

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**IMPLICACIÓN DE LA MEDETOMIDINA Y DEL
ÁCIDO RETINOICO EN LA SENSIBILIZACIÓN
NOCICEPTIVA. INTERACCIÓN CON ANTI-
INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS.**

TESIS DOCTORAL

Carlos Molina Camacho

2007

D. Pedro de la Villa Polo, Director del Departamento de Fisiología y Catedrático de Fisiología de la Universidad de Alcalá

CERTIFICA

Que la presente Tesis Doctoral, que lleva por título *“Implicación de la medetomidina y del ácido retinoico en la sensibilización nociceptiva. Interacción con anti-inflamatorios no esteroideos”*, que presenta D. **Carlos Molina Camacho** para optar al grado de Doctor por la Universidad de Alcalá, ha sido realizada bajo la dirección del Prof. Dr. D. Juan Fernando Herrero González en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Alcalá y que cumple todos los requisitos legales para proceder a su defensa pública.

Y para que conste donde convenga y surta los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Alcalá de Henares a 18 de Diciembre de 2006.

D. Juan Fernando Herrero González, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Alcalá

CERTIFICA

Que la presente Tesis Doctoral, que lleva por título *“Implicación de la medetomidina y del ácido retinoico en la sensibilización nociceptiva. Interacción con anti-inflamatorios no esteroideos”*, que presenta D. **Carlos Molina Camacho** para optar al grado de Doctor por la Universidad de Alcalá, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Alcalá y que cumple todos los requisitos legales para proceder a su defensa pública.

Y para que conste donde convenga y surta los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Alcalá de Henares a 18 de Diciembre de 2006.

AGRADECIMENTOS

A Juanfer, que se preocupó tanto como yo para que esta tesis saliese adelante, mezclando amistad, sabiduría y paciencia.

A mis compañeros de laboratorio en estos años: Javier, Gema, Guillermo y Mar. Muy especialmente a Alfonso, más compinche que compañero, catalizador de tantos momentos inolvidables.

A mis compañeros del Departamento de Fisiología, en especial a mis amigas Mati y Mercedes, siempre dispuestas a prestarme ayuda.

A Elsa, un estímulo constante para superarme.

ARTICULOS EN REVISTAS

- E. Alfonso Romero-Sandoval, Matilde Alique, Victoria Moreno-Manzano, Carlos Molina, Francisco J. Lucio y Juan F. Herrero. The oral administration of retinoic acid enhances nociceptive withdrawal reflexes in rats with soft-tissue inflammation. *Inflammation Research* 53, 1-7. Febrero 2004.

- Carlos Molina y Juan F. Herrero. The influence of the time course of inflammation and spinalization on the antinociceptive activity of the α_2 -adrenoceptor agonist medetomidine. *European Journal of Pharmacology* 532, 50-60. Febrero 2006.

- E. Alfonso Romero-Sandoval, Carlos Molina y Juan F. Herrero. Enhancement of the analgesic activity of paracetamol and nitroparacetamol by the oral administration of *all-trans* retinoic acid. *Neuropharmacology* 51, 858-65. Septiembre 2006.

- E. Alfonso Romero-Sandoval, Carlos Molina, Matilde Alique, Victoria Moreno-Manzano, Francisco J. Lucio y Juan F. Herrero. Vitamin A active metabolite, *all-trans* retinoic acid, induces spinal cord sensitization. I. Effects after oral administration. *British Journal of Pharmacology* 149, 56-64. Septiembre 2006.

- Carlos Molina y Juan F. Herrero. Potenciación del efecto antinociceptivo de la medetomidina mediante su combinación con dosis subanalgésicas de AINEs. En preparación.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- Carlos Molina y Juan F. Herrero. La valoración de la efectividad analgésica de la medetomidina en el dolor inflamatorio depende de la fase de la inflamación y del tipo de estímulo. Comunicación Póster. X Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia. Revista de Neurología 37, (P-131) 1149, 2003. Lleida, del 6 al 9/09/2003.

- Carlos Molina, E. Alfonso Romero-Sandoval, Matilde Alique, Victoria Moreno-Manzano, Francisco J. Lucio y Juan F. Herrero. The oral administration of retinoic acid enhances nociceptive withdrawal reflexes and the expression of the COX 2 enzyme. Comunicación Póster. 4th Forum of European Neuroscience. FENS Forum Abstracts, vol. 2, A051.15, 2004. Lisboa (Portugal), del 10 al 14/07/2004.

- Carlos Molina y Juan F. Herrero. Modulación central y periférica del efecto analgésico de la medetomidina en situación de inflamación. . Comunicación Póster. XI Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia. Revista de Neurología 41, (P-438) 122, 2005. Málaga, del 15 al 18/09/2005.

- Carlos Molina, E. Alfonso Romero-Sandoval, Matilde Alique, Francisco J. Lucio y Juan F. Herrero. Retinoic acid induces pronociceptive activity after oral and intrathecal administration. Comunicación Póster. 35th Annual meeting of the Society for Neuroscience. Washington D.C. (EEUU), del 12 al 16/11/2005.

Los trabajos de investigación han sido realizados gracias a la financiación aportada por proyectos de:

- Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2001-1048-C03-03)
- Comunidad de Madrid (GR/SAL/0815/2004)
- NicOx, S.A.
- Grünenthal, S.A.

RESUMEN

A large number of chemical mediators and neurotransmitters are involved in the processing of nociceptive information, both in peripheral sites and in the central nervous system. The final sensation of pain depends on the interaction among these neuromodulators. Chemical mediators implicated in the nociceptive system can be pooled in two groups: pronociceptive substances, which facilitate the transmission of the nociceptive message and the development of pain, and analgesic or antinociceptive substances, which difficult the transmission of the nociceptive information and, therefore, reduce or eliminate pain. Analgesia can be reached through the activation of inhibitory systems or/and by the blockage of excitatory systems.

Among the systems involved in nociception, we have studied the analgesic actions of medetomidine (MED), an α_2 -adrenergic agonist, and the pronociceptive actions of all-*trans* retinoic acid (ATRA), an active metabolite of vitamin A, as well as their possible roles in inflammation-induced sensitization processes. In addition, we studied the possible enhancement of antinociception when combined with cyclooxygenase (COX) inhibitors, such as paracetamol (PAR) and its NO-derivative nitroparacetamol (NOP).

The recording of single motor units (SMU) in male Wistar rats showed that MED was a very efficacious antinociceptive agent, reducing the responses to noxious mechanical stimulation in animals with inflammation. In behavioral and electrophysiological experiments, we observed that its antihyperalgesic effect depends on the time course of inflammation, being more intense in the phase of maintenance than in the early or resolution stages. This effect is mainly located supraspinally, because it was more pronounced in animals with an intact spinal cord than in spinalized animals. The administration of subanalgesic doses of NOP induced a significant enhancement of the intensity and duration of the antinociceptive effect of MED. This observation might be useful in the therapy against pain, specially when considering the reduction of the dose required to induce analgesia.

The oral administration of ATRA induces an enhancement of the nociceptive withdrawal reflexes evoked by mechanical and thermal stimulation in behavioral experiments, either in normal animals or in animals with inflammation. Likewise, ATRA induces a sensitization-like effect on spinal cord neuronal responses, similar to that observed by the induction of inflammation, i.e. decreased thresholds for natural and electrical stimulation and enlargement of cutaneous receptive fields. Thus, ATRA

seems to be involved in the mechanisms underlying the generation and/or maintenance of sensitization in the spinal cord. The mechanism of action includes the activation of RAR receptors and the up-regulation of the expression of COX enzymes in dorsal and ventral horn areas of the lumbar spinal cord assessed by Western blot analysis and immunohistochemistry. Since COX enzymes are the substrate of action of COX inhibitors, we studied, using the recording of SMU technique, the analgesic activity of PAR and NOP in the presence and in the absence of ATRA. We observed that the antinociceptive activity of NOP in normal animals, but not PAR, increased in the presence of oral ATRA up to a level similar to that seen in animals with inflammation and without ATRA. This increased analgesic activity might be due to the up-regulation of the expression of COX enzymes induced by ATRA.

Finally we studied the possible antinociceptive interaction of ATRA with MED, fentanyl (FEN) and S-ketoprofen (S-KET). The oral administration of ATRA did not induce a significant enhancement of the antinociceptive effect of any of the compounds studied. However, additional experiments showed an important enhancement of S-KET activity when injected intrathecally, confirming a central, but not peripheral, interaction of ATRA and COX-activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **AINE:** Antiinflamatorio no esteroideo
- **ANOVA:** Análisis de la varianza
- **AR:** Ácido retinoico
- **ATI:** Atipamezol
- **ATP:** Trifosfato de adenosina
- **ATRA:** Ácido retinoico todo-*trans*
- **CAR:** Carragenina
- **CMC:** Carboximetilcelulosa
- **CGRP:** Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
- **COMT:** Catecol-O-Metil-Transferasa
- **COX:** Ciclooxygenasa
- **DE₅₀:** Dosis efectiva 50
- **DME:** Dosis mínima efectiva
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido
- **e.e.m.:** Error estándar de la media
- **FEN:** Fentanilo
- **GABA:** Ácido γ -aminobutírico
- **IL1 β :** Interleucina 1 β
- **i.p.:** Intraperitoneal
- **i.v.:** Intravenosa
- **IASP:** International Association for the Study of Pain
- **MAO:** Monoamino oxidasa
- **MED:** Medetomidina

- **NA:** Noradrenalina
- **NO:** Óxido nítrico
- **NO-AINE:** Antiinflamatorio no esteroideo liberador de óxido nítrico
- **NOP:** Nitroparacetamol
- **PAR:** Paracetamol
- **p.o.:** Vía oral
- **PEG:** Polietilenglicol
- **PG:** Prostaglandina
- **RAR:** Receptores de ácido retinoico
- **RXR:** Receptores X de retinoides
- **SGP:** Sustancia gris periacueductal
- **S-KET:** S-ketoprofeno
- **SNA:** Sistema nervioso adrenérgico
- **SNC:** Sistema nervioso central
- **UMA:** Unidad motora aislada

ÍNDICE

• Publicaciones	i
• Resumen	iii
• Abreviaturas	vi
• Índice	viii
• Introducción	
1. Concepto de dolor.....	2
2. Vías del dolor.....	2
2.1. <i>Nociceptores</i>	3
2.2. <i>Procesamiento medular de la información nociceptiva</i>	4
2.3. <i>Reflejo de retirada</i>	5
2.4. <i>Vías ascendentes</i>	6
2.5. <i>Integración de la información nociceptiva en los centros superiores: tálamo y corteza</i>	7
2.6. <i>Modulación descendente de la información nociceptiva</i>	9
3. Tipos de dolor.....	10
4. Sensibilización: hiperalgesia y alodinia.....	12
5. Neuroquímica de la nocicepción.....	14
6. 5.1. <i>Agonistas α_2-adrenérgicos</i>	15
5.2. <i>AINEs</i>	18
5.3. <i>Ácido Retinoico</i>	21
7. Objetivos generales.....	23
• Materiales y Métodos	
1. Técnicas comportamentales.....	25
1.1. <i>Elaboración de las curvas intensidad-respuesta</i>	25
1.2. <i>Estimulación térmica</i>	29
1.3. <i>Control de la inflamación</i>	30
1.4. <i>Análisis de datos</i>	32
2. Técnica de unidades motoras aisladas.....	32
2.1. <i>Cirugía y anestesia</i>	33
2.2. <i>Aislamiento y estimulación de las unidades motoras</i>	35
2.3. <i>Equipo de registro</i>	39
3. Fármacos.....	41
• Capítulo I: Influencia de la fase de la inflamación y de la espinalización en la actividad antinociceptiva del agonista α_2-adrenérgico medetomidina.	
I.1. Objetivos.....	44
I.2. Introducción.....	45
I.3. Métodos.....	46
I.4. Resultados.....	50
I.5. Discusión.....	59
I.6. Conclusiones.....	63
• Capítulo II: Potenciación del efecto antinociceptivo de la medetomidina mediante su combinación con dosis subanalgésicas de AINEs.	
II.1. Objetivos.....	65
II.2. Introducción.....	66
II.3. Métodos.....	67
II.4. Resultados.....	69
II.5. Discusión.....	73
II.6. Conclusiones.....	76
• Capítulo III: La administración oral de ácido retinoico aumenta las respuestas nociceptivas en ratas con inflamación de tejido blando.	
III.1. Objetivos.....	78
III.2. Introducción.....	79
III.3. Métodos.....	79
III.4. Resultados.....	81

III.5. Discusión.....	84
III.6. Conclusiones.....	89
• Capítulo IV: La administración oral de ácido retinoico induce sensibilización en la médula espinal.	
IV.1. Objetivos.....	91
IV.2. Introducción.....	92
IV.3. Métodos.....	93
IV.4. Resultados.....	96
IV.5. Discusión.....	99
IV.6. Conclusiones.....	105
• Capítulo V: La administración oral de ácido retinoico mejora la efectividad analgésica del paracetamol y el nitroparacetamol.	
V.1. Objetivos.....	107
V.2. Introducción.....	108
V.3. Métodos.....	109
V.4. Resultados.....	111
V.5. Discusión.....	115
V.6. Conclusiones.....	121
Capítulo VI: Estudio de la interacción nociceptiva del ácido retinoico con el s-ketoprofeno, el fentanilo y la medetomidina.	
VI.1. Objetivos.....	123
VI.2. Introducción.....	124
VI.3. Métodos.....	125
VI.4. Resultados.....	133
VI.5. Discusión.....	138
VI.6. Conclusiones.....	141
• Conclusiones finales	142
• Bibliografía	144

INTRODUCCIÓN

1. CONCEPTO DE DOLOR

El dolor es una sensación difícil de definir por su especificidad y variabilidad. Cada persona podría definirlo de una manera diferente. De hecho, en situaciones de igual intensidad traumática, la reacción dolorosa varía de un individuo a otro (Coghill et al., 2003). Además, en una misma persona, la percepción del dolor puede variar según la naturaleza del trauma, la recuperación y las circunstancias en que se produce el origen de la sensación (Sandkuhler, 2000; Klein et al., 2004). Aunando criterios, el dolor ha sido definido por la Asociación Internacional para el estudio del dolor (IASP) como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a daño tisular potencial o real, o descrita en términos de dicho daño” (IASP, 1979 y 1986).

Sin embargo, el dolor es igualmente una sensación esencial para la supervivencia y sin experiencia del dolor no puede haber reflejo protector, ni miedos, ni prevención de riesgos. Desde este punto de vista, el desarrollo de un sistema nervioso plástico, capaz de reaccionar ante estímulos nocivos y detectar, recordar, adaptarse o huir del peligro, pudo ser consecuencia de esta naturaleza del dolor como sistema de alarma (Woolf y Salter, 2000). Finalmente, el dolor es también un problema físico, psicológico y social, que puede afectar el desenvolvimiento y conducta normal de un individuo. Este componente tan negativo es el que nos impulsa a luchar contra él, en busca de tratamientos eficaces e inocuos.

2. VÍAS DEL DOLOR

Existe una clara disociación entre las componentes sensorial y afectiva del dolor. La corteza anterior (prefrontal y supraorbital, especialmente) junto con la circunvolución del cíngulo y la corteza insular están relacionadas con la respuesta emocional, mientras que la corteza somatosensorial se relaciona con la dimensión sensorial, es decir, con la calidad e intensidad del dolor (Basbaum y Jessell, 2000; Hofbauer et al., 2001). Para llegar a sentir dolor es necesario un proceso sensorial previo que permita la llegada de las señales que lo desencadenan. Este proceso se denomina nocicepción, siendo el sistema nociceptivo el conjunto de estructuras del sistema nervioso encargadas de procesar la información nociceptiva. Nocicepción es, por tanto, la respuesta del sistema al estímulo nocivo, mientras que el dolor consiste en la evocación consciente de la información nociceptiva y su interpretación o percepción (López-García y Herrero, 1998). Un estímulo capaz de provocar daño en tejidos sanos se considera nocivo (IASP, 1986). Sin embargo pueden darse

circunstancias tanto de dolor sin daño tisular, como de ausencia de dolor aun existiendo daño en los tejidos y la consiguiente activación del sistema nociceptivo.

2.1. Nociceptores

El camino que sigue la información nociceptiva hasta ser transformada en percepción en los centros superiores, parte de los nociceptores. Son terminaciones nerviosas libres, sin especialización de membrana, capaces de detectar estímulos nocivos mecánicos, térmicos o químicos y enviar esta información en forma de potenciales de acción al sistema nervioso central (SNC), a través de una fibra aferente primaria o central. Los nociceptores se caracterizan por tener un umbral de respuesta muy alto (sólo se activan con estímulos nocivos), actividad postdescarga (mantenimiento de las respuestas después de cesar el estímulo), y por ser de fácil sensibilización (aumentan su excitabilidad tras una estimulación continuada). Se clasifican en varios tipos en función del estímulo que los active y las características de la fibra aferente (Basbaum y Jessell, 2000):

Nociceptor mecánico.- Fibras A δ y C que responden únicamente a estimulación mecánica nociva.

Nociceptor térmico.- Fibras C que se activan con estímulos térmicos de alta (más de 45 °C) y baja (menos de 5 °C) intensidad.

Nociceptor químico.- Fibras C que son sensibles a sustancias químicas exógenas, por ejemplo irritantes en contacto con la piel, o endógenas, como las sustancias liberadas por las células del tejido dañado (iones hidrógeno, potasio, serotonina, histamina, noradrenalina, sustancia P, prostaglandinas o leucotrienos). La mayoría de los nociceptores actúan como quimioceptores, puesto que los mediadores químicos son capaces de modificar la actividad de las fibras aferentes (Raja et al., 1984; Levine, 1987).

Nociceptor termomecánico.- Fibras A δ que responden a estímulos mecánicos y térmicos (Lawson, 1996).

Nociceptor polimodal.- Fibras C capaces de responder frente a estimulación mecánica, térmica y química. Constituyen el grupo más numeroso (Coutaux et al., 2005).

Nociceptor silente.- Fibras C, habitualmente inactivas, que sólo responden a estímulos mecánicos como la distensión y estiramiento o a la liberación de diversas sustancias, como sucede en caso de inflamación (McMahon y Koltzenburg, 1990). Se consideran como un sistema de alarma que se activa ante situaciones de riesgo de daño tisular grave (Fields et al., 1984; Go et al., 1987).

Los nociceptores periféricos tienen sus cuerpos celulares en los ganglios raquídeos y alcanzan la médula espinal a través de las raíces dorsales, terminando en el asta posterior. La primera neurona de las vías del dolor es bipolar, con un extremo distal en la periferia, el cuerpo en el ganglio raquídeo y el extremo proximal, la aferente primaria, en el asta posterior de la médula espinal.

Estas fibras pueden ser de dos tipos: A δ y C (Tabla I.1). Las fibras A δ suponen en la piel un 10% de las fibras aferentes sensitivas. Transmiten información procedente de nociceptores de tipo mecánico y térmico, relativa a sensaciones localizadas con precisión. Su estimulación provoca una sensación de dolor que es definido como rápido, agudo o punzante. Por el contrario, cuando la intensidad de estimulación es lo suficientemente alta como para activar fibras C, el dolor que se experimenta se define como lento, sordo, indefinido o duradero. Constituyen el 70 % de las fibras aferentes sensitivas de la piel (Millan, 1999).

Fibras Nociceptivas	Tipo	Velocidad	Diámetro
Fibras Aδ	Mielínicas	4 - 30 m/s	1 - 5 μm
Fibras C	Amielínicas	0.4 - 2 m/s	0.3 – 1.5 μm

Tabla I.1.- Características de las fibras aferentes primarias.

