i.p. para asegurar un nivel profundo de anestesia.

Al concluir el experimento los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis intravenosa de tiopental sódico o con sobredosis de CO<sub>2</sub>.

Vehiculo del SC 560 (dimetil formamida + salina 1:1): es uno de los derivados de las Metilaminas, se utiliza como disolvente de resinas en la fabricación de cuero sintético, poliuretano y fibras acrílicas; se emplea también como medio de reacción y disolvente en la extracción de productos farmacéuticos, así como en disolución de resinas, pigmentos y colorantes.

DIMETILFORMAMIDA	CAS:68-12-2
Sinónimos: DMF; N,N-dimetilda; N-formildimetilar	mina
Fórmula: C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ON	
Peso molecular: 73,09	$CH_3 - N - C = O$
Presión de vapor a 20°C: 2,7 mmHg	1
Punto de ebullición (760 mmHg): 153°C	
Punto de fusión: - 61 °C	CH, H
Densidad relativa (agua = 1): 0,9445 a 25°C	
Densidad de vapor relativa (aire = 1): 2,51	

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas de la dimetilformamida.

SC- 560: inhibidor selectivo de la COX-1 en una concentración de 3 mM disuelto en dimetilformamida y salina 1:1 (Telleira et al. 2006).

#### Cirugía

Los experimentos se realizaron siguiendo las normas éticas para el trabajo con animales. Durante el desarrollo de la cirugía y del experimento los animales se mantuvieron profundamente anestesiados.

- Se afeitó a la rata en parte del cuello, cabeza, zona de la espalda y patas con la finalidad de facilitar el resto del procedimiento.
- Se realizó un corte sobre la línea media del cuello con el objetivo de exponer la traquea, se cortó y se introdujo un traqueotomo el cual fue fijado por medio de hilos.
- Se introdujo en la vena yugular un catéter de 1 mm de grosor el cual fue fijado mediante hilos.
- Se practico una laminectomía (imágenes 3,4,5) para exponer los segmentos lumbares L<sub>1</sub> a L<sub>4</sub>, para esto se utilizó un cortacutícula con el

cual extrajeron las vértebras correspondientes, una vez finalizada se colocó un trozo de papel con solución salina cubriendo la médula expuesta.

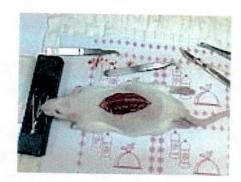


Imagen 3



Imagen 4



Imagen 5

- Luego la cabeza del animal fue fijada al marco esterotaxico (imágenes 6 y
   con la finalidad de colocar cánulas 12 mm en SGPA. Para lo cual se llevaron a cabo los siguientes pasos:
  - Se hizo una incisión en el nivel del cráneo como se muestra en la imagen 8, se limpió la zona con la finalidad de buscar Bregma

- situado en el punto de unión de la sagital con la coronal como se ve en la figura 6.
- Se utilizó el micromanipulador y se tomaron las medidas de la zona Anteroposterior (AP), Lateral (L) y Dorsoventral (DV), una vez tomadas las medidas se procedió a hacer los cálculos para llegar al punto de inserción de la cánula en SGPA (Pellegrino, 1981).

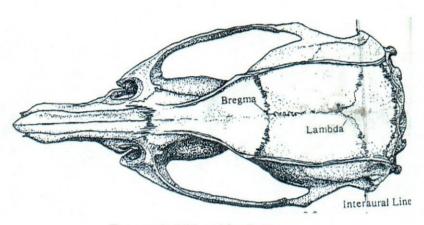


Figura 6: Ubicación de Bregma

- Se marcó la zona y se procedió a hacer una craneotomía de 1mm con un dremel como se ve en la imagen 10, se introdujo la cánula y se bajo hasta el valor obtenido en DV.
- Para fijar la cánula al cráneo se utilizo acrílico dental.



Imagen 6



Imagen 7



Imagen 8

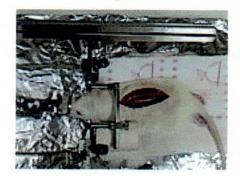


Imagen 9



Imagen 10



Imagen 11



Imagen 12

6. Se fijó la médula espinal mediante pinzas a un soporte.



Imagen 13

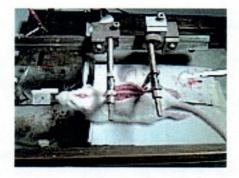


Imagen 14

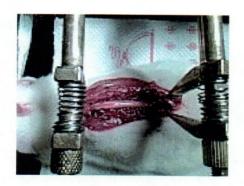


Imagen 15

 Se agregó agar a la médula (cubierta con papel y solución salina) con la finalidad de crear un medio semisólido para el electrodo.

### Registro de neuronas

A través del reservorio se introdujo un microelectrodo de tungsteno aislado con epoxy en el asta dorsal de la médula espinal para registrar extracelularmente los potenciales de acción de las neuronas. Para el almacenamiento y la discriminación final de las neuronas se utilizó el programa de computadora Brain Wave. Al iniciarse el registro unitario de la neurona se almacenó la forma y la amplitud del potencial de acción. Posteriormente y durante todo el experimento los potenciales de acción fueron constantemente monitoreados en un osciloscopio para controlar que se estuviera registrando la misma neurona durante todo el experimento.

La señal se ajustó dentro de un discriminador de una ventana cuya salida fue procesada en una interfase analógico-digital para construir histogramas periestímulo en una computadora durante el experimento. Los potenciales de acción fueron también almacenados en el disco duro de la computadora para la discriminación final que se realizó al concluir los experimentos.

#### Muestreo de neuronas

Para realizar este estudio se recogieron neuronas que respondan a la presión aplicada en pata, para ello se aplicó agua caliente en la zona donde se registró la neurona. Fueron rechazadas aquellas neuronas con campo receptivo en otra zona o aquellas que presentaron actividad espontánea. Cuando se logró un registro adecuado de la neurona (relación señal/ruido) se procedió a determinar el tamaño y el umbral de su campo receptivo. Los estímulos se aplicaron en la pata. La estimulación mecánica se aplicó mediante dos pinzas aplicadas dorsoventralmente a la pata. Una de estas pinzas (inocua) producía una presión leve. La otra pinza (nociva) producía una presión fuerte, que se percibió como dolorosa al dedo del investigador.

### Inflamación de la pata

A las ratas se les indujo un proceso de inflamación de la pata durante la sesión de registro mientras la neurona estaba siendo estudiada, para esto se inyecto la pata trasera de la rata con carragenina. (0.02mg).

Esta inyección subcutánea produce un aumento en el volumen de la pata, acompañado de enrojecimiento y calor dentro de los siguientes 15-30min después de la inyección.



Imagen 16



Imagen 17

## Protocolo experimental

Los experimentos se llevaron a cabo por ciclos de estimulación que se repitieron constantemente durante todo el experimento. Cada ciclo de estimulación se definió operacionalmente de la siguiente manera: dos minutos de actividad basal (1 y 2), al comienzo del tercer minuto se aplica presión inocua sobre la pata por 15 segundos, luego se esperan 15 segundos, se aplica el estímulo nocivo por 15 segundos sobre la pata.

Esto se realizó para las diferentes tandas de experimentos a realizar, las cuales fueron:

- 1) Línea base: fue el periodo de 20 minutos que se realizó antes de cada experimento con la finalidad de comprobar el comportamiento de la neurona sin inflamación y sin droga.
- 2) Control de inflamación: se realizó una línea base de 20 minutos, siguiendo el protocolo descrito anteriormente, una vez transcurrido este tiempo se procedió a inyectar la carragenina en la pata trasera se siguió registrando la actividad de la neurona hasta 1 hora después de la inyección.
- 3) SC 560 + Salina: se realizó una línea base de 20 minutos, una vez transcurrido dicho tiempo se microinyectó en la SGPA el SC 560 y en la pata salina, se registró la actividad de la neurona hasta 1 hora después de la inyección.
- 4) SC 560 + Carragenina: se realizó una línea base de 20 minutos, una vez transcurrido dicho tiempo se microinyectó el SC 560 en la SGPA y en la pata carragenina, se registró la actividad de la neurona hasta 1 hora después de la inyección.