En el asta dorsal de la médula espinal las fibras A δ realizan sinapsis con neuronas situadas esencialmente en las láminas I (capa marginal) y V, mientras que las fibras C terminan casi exclusivamente en la lámina II (sustancia gelatinosa).

2.2. Procesamiento medular de la información nociceptiva

El asta dorsal de la médula espinal o su equivalente en el núcleo del trigémino, se considera como el primer nivel de integración de la información nociceptiva en el SNC. Las interneuronas espinales modulan la información recibida, envían esa

información a través de las vías ascendentes y elaboran las respuestas reflejas. Teniendo en cuenta las características de sus aferencias cutáneas, las neuronas nociceptivas pueden ser de dos tipos:

Clase II o convergentes o de rango dinámico amplio. Son neuronas activadas por fibras aferentes de bajo umbral así como por aferencias nociceptivas. Reciben información de un gran número de nociceptores. Sus campos receptores son muy amplios, por lo que carecen de la capacidad de localización precisa de los estímulos periféricos.

Clase III o nociespecíficas. Son neuronas activadas exclusivamente por aferencias nociceptivas. Poseen campos receptores pequeños. Participan en los procesos de localización fina de los estímulos periféricos nocivos.

Las neuronas de clase I, o de bajo umbral, reciben únicamente información de baja intensidad y no parecen estar implicadas en el procesamiento de la información nociceptiva en condiciones fisiológicas. El procesamiento medular de la información nociceptiva es, en gran parte, desconocido. Sabemos, sin embargo, que como resultado de este procesamiento, se envía una respuesta ascendente, a través de neuronas de proyección, y una respuesta periférica, a través de motoneuronas del asta anterior. La respuesta periférica es refleja y su función es provocar la contracción de los músculos cercanos al lugar que está siendo dañado. El resultado es un reflejo de retirada, que trata de evitar un daño tisular mayor. La respuesta ascendente se dirige por distintas vías a lugares superiores de procesamiento para, fundamentalmente, evocar la sensación de dolor. Existen también vías descendentes que, partiendo de niveles superiores del SNC, modulan y controlan el procesamiento medular de la información nociceptiva (López-García y Herrero, 1998).

2.3. Reflejo de retirada

El reflejo de retirada es un mecanismo puramente nociceptivo de carácter flexor y polisináptico, que se produce íntegramente en la médula y, por tanto, es inconsciente y rápido (Sherrington, 1910).

Los sistemas interneuronales de la médula espinal se encargan de integrar y procesar la información nociceptiva procedente de los nociceptores previamente activados (Schomburg y Steffens, 1986). Esta información llega a los músculos responsables de la flexión o retirada de la extremidad dañada a través de α -motoneuronas. La contracción de los músculos agonistas y relajación de los antagonistas, característica del reflejo de retirada, va acompañada de un reflejo antagónico en el lado contralateral, denominado reflejo extensor cruzado, que tiene la función de mantener el equilibrio, comprometido al retirar rápidamente el miembro sometido al estímulo nocivo.

Al ser una respuesta nociceptiva pura, el reflejo de retirada ha sido y es muy utilizado como herramienta para el estudio del procesamiento espinal de información nociceptiva (Herrero y Headley, 1991; Romero-Sandoval et al., 2004; Molina y Herrero, 2006).

2.4. Vías ascendentes

La información de tipo nociceptivo se transmite hacia el encéfalo mediante vías o tractos que se originan en las neuronas de proyección del asta medular dorsal o del núcleo espinal del trigémino. La mayor parte de la información se transmite a través de 5 vías cruzadas ascendentes (Basbaum y Jessel, 2000):

Tracto Espino-talámico.- Es la vía más importante para la transmisión de la información nociceptiva. Se origina a partir de las neuronas medulares de las láminas I, V, VII y VIII, cuyos axones ascienden por la sustancia blanca anterolateral hasta el tálamo. Parte de las fibras finalizan su recorrido en el tálamo y las restantes se proyectan hacia la corteza sensitiva primaria y secundaria. Transmite información sobre la modalidad, la intensidad y la localización del estímulo.

Tracto Espino-reticular.- Su origen reside en las neuronas de las láminas V, VII y VIII del asta dorsal. Termina en distintos niveles del tronco encefálico, especialmente en los núcleos mediales de la formación reticular. Este tracto está asociado con la reacción de alerta ante los estímulos dolorosos y con los aspectos emocionales de la estimulación sensitiva somática.

Tracto Espino-mesencefálico.- Con origen en las láminas I y V del asta dorsal, sigue un trayecto ascendente por la porción dorsal del cordón lateral y termina en la formación reticular, en la sustancia gris periacueductal, en el núcleo parabraquial y en el tubérculo cuadrigémino superior. Se asocia también a los aspectos afectivos de la percepción dolorosa.

Tracto Espino-hipotalámico.- Se origina a partir de las neuronas de las láminas I, V y VIII. Sus fibras llegan directamente al hipotálamo. Se cree que a través de esta vía se activan las respuestas vegetativas y emocionales a los estímulos nociceptivos. (Giesler et al., 1994; Warren et al., 1997).

Tracto Cérvico-talámico.- Tiene su origen en neuronas de de láminas III y IV. Continúa hasta núcleos en el cerebro medio y el núcleo ventral posterolateral del tálamo.

2.5. Integración de la información nociceptiva en los centros superiores: tálamo y corteza

El **tálamo** actúa como estación de procesamiento de una gran parte de la información nociceptiva. Posteriormente, esta información procesada se proyecta a la corteza cerebral. El tálamo está formado por diversos grupos de núcleos, siendo sus conexiones tan diversas que no se puede hablar de una función unitaria. Son varios los núcleos talámicos que reciben información nociceptiva, aunque existen dos núcleos especialmente implicados en esta tarea:

Núcleos talámicos laterales y, específicamente, las divisiones medial y lateral del núcleo ventral posterior. La parte lateral del núcleo, denominado núcleo ventral posterolateral, recibe aferencias sensitivas del tronco y de las extremidades, por medio del tracto espinotalámico, aunque también recibe fibras del tracto cérvico-talámico. Desde este núcleo, las neuronas talámicas envían sus axones principalmente al área somestésica primaria. La parte medial del núcleo o núcleo ventral posteromedial recibe aferencias procedentes de la cara y de otras estructuras cefálicas.

Núcleos talámicos mediales y núcleos intralaminares. Reciben aferencias del tracto espinotalámico. Estos núcleos son de proyección difusa, enviando las eferencias hacia las áreas sensitivas somáticas del lóbulo parietal, pero

también hacia las áreas motoras, las estructuras límbicas y los núcleos basales.

Por lo tanto, de acuerdo con los distintos núcleos diana de las vías nociceptivas, se pueden considerar dos sistemas de procesamiento de la información nociceptiva: medial y lateral (Albe-Fessard et al., 1985; Jones y Derbyshire, 1996). El sistema medial incluiría la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo y los núcleos talámicos mediales e intralaminares, que se proyectan hacia la circunvolución del cíngulo y otras estructuras límbicas, y la corteza prefrontal. El sistema medial sería el responsable del componente afectivo y emocional del dolor. De ahí la utilización de la ablación de los núcleos intralaminares como tratamiento del dolor crónico (Clark y Boutros, 1999). El sistema lateral incluiría los núcleos ventrales posterolateral y posteromedial, que se proyectan hacia la corteza parietal. El sistema lateral sería el responsable de la localización exacta del estímulo doloroso (Hutchinson et al., 1992; Sherman et al., 1997).

En la **corteza cerebral** ocurre el procesamiento último de la información nociceptiva y la percepción del dolor. Sabemos que el dolor es una sensación compleja en la que influyen experiencias previas y el contexto en el que se produce el estímulo nocivo (Petrovic et al., 2000). Las neuronas de determinadas regiones de la corteza cerebral responden selectivamente a los estímulos nocivos. Sin embargo, no se puede hablar de un centro específico de procesamiento de la información nociceptiva, sino de un conjunto de estructuras involucradas, que daría lugar a una matriz de estructuras neuronales o neuromatriz (Melzack, 1999) formada por diversas áreas, participando cada una de ellas en un aspecto de la percepción. Dentro de este conjunto de estructuras se incluyen:

Corteza somestésica primaria. A este área llegan las señales procedentes de los núcleos talámicos ventral posterolateral y ventral posteromedial.

Corteza insular. Se cree que su parte posterior participa en los aspectos emocionales de la percepción del dolor (Casey et al., 1994; Clark y Boutros, 1999) y también en relación con la memoria (Treede et al., 2000).

Circunvolución del cíngulo. Además de estar involucrada en el procesamiento de la información en tareas cognitivas y motoras complejas, parece estar relacionada con el componente afectivo de los estímulos nocivos y

en los mecanismos de aprendizaje asociados con la predicción y la evitación del dolor. Se le atribuye la organización de las respuestas motoras adecuadas a los estímulos nocivos, ya sean de evitación o de adaptación (Devisnky et al., 1995; Petrovic e Ingvar, 2002).

Corteza prefrontal. Se cree que la activación de la porción dorsolateral por un estímulo doloroso se corresponde con la elaboración de mecanismos de conducta y atención frente al dolor (Derbyshire et al., 1997).

Amígdala. Una de sus funciones principales consiste en asignar una carga emocional a las diversas situaciones que experimenta el sujeto.

Hipotálamo. Se trata de una estructura esencial para la coordinación de las pautas dirigidas a la supervivencia del individuo y a su reproducción. Le llegan aferencias del tracto espinohipotalámico, que aporta información nociceptiva desde el asta dorsal medular. Recibe también información indirecta procedente de la médula por medio de aferencias de la formación reticular y de la sustancia gris periacueductal. Del hipotálamo parten proyecciones hacia la sustancia gris periacueductal y el bulbo raquídeo, estructuras relacionadas con el control de la llegada de los estímulos nocivos al SNC y con el inicio de las conductas de agresión y defensa.

La percepción del dolor se debe, por tanto, a múltiples áreas corticales y subcorticales. Asimismo, parece ser que cuanto mayor es la intensidad de la estimulación nociva, más estructuras, tanto ipsilaterales como contralaterales, se suman al procesamiento de la información (Coghill et al., 1999).

2.6. Modulación descendente de la información nociceptiva

Existen varios circuitos neuronales de tipo modulador, situados a distintos niveles en el sistema nervioso, cuya función consiste en regular la percepción del dolor.

Se cree que estos circuitos moduladores constituyen un mecanismo de adaptación ante situaciones en las que, al generarse un determinado nivel de estrés, la reacción habitual al dolor (reflejo de retirada, escapada, reposo y recuperación) puede resultar desfavorable. Por ello, durante el estrés provocado por estas situaciones, las reacciones al dolor pueden ser suprimidas (Fanselow, 1994).

A nivel central existen varios circuitos moduladores del dolor que controlan la llegada de la información nociceptiva procedente de las vías nociceptivas aferentes. (Stamford, 1995; Warren et al., 1997; Basbaum y Jessell, 2000; Petrovic e Ingvar, 2002). Son vías muy numerosas y mal delimitadas. Entre ellas, las más importantes son:

Fibras descendentes con origen en la **sustancia gris periacueductal**. La sustancia gris periacueductal (SGP), es un centro nervioso que actúa de enlace entre emoción, dolor y conductas defensivas (Clark y Boutros, 1999). Las fibras descendentes de la SGP envían conexiones excitadoras a los núcleos del rafe relacionados con la supresión del dolor, en especial el núcleo magno, tanto de forma directa como mediante interneuronas de la formación reticular del bulbo raquídeo. Algunas de las fibras de la SGP se proyectan directamente hacia el asta dorsal medular. Desde los núcleos del rafe, que utilizan como neurotransmisores serotonina y diversos neuropéptidos, como por ejemplo opioides, se envían fibras descendentes que realizan conexiones de tipo inhibitorio con las neuronas de las láminas I, II y V del asta dorsal y con las del núcleo espinal del Trigémino, regulando la entrada de señales nociceptivas (Masson y Leung, 1996).

Fibras descendentes originadas en el **locus coeruleus**. El locus coeruleus forma parte de la formación reticular y recibe conexiones aferentes del hipotálamo, la amígdala, los núcleos del rafe, la sustancia negra y la SGP. Envía proyecciones descendentes hacia la médula espinal y el núcleo del trigémino. Estas fibras bloquean la salida de información de las neuronas de las láminas I y V del asta dorsal, mediante acciones inhibitorias directas e indirectas mediadas por receptores adrenérgicos (Budai et al., 1998; Pudovkina y Westerink, 2005).

3. TIPOS DE DOLOR

El dolor se puede clasificar según distintos criterios. Por ejemplo, utilizando un criterio de temporalidad, podemos hablar de dolor agudo o crónico. El dolor **agudo** aparece como respuesta ante un daño específico de corta duración o baja intensidad y desaparece cuando cesa el daño. Se trata de un dolor útil y bien localizado. Por el contrario, el dolor **crónico** es, en ocasiones, un dolor inútil, que tiende a permanecer en el tiempo más allá de la causa que lo inició. En muchas ocasiones es un dolor de

difícil tratamiento, por lo que una de sus principales características es el componente psicológico de frustración del paciente, al observar la persistencia de la sintomatología. También podemos distinguir entre dolor **somático** o **visceral**, según cual sea el origen del estímulo nocivo.

Actualmente es muy aceptada la clasificación propuesta por Cerveró y Laird en 1991, que consiste en dividir el dolor en etapas o fases, teniendo en cuenta sobre todo, el estado funcional del sistema nociceptivo y las consecuencias clínicas. De esta manera, se diferenciarían tres tipos de dolor (Figura I.1):

Dolor de **Fase I o fisiológico**.- Resultante de estimulación nociva breve o de baja intensidad. La duración e intensidad del dolor están directamente relacionadas con la duración e intensidad del estímulo. El sistema nociceptivo funciona con normalidad, es decir, la frecuencia de disparo de la neurona aumenta de forma proporcional a la intensidad del estímulo. Esta codificación de frecuencia de disparo es característica del sistema nociceptivo. Se trata de un dolor protector que actúa como mecanismo de defensa.

Dolor de **Fase II o inflamatorio**.- Consecuencia de estímulos muy intensos o prolongados, que provocan un daño en el área estimulada y una reacción inflamatoria. La reacción inflamatoria conlleva la activación de los nociceptores silentes y la sensibilización del resto de los nociceptores. Este proceso se denomina sensibilización periférica, y supone una disminución intensa del umbral de activación y un aumento de la información nociceptiva que llega a la médula. Como consecuencia, se puede producir una sensibilización central, que se manifiesta en una hiperexcitabilidad de las neuronas medulares, aumentando el disparo de potenciales de acción y la liberación de neuromedidores químicos. El resultado es que en el dolor inflamatorio se pierde la relación entre la intensidad y duración del estímulo y el dolor evocado. Aparecen los fenómenos de **alodinia** e **hiperalgesia** (ver más adelante, página 13).

Dolor de **Fase III o neuropático**.- Aparece en casos de daño del SNC (tumores, traumatismos en la médula espinal), periférico (amputación de miembros) o en procesos crónicos (artritis crónica). En estos casos, el sistema nociceptivo se altera de forma patológica, debido a la formación de circuitos aberrantes en forma de bucles que amplifican y cronifican la información

nociceptiva. La sensibilización central continúa indefinidamente, ocasionando dolor espontáneo, alodinia e hiperalgesia. Es el dolor de más difícil tratamiento, y además el más imprevisible, puesto que la sensación dolorosa presenta una carencia total de relación con el estímulo. También se conoce como dolor intratable o de difícil tratamiento.

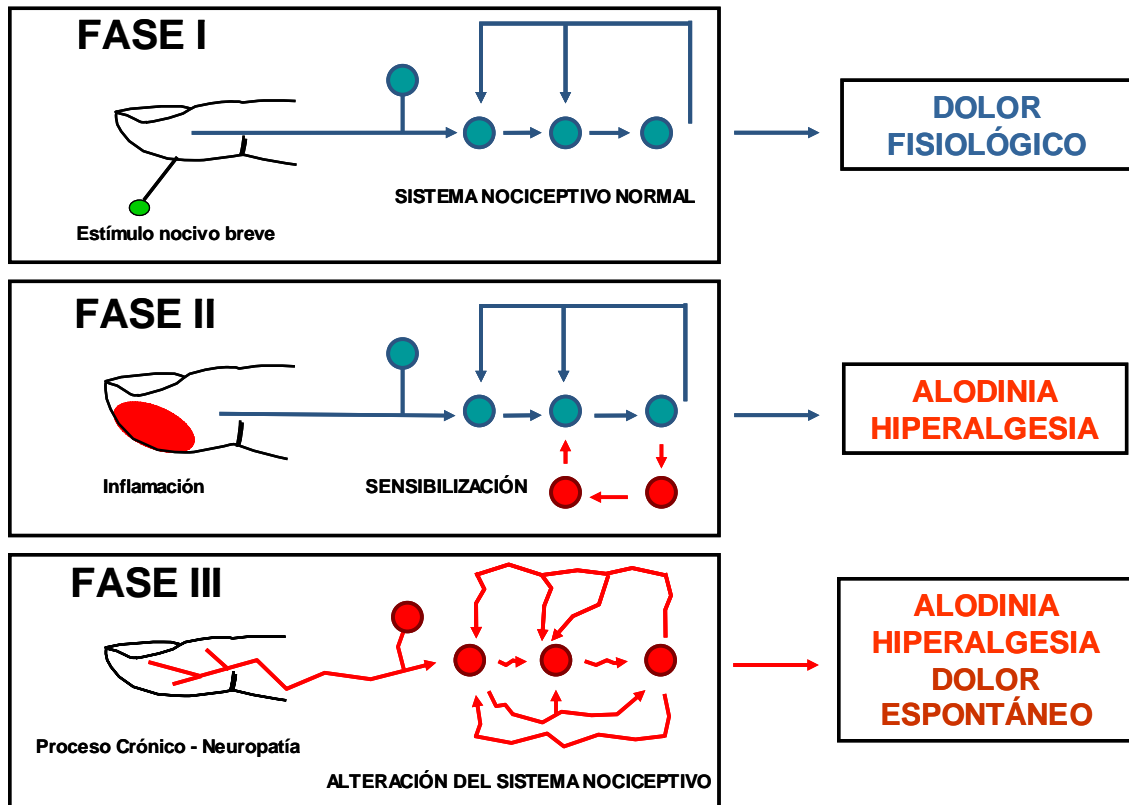


Figura 1.1.- Tipos de dolor en función de la naturaleza de la estimulación, la situación del sistema nociceptivo y las consecuencias derivadas (modificado a partir de Cerveró y Laird, 1991).

4. SENSIBILIZACIÓN: HIPERALGESIA Y ALODINIA

Se denomina sensibilización a un proceso de hiperexcitabilidad del sistema nociceptivo, tanto central como periférico, caracterizado por una disminución de los umbrales de estimulación y un aumento de la frecuencia de generación de los potenciales de acción. La **sensibilización periférica** o del nociceptor comienza con un estímulo intenso o duradero que activa el reflejo axónico. Los potenciales de acción generados en el nociceptor provocan la liberación, en las terminaciones periféricas cercanas al área estimulada, de neuropéptidos como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Estas sustancias son responsables de varios procesos (vasodilatación, extravasación y desgranulación de mastocitos) que suponen el inicio de la reacción inflamatoria o neurogénica y la

liberación de mediadores de la inflamación. Los mediadores de la inflamación producen una fuerte despolarización del propio nociceptor, con disminución del umbral de activación, aumento de la frecuencia de disparo y expansión del campo receptivo debido a la activación de los receptores silentes (Habler et al., 1992; Schmidt et al., 2000).

La **sensibilización central** es el resultado de la llegada a la médula espinal de una gran cantidad de información nociceptiva enviada desde los nociceptores. Como consecuencia de ello, aparece una hiperexcitabilidad de las neuronas del asta dorsal, lo cual se manifiesta en una disminución de los umbrales, aumento de la frecuencia de potenciales de acción y aumento de la liberación de neuromediadores. La sensibilización central tarda más tiempo en aparecer que la periférica, pero es más duradera (Treede et al., 1992; Schaible et al., 2002).

Las consecuencias sensoriales derivadas de un proceso de sensibilización son los fenómenos de alodinia e hiperalgesia (Figura I.1). La **alodinia** consiste en la evocación de dolor al recibir una estimulación habitualmente inocua. Un ejemplo típico es el dolor que se padece con el simple contacto con la ropa cuando la piel ha resultado quemada por el sol. La **hiperalgesia** se define como un dolor de una intensidad mucho mayor de la esperada en relación con la intensidad del estímulo nocivo aplicado. Un arañazo sobre una herida resulta mucho más doloroso que si se recibe en la misma zona sana. La hiperalgesia puede ser primaria, si la desencadenó una sensibilización periférica, o secundaria, si se debe a una sensibilización central.

La cuantificación de los fenómenos de alodinia e hiperalgesia se realiza mediante la construcción de curvas de intensidad-respuesta, aplicando estimulación mecánica de intensidad creciente (Figura M.3, página 29 del Capítulo de Materiales y Métodos). Las curvas de intensidad-respuesta permiten estudiar la relación que existe entre la intensidad del estímulo y la respuesta nociceptiva o sensación de dolor evocado. En un proceso inflamatorio se produce un desplazamiento hacia la izquierda de la curva, apareciendo dolor con estímulos que antes eran inocuos (alodinia) y un aumento del dolor con estímulos que ya eran nocivos (hiperalgesia).

5. NEUROQUÍMICA DE LA NOCICEPCIÓN

Existe un gran número de mediadores químicos y sustancias transmisoras implicados en el procesamiento de la información nociceptiva, tanto a nivel periférico (en el lugar de la lesión) como en el SNC. La sensación final del dolor depende de la interacción entre estos neuromoduladores. Los mediadores químicos implicados en el sistema nociceptivo se pueden dividir en dos grandes grupos: sustancias pronociceptivas, que facilitan la transmisión del mensaje nociceptivo y favorecen la aparición de dolor, y sustancias antinociceptivas o analgésicas, que obstaculizan la transmisión nociceptiva y por tanto, disminuyen o eliminan el dolor (López-García y Herrero, 1998). La analgesia puede conseguirse tanto por activación de sistemas inhibidores como por el bloqueo de los sistemas excitadores.

Entre las sustancias pronociceptivas se encuentran los aminoácidos excitadores, con el glutamato como representante más conocido, que tiene un efecto excitador directo en prácticamente todas las neuronas del sistema somestésico; las neurocininas, como la neurocinina A y la sustancia P, que despolarizan las neuronas de segundo orden; las prostaglandinas (PGs), sintetizadas a partir del ácido araquidónico, en un proceso catalizado por ciclooxigenasas (COX); y otras como, el CGRP o la hormona tireotropa.

Entre las sustancias antinociceptivas se encuentran los aminoácidos inhibidores, como el ácido gamma amino butírico (GABA); los opioides endógenos, entre los que encuentran las encefalinas, endorfinas y dimorfinas; los agonistas α_2 -adrenérgicos y la serotonina, entre otros.

Existen otras muchas sustancias presentes en el sistema nociceptivo cuya función no está plenamente definida, como, por ejemplo, el óxido nítrico (NO), el ATP, la adenosina, los cannabinoides endógenos, la colecistocinina, etc. Todos ellos auguran un arduo y apasionante trabajo de investigación, con la esperanza de mejorar el tratamiento clínico del dolor.

De entre los numerosos sistemas implicados en la regulación de los mecanismos de la nocicepción, hemos centrado nuestro estudio en algunos aspectos de la acción analgésica de tres de ellos: **agonistas α_2 -adrenérgicos, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y ácido Retinoico (AR)** y sus posibles interacciones en los procesos de sensibilización de origen inflamatorio.

5.1. Agonistas α_2 -adrenérgicos

El sistema nervioso adrenérgico (SNA) es la rama del sistema nervioso autónomo cuyo neurotransmisor, entre la terminación nerviosa y el músculo efector, es la noradrenalina (NA). Por tanto, el SNA comprende las terminales de las fibras postganglionares del sistema nervioso simpático que, con la excepción de las glándulas salivares y algunas glándulas sudoríparas, liberan NA. El SNA tiene un importante papel en la regulación de numerosas funciones fisiológicas, como la presión sanguínea, el ritmo y la potencia cardiacos, la motilidad gastrointestinal y el tono bronquial (Goodman y Gilman, 1975).

La NA es un neurotransmisor perteneciente al grupo de las catecolaminas. La formación de NA comienza en el citoplasma de las neuronas simpáticas postganglionares y en neuronas del SNC, finalizando la síntesis en las vesículas sinápticas. Es probable que las enzimas que participan en la síntesis de NA sean producidas en las mismas neuronas simpáticas postganglionares y centrales. La NA se almacena en las vesículas sinápticas, para liberarse, como respuesta a un potencial de acción, por exocitosis de las vesículas; en cada estímulo se libera aproximadamente un 1% de la NA almacenada. Después de su interacción con el receptor, la NA puede eliminarse por distintos mecanismos. La recaptación por tejido neuronal es probablemente el mecanismo más importante, ya que recupera alrededor de un 80% de la NA y constituye una gran fuente de NA para ser reutilizada. Este transporte se realiza contra gradiente, a través de la bomba de protones. Otros mecanismos son la recaptación por el tejido no neuronal, en el que el neurotransmisor sale de la sinapsis, y el metabolismo, que como sistema de finalizar la acción de la terminal sináptica, tiene poca importancia clínica. La pequeña cantidad de NA que escapa de ser recaptada, entra en la circulación y es metabolizada por la monoamino oxidasa (MAO) y/o por la catecol-o-metil-transferasa (COMT) principalmente en sangre, hígado y riñón.

La acción de la NA como neurotransmisor está mediada por los receptores adrenérgicos, que pueden localizarse en la membrana presináptica y/o en la postsináptica, así como en tejido no neuronal, como el intestino o el epitelio renal. En un principio se identificaron dos tipos de receptores, α y β (Ahlquist, 1948). Sin embargo, hoy se sabe que existen tres tipos principales: α_1 , α_2 y β (Bylund, 1988), cada uno de los cuales presenta a su vez, tres distintos subtipos (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , β_1 , β_2 y β_3 , Bylund et al., 1994). Todos ellos se caracterizan por ser receptores de

membrana de catecolaminas, implicados en la transducción de la información del exterior al interior de la célula, acoplados a las familias G_1 y G_0 de proteína G (Limbird, 1988). Sólo para los receptores β se han desarrollado un número suficiente de ligandos selectivos para cada subtipo, de forma que se conocen mejor los procesos fisiológicos que regulan. Así, agonistas selectivos de los receptores β_2 se emplean en clínica en la terapia contra el asma, mientras que antagonistas de receptores β_1 se utilizan contra la hipertensión, enfermedad coronaria o fallo cardíaco crónico (Philipp et al., 2002).

Los receptores α_1 son postsinápticos y se encuentran en el músculo liso (con efecto constrictor, salvo a nivel gastrointestinal, donde provocan relajación), corazón (efecto crono e inotrópico positivo) y en las glándulas salivares y sudoríparas, en las que producen aumento de la secreción (Nichols y Ruffolo, 1991).

Los receptores α_2 -adrenérgicos se encuentran ampliamente distribuidos tanto en el SNC (MacDonald et al., 1995) como a nivel periférico (Handy et al., 1993). Se ha demostrado que participan en un amplio espectro de funciones fisiológicas que incluyen la inhibición de la liberación de neurotransmisores, la regulación de la presión arterial, el control de la liberación de insulina, lipólisis, sedación, regulación de la función renal y de funciones cognitivas y de comportamiento (Small et al., 2001). Los efectos a nivel celular de la activación de los adrenoreceptores α_2 , que se acoplan a múltiples efectores mediante las proteínas Gi/Go, incluyen inhibición de adenil ciclasa, activación de los canales de K^+ mediados por receptor, inhibición de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, activación de la fosfolipasa C, estimulación de la liberación de Ca^{2+} intracelular y estimulación de las MAP-quinasas (Saunders y Limbird, 1999).

La administración en la médula espinal de agonistas α_2 -adrenérgicos produce una analgesia dosis-dependiente y mediada por diferentes mecanismos de acción, entre los cuales se encuentran la modulación de la liberación de neurotransmisores y la hiperpolarización de neuronas (Williams et al., 1985; Bean, 1989; Lipscombe et al., 1989; Takano et al., 1993; Eisenach et al., 1996). Numerosos estudios sugieren que los agonistas α_2 -adrenérgicos son muy efectivos en la modulación nociceptiva, siendo incluso más activos en situaciones de sensibilización inducida por inflamación (Hylden et al., 1991; Idänpään-Heikkilä et al., 1994; Stanfa y Dickenson, 1994; Mansikka y Pertovaara, 1995). Esto se relaciona con un aumento de la densidad de

receptores adrenérgicos en láminas I y II de la médula espinal (Brandt y Livingston, 1990) y con un incremento de la movilización de NA en artritis (Weil-Fugazza et al., 1986).

La modulación del dolor inflamatorio mediante el sistema α_2 -adrenérgico no se limita únicamente a una acción directa sobre neuronas de la médula espinal. Los mecanismos de control de la inhibición descendente del dolor se activan en el dolor inflamatorio (Herrero y Cerveró, 1996a; Ren y Dubner, 1996) y, entre estos, el SNA se considera como uno de los más importantes con origen en el tronco del encéfalo (Peng et al., 1996; Cui et al., 1999).

Se conocen tres tipos de receptores α_2 -adrenérgicos presentes en humanos: α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} que son codificados por genes localizados en los cromosomas 10, 2 y 4, respectivamente (Small et al., 2001). Los receptores α_{2A} median la antinocicepción inducida por agonistas como la clonidina y la dexmedetomidina (Fairbanks et al., 2002; Stone et al., 1997). Los receptores α_{2B} , así como receptores opiodes espinales, están implicados en la analgesia inducida por NO (Guo et al., 1999). El NO activa la liberación de endorfinas en la SGP, que estimula a su vez una vía noradrenérgica descendente, con liberación de NA en los receptores α_{2B} del asta dorsal de la médula espinal (Zhang et al., 1999). Además, en ratones sin receptores α_{2B} , el NO carece de efecto analgésico (Sawamura et al., 2000).

El grado de sedación y analgesia producidas por un agonista α_2 -adrenérgico no se relaciona únicamente con la densidad, localización y subtipo de receptor α_2 , sino con la selectividad y afinidad de la molécula entre los receptores α_1 y α_2 . De esta manera cuanto mayor es la selectividad, más potente es el fármaco. En el caso de la medetomidina (MED), la relación de selectividad α_2/α_1 es de 1620:1, superior a otros agonistas α_2 -adrenérgicos bien conocidos, como la clonidina (220:1) o la xilacina (160:1) (Virtanen, 1988; Scheinin et al., 1992). La MED es un agonista α_2 -adrenérgico del tipo de los imidazoles (Figura 1.2) y, al igual que todos los fármacos de este grupo, tiene una acción sedante, analgésica, relajante muscular y ansiolítica (Pertovaara, 1993). Se emplea como coadyuvante de la anestesia, puesto que disminuye las cantidades de anestésico requeridas y su efecto se puede revertir fácilmente con un antagonista α_2 -adrenérgico (atipamezol, Ewing et al., 1993).

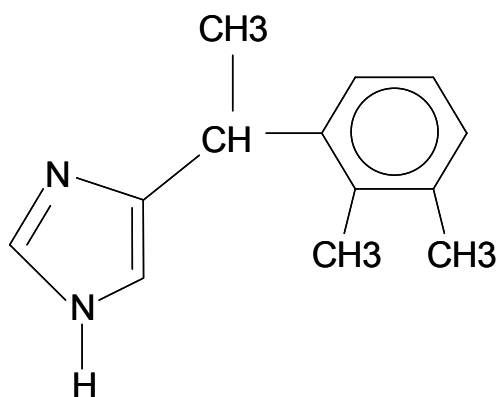


Figura 1.2.- Estructura química de la MED (4-[1-(2,3-dimetilfenil) etil]-1H-imidazol).

Los agonistas α_2 -adrenérgicos interaccionan con sistemas glutamatérgicos, de forma que pueden eliminar las respuestas de neuronas de la médula provocadas por la acción de aminoácidos excitadores (Davies, 1989). De igual forma, estos agonistas presentan una clara interacción con los sistemas μ -opioides (Herrero y Solano, 1999), pudiendo potenciar su efecto (Wilcox et al., 1987).

No existen estudios sistemáticos respecto a la efectividad analgésica de los agonistas α_2 -adrenérgicos en distintos tipos de dolor, especialmente en el caso del dolor de origen inflamatorio, en los que la fase de la inflamación podría ser determinante sobre la actividad analgésica de estos fármacos. Además, se desconoce una parte importante de sus mecanismos de acción y de la interacción con otros fármacos antinociceptivos, como AINEs y opioides.

5.2. AINEs

Los AINEs constituyen el grupo de analgésicos más utilizados en clínica debido a la relación coste-eficacia que presentan. Entre los AINEs se incluyen sustancias de muy diferente estructura química, pero todos ellos se caracterizan por tener el mismo mecanismo de acción: la inhibición de las COX. Las COX son las enzimas responsables de la transformación del ácido araquidónico en PGs, prostaciclina y tromboxano. Debido a que los AINEs actúan, por lo tanto, previniendo la formación de PGs (Vane, 1971), la mayoría de ellos son analgésicos efectivos en el tratamiento del dolor inducido en la inflamación, pero no en el dolor agudo (Collier y Schneider, 1972).

Se conocen tres isoformas de COX con funciones y lugar de expresión diferentes. La COX 1 está presente en todos los tejidos y participa en el mantenimiento de la homeostasis tisular (Hemler y Lands, 1976; Berde y Sundel, 1998). Las PGs producto de la acción de la COX 1 actúan como protectoras gástricas y participan en el inicio de la agregación plaquetaria (Hawkey, 2002). También sabemos hoy día que están implicadas en procesos de dolor, sobre todo de origen inflamatorio (Bley et al., 1998; Stock et al., 2001; Samad et al., 2002; Sarkar et al., 2003). La COX 2 es análoga en más de un 60 % de su estructura a la COX 1, de la que se diferencia en la forma en que se regula su expresión y actividad enzimática. Se expresa de forma constitutiva en el cerebro (Vanegas y Shaible, 2001), y en la médula (Beiche et al., 1998), aunque los procesos inflamatorios o de daño medular pueden inducir una sobreexpresión tanto de esta isoforma como de la COX 1 (Tonai, 1999; Schwab et al., 2002). Las PGs producto de la acción de la COX 2 fueron relacionadas inicialmente de forma casi exclusiva con la inducción de fiebre, dolor e inflamación (Ayoub et al., 2004). La COX 3 es una isoforma de reciente descubrimiento (Chandrasekharan et al., 2002), cuyas funciones no están claras, aunque podrían participar también en la síntesis de los prostanoïdes relacionados con la fiebre y el dolor. Su descubrimiento se interpretó como el sustrato sobre el que actúa el paracetamol (PAR, Willoughby et al., 2000; Schwab et al., 2003). Sin embargo, el PAR la inhibe de manera débil e inespecífica, por lo que queda abierta la búsqueda de nuevas COX.

En general, todos los AINEs poseen efectos terapéuticos y adversos comunes. Las propiedades beneficiosas incluyen la reducción de la inflamación, la analgesia y el efecto antipirético. Estas acciones alcanzan un máximo con determinadas dosis, por encima de las cuales sólo aumentan los efectos adversos, lo que condiciona su uso a largo plazo. Los efectos colaterales derivados de la inhibición de la COX incluyen lesiones gastrointestinales, renales, pulmonares, cardiovasculares y hematológicas. Además, pueden aparecer efectos negativos impredecibles e independientes de la dosis, como reacciones de hipersensibilidad, choque anafiláctico, insuficiencia hepática o cefaleas.

A pesar de todo, los AINEs siguen siendo los analgésicos de primera elección y su eficacia terapéutica se ha tratado de mejorar mediante distintas aproximaciones científicas. Las estrategias empleadas para el desarrollo de AINEs más efectivos e inocuos se han abordado desde distintos puntos de vista:

- 1) Mejorar su especificidad de acción, bloqueando selectivamente la COX 2, considerada inicialmente como la isoforma responsable de la producción de PGs en procesos patológicos e inflamatorios. De esta manera se obtendrían fármacos de igual o mejor eficacia clínica que los AINEs clásicos pero con menos efectos secundarios. Sin embargo, los resultados clínicos de la primera generación de estos fármacos (celecoxib, Penning et al., 1997, y rofecoxib, Chan et al., 1999) no parecen haber supuesto una mejora de la eficacia analgésica ni tampoco en la disminución de efectos secundarios (Herrero et al., 2003).
- 2) Considerar que todas la PGs sintetizadas tanto por la COX 1 como por la COX 2 están implicadas en la aparición de inflamación, fiebre y dolor. Esta estrategia se basa en el descubrimiento de que la COX 1 no sólo es constitutiva sino que se sobreexpresa en situaciones de inflamación, y que la COX 2 no sólo es inducible, sino que también se expresa en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, para lograr una analgesia más efectiva es necesaria la inhibición de ambos isoenzimas. Los nuevos inhibidores mixtos de la COX se caracterizan por un aumento de la potencia y una mejor farmacocinética (Mazarío et al., 2001; Wallace, 1999b), lo cual supone una reducción de la dosis terapéutica y, así, de los efectos secundarios.
- 3) Complementar los AINEs con moléculas que potencien sus propiedades terapéuticas. Algunos de estos nuevos AINEs muestran efectos que no eran evidentes con sus moléculas madre, e indican nuevos mecanismos de acción, quizás independientes de la inhibición de la COX. Moléculas como el NO, han dado lugar a un nuevo tipo de AINEs, denominados NO-AINEs, que parecen proteger mejor la mucosa intestinal (Wallace et al., 1999a), debido a las propiedades citoprotectoras conferidas por el NO, y ser mejores analgésicos (Al-Swayeh et al., 2000, Romero-Sandoval et al., 2002) y antiinflamatorios (Fiorucci, 2001) que sus moléculas madre.
- 4) Combinar los inhibidores de la COX con otros analgésicos. Se pretende obtener un sinergismo en los efectos analgésicos y antiinflamatorios, disminuyendo las dosis efectivas necesarias de cada fármaco y por tanto, sus efectos adversos. Evidencias experimentales muestran que los inhibidores de la COX, igual que los agonistas α_2 -adrenérgicos, potencian el efecto de los opiáceos (Gaitán et al., 2003).

Sin embargo, a pesar de que los tanto los AINEs como los agonistas α_2 adrenérgicos están implicados en la modulación del sistema nociceptivo y, aunque ambos están relacionados con la modulación de los sistemas opioides, no se ha estudiado la posible interacción entre estos sistemas.