### Microinyección

Para la microinyección se utilizó una microcánula de aproximadamente 12 mm a 12.5 mm la cual esta conectada a una manguera que facilita su colocación en la pipeta Hamilton, con la cual se microinyectó 0.5µl del inhibidor SC 560.

## Estadística

Los resultados de expresaron como el promedio de cada 20 minutos de registro de las neuronas. El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante la prueba MannWhitney-Wilcoxon. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas cuando p<0.05.

## CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSION

#### Resultados

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron 15 ratas, de las que se registraron en total 17 neuronas, ubicadas en el asta dorsal de la médula espinal. Para el análisis estadístico se promedió el valor de línea base y se comparó con los valores obtenidos en períodos de 20 min después de la inflamación. De esta manera se obtuvieron 4 puntos para graficar; 1) LB, que corresponde al promedio de las respuestas de los ciclos de estimulación que comprendieron la línea base; 2) 20 min, promedio de las respuesta de los primeros 20 min post inflamación; 3) 40 min, promedio de las respuestas comprendidas entre los minutos 21 a 40 post inflamación y 4) 60 min, promedio de las respuestas comprendidas entre el minutos 41 a 60 post inflamación. Esto se realizo para cada grupo y con cada intensidad de estímulo.

La inflamación de la pata condujo al desarrollo del proceso de hiperexcitabilidad espinal, caracterizada por el aumento en la respuesta de las neuronas espinales a la estimulación inocua y nociva de su campo receptivo.

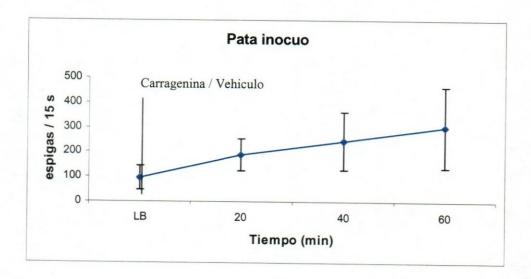
La microinyección del SC 560, un inhibidor especifico de la COX-1, antes del desarrollo de la inflamación evitó el desarrollo del cuadro de hiperexcitabilidad espinal. Por otro lado su aplicación en animales sanos, sin inflamación, no afecto la respuesta de las neuronas espinales a la estimulación mecánica de su campo receptivo.

## Inflamación por Carragenina

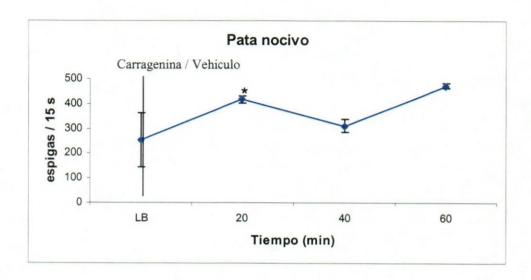
Para evaluar el modelo de inflamación por carragenina se utilizaron 6 ratas de las que se registraron 6 neuronas.

Cambios en las frecuencias de disparo de las neuronas espinales.

En las gráficas 1 y 2 se muestra el valor promedio de los potenciales de acción que produjeron las neuronas cada 15s. El aumento de la respuesta entre el punto 60 min con respecto al punto LB fue de 313 % para la estimulación inocua (gráfica 1, p<0.05) y 158 % (gráfica 2, p<0.05 para la estimulación nociva).



Gráfica 1: Control inflamación, inflamación de la pata con Carragenina. Estímulo inocuo.



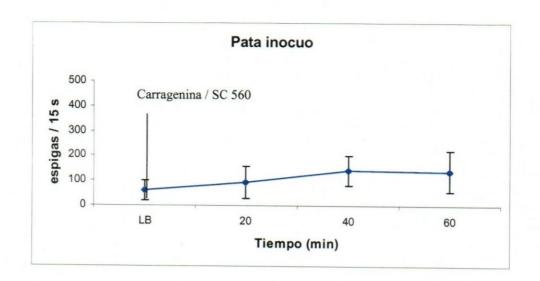
Gráfica 2: Control inflamación, inflamación de la pata con Carragenina. Estímulo nocivo.