5.3. **Ácido Retinoico**

La vitamina A o retinol es un alcohol poliénico isoprenoide de carácter liposoluble, que es sintetizado por el organismo a partir del β -caroteno. Participa en numerosos funciones fisiológicas, tales como en la protección contra el daño tisular, defensa inmune, reproducción, crecimiento y desarrollo (Debier y Larondelle, 2005). Del retinol derivan los ésteres de retinol (forma en que se deposita) y por oxidación el retinal y el AR. Este grupo de sustancias se denominan retinoides y son compuestos que poseen las propiedades fisiológicas y farmacológicas de la vitamina A. El retinal tiene una gran importancia en el ciclo visual como precursor de la rodopsina. El AR es el principal metabolito activo y, al igual que sucede con el retinol, se presenta en forma de distintos isómeros geométricos debido a las posibles configuraciones *cis-trans* alrededor de los dobles enlaces de la cadena lateral (Figura I.3). El AR actúa como mensajero intracelular combinándose con receptores nucleares y modificando la expresión de genes (Almasan et al., 1994). Se conocen dos tipos de receptores a los que pueden unirse el AR: los RAR o receptores de ácido retinoico y los RXR o receptores X de retinoides, ambos con tres subtipos: α , β y γ (Allenby et al., 1993). El AR todo-*trans* (ATRA), se une a los RAR, mientras que el AR 9-*cis*, se une a ambos tipos, RAR y RXR (Solomin et al., 1998).

Todos los retinoides juegan un papel esencial en el desarrollo embrionario de varios tejidos y órganos (Sporn et al., 1994), incluidos el cerebro y la médula espinal (Duester et al., 2003; Solomin et al., 1998), aunque también están presentes en el cerebro y en la médula espinal de ratas y ratones adultos (Werner y Deluca, 2002). Los retinoides están implicados en funciones tales como la regulación de la expresión genética en el funcionamiento del cerebro normal (Zetterstrom et al., 1994) y en la memoria y el aprendizaje espacial (Misner et al., 2001; Cocco et al., 2002).

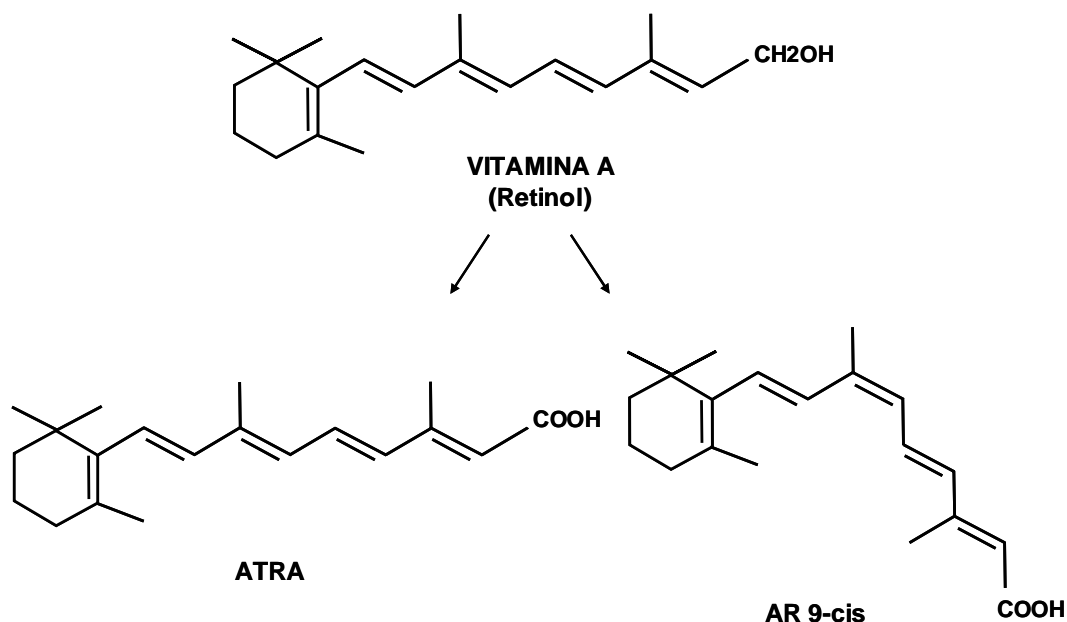


Figura 1.3.- Estructura química de los retinoides. La oxidación de la vitamina A produce varios metabolitos activos entre los que se encuentran los ácidos retinoicos *todo-trans* (ATRA) y *9-cis*.

El AR también participa en los mecanismos que controlan la reacción inflamatoria, habiéndose relacionado con la generación y expresión de NO (Hirokawa et al., 1994; Grosjean et al., 2001; Seguin-Devaux et al., 2002), PGs (Hill et al., 1996; Devaux et al., 2001), COX 1 (Nusing et al., 1995) y COX 2 (Kanekura et al., 2000; Li et al., 2002), interleucina 1 β (IL1 β ; Liu y Gudas, 2002; Wagsater et al., 2006) y citocinas (Ho et al., 2005). Todos estos mediadores actúan en la generación o el mantenimiento de la sensibilización y el dolor debido a la inflamación y son la diana de muchos analgésicos, algunos de los cuales hemos estudiado en nuestro laboratorio (Gaitán et al., 2002; Romero-Sandoval et al., 2002).

No existe información acerca de la implicación de los retinoides en el procesamiento de la información nociceptiva. No obstante, se ha constatado que el uso tópico de beraxoteno, un agonista selectivo de los receptores RXR, utilizado en el tratamiento de linfoma cutáneo, se acompañó de eccema, prurito y dolor (Lowe et al., 2000). Este hecho, junto con la presencia y participación en el SNC de los retinoides y su papel en los procesos inflamatorios, nos llevó a plantearnos la hipótesis de la posible implicación de los retinoides en la nocicepción, especialmente en situaciones de hiperalgesia debida a inflamación.

6. OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos generales planteados en esta tesis han sido los siguientes:

- Determinar si la actividad antinociceptiva del agonista α_2 -adrenérgico MED depende de la fase del proceso inflamatorio y de la integridad de la médula espinal.
- Estudiar si la combinación del agonista α_2 -adrenérgico MED con los inhibidores de los AINEs PAR y nitroparacetamol (NOP), produce una potenciación del efecto analgésico de ambos en situación de dolor inflamatorio.
- Evaluar la implicación del ácido retinoico en la modulación del procesamiento de la información nociceptiva en condiciones de hiperalgesia inducida por inflamación.
- Determinar si el ATRA participa en el proceso de sensibilización del sistema nociceptivo.
- Comprobar si la administración oral de ATRA potencia la acción antinociceptiva de inhibidores de la COX como el PAR, el NOP o el s-ketoprofeno, de opioides, como el fentanilo y de agonistas α_2 -adrenérgicos como la MED.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. TECNICAS COMPORTAMENTALES

Estas técnicas están basadas en la observación del comportamiento de animales no anestesiados sometidos a estímulos que activan el reflejo nociceptivo de retirada. Como se comentó en la introducción, el reflejo de retirada es un reflejo nociceptivo puro, polisináptico y medular. Este reflejo sirve como mecanismo de defensa frente a agresiones del medio ambiente.

Para la realización de estos experimentos se emplearon ratas Wistar macho con pesos comprendidos entre 236-351 g, provenientes del animalario de la Universidad de Alcalá, donde fueron criados en unas condiciones de temperatura, humedad y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y provistas de agua y comida *ad libitum*.

Estas condiciones fueron reproducidas al trasladar los animales al laboratorio de experimentación, lo cual se hizo al menos dos días antes de las pruebas, con el objeto de que los animales se adaptaran al nuevo entorno y eliminar así, las posibles alteraciones de resultados debidas al estrés. Con idéntico objetivo se trató de que los animales se acostumbraran al experimentador y al lugar concreto de experimentación, antes de la realización de las pruebas, dedicando a esta tarea unos minutos el día anterior al de las determinaciones.

1.1. Elaboración de la curvas de intensidad-respuesta

Las curvas de intensidad-respuesta se obtuvieron aplicando una estimulación de intensidad creciente en la planta de una pata del animal, anotando el número de respuestas positivas para cada estímulo, considerando como respuesta positiva la retirada de la pata como consecuencia de la aplicación del estímulo. De esta manera, se observó un aumento de las respuestas con la intensidad, hasta alcanzar un punto de saturación a partir del cual estímulos más intensos no produjeron un número mayor de respuestas. Resulta muy interesante en este sentido, trabajar con un rango de intensidades que en condiciones normales vayan desde la inocuidad hasta la saturación, ya que esto nos permitirá estudiar los fenómenos de alodinia e hiperalgesia, como veremos a continuación.

La herramienta empleada para la elaboración de estas curvas fue una batería de filamentos de Von Frey de diferentes valores, fabricados y calibrados por nosotros mismos (Figura M.1). Al aplicarlos sobre la pata de la rata, si la intensidad de

estimulación es suficiente, se activa el reflejo de retirada (Figura M.2). Las ratas se colocaron bajo una cámara de plástico y sobre una estructura elevada, apoyada en unos soportes, con un enrejado metálico que permitía el acceso a las patas de los animales. Se aplicaron 7 filamentos de Von Frey (50, 60, 80, 100, 200, 300 y 500 mN) 10 veces durante aproximadamente un segundo, en la superficie de la planta de cada pata trasera en series de intensidad creciente. La frecuencia de la retirada de cada pata se calculó para cada monofilamento. Los datos fueron recogidos en una hoja diseñada a tal efecto (Tabla M.1). Para cada intensidad se obtuvo un promedio de las respuestas positivas, expresadas como la media \pm e.e.m., considerándose el conjunto como la curva de intensidad-respuesta.

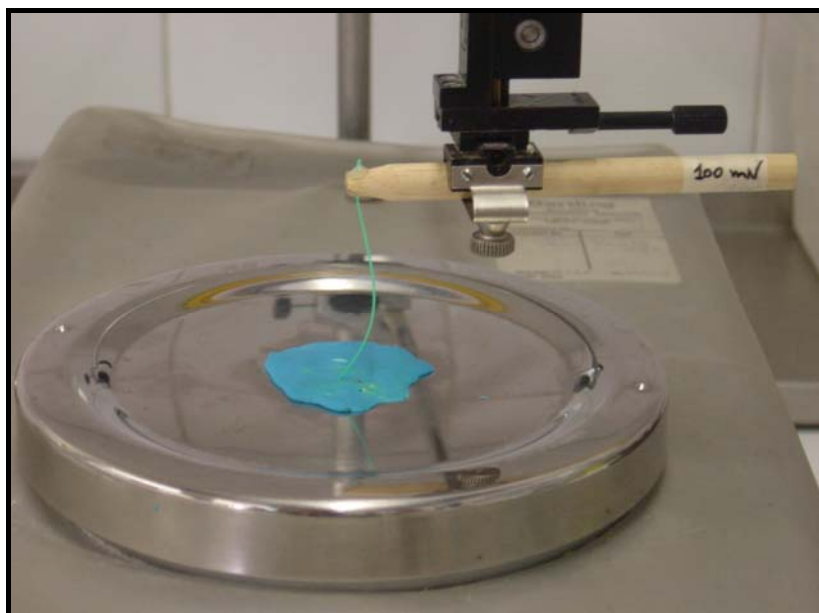


Figura M.1.- Calibración de un filamento de Von Frey de 100 mN de intensidad. Se emplearon filamentos de 50, 60, 80, 100, 200, 300 y 500 mN para la elaboración de las curvas de intensidad-respuesta.

Las curvas siempre se realizaron en ambas patas, obteniéndose en primer lugar las correspondientes a una situación de normalidad, previa a cualquier cambio inducido en el animal o administración de un fármaco. A estas curvas las hemos denominado curvas control, puesto que son con las que se compara cualquier efecto posterior. A continuación, se indujo una inflamación de tejido blando en la pata derecha, mediante la administración de 100 μ l de carragenina λ (CAR, 10 mg/ml en agua destilada, Sigma). La pata izquierda recibió 100 μ l de suero salino (9 g/l NaCl), con el fin de ser utilizada como control de la inflamación y de las curvas de intensidad-respuesta.

HOJA DE REGISTRO DE CURVAS DE INTENSIDAD-RESPUESTA

RATA #		FECHA	
Curva Control			

HORA	
------	--

PATA DERECHA							
Respuestas							
Intensidad	50	60	80	100	200	300	500

PATA IZQUIERDA							
Respuestas							
Intensidad	50	60	80	100	200	300	500

Volumen		ml
Test térmico		seg

Volumen		ml
Test térmico		seg

Carragenina	
Hora	
FECHA	

Salino	
Hora	

Control Post-carragenina							
---------------------------------	--	--	--	--	--	--	--

HORA	
------	--

PATA DERECHA							
Respuestas							
Intensidad	50	60	80	100	200	300	500

PATA IZQUIERDA							
Respuestas							
Intensidad	50	60	80	100	200	300	500

Volumen		ml
Test térmico		seg

Volumen		ml
Test térmico		seg

Fármaco	
Dosis	
Curva a los 15 min	

HORA	
------	--

HORA	
------	--

PATA DERECHA							
Respuestas							
Intensidad	50	60	80	100	200	300	500

PATA IZQUIERDA							
Respuestas							
Intensidad	50	60	80	100	200	300	500

Volumen		ml
Test térmico		seg

Volumen		ml
Test térmico		seg

Curva a los 30 min							
---------------------------	--	--	--	--	--	--	--

HORA	
------	--

PATA DERECHA							
Respuestas							
Intensidad	50	60	80	100	200	300	500

PATA IZQUIERDA							
Respuestas							
Intensidad	50	60	80	100	200	300	500

Volumen		ml
Test térmico		seg

Volumen		ml
Test térmico		seg

Curva a los 60 min							
---------------------------	--	--	--	--	--	--	--

HORA	
------	--

PATA DERECHA							
Respuestas							
Intensidad	50	60	80	100	200	300	500

PATA IZQUIERDA							
Respuestas							
Intensidad	50	60	80	100	200	300	500

Volumen		ml
Test térmico		seg

Volumen		ml
Test térmico		seg

Tabla M.1.- Plantilla de recogida de datos en experimentos de comportamiento.

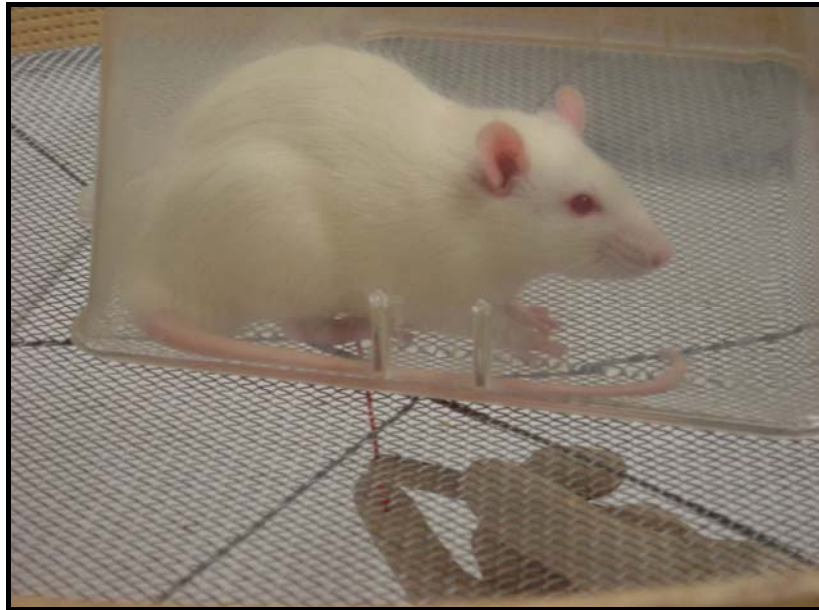


Figura M.2.- Test de comportamiento con filamentos de Von Frey. El animal se dispone sobre una malla metálica que permite el acceso a las patas. Cada filamento se aplica diez veces por pata, considerándose una respuesta positiva la retirada de la misma.

El estudio de la evolución del proceso inflamatorio se realizó mediante la comparación de las curvas control pre y post CAR de la pata derecha, observándose un desplazamiento significativo a la izquierda de las curvas realizadas tras la inducción de la inflamación (Figura M.3). Por otra parte, la comparación de las curvas obtenidas en la pata derecha (CAR) e izquierda (salino) permitió conocer la efectividad del fármaco. La reversión a la derecha de las curvas realizadas tras la administración del fármaco, se consideró como un efecto antinociceptivo provocado por dicho fármaco. La falta de reversión se interpretó por tanto, como una ausencia de efecto antinociceptivo del fármaco estudiado.

Para el análisis de la **alodinia**, se trabajó con el promedio de las respuestas positivas de aquellas intensidades en las que, en condiciones normales (sin inflamación), no provocaron el reflejo de retirada, es decir, intensidades de 50 y 60 mN. Estos filamentos sí produjeron respuestas en condiciones de inflamación, lo cual fue considerado como alodinia. Cualquier grado de reversión a la derecha de la curva después de la administración de un fármaco, se interpretó como una reducción de la alodinia.

Los filamentos de 80, 100 y 200 mN produjeron estímulos situados entre los cercanos a la intensidad umbral y los que alcanzaron una saturación de las

respuestas, en los experimentos realizados previamente a la administración de CAR. El aumento de las respuestas observado con estos filamentos, debido a la inflamación, se consideró como **hiperalgesia**. Una reducción de estas respuestas, promediadas y analizadas en conjunto, tras la administración del fármaco, se consideró como una inhibición o atenuación de la hiperalgesia (Mazarío et al., 2001).

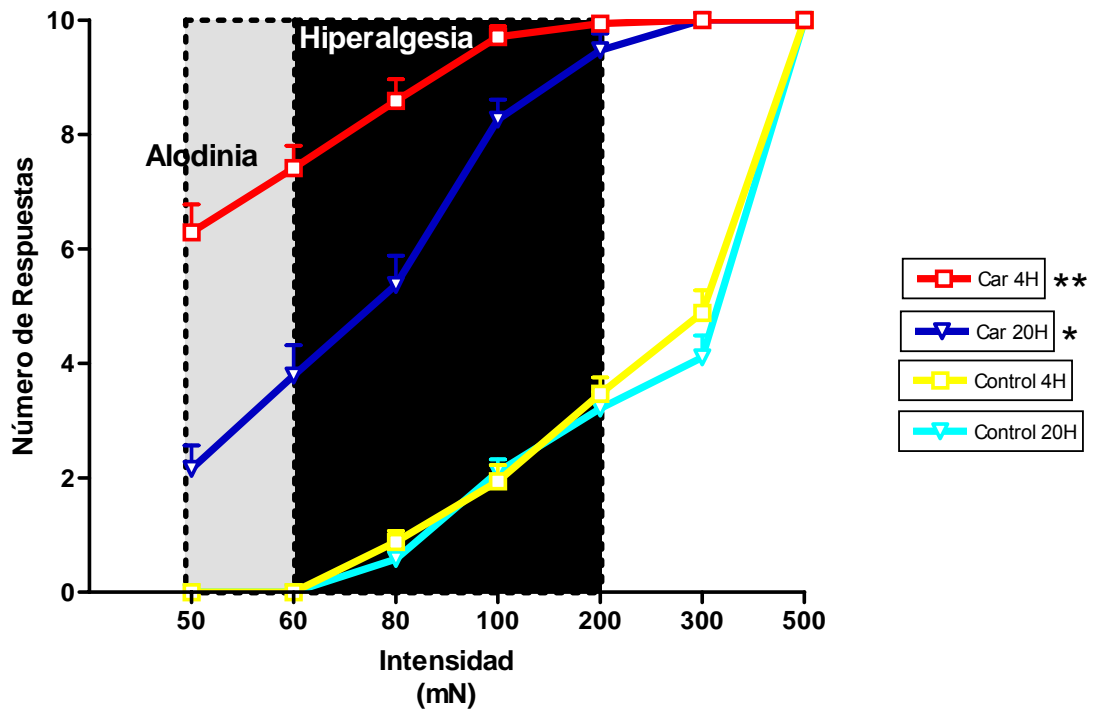


Figura M.3.- Curvas de intensidad-respuesta en animales control y con inflamación por CAR a las 4 y 20 horas de la inflamación. Se observa cómo las curvas se han desplazado significativamente a la izquierda, como consecuencia de la inflamación, apareciendo los fenómenos de alodinia e hiperalgesia (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, comparación mediante ANOVA de una vía con post-test de Dunnett).

1.2. Estimulación térmica

La hiperalgesia térmica fue determinada midiendo el tiempo de latencia del reflejo de retirada de la pata tras aplicar un estímulo nocivo mediante calor radiante (55°C), generado por un algesímetro (test plantar Ugo Basile 7371, Hargreaves et al., 1988). Los animales se situaron en una cámara de plástico transparente al menos 5 minutos antes del comienzo de la prueba para que se acostumbraran al nuevo entorno y eliminar las posibles alteraciones de resultados debidas al estrés. Fueron aplicados dos estímulos térmicos consecutivos en cada pata con un intervalo de 2-3 minutos entre los mismos. Con el fin de evitar daños tisulares, el tiempo máximo de exposición al estímulo fue de 17 segundos (Figura M.4). Al igual que en la

estimulación mecánica, se realizaron dos test, uno previo a la inducción de la inflamación y otro tras la administración intraplantar de CAR. Los datos obtenidos en la pata inflamada se compararon también con los observados en la pata contralateral tratada con salino. En este caso, consideramos la hiperalgesia como una disminución del tiempo de respuesta en el animal con inflamación, con respecto a la situación control, frente a un estímulo de intensidad constante.

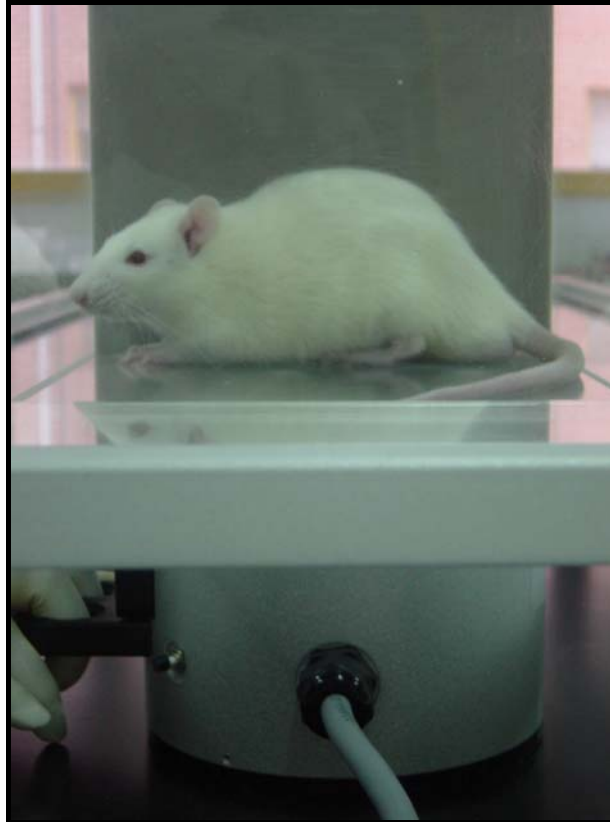


Figura M.4.- Medida del tiempo de latencia del reflejo de retirada al aplicar un estímulo térmico nocivo (Sistema de Hargreaves).

1.3. Control de la inflamación

La inducción de la inflamación se hizo siempre bajo anestesia con halotano vaporizado en oxígeno humidificado (dosis inicial de 5% y de mantenimiento de 2-2.5 %), empleando CAR λ (10 mg/ml en agua destilada, Sigma), un polímero aniónico presente en las algas rojas (Cohen, 2002). Se indujeron dos tipos de inflamación:

Inflamación de tejido blando.- Para su inducción fueron administrados 100 μ l de CAR por vía subcutánea en la planta de la pata trasera derecha y la misma cantidad de suero salino en la planta de la pata izquierda, como control de la inflamación. Para la valoración de la intensidad de la inflamación se utilizó un

pletismómetro (LETICA Panlab, Figura M.5). Se midieron los volúmenes de ambas patas, siguiendo el mismo protocolo que para la realización de las curvas de intensidad-respuesta, esto es, en condiciones normales, después de la inducción de la inflamación y tras la administración del compuesto estudiado.

Monoartritis.- La inducción de la monoartritis se realizó mediante la inyección intraarticular en la rodilla derecha de 50 μ l CAR, entre 15 y 20 horas antes del inicio del registro electrofisiológico. El control de la inflamación se llevó a cabo comparando las medidas del perímetro de la rodilla antes de la administración de CAR y al finalizar el experimento.



Figura M.5.- Medida del volumen de la pata por pletismometría (pletismómetro LETICA, Panlab).

1.4. Análisis de datos

Los datos se expresaron como la media \pm e.e.m y se consideraron en conjunto como una curva de intensidad-respuesta. Los resultados se analizaron en forma de datos crudos y, para comparar el efecto entre los grupos, como porcentaje del máximo efecto posible (%MEP, Harris y Pierson, 1964; Romero-Sandoval et al., 2005) de acuerdo con la fórmula $\%MEP = 100 \times [(\text{Valor postfármaco} - \text{Valor prefármaco}) / (\text{Máxima respuesta posible} - \text{Valor prefármaco})]$, donde el valor postfármaco representa la latencia (en el caso de la estimulación térmica) o el número de respuestas positivas (para los estímulos con filamentos de Von Frey) para una dosis específica a un tiempo concreto tras la administración del fármaco; el valor prefármaco es la latencia o el número de respuestas positivas antes de la administración; máxima respuesta posible representa un tiempo máximo de 17 segundos para la estimulación térmica o el máximo número de respuestas que pueden observarse con la estimulación mecánica (10 respuestas positivas del reflejo de retirada para cada uno de los filamentos). Los análisis estadísticos se realizaron mediante los programas comerciales GraphPad Prism y GraphPad InStat para Windows.

2. TÉCNICA DE UNIDADES MOTORAS AISLADAS

La técnica de las unidades motoras aisladas (UMAs) se basa en el registro de la actividad eléctrica generada en los músculos implicados en el reflejo de retirada. Esta técnica permite cuantificar los potenciales de acción de una sola unidad motora activada por estímulos nocivos de tipo mecánico y eléctrico de suficiente intensidad. Mediante el registro de UMAs podemos estudiar las características electrofisiológicas de motoneuronas aisladas, activadas mediante estímulos nocivos, sin necesidad de realizar una cirugía traumática de la columna vertebral. Es, por tanto, una preparación más fisiológica que permite, además, discriminar mediante el tipo de estímulo (natural o artificial), si el efecto de un fármaco se ejerce a nivel central o en tejidos periféricos. Por último, el registro de UMAs es muy estable, permitiendo realizar un estudio muy reproducible del efecto antinociceptivo de un fármaco.

Los animales utilizados fueron ratas Wistar macho de pesos comprendidos entre 240-354 g, procedentes del animalario de la Universidad de Alcalá, donde fueron

criados en unas condiciones de temperatura, humedad y ciclos de luz/oscuridad estándar, con comida y agua *ad libitum*.

2.1. Cirugía y anestesia

Previamente a los experimentos, los animales sufrieron una pequeña cirugía preparatoria realizada bajo anestesia con halotano (Astra-zeneca). El halotano se administró por vía respiratoria vaporizado en oxígeno al 5% para inducción y al 2-3% para mantenimiento.

La cirugía, descrita con detalle por varios autores (Herrero y Headley, 1996; Herrero y Cerveró, 1996a; Solano y Herrero, 1997), consistió en la canulación de dos ramas superficiales de las venas yugulares, una arteria carótida y la tráquea. Las cánulas utilizadas para los vasos sanguíneos fueron catéteres de polietileno de 0.96 mm de diámetro externo y 0.58 mm de interno (Portex). Para la cánula de la tráquea se utilizó un catéter de polietileno de 2.08 mm de diámetro externo y 1.57 mm de interno (Portex). La canulación de la arteria carótida permitió monitorizar la presión arterial, mientras que una de las venas se utilizó para la administración de los fármacos estudiados y la otra para mantener una adecuada fluidoterapia y para administrar el anestésico de mantenimiento. La canulación de la tráquea tuvo como fin asegurar un correcto desarrollo de la función respiratoria. En los animales *sham*-espinalizados y espinalizados, se realizó una pequeña laminectomía con infiltración de lidocaína (1%) con adrenalina (10 µg/ml) entre las vértebras torácicas 8 y 10 y se abrió la duramadre. En el grupo de *sham*-espinalizados finalizó en este punto la cirugía y se cerró la incisión. En el grupo de animales espinalizados, la médula espinal fue seccionada en el octavo o noveno segmento torácico dependiendo del grado de vascularización, empleando un cauterizador para minimizar el sangrado.

Además se implantó a nivel subcutáneo un electrodo de bola de plata clorurada por encima de la pata derecha del animal y cerca del lugar de registro, con el fin de servir de electrodo de tierra. Finalmente, la pata trasera derecha fue fijada con escayola en posición de extensión inframáxima sobre una pieza de metacrilato, de forma y dimensiones especialmente diseñadas para tal propósito (Figura M.6).

El anestésico empleado durante el experimento fue α -cloralosa (Sigma), con una dosis inicial de 50 mg/kg, cuya administración se hizo coincidir con la retirada del halotano. A continuación comenzó a administrarse una dosis de mantenimiento de

30 mg/kg/hora, diluida en solución salina a razón de 1 ml/h. Debido a que es necesario un nivel similar de anestesia para poder comparar resultados experimentales en distintos animales, se administró el anestésico mediante bomba de infusión continua (Sp 100i, WPI).

Las variables utilizadas para comprobar el nivel de anestesia durante el experimento fueron presión arterial, reflejo auditivo, reflejo corneal, frecuencia respiratoria y reflejo de retirada. Se consideró como una situación de anestesia superficial los casos de reflejos auditivo o corneal intensos, un reflejo de retirada brusco al aplicar estímulos nocivos moderados, o una respiración muy acelerada. Por el contrario, se consideró un nivel muy profundo de anestesia la ausencia de reflejo auditivo o corneal, la respiración superficial y de baja frecuencia, la ausencia de reflejo de retirada a estímulos nocivos altos o una presión arterial sistólica inferior a 100 mm de Hg.

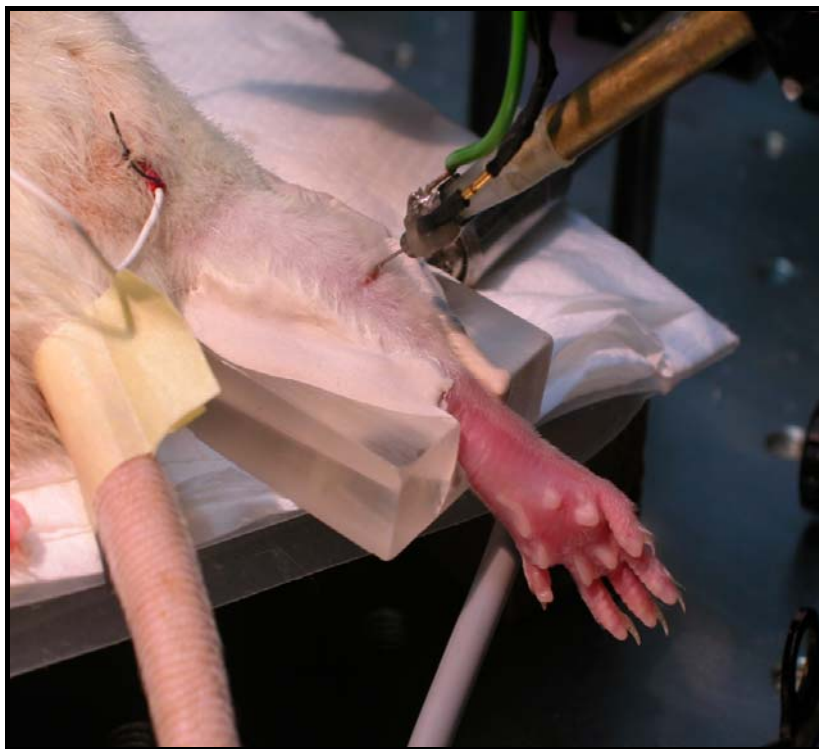


Figura M.6.- Detalle de la preparación para registro de UMAs. Se observa el electrodo de tierra, el electrodo de registro y la pieza de metacrilato sobre la que se fija la pata derecha semiextendida.

Las constantes vitales fueron controladas en todo momento durante el desarrollo de los experimentos:

- Respiración.- La canulación traqueal tuvo como objeto mantener las vías respiratorias despejadas y eliminar el exceso de secreciones. Además, para evitar la sequedad en el tracto respiratorio, los animales respiraron una mezcla humidificada de aire enriquecido con oxígeno.
- Temperatura.- Se mantuvo siempre a 37 ± 0.5 °C mediante una manta térmica por retroalimentación (RTM2, Cibertec) conectada a una sonda rectal.
- Presión arterial.- La monitorización de la presión sistólica, diastólica y media se hizo a través de un transductor de presión estándar (Presmetter 99, Cibertec) conectado a la cánula de la arteria carótida. La cánula se rellenó con una solución salina heparinizada (15 U.I./ml, heparina Leo, Altana Pharma) para eliminar la posibilidad de obstrucción por coagulación sanguínea.
- Volemia.- El nivel volémico se aseguró mediante la administración continua (1 ml/h) de la solución salina empleada como disolvente del anestésico α -cloralosa.

2.2. Aislamiento y estimulación de las unidades motoras

Una vez transcurrida 1 hora desde la finalización de la cirugía y tras comprobar que el valor sistólico de la presión arterial estaba por encima de los 100 mm de Hg, se procedió a registrar la actividad de los músculos implicados en el reflejo de retirada. Las UMAs se registraron con un electrodo bipolar de wolframio (tungsteno) insertado percutáneamente en los músculos de la pata trasera derecha de la rata implicados en el reflejo de retirada (peroneo largo, tibial anterior y extensor largo de los dedos; Schouenborg y Weng, 1994; Solano y Herrero, 1997). El electrodo se manejó desde un micromanipulador que facilitó un movimiento muy preciso del mismo. Simultáneamente, se aplicó una presión de intensidad moderada sobre los dedos de la pata como forma de activación del reflejo de retirada y captura de la señal eléctrica correspondiente.

Tras conseguir el aislamiento de la unidad motora, comenzó el proceso de estimulación de la misma. La zona más sensible del campo receptor cutáneo de la

pata del animal fue sometida a dos tipos de estimulación nociva: mecánica o natural y eléctrica. Ambos estímulos se aplicaron alternativamente en ciclos de 3 minutos de duración.

Los estímulos mecánicos fueron generados por un estimulador controlado electrónicamente (Estimec, Cibertec). El estimulador permitió ejercer una fuerza de intensidad conocida durante 10 segundos en un área circular de 14 mm² de diámetro. Se consideró como umbral para la estimulación mecánica la intensidad mínima requerida para generar un disparo estable durante al menos 10 segundos. Teniendo esto en cuenta, la intensidad de estimulación mecánica aplicada fue 200 mN mayor del valor del umbral de cada UMA, con el fin de asegurar su activación.

Los estímulos eléctricos consistieron en 16 pulsos de 2 ms de duración, una frecuencia de 1 Hz y el doble de la intensidad umbral para aferencias de fibras C, y fueron transmitidos por un par de agujas de 0.2 mm de diámetro conectadas a un generador eléctrico (WPI) e insertadas en el área de mayor sensibilidad del campo receptor (generalmente, el primer dedo de la pata trasera, Solano y Herrero, 1997). La estimulación eléctrica con impulsos repetitivos de alta intensidad produjo un fenómeno mediado a nivel medular conocido como *wind-up*, caracterizado por un incremento en el número de las respuestas de fibras C tras cada pulso de estimulación (Mendel, 1965; Herrero et al, 2000). Las fibras C producen respuestas de latencia tardía, al menos 150 ms después del estímulo, en este tipo de preparaciones, llegando hasta los 650 ms (Herrero y Cerveró, 1996b). Se consideró como umbral para la estimulación eléctrica la intensidad mínima necesaria para activar fibras C con el primer pulso, siendo la intensidad empleada en los experimentos el doble del umbral para fibras C.

Solamente las UMAs con un rango de disparo estable, tanto a estimulación mecánica como a estimulación eléctrica, capaces de producir el fenómeno de *wind-up*, fueron seleccionadas para su estudio y la administración de fármacos. En la Figura M.7 se muestran las respuestas obtenidas en un registro original, de una UMA a estimulación mecánica y eléctrica, representando más detalladamente el fenómeno del *wind-up*.

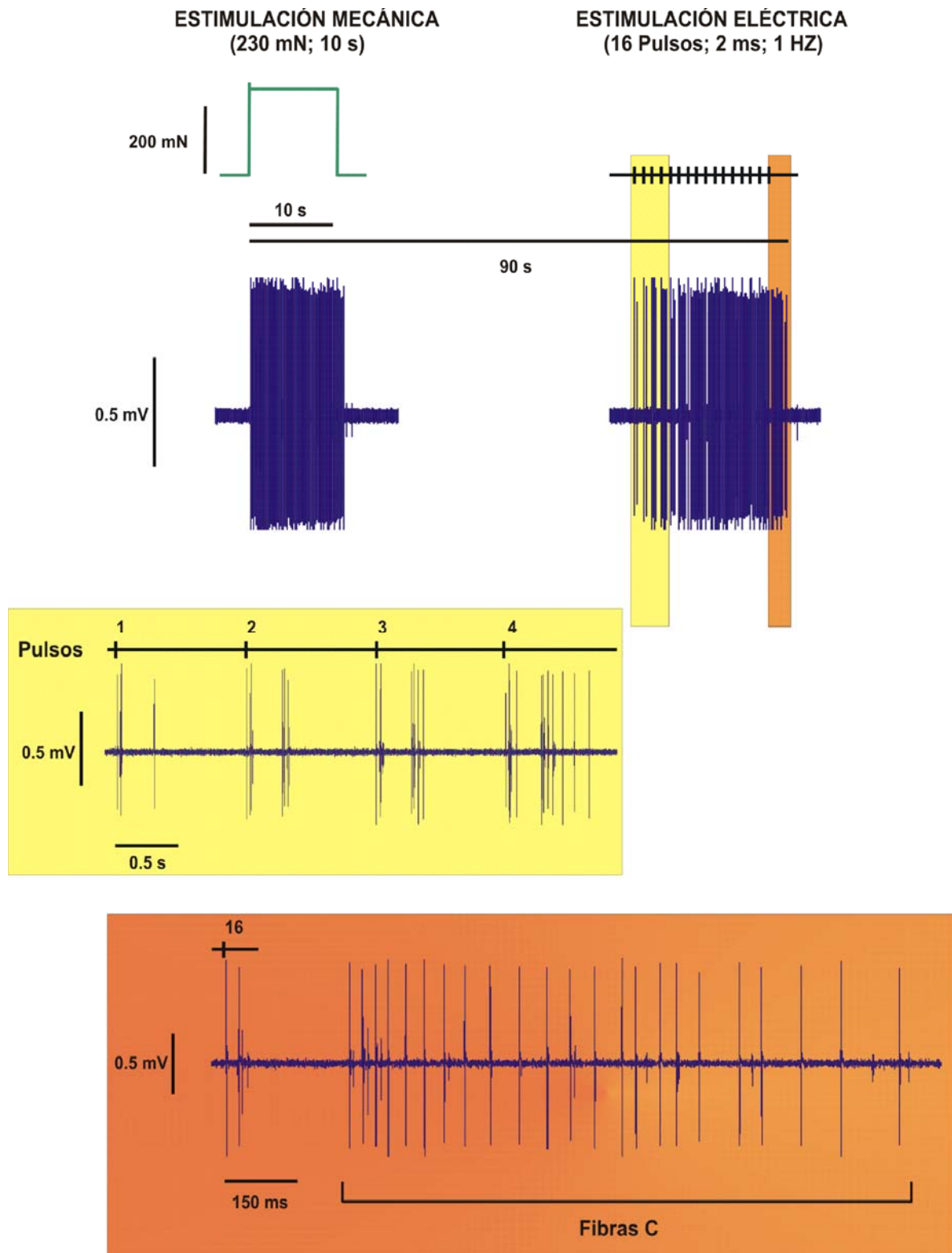


Figura M.7.-Fenómeno de wind-up. La estimulación eléctrica con impulsos repetitivos de alta intensidad produce una respuesta característica de la médula espinal denominada wind-up, que consiste en un incremento progresivo del número de las respuestas de las fibras C tras cada pulso de estimulación. Las fibras C producen respuestas de latencia tardía, al menos 150 ms después del estímulo eléctrico. Para la cuantificación del wind-up se consideró el número total de espigas registradas entre los 150 y los 650 ms.