## Microinyección del SC 560 en la SGPA de animales con inflamación

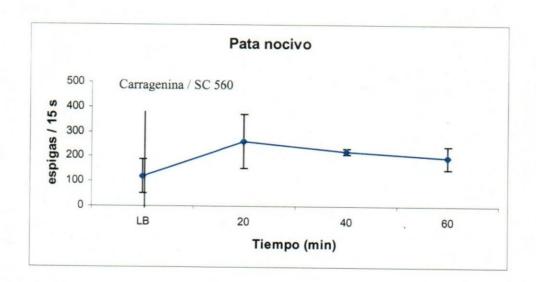
En estos experimentos se utilizaron 5 ratas con las que se registró 7 neuronas.

En el momento en el que se inyectó la carragenina en la pata se microinyectó 0.5µl de SC 560 mnM en la SGPA. El SC 560 previno el desarrollo del cuadro de hiperexcitabilidad espinal, lo que puede apreciarse en las gráficas 3 y 4.

El aumento de las respuestas del punto 60 min con respecto al punto LB fue de apenas 222 % (gráfica 3, p>0.05). La microinyección del SC 560 afectó especialmente la respuesta de las neuronas a la estimulación nociva como puede apreciarse el leve aumento de 163 % (gráfica 4, p>0.05).



Gráfica 3: SC 560 en la SGPA y carragenina. Estímulo inocuo.

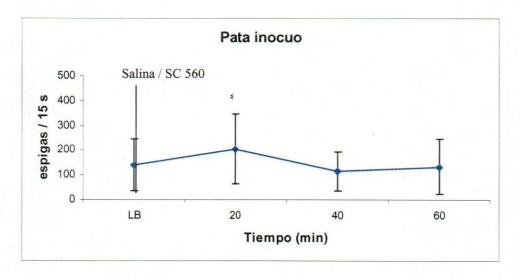


Gráfica 4: SC 560 en la SGPA y carragenina. Estímulo nocivo.

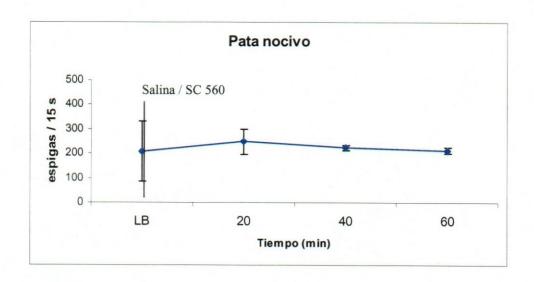
## Microinyección del SC 560 en la SGPA de animales sanos

En estos experimentos se utilizaron 4 ratas de las cuales se registraron 4 neuronas.

La microinyección del SC 560 en animales sanos (sin proceso inflamatorio), no afecto la respuesta de las neuronas espinales en la estimulación. Así tenemos que la variación de la respuesta de los 60 min comparada con la LB fue de 95 % para la estimulación inocua (gráfica 5, p>0.05, no significativa) y de 102 % para la estimulación nociva (gráfica 6, p>0.05, no significativa).



Gráfica 5: SC 560 en la SGPA y salina. Estímulo inocuo.



Gráfica 6: SC 560 en la SGPA y salina. Estímulo nocivo.

#### Discusión

En el presente trabajo se comprobó el aumento de las respuestas de las neuronas sensoriales de la médula espinal sometidas a la entrada sensorial de tejidos inflamados (gráfica 1 y 2). Este cuadro de hiperexcitabilidad espinal complejo y no totalmente comprendido, fue inhibido por la microinyección del SC 560 un inhibidor específico de la COX-1 en la SGPA. Por otro lado su aplicación en animales sanos, sin inflamación, no afectó la capacidad de respuesta de las neuronas espinales.

El efecto de la aplicación de AINEs no específicos (inhibidores tanto de la COX-1 como COX-2), así como inhibidores de la COX-2 ha sido ampliamente estudiado (para revisión Vanegas y Schaible, 2000). Con estos trabajos se reforzó la idea de que solo la COX-2, inducible en situaciones de inflamación, es la principal responsable en el desarrollo de la hiperexcitabilidad espinal y que los inhibidores inespecíficos eran efectivos para prevenir dicho cuadro en el mismo grado en que estos eran capaces de inhibir la COX-2. La COX-1 no pareciera jugar ningún rol el la hiperexcitabilidad. Sin embargo los resultados obtenidos por nosotros a lo largo del desarrollo de este trabajo que indican que la COX-1 es también un "blanco" farmacológico que debe atacarse para evitar la hiperexcitabilidad espinal, sin descuidar, por supuesto, a la COX-2. Ya que su inhibición específica previno el desarrollo de la hiperexcitabilidad espinal dentro de la primera hora postinflamación (gráfica 3y 4).

El efecto inhibitorio inmediato del SC 560 sobre el desarrollo de la hiperexcitabilidad espinal (gráficas 3 y 4) es compatible con el carácter constitutivo de la COX-1. Dado que esta enzima se encuentra presente en el tejido nervioso, y que sintetiza PGs activamente, su inhibición debe tener un efecto inhibitorio inmediato sobre la acción pro nociceptiva de las PGs.

Por otro la microinyección del SC 560 en animales sanos (sin inflamación) no causó ningún efecto (gráficas 5 y 6). Esto confirma numerosos trabajos anteriores (Ver Millan, 1999) que muestra que los AINEs son poderosos analgésicos que combaten efectivamente el desarrollo de cuadros de hiperexcitabilidad periférica y central asociadas al dolor inflamatorio, pero no afectan el dolor nociceptivo agudo originado en tejidos sanos. Los AINEs, a los que pertenece el SC 560, tampoco tiene propiedades anestésicas, es decir no produce el bloqueo de la conducción nerviosa en neuronas nociceptivas, o aquellas de bajo umbral, importantes para la somestesia general.

Por ultimo nuestros resultados también confirman hallazgos previos que demuestran que los AINEs, drogas clásicamente consideradas como de acción exclusivamente periférica, también actúan en el SNC (Vázquez *et al.* 2005; 2007), concretamente en estructuras pertenecientes al sistema descendente de modulación del dolor como la SGPA.

# CAPÍTULO V CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demuestra la COX-1 tiene un papel importante en el desarrollo de la hiperexcitabilidad espinal.

Los AINEs son drogas efectivas para la prevención del desarrollo de la hiperexcitabilidad espinal.

Por último, la SGPA, estructura clave del sistema descendente de la modulación del dolor, es un sitio de acción de los AINEs.

## BIBLIOGRAFÍA

- Akaike, A., Shibata, T., Satoh, M. Takagi, H., (1978). Analgesia induced by microinjection of norohine into, and electrical stimulation of, nucleus reticular is paragigantocellularis of rat medulla oblongata, *Neuropharmacol.* 17, 775-778.
- Azami, J., LLewelyn, M. B. and Roberts, M. H. (1982). The contribution of nucleus reticularis paragigantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produces by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. *Pain.* 12, 229-246.
- Basbaum, A. L., Canton, C. H., Fields, H. L. (1986). Three bulbospinal pathways from the rostral medulla of the cat: an autoradigraphic of pain modulating systems. *J. Comp. Neurol.* **178**, 209-224.
- Breder, C. D., Dewitt D. and Kraig R. P (1995). Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **355**, 296-315.
- Brune, K. (1987). Pharmacology of central acting analgesics: an introduction. *Potsgrad. Med. J.* **63,** 5-7.
- Campbell, W. B and Halushka, P. V (1996). Lipid-derived autacoids, eicosanoids and platelet-activating factor. In: Harmand, J. G; Limbird, L.E; Molinoff P.B; Ruddon R. W; Gilman, A. G (Eds), Goodman an Gilma's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Mc Graw-Hill: New York.
- Coderre, T. J., Gonzales, R., Gidyne, M. E., West, M. E. and Levine J. D. (1990). Noxiouz stmulis-induced increase in spinal prostaglandin E<sub>2</sub> is noradrenergic terminal-dependent. *Neurosci. Lett.* **115**, 253-258.
- Coggehall, R; Hong, K; Langford, L; Schaible, H and Schmidt, R (1983). Discharge characteristic of fine medial articular afferntes at rest and during passive movements of inflamed knee joints. *Brain Res* 272, 185-1888.
- De la Fuente, G. Fisiotalologia de la inflamación.
- Dickenson, A. H., Le Bars, D., Besson, J. M. (1979). An involvement of nucleus raphe magnus in diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in the rat. *Neurosci. Lett.* **5**, 375.