Los fármacos empleados se administraron por vía intravenosa en dosis acumulativas de forma logarítmica en base 2. La farmacocinética propia de cada sustancia condicionó los tiempos entre cada dosis y por tanto, el número de ciclos de estimulación. Las respuestas a estimulación mecánica y eléctrica fueron contabilizadas y analizadas por separado. El análisis estadístico se realizó promediando el número de respuestas de los dos o tres últimos ciclos de estimulación para cada una de las dosis y comparándolas con las respuestas control, que se obtuvieron también promediando los tres ciclos de estimulación previos a la administración de la primera dosis. Los datos de la estimulación eléctrica se analizaron contando el número de espigas evocadas entre 150 y 650 ms tras cada estimulación. La presión arterial se analizó en los mismos ciclos de estimulación antes indicados para poder descartar, en su caso, una posible relación entre su alteración y los efectos observados en sistema nociceptivo.

En la Figura M.8 se observa un registro original de un experimento, en el cual aparecen los dos tipos de estimulación y sus respuestas correspondientes en forma de histogramas.

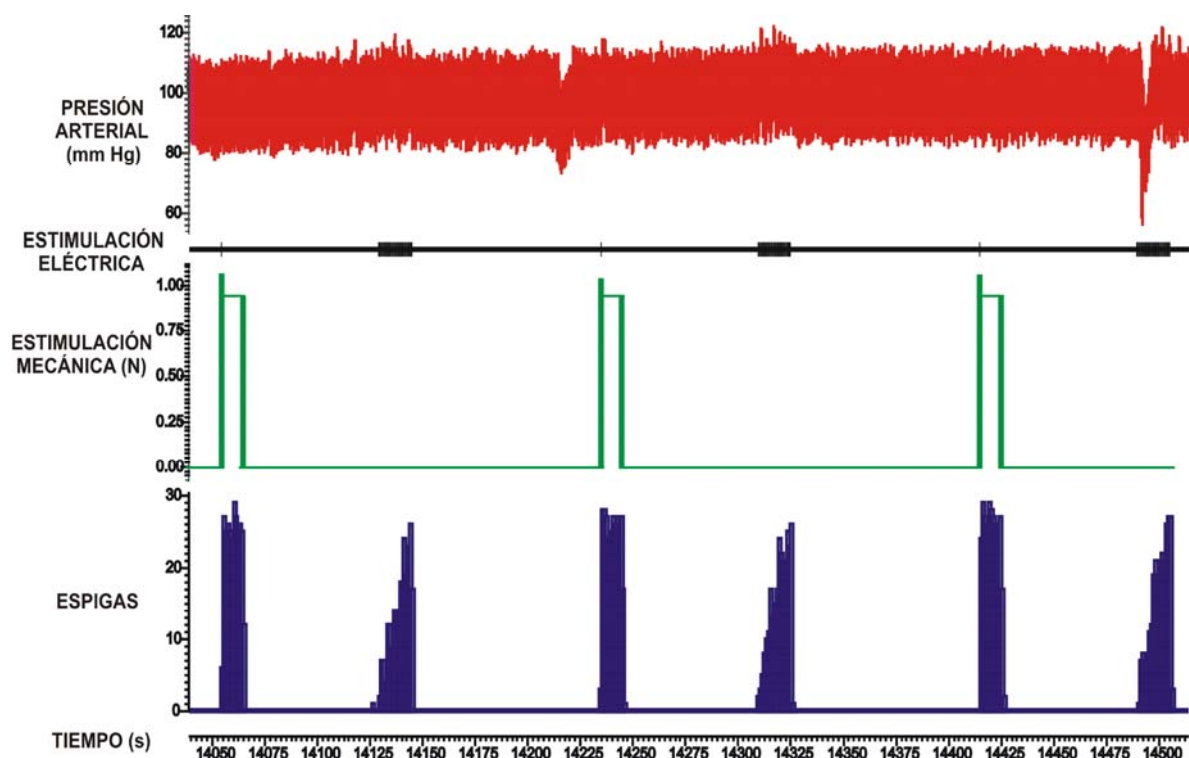


Figura M.8.- Registro original de una UMA. Las respuestas características para cada tipo de estimulación, mecánica y eléctrica, se observan en forma de histogramas durante 3 ciclos completos. En paralelo aparece el registro continuo de la presión arterial.

2.3. Equipo de registro

Los elementos que constituyen el sistema de registro electrofisiológico empleado para estudiar la actividad de las UMAs son:

Electrodo bipolar.- Los electrodos bipolares fueron construidos en el laboratorio (Solano y Herrero, 1997). Se utilizaron agujas hipodérmicas (26G x 20) de acero inoxidable en la que se practicaron un par de agujeros de 2 mm en los laterales de la base. Por la punta de la aguja se introdujeron dos hilos de wolframio (tungsteno) recubiertos con teflón (75 μ m de diámetro, Advent) impregnados con una resina epoxi, saliendo cada uno de ellos por un orificio, donde quedaron soldados (tras retirar la capa de teflón) a un conector macho de 1 mm. Estos conectores se fijaron a los laterales de la base de la aguja con la resina, mientras que en la parte central de la base se soldó un cable con un conector de 2 mm que se utilizó como derivación a tierra. El bisel de la aguja fue limado de forma que no hubiera ningún contacto entre los hilos ni con las paredes metálicas.

Modulo de amplificación y filtrado.- La señal procedente del electrodo se hizo pasar inicialmente por un preamplificador estándar y, a continuación, por un sistema de filtrado y amplificación (Neurolog). El sistema consta de un conjunto de tres filtros: un filtro de alta frecuencia, que eliminó las señales de más de 1000 Hz (aprox.); un filtro de baja frecuencia, que desechó las señales de hasta 100 Hz (aprox.); y un filtro Notch, que evitó la interferencia de ruido debido a la frecuencia eléctrica (50 Hz).

Osciloscopio analógico.- Se utilizó un osciloscopio analógico (HM 303-6, Hameg) para observar la espiga producida por la actividad bioeléctrica de las unidades motoras en tiempo real. Asimismo se utilizó un discriminador de ventana para la correcta discriminación de la unidad.

Osciloscopio digital.- La espiga amplificada, filtrada y aislada se envió a un osciloscopio digital donde se pudo visualizar ampliada con el fin de realizar un seguimiento de la misma durante todo el experimento.

Convertidor analógico-digital.- Este equipo (1401 plus, CED1) transformó la señal analógica aislada en digital, lo cual permitió registrar y analizar los datos en un ordenador mediante el programa comercial Spike 2 para Windows.

En la Figura M.9 se muestran imágenes del equipo utilizado.

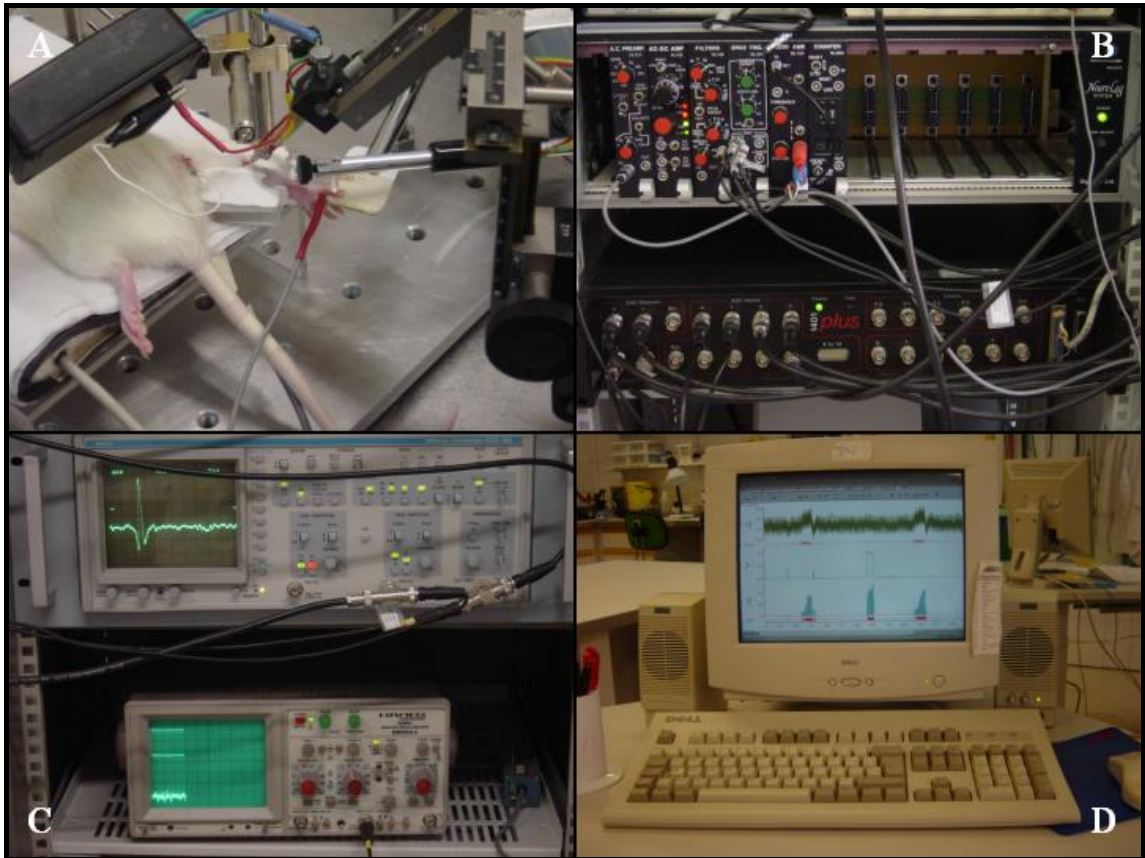


Figura M.9.- Equipo de registro electrofisiológico. La señal eléctrica generada en la médula espinal mediante estimulación nociva mecánica y eléctrica, se registra a través de un electrodo bipolar (A), llegando, tras ser amplificada y filtrada, a un convertidor analógico-digital (CED) (B) desde donde se envía a un osciloscopio donde se facilita su seguimiento y aislamiento con un discriminador de ventana (C). Finalmente un programa comercial (Spike 2 3.8) permite trabajar con la señal aislada en un ordenador (D).

3. FÁRMACOS

En el presente trabajo se han estudiado los efectos de los siguientes fármacos:

Medetomidina (MED, Domtor, Pfizer).- Agonista α_2 -adrenérgico. En los experimentos de comportamiento se empleó una disolución acuosa de 100 $\mu\text{g/ml}$, que fue administrada vía i.p. en un volumen total de 0.5 ml en suero salino, en dosis de 20, 40 y 80 $\mu\text{g/kg}$. En los experimentos de UMAs, la MED fue administrada i.v. en dosis de 0.3 a 9.6 $\mu\text{g/kg}$, en un volumen total de 0.3 ml en salino, partiendo de concentraciones de 1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$.

Atipamezol (ATI, Antisedan, SB).- Antagonista α_2 -adrenérgico. En los experimentos de comportamiento se administró una dosis de 100 $\mu\text{g/kg}$ i.p. disuelto en un volumen total de 0.5 ml con suero salino, con una concentración de partida de 500 $\mu\text{g/ml}$ en agua destilada. La misma dosis de 100 $\mu\text{g/kg}$, a partir de la misma concentración inicial de 500 $\mu\text{g/ml}$, fue administrada i.v. en un volumen final de 0.3 ml en salino para los experimentos de UMAs.

Ácido retinoico todo-trans (ATRA, Tretinoína, Sigma).- Metabolito de la vitamina A. El ATRA se suspendió en carboximetilcelulosa (CMC, Sigma) al 0.5% y fue administrado p.o. en un volumen final de 0.5 ml los cuatro días previos al registro de las UMAs, en dosis de 15 mg/kg los dos primeros días de tratamiento y de 10 mg/kg los dos últimos. En el caso de los experimentos de comportamiento, esta pauta de tratamiento con ATRA fue prorrogada durante tres días más, hasta un total de siete días, con dosis de 10 mg/kg.

Paracetamol (PAR, Nicox).- Inhibidor de las COX. El PAR se disolvió en una mezcla de Dimetilsufóxido (DMSO, Sigma) y Polietilenglicol 300 (PEG, Panreac) en relación 1:1, a unas concentraciones de 50 mM y 500 mM. Su efecto se valoró mediante la técnica de las UMAs, utilizando dosis entre 15 y 960 $\mu\text{mol/kg}$ administradas en un volumen final de 0.3 ml en salino.

Nitroparacetamol (NOP, Nicox).- Inhibidor de COX. Se utilizaron las mismas disoluciones y dosis que para el paracetamol.

S-Ketoprofeno (S-KET, Nicox).- Inhibidor de COX. Se disolvió en una mezcla de DMSO (Sigma) y PEG 300 (Panreac) en relación 1:1, a una concentración

de 10 mM. Se emplearon dosis entre 0.1 y 6.4 $\mu\text{mol/kg}$ que fueron administradas en un volumen total de 0.3 ml en salino por vía i.v. para el estudio de su efecto mediante la técnica de las UMAs.

Fentanilo (FEN, Sigma).- Agonista de los receptores opioides μ . Se disolvió en suero salino en una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Se utilizaron dosis de 1 a 32 $\mu\text{g/kg}$, que fueron administradas en un volumen total de 0.3 ml en salino por vía i.v para el estudio de su efecto mediante el registro de UMAs.

Naloxona (Sigma).- Antagonista de los receptores opioides. Se disolvió en agua destilada a una concentración de 10 mg/ml . Se utilizó una dosis de 1 mg/kg , administrada en un volumen final de 0.3 ml en salino por vía i.v para el estudio de su efecto mediante la técnica de las UMAs.

Tanto en los experimentos de comportamiento como en los electrofisiológicos, los animales fueron utilizados en una única ocasión y sacrificados a la conclusión de los mismos con una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol). Todos los procedimientos experimentales se hicieron de conformidad con las directrices nacionales y europeas que regulan el uso de animales de laboratorio.

**CAPITULO I. INFLUENCIA DE LA FASE DE LA INFLAMACIÓN Y DE LA
ESPINALIZACIÓN EN LA ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DEL AGONISTA
 α_2 -ADRENÉRGICO MEDETOMIDINA.**

1. OBJETIVOS

- 1) Conocer la variabilidad de la intensidad de la hiperalgesia y la alodinia durante la evolución de la inflamación de tejido blando, inducido por CAR, en experimentos de comportamiento.

- 2) Averiguar la importancia de la fase de la inflamación sobre la intensidad y duración del efecto antihiperalgésico y antialodínico del agonista selectivo α_2 -adrenérgico MED.

- 3) Evaluar la importancia de la integridad de la modulación supraespinal en la acción antinociceptiva de la MED, comparando su efecto en animales normales y espinalizados por medio de técnicas electrofisiológicas.

2. INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios sugieren que los agonistas α_2 -adrenérgicos son fármacos analgésicos muy efectivos, siendo incluso más activos en situaciones de sensibilización inducida por inflamación (Hylden et al., 1991; Idänpään-Heikkilä et al., 1994; Stanfa y Dickenson, 1994; Mansikka y Pertovaara, 1995). Esto se relaciona con un aumento de la densidad de receptores adrenérgicos en láminas I y II de la médula espinal (Brandt y Livingston, 1990) y con un incremento de la movilización de noradrenalina en artritis (Weil-Fugazza et al., 1986). La administración en la médula espinal de agonistas α_2 -adrenérgicos produce una analgesia dosis-dependiente y mediada por diferentes mecanismos de acción, entre los cuales se encuentran la modulación de la liberación de neurotransmisores y la hiperpolarización de neuronas (Williams et al., 1985; Bean, 1989; Lipscombe et al., 1989; Takano et al., 1993, Eisenach et al., 1996).

La modulación del dolor inflamatorio mediante el sistema α_2 -adrenérgico no se limita únicamente a una acción directa sobre neuronas de la médula espinal. Los mecanismos de control de la inhibición descendente del dolor se activan en el dolor inflamatorio (Herrero y Cerveró, 1996a, Ren y Dubner, 1996) y, entre estos, el sistema noradrenérgico se considera como uno de los más importantes, con origen en el tronco del encéfalo (Peng et al., 1996; Cui et al., 1999).

Sin embargo, la actividad antinociceptiva y antihiperalgésica de los agonistas α_2 -adrenérgicos ha sido evaluada siguiendo diferentes protocolos experimentales y en condiciones de inflamación muy variables. Así, por ejemplo, se ha estudiado en animales con monoartritis inducida a las 24 horas por inyección de caolín y CAR (Buerkle et al., 1999), o en inflamación de tejido blando de la pata a las 3 horas mediante administración subcutánea de CAR (Kawamata et al., 1999), entre muchas otras (Idänpään-Heikkilä et al., 1994; Mansikka y Pertovaara, 1995; Stanfa y Dickenson, 1994; Xu et al., 2000; Mansikka et al., 2002).

En muchas ocasiones, los resultados observados sobre la duración e intensidad de la acción analgésica de los agonistas α_2 -adrenérgicos son muy variables e incluso contradictorios. Esta variabilidad de resultados podría deberse a la diversidad de protocolos empleados, a los distintos modelos experimentales de la inflamación, anestesia e integridad de los sistemas moduladores supraespinales. El propósito de este estudio fue, en primer lugar, investigar la variabilidad de la intensidad de la

hiperalgesia y la alodinia durante la evolución de la inflamación de tejido blando inducido por CAR. En segundo lugar, averiguar la importancia de la fase de la inflamación sobre la intensidad y duración del efecto antihiperalgésico y antialodínico de la MED (Virtanen et al., 1988; Pertovaara, 1993). Tras estos experimentos se trató de evaluar la importancia de la integridad de la modulación supraespinal en la acción antinociceptiva de la MED, comparando su efecto en animales normales y espinalizados.

3. MÉTODOS

3.1. Experimentos de comportamiento

3.1.1. Animales y preparaciones

Los experimentos fueron realizados en ratas Wistar macho de pesos comprendidos entre 235-355 g. La evolución de la hiperalgesia inducida por la inflamación con CAR y el efecto antinociceptivo de la MED fueron estudiados en respuestas al reflejo de retirada evocado por estimulación mecánica y térmica, siguiendo métodos adaptados de los descritos por Gilchrist et al., (1996), modificados y descritos en detalle por otros autores (Mazarío et al., 2001; Lahdesmaki et al., 2003) y en el capítulo dedicado a los métodos en esta tesis.