- Dougherty P. M; Sluka K. A; Sorkin L.S; Westlund K. N and Willis W. D (1992). Neural changes in acute arthritis in monkeys. I. Parallel enhancement of responses of spinothalamic tract neurons to mechanical stimulation and excitatory amino acids. *Brain Res.*Rev. 17.
- Ebersberger, A., Grubb, B. D., Willingale, H. L.; Gardiner, N. J. Nebe, J. and Schaible H.-G. (1999). The intraspinal release of prostaglandin E<sub>2</sub> in a model of acute arthritis is accompanied by up-regulation of cyclo-oxigenase-2 in the spinal cord. *Neuroscience* 93, 775-781.
- Eblen-Zajjur A. A and Sandkuhler J (1997). Synchronicity of nociceptive an non-nociceptive adjacent neurons in the spinal dorsal corn of the rat: stimulus-induced plasticity. *Neuroscience* **76**, 39-54.
- Fields, H. L., Bry, J., Hentall, I., Zorman, G (1983). The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *J Neurosci*. **3**, 2545-2552.
- Fields, H. L. (1987). Pain. McGraw-Hill Book Compay: New York.
- Fitzgerald, M. (1986). Monoamines and desdending control nociception. *Trends Neurosci.* **9**, 51-52.
- Folkman J, Klaysbrun M. Angiogenic (1987). Factors. Science 235: 442-7.
- Form D, Auerback R. (1987). PGE<sub>2</sub> and angiogenesis, *Proc Soc Exp Biol* 1987; **172**, 214-8.
- García, E., Martínez, M. y Gonzáles, H. (2001). Inflamación y dolor: cambios en el sistema nervioso periférico y central. MedUnab. Vol 4 Numero 10.
- Gebhart, G. F., Sandkuhler, J., Thalhammer, J. G., Zimmermann, M. (1983). Inhibition of spinal nociceptiva information by stimulation in midbrain of the cat is blocked by lidocaine microinjected in nucleus raphe magnus ans medullary reticular formation. *J. neurophysiol.* **50**, 1446-1459.
- Gooppelt, M., Beiche, F. (1998). Ciclooxygenase-2 in the spinal cord: localization and regulation alter periphereal inflamatory stimulus. *Adv. Exp. Med. Boil* **433**, 213-216.
- Hambleton P, Miller P. (1989.) Studies on carrageenan air pouch inflammation in the rat. *Br J Exp Path*; **70**: 425-33.
- Hawkey, C.J. COX-2 inhibitors (1999). Lancet; 353: 307-14.
- Hua, X. Y., Chen, P. Marsala, M. and Yaksh, T. L. (1999) Intrathecal substance P- induce termal hyperalgesia and spinal relase of prostagladins E<sub>2</sub> and amino acids. *Neuroscience* 89, 525-534.