Los grupos experimentales y los tipos de tests empleados se resumen en la tabla I.1. Las pruebas control se realizaron antes de la administración de CAR. Seguidamente se repitieron a las 4, 20 y 44 horas de la inflamación para comprobar el desplazamiento de la curva de intensidad-respuesta y para seguir la evolución de la alodinia y la hiperalgesia en las diferentes fases de la inflamación. En los animales tratados con MED, el test control fue realizado inmediatamente antes de la administración del fármaco y a los 10, 30 y 60 minutos de su inyección intraperitoneal. En todos los casos, los tests se llevaron a cabo en la pata tratada con CAR y en la tratada con salino. El efecto de 40 µg de MED se trató de revertir en 4 animales con 20 horas de inflamación con el antagonista selectivo α_2 -adrenérgico ATI (100 µg/kg, i.p., Virtanen et al., 1989). En otro grupo experimental (n=4), se utilizó una dosis de 100 µg/kg, i.p. de ATI para descartar un efecto del antagonista sobre las respuestas nociceptivas tabla (1-I).

	SAL			MED			MED			ATI			MED + ATI					
Dosis	500µl			20µg/kg			40µg/kg			80µg/kg			100µg/kg			40+100µg/kg		
Tiempo de Test (min)	10-30-60			10-30-60			10-30-60			10-30-60			10-30-60			10-30		
Tipo de Test	M-V-T			M-V-T			M-V-T			M-V-T			M-V-T			M-V-T		
Pata	D-I			D-I			D-I			D-I			D-I			D-I		
Tiempo de Inflamación (h)	4	20	44	4	20	44	4	20	44	4	20	44	20			20		
n	5	6	3	9	11	6	9	8	6	6	6	3	4			4		

Tabla I.1.- Grupos experimentales y tipos de tests. Las respuestas nociceptivas obtenidas por estimulación térmica (T) y mecánica (M), así como la medida del volumen de la pata (V) se estudiaron tanto en la pata derecha (D, CAR), como en la izquierda (I, salino), antes de la inducción de la inflamación y 4, 20 y 44 horas después. Los experimentos se realizaron antes de cualquier tratamiento y tras ser tratados con salino (SAL) o MED a dosis de 20, 40 y 80 µg/kg. El efecto de la MED se estudió 10, 30 y 60 minutos después de ser inyectada. También se realizaron experimentos control con el antagonista α_2 -adrenérgico ATI.

3.1.2. Fármacos y análisis de datos

Todos los experimentos fueron realizados sin que el experimentador conociera el fármaco empleado. La MED fue disuelta en salino y administrada i.p. en un volumen total de 0.5 ml en dosis de 20, 40 y 80 µg/kg. El ATI se disolvió también en salino y se inyectó i.p. en una dosis de 100 µg/kg.

Los resultados de la actividad antinociceptiva de la MED fueron representados en forma de datos crudos y, para comparar el efecto entre los grupos, como porcentaje del máximo efecto posible (%MEP, ver en capítulo de Materiales y Métodos). Los posibles efectos secundarios debidos al tratamiento farmacológico tales como actividad exploratoria excesiva, tareas de limpieza corporal exageradas, masticación y sedación, fueron determinados de una manera semicuantitativa, de acuerdo con su intensidad (nula, media, moderada o severa) y naturaleza (ausente, intermitente o continua), inmediatamente después de cada test y para cada tiempo estudiado (Nielsen et al., 2005). Los datos se expresaron como la media \pm e.e.m. y fueron comparados mediante un ANOVA de una vía con post test de Dunnett.

3.2. Experimentos de electrofisiología

3.2.1. Animales y preparaciones

Se emplearon ratas Wistar macho adultas con pesos comprendidos entre 250-380 g divididos en 6 grupos: animales intactos sin inflamación (n=7), animales intactos con 4 horas de inflamación (n=8), animales intactos con 20 horas de inflamación (n=8), animales espinalizados sin inflamación (n=7), animales espinalizados con 4 horas de inflamación (n=8) y animales espinalizados con 20 horas de inflamación (n=7). Puesto que se ha demostrado que la cirugía en la médula espinal puede modificar la acción analgésica de algunas sustancias, como opioides y adenosina, sobre los reflejos nociceptivos (Herrero y Headley, 1991; Ramos-Zepeda et al., 2004), se consideró necesario incluir un grupo de animales *sham*-espinalizados con 20 horas de inflamación (n=6) en los que se estudió el efecto de la MED. La inflamación fue inducida siguiendo el mismo protocolo que en los experimentos de comportamiento.

Tras la cirugía preparatoria, se procedió al registro del reflejo de retirada como UMAs, descrito en la sección de Materiales y Métodos. En la figura I.1 se muestran ejemplos de registro y protocolos de estimulación.

La fuerza media de estimulación mecánica fue 0.9 ± 0.1 N en animales intactos, 0.83 ± 0.1 N en animales intactos con inflamación, 1.1 ± 0.1 N en animales espinalizados, 0.96 ± 0.04 N en animales espinalizados con inflamación y 1.3 ± 0.6 N en el grupo de los *sham*-espinalizados. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales ni entre diferentes situaciones de inflamación, por lo que se presentan agrupados los datos correspondientes a 4 y 20 horas de inflamación. La estimulación media eléctrica fue de 2.05 ± 0.7 mA en animales intactos, 1.85 ± 0.7 mA en animales intactos con inflamación, 2 ± 0.6 mA en animales espinalizados, 2.17 ± 0.04 N en animales espinalizados con inflamación y 2 ± 0.8 mA en el grupo de los *sham*-espinalizados. Como ocurrió para la estimulación mecánica, no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales.

Efecto de Medetomidina sobre respuestas nociceptivas en UMAs

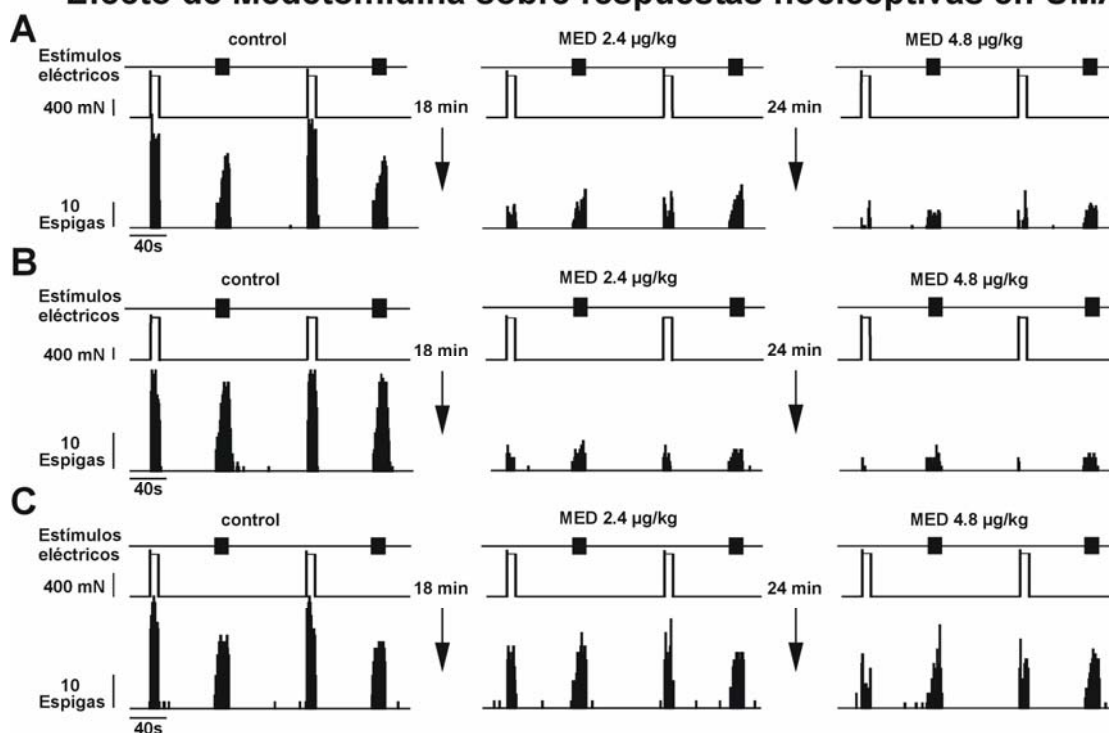


Figura 1.1.- Registros originales de UMAs. Las UMAs fueron activadas en ciclos de tres minutos con estimulación mecánica y eléctrica nocivas en animales intactos (A), animales sham-espinalizados (B) y espinalizados (C). Todos los ejemplos proceden de animales con 20 horas de inflamación plantar. Se pueden observar dos respuestas control previas a la administración de dosis acumulativas de MED (dosis inicial de 0.6 µg/kg) y los efectos obtenidos tras administrar 2.4 y 4.8 µg/kg de MED. La administración i.v. de MED produjo una inhibición de las respuestas nociceptivas significativamente mayor en los animales intactos (A) y sham-espinalizados (B) que en los espinalizados (C).

3.2.2. Fármacos y análisis de datos

Los datos se expresaron como la media \pm e.e.m del porcentaje del control, tomando como control la media de las respuestas obtenidas en los tres ciclos previos a la administración del fármaco. El análisis cuantitativo se basó en el recuento de las espigas evocadas durante los dos ciclos de estimulación entre cada dosis. El efecto de la MED fue estudiado en dosis desde 0.6 a 9.6 µg/kg, siendo inyectada por vía intravenosa en un volumen constante de 0.3 ml en salino, con dosis acumulativas de régimen logarítmico en base 2 cada dos ciclos de estimulación (6 minutos). Como en los experimentos de comportamiento, se estudió la selectividad del fármaco con 100 µg/kg de ATI en al menos tres animales. Las respuestas se compararon como datos puros utilizando un ANOVA de una vía para medidas repetitivas con post test de Dunnett.

4. RESULTADOS

4.1. Experimentos de comportamiento

4.1.1. Evolución de la inflamación

Las curvas de intensidad-respuesta se realizaron a las 4, 20 y 44 horas de la inducción de la inflamación para conocer la evolución del proceso inflamatorio y determinar la efectividad del fármaco en cada fase de este proceso: el pico, la meseta y la etapa de recuperación.

El número de respuestas del reflejo de retirada con la estimulación mecánica fue muy similar en todos los test control, y también muy parecido a los publicados con anterioridad siguiendo protocolos de experimentación similares (Romero-Sandoval et al., 2004; Mazarío et al., 2001). Se observó un claro desplazamiento a la izquierda en la curva intensidad-respuesta en los tres estadios de inflamación estudiados. La amplitud de este desplazamiento fue inversamente proporcional al tiempo de inflamación, de tal forma que fue mayor 4 horas después de la inducción de la inflamación y menor a las 44 horas de la inflamación (Figura I.2).

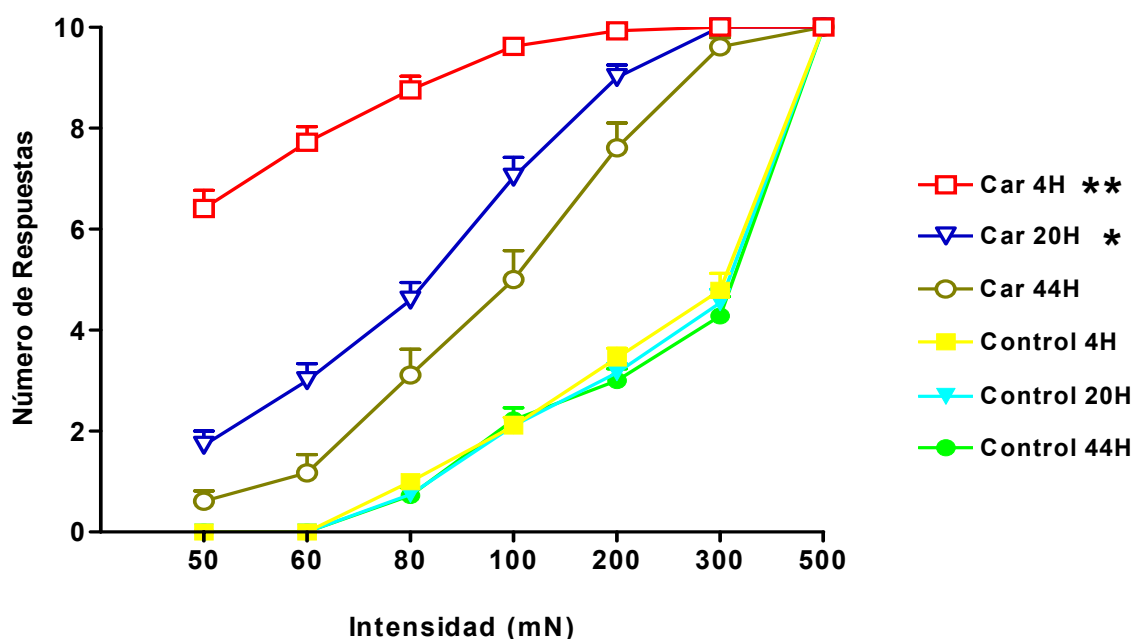


Figura I.2.- Curvas de intensidad-respuesta en animales control y con CAR a las 4, 20 y 44 horas de la inflamación. Se observa el desplazamiento hacia la izquierda de las curvas tras la inducción de la inflamación (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, comparación mediante ANOVA de una vía con post test de Dunnett).

Los niveles de inflamación, alodinia, e hiperalgesia mecánica se mantuvieron significativamente altos en las tres etapas estudiadas de la inflamación (Figura I.3). Sin embargo, la hiperalgesia térmica sólo se observó a las 4 y a las 20 horas, pero no a las 44 horas, del momento de la inflamación (Figura I.3). Por ello, no se estudió el efecto de la MED sobre la hiperalgesia térmica en esta última fase.

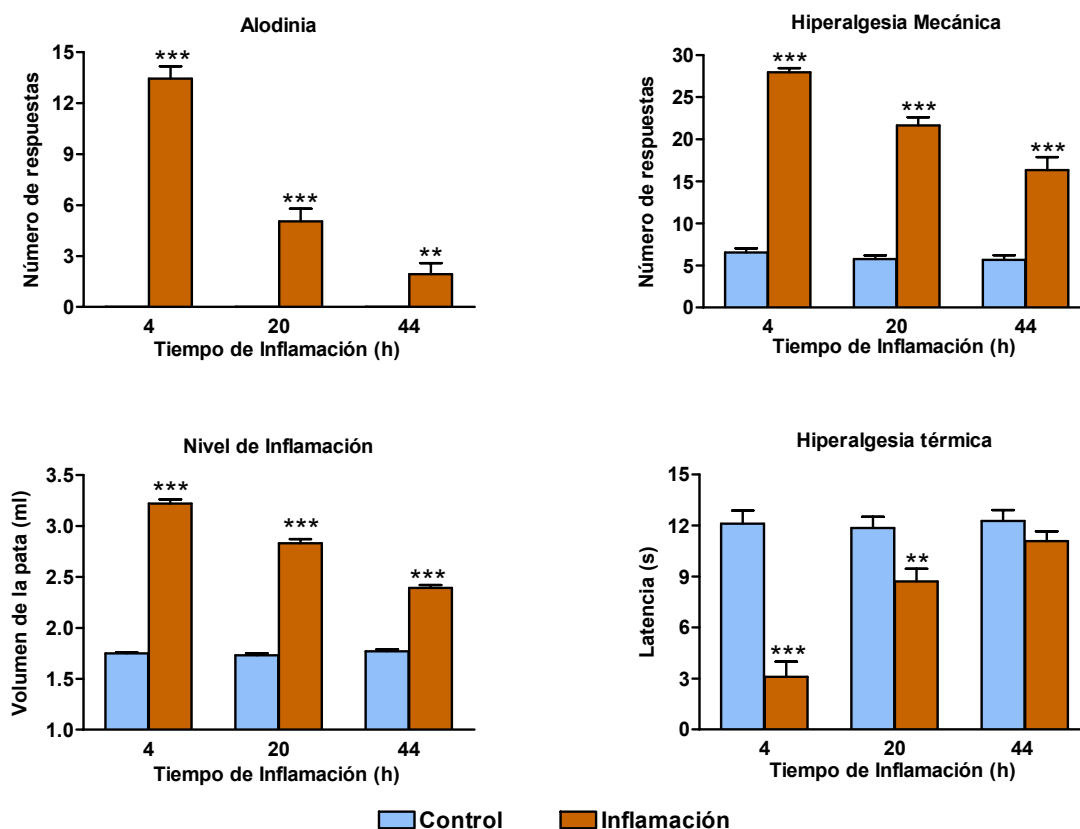


Figura I.3.- Evolución del nivel de inflamación y de la alodinia e hiperalgesia mecánica y térmica durante el proceso inflamatorio. Las respuestas nociceptivas se obtuvieron en la pata en la que se inyectó la CAR (Inflamación) y comparadas con las respuestas observadas en la pata tratada con salino (Control; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparación frente a las respuestas control empleando un ANOVA con post test de Dunnett).

4.1.2. Efecto de medetomidina en los test de comportamiento

La administración de MED no indujo cambio alguno en el nivel de la inflamación en las tres etapas estudiadas, lo cual supone que, en las presentes condiciones experimentales, la MED careció de una acción antiinflamatoria y que, por lo tanto, cualquier efecto sobre las respuestas nociceptivas no fue secundario a una reducción de la inflamación.

Asimismo, la administración de MED no provocó una reducción de las respuestas nociceptivas en la pata tratada con salino en las dosis de 20 y 40 µg/kg, aunque la dosis de 80 µg/kg sí produjo una clara reducción de la línea base. Esto fue interpretado como un signo de sedación.

La MED produjo una reducción dosis-dependiente de las respuestas nociceptivas en la pata tratada con CAR. Los efectos observados con la administración de la dosis de 20 µg/kg se muestran en la Tabla I.2. El efecto principal se observó sobre la alodinia (67±7 %, $p<0.05$), seguido del efecto sobre la hiperalgesia mecánica (60±9 %, $p<0.01$) y la hiperalgesia térmica (45±18 %, $p<0.05$). En todos los casos, el efecto de la MED fue mayor a los 30 minutos de la inyección que a los 10 o a los 60 minutos. Además, el efecto fue muy parecido a las 20 y a las 44 horas de la inflamación y en ambos casos, mayor que el observado a las 4 horas de la inflamación.

Fármaco	Tiempo Inf (h)	Tiempo test (min)	Vol 1 (ml)	Vol 2 (ml)	HT (% MEP)	A (% MEP)	HM (% MEP)
MED 20 µg/kg	4	10	3.2±0.1	3.3±0.1	10±5	12±6	9±6
		30		3.2±0.1	15±6 *	22±7 *	13±6
		60		3.2±0.1	9±2	7±5	2±1
	20	10	2.7±0.1	2.7±0.1	34±19	37±10	30±8 *
		30		2.7±0.1	45±18 *	57±8 **	35±7 **
		60		2.7±0.1	18±8	43±11 *	29±7 *
	44	10	2.4±0.1	2.4±0.1	----	40±14	23±11
		30		2.3±0.04	----	67±7 *	60±9 **
		60		2.4±0.04	----	28±9	28±14

Tabla I.2.- Efecto de 20 µg/kg de MED en experimentos de comportamiento. El efecto de la MED se estudió a las 4, 20 y 44 h de la inducción de la inflamación (Tiempo Inf) y 10, 30 y 60 min (Tiempo test) después de la administración i.p. Las pruebas que se realizaron fueron la medida del volumen de la pata antes (Vol 1) y después de la inyección de MED (Vol 2), hiperalgesia térmica (HT), alodinia (A) e hiperalgesia mecánica (HM). El efecto antihiperalгésico y antialodínico de la MED se ha expresado como porcentaje del máximo efecto posible (% MEP). Un 100 % representaría la inhibición completa de las respuestas por el fármaco. Las comparaciones estadísticas se realizaron con datos crudos para cada valor frente a los controles (valores previos a la administración de la droga), empleando un ANOVA de una vía con post test de Dunnett. Los datos se expresan como la media ± eem (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

La dosis más efectiva de MED sin causar sedación fue la de 40 µg/kg. En respuestas a estimulación mecánica, el efecto observado con esta dosis fue máximo a los 30 minutos de su administración (Figura I.4). Asimismo, la antinocicepción observada fue más intensa a las 20 horas de la inflamación (alodinia: 85.5±8 %, $p<0.01$; hiperalgesia: 66±12 %, $p<0.01$), aunque el efecto fue también significativo a las 4 horas (alodinia: 61±11 %, $p<0.05$; hiperalgesia: 47±14 %, $p<0.01$) y a las 44 horas (alodinia: 44±15 %, $p<0.05$; hiperalgesia: 56±13 %, $p<0.05$). La hiperalgesia térmica se redujo de forma más intensa también a los 30 minutos de la administración de la dosis de 40 µg/kg (Figura I.4), con un máximo efecto de 76±15 % ($p<0.01$) a las 20 horas de la inflamación.