- Inoue, A., Ikoma, K., Morioka, N., Kumagai, K., Hashimoto, T., Hide, I. and Nakata, Y. (1999). Interleukin-1 induces substance P release from primary afferent neurons though the cyclooxugenase-2 system. *J. Neurochem.*73, 2206-2213.
- Jensen, T. S., Yaksh, T. L. (1992). Brainstem excitatory amino acid receptors in nociception: microinjection mapping and pharmacological Charactrizacion of glutamate-sensitive sites in the brainstem associated with alogogenic behaviour. *Neuroscience*. 46, 535-547.
- Jessel, T. S and Kelly, D.D (1991). Pain and analgesia. Elsiever: Nee Cork.
- Joris. J, Costello A, Dobher R, Havgraves K (1990). Opiates suppress carragenaninduced edema and hyperthermia at does that inhibit hperalgesia. *Pain* 43 (1), 95-103.
- Lim, R. K. S., Guzman, F., Rodgers, D. E., Goto, K. Braun, G., Dickerson, G. D., Engle, R. J. (1964). Site of action of narcotic and non-narcotic analgesiscs detrmined by blocking brfadikinin-evoked visceral pain. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 152. 25-59.
- Malmberg. A. B. and Yaksh, T. L (1995). Cyclooxygenase inhibition and the spinal Relase of E<sub>2</sub> and amino acids evoked by paw formalin injection: A microdialysis study in unanesthetized rats. *J. neurosci.* **15**, 2768-2776.
- Meade, E.A., Smith W.L. and Dewitt, D.L. (1993). Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxy- genase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti- in ammatory drugs. *J. Biol. Chem.*, **268**, 6610-6614.
- Milla, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative rewiev. Prog. Neurobiol 57, 1-164.
- Minami, T., Okuda-Ashitaka, E. Hori, Y., Sakuma, S., Sugimoto, T., Sakimura, K., Mishina, M. and Ito, S. (1994). Involvemet of primari afferent C-fibres in touch evoked pain (allodynia) induced by prostagandins E<sub>2</sub>. *Eur. J. Neurosci* 11, 1849-1856.
- Nihihara, I., Minami, T., Watanabe, Y., Ito, S. and Hayaishi, O (1995). Prostagandins E<sub>2</sub> stimulates glutamate release from synaptosomes of rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* **196**, 57-60.
- Núñez Cámara C, Ventura López, Martínez Escudero (2001). Boletín fárfarmacoterapéutico de Castilla la Mancha. Vol. II-4.
- Pellegrino, L, Pellegrino, A: and Cusman A. (1981). A sterotaxic atlas of the rat Brain. 2<sup>a</sup> edicción.

- Perena. M. J, Perena. M. F, Rodrigo-Royo M. D y Romera. E (2000). Neuroanatomía del del dolor. *Rev Soc Esp Dolor*; 7: Supl. II, 5-10.
- Perl, E. R (1971). Is pain a specific sensation? J. Psychiat. Res 8, 273-287
- Puebla Díaz. F (2005). Tipos de dolor y escala terapéutica del O.M.S. Dolor iaiaiatrogénico Oncología, 28 (3):139-143.
- Raja S. N; Meyer, R. A and Campbell, J.N (1988). Peripheral mechanism of somatic pain. Anesthesiology 68, 571-590.
- Ramwell, P. W., Shaw, J. E. and Jessup, R. (1996). Spontaneous and evoked reales of prostaglandins from frog spinal cord. *Am. J. physiol.* **211**, 988-1004.
- Reynolds, D. V. (1969). Sugery in the rat durig electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*. **454**, 444-445.
- Riendeau, D., Percival, M.D., Boyce, S., Brideau, C., Char- Leson, S., Cromlish, W., Ethier, D., Evans, J., Falgueyr- Et, J.P., Ford-Hutchinson, A.W., Gordon, R., Greig, G., Gresser, M., Guay, J., Kargman, S., Leger, S., Mancini, J.A., O'neill, G., Ouellet, M., Rodger, I.W., Therien, M., Wang, Z., Webb, J.K., Wong, E., Xu, L., Young, R.N., Zamboni, R., Prasit, P. and Chan, C.C. (1997). Biochemical And Pharmacological Pro®Le Of A Tetrasubstituted Furanone As A Highly.
- Romera. E, Perena. M.J, Perena. M.F, Rodrigo-Royo. M.D (2000). Neurofisiología del dolor. *Rev Soc Esp Dolor*; 7: Supl. II, 11-17.
- Sato H, Hashimoto M, Sugio K, Ohuchi K, Tsurufuji S (1980). Comparative study between steroidal and non-esteroidal anti-inflammatory drugs on the mode of their action on vascular permeability in rat carrageenan air pouch inflammation. *J Pharmacobiodyn*; 3, 345-52.
- Sedgwick AD, Lees P. A (1986). comparison of air pouch sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents Actions*; **18**, 439-46.
- Sandkuhler, J., Gebhart, G. F. (1984). Relative contributions of the nucleus raphe magnus and adjacent medullary reticular formation to the inhibion by stimulation in the periacueductal gray of spinal nociceptiva reflex in the pentobarbital-anesthetized rat. *Brain Res.* **305**, 77-87.
- Schaible, H. G. and Vanegas, H (2000). How do we manage chronic pain? Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol. 14, 797-811.
- Sorkin, L: S. (1993). IT ketorolac blocks NMDA-evoked spinal release of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and tromboxane B<sub>2</sub> (TBXB<sub>2</sub>) *Anesthesiologi* **79**, 908.

- Talbot, J. D; Marret, S; Evans. A. C; Meyer, E; Bushnell, M. c and Duncan, G. H 1991). Multiple representations of pain in human cerebral cortex. *Science* 251, 1355-1358.
- Taiwo, Y. O and Levine, J. D (1998). Prostaglandins inhibit endogenous pain control mechanisms by bloking transmission at spinal noradrenergic sinapses. *J. Neurosci* **8**, 1346-1349.
- Telleira, A., Neubert, A., Schache, F., Vázquez, E., Ebersberger, A. Vanegas, H. and Schaible, G. (2006). Different Effets of Spinally Applied COX-1, COX-2 and Nonselective Cyclooxygenase Inhibitors on Inflammatio-Evoqued Spinal Hyperexcitability.
- Torres-López, Granados-Soto (2001) Participación de la Ciclo-Oxigenasa-1 en el Dolor Inflamatorio. *Universidad y ciencia*. Vol 17 N° 34.
- Tortorici, V. and Vanegas, H. (1995). Anti-Nociception Induced By Systemic Or Pag-Microinjected Lysine-Acetylsalicylate In Rats. E€Ects On Tail- Ick Related Activity Of Medullary O€- And On-Cells. Eur. J. Neurosci., 7, 1857 ± 1865.
- Vane J. R (1971). Inhibitions of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature* **231**,232-235.
- Vane J. (1986). Prostaglandin as mediators of inflammation, Arch. *Prostaglandin Tromboxane Res*; **2**, 791-6.
- Vanegas, H and Schaible, H (2001). Prostaglandins and cyclooxigenases in the spinal cord. *Prog Neurobiol* **64**, 327-363.
- Vanegas, H., Tortorici, V., Eblen-Zajjur, A. and Vazquez E. (1997). PAG-microinyectec dipyrone (metamizol) inhibits reesponses of spinal dorsal horn neurons to natural noxious stimulation in rats. *Brain Res*: 759, 171-174.
- Vazquez E, Escobar W, Ramirez K, Vanegas H. A nonopioid analgesic acts upon the PAG-RVM axis to reverse inflammatory hyperalgesia (2007). Eur J Neurosci. Jan;25 2:471-9
- Wall, P. D. (1967). The laminar organization of dorsal horn and effects of descendibg impulses. *J Physiol. (Lond.)*, **188**, 403-423.
- Willingale, H. L., Gardiner, N. J., McLymont, N., Giblett, S. and Grubb, B. D (1997). Prostanoid sythetized by ciclooxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. *Br. J. Pharmacol.* **122**, 1593-1604.

- Willis, W. D.,(1985). The Pain System: The neuronal basis of nociceptive transmission in the mammalian nervous system. S. Karger: Basel.
- Wolf, T. J (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*. Pag 686-688.
- Yaksh, T. L. (1982). Central an peripheral mechanism for the analgesic action of acetylsalicrlic acid. Acetylsalicylic acid: New Uses for an old Drug. En: H.J.M. Barnett, J. Hirsh, J. F. Mustard (Eds.), *Raven Press*, New York, pp. 137-151.
- Yang, L. C. Marsaa, M. And Yaksh, T. L (1996). Effect of spinal kainic acid receptor on spinal amino acid and prostaglandin E<sub>2</sub> release in rat. Neuroscience 78, 453-61.
- Zimmermann, M. (1984). Schmerz. Konzepte arztliche Handelns. En: M. Zimmermann, H. O. Handwerker (Eds.), Spinger, Berlin, pp 1-43

00000000000

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*