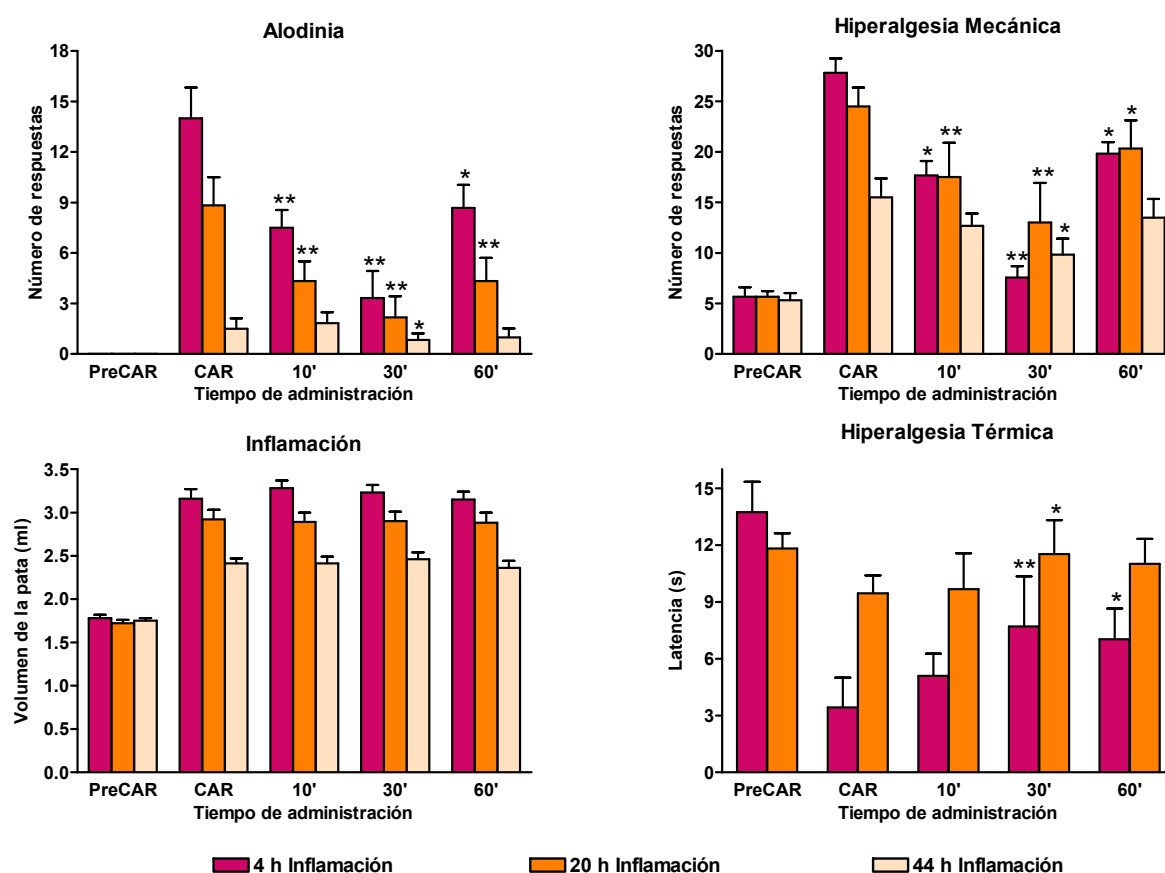


Figura I.4.- Efecto de MED 40 µg/kg sobre las respuestas nociceptivas y el nivel de inflamación en diferentes estadios de la inflamación inducida por CAR. El efecto antinociceptivo de la MED fue similar en la alodinia y la hiperalgesia mecánica y eléctrica. No se observó reducción del nivel de inflamación. El efecto fue más intenso a los 30 minutos de la administración i.p. que a los 10 ó 60 minutos (Comparación estadística como en la Figura I.3, $*p<0.05$).

No se observaron signos de sedación con las dosis de 20 y 40 µg/kg, pero éstos fueron evidentes con la dosis de 80 µg/kg. En este caso (Tabla I.3) se observó una inhibición completa de las respuestas nociceptivas en la mayoría de los test realizados a las 20 y 44 horas de la inflamación. La sedación fue también evidente a las 4 horas, aunque en estos experimentos no se observó una antinocicepción completa.

Fármaco	Tiempo Inf (h)	Tiempo test (min)	Vol 1 (ml)	Vol 2 (ml)	HT (% MEP)	A (% MEP)	HM (% MEP)
MED 80 µg/kg	4	10		3.3±0.04	46±10	69±16	52±10
		30		3.3±0.04	67±12	71±16	59±17
		60		3.3±0.05	46±13	48±17	33±15
	20	10	3±0.1	2.9±0.1	79±20	89±7	97±3
		30		2.9±0.1	86±14	96±4	100±0
		60		2.9±0.1	77±19	75±25	67±19
	44	10	2.4±0.03	2.4±0.04	----	100±0	90±6
		30		2.4±0.04	----	100±0	100±0
		60		2.4±0.05	----	100±0	52±26

Tabla I.3.- Efecto de 80 µg/kg MED en experimentos de comportamiento. El efecto de la MED fue siempre significativo, aunque en todos los casos se observaron claros signos de sedación (Mismo diseño y distribución de datos que para la Tabla I.2).

Para determinar una acción selectiva de la MED sobre los receptores adrenérgicos α₂, se trató de revertir su efecto con una dosis de 100 µg/kg del antagonista selectivo α₂-adrenérgico ATI, en 4 animales con 20 horas de inflamación. En todos los casos, se observó de inmediato una recuperación de las respuestas por encima de un 75% del control. La administración por separado de la misma dosis de antagonista no modificó significativamente ninguna de las respuestas estudiadas (datos experimentales no mostrados).

4.2. Experimentos de electrofisiología

Como comentamos en la introducción, los resultados observados en los anteriores experimentos mostraron una alta afectividad antinociceptiva de la MED. No sabemos, sin embargo, si la acción de la MED se produce en tejidos periféricos, en la médula o en zonas supramedulares, por lo que los siguientes experimentos

tuvieron como objetivo estudiar las posibles diferencias en la intensidad analgésica de la MED en animales intactos y espinalizados.

4.2.1. Efecto de medetomidina en animales sin inflamación

La MED fue muy efectiva en animales intactos sin inflamación. Las respuestas a la estimulación mecánica nociva fueron completamente inhibidas con una dosis de 4.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($2\pm 0.7\%$, $p<0.01$) y una DE_{50} de $1.1\pm 1\ \mu\text{g}/\text{kg}$. Sin embargo, en animales espinalizados la MED fue menos efectiva, siendo el máximo efecto observado del $48\pm 11\%$ ($p<0.01$) de las respuestas control, con una dosis de 9.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, el doble de la dosis necesaria para obtener una inhibición completa en animales intactos (Figura I.5). Las diferencias observadas en las dos situaciones experimentales fueron significativas con dosis de 2.4 ($p<0.05$) y 4.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p<0.01$). El *wind-up* fue inhibido de manera dosis dependiente por la MED en animales intactos, con una inhibición completa con la dosis de 2.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($8\pm 5\%$, $p<0.001$, datos no mostrados en figura). En los animales espinalizados, por el contrario, no se observó ninguna reducción significativa con las dosis estudiadas.

4.2.2. Efecto de medetomidina en animales con 4 horas de inflamación

En animales intactos con 4 horas de inflamación, la MED fue tan efectiva como en el grupo de animales sin inflamación (Figura I.5), observándose una completa inhibición de las respuestas con 4.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($1.3\pm 0.5\%$, $p<0.01$) y una DE_{50} de $0.7\pm 1.3\ \mu\text{g}/\text{kg}$. En animales espinalizados, la MED fue de nuevo menos efectiva que en el grupo de animales intactos (Figura I.5; $30\pm 3\%$ con una dosis de 9.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $p<0.01$) y una DE_{50} de $8.1\pm 1.3\ \mu\text{g}/\text{kg}$. Las diferencias observadas en las dos situaciones experimentales fueron significativas con dosis desde 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p<0.01$) hasta 4.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p<0.001$; Figura I.5).

Como ocurrió en los animales sin inflamación, el *wind-up* fue totalmente inhibido en animales intactos con una dosis de 2.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($3.4\pm 2\%$, $p<0.001$). Tan solo una ligera, aunque significativa, reducción se observó en animales espinalizados con la dosis de 9.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($62\pm 10\%$, $p<0.05$, datos no mostrados en figura).

4.2.3. Efecto de medetomidina en animales con 20 horas de inflamación

En animales intactos con 20 horas de inflamación, la MED fue tan efectiva como en los grupos experimentales previos: 8 ± 3 % con $4.8 \mu\text{g/kg}$, ($p < 0.01$; Figura I.5) y una DE_{50} de $1.1 \pm 0.06 \mu\text{g/kg}$.

En animales espinalizados con 20 horas de inflamación, la MED fue más potente y efectiva que en el resto de los experimentos hechos en animales espinalizados, con una DE_{50} de $1.3 \pm 1 \mu\text{g/kg}$. El máximo efecto fue, en este caso, similar al observado en animales intactos (Figura I.5, 2.8 ± 0.7 % con $9.6 \mu\text{g/kg}$, $p < 0.01$), aunque los efectos observados con dosis de 2.4 a $4.8 \mu\text{g/kg}$ fueron mayores en los animales intactos ($p < 0.05$).

Como se puede observar en la figura I.5, no se observaron diferencias significativas en los efectos de la MED en las tres series de experimentos llevados a cabo en animales intactos. Sin embargo, en animales espinalizados con 20 horas de inflamación la MED provocó un efecto mucho más intenso con todas las dosis, que en animales con solo 4 horas de inflamación ($p < 0.001$, Figura I.5) y para las dosis de 4.8 ($p < 0.05$) y $9.6 \mu\text{g/kg}$ ($p < 0.001$, Figura I.5) que en animales espinalizados sin inflamación.

Para descartar un posible efecto de la cirugía sobre la acción analgésica de la MED, realizamos un grupo de animales *sham*-espinalizados utilizando el mismo protocolo experimental.

El efecto de la MED en los animales *sham*-espinalizados a las 20 horas de la inflamación fue muy similar al observado en los animales intactos: $6.7 \pm 2 \mu\text{g/kg}$ con $4.8 \mu\text{g/kg}$, ($p < 0.01$; datos no mostrados en la figura) y una DE_{50} de $0.9 \pm 1.1 \mu\text{g/kg}$.

La MED redujo el *wind-up* en animales intactos con 20 horas de inflamación con una intensidad semejante a la observada en los grupos experimentales previos (Figura I.6), observándose una inhibición completa con la dosis de $2.4 \mu\text{g/kg}$ (12 ± 7 %, $p < 0.001$). El efecto fue similar en los animales *sham*-espinalizados, con una reducción del 26 ± 6 % ($p < 0.01$) con la dosis de $4.8 \mu\text{g/kg}$ (datos no mostrados en la figura). En animales espinalizados, aunque el efecto fue menor que en los animales intactos y *sham*-espinalizados, se observó una reducción más pronunciada del

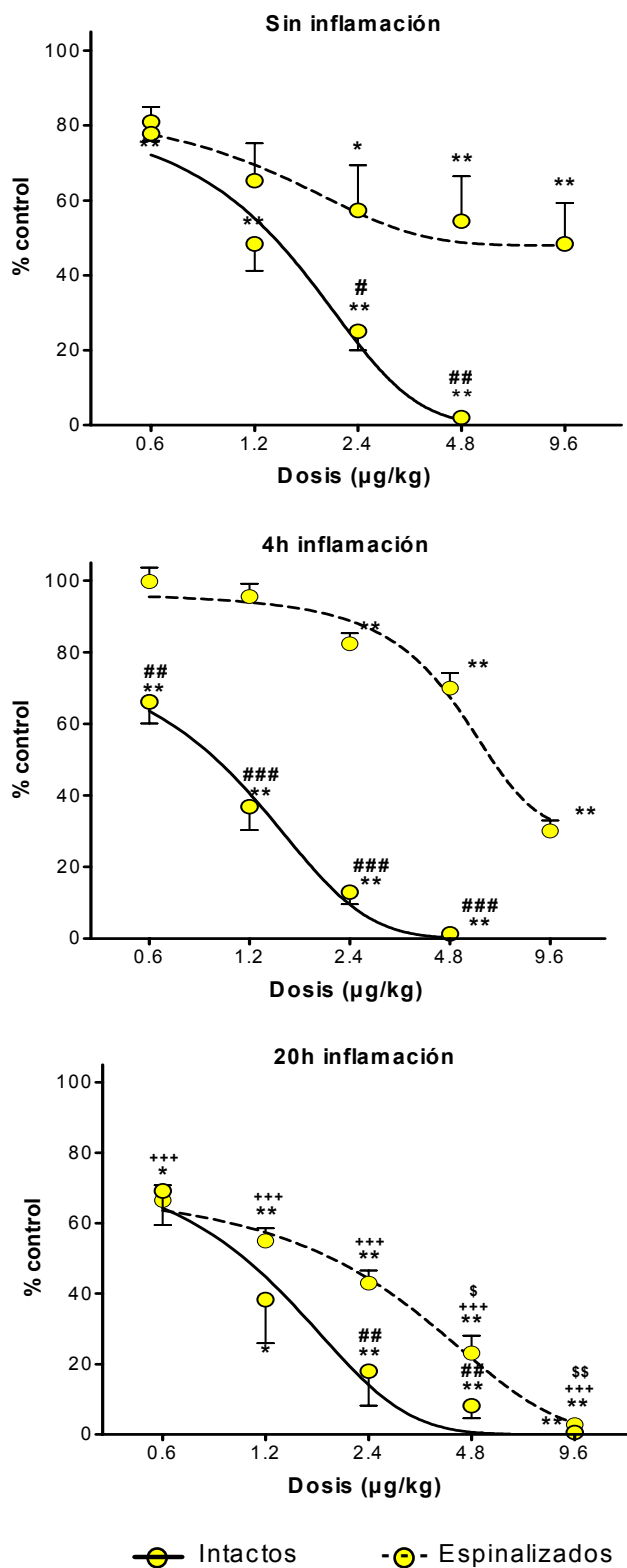


Figura I.5.- Efecto de la MED en las respuestas de unidades motoras aisladas activadas por estimulación mecánica nociva. El efecto de la MED fue similar en todos los experimentos realizados en animales intactos. Sin embargo, el efecto fue menor en los animales espinalizados. El efecto de la MED fue significativamente mayor en los animales con 20h de inflamación que en los de 4h de inflamación o en los no inflamados. (Comparación estadística mediante un ANOVA de una vía con post test de Dunnett * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, comparación vs. las respuestas control. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, comparación vs. animales intactos \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, comparación vs. animales espinalizados sin inflamación. +++ $p < 0.001$, comparación vs. animales espinalizados con 4 h de inflamación).

wind-up que en los grupos anteriores (Figura I.6), con un efecto máximo de 22 ± 7 % ($p < 0.01$) con la dosis de $9.6 \mu\text{g}/\text{kg}$.

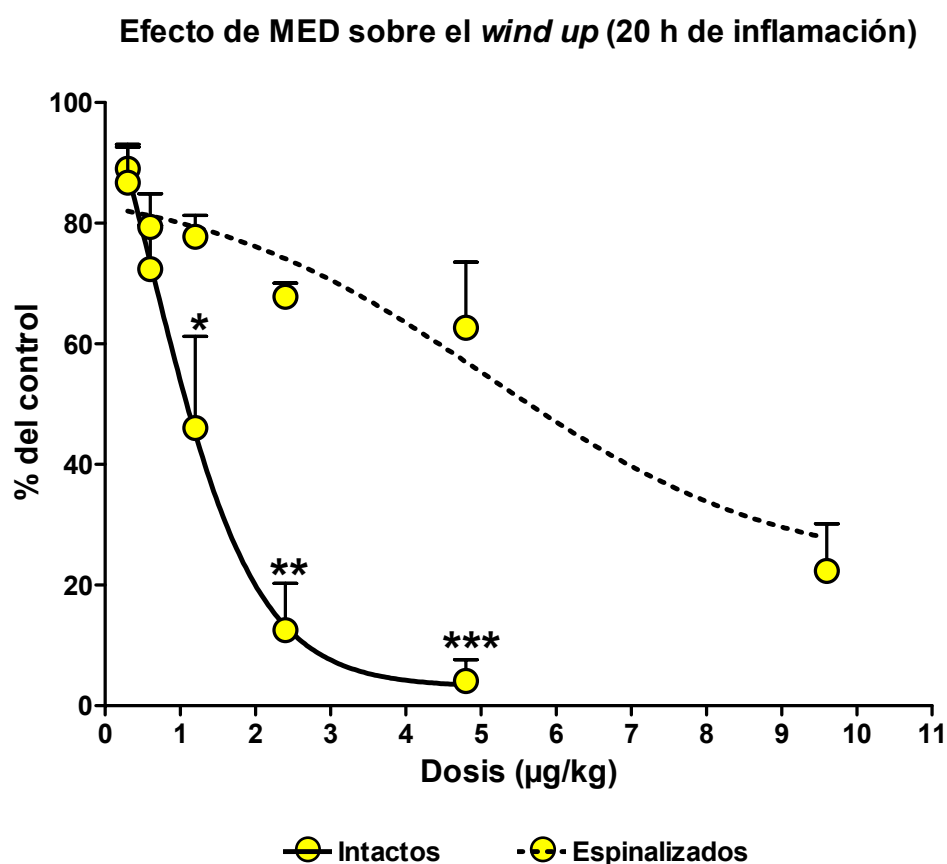


Figura I.6.- Efecto de la MED sobre el *wind-up* en animales normales y espinalizados con 20 horas de la inflamación. El efecto de la MED sobre el *wind-up* fue más intenso en animales con la médula espinal intacta que en los espinalizados. Se observó una inhibición completa del *wind-up* con la dosis de $4.8 \mu\text{g}/\text{kg}$ en animales intactos, mientras que la misma dosis sólo redujo el *wind-up* hasta un $63 \pm 10\%$ del control en los animales espinalizados. (Comparación estadística mediante un ANOVA de una vía con post test de Dunnett * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparación vs. animales espinalizados).

Al igual que sucedió en los experimentos de comportamiento, el efecto de la MED fue revertido en un porcentaje superior al 80 % del control inmediatamente después de la administración de $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ de ATI.

5. DISCUSIÓN

En los tres estadios de la inflamación estudiados en los experimentos de comportamiento, se observaron claramente los fenómenos de hiperalgesia y alodinia, aunque las respuestas de la hiperalgesia fueron más intensas en la etapa inicial y media que en la fase de resolución del proceso. En esta fase final, el nivel de inflamación y las respuestas a estimulación mecánica fueron todavía elevados, mientras que la hiperalgesia térmica desapareció, lo cual indica que la intensidad de la hiperalgesia en diferentes estadios de la inflamación depende del tipo de estímulo utilizado. Esto se basa en el hecho bien conocido de que la hiperalgesia depende principalmente del conjunto de las aferencias periféricas en el periodo inicial de la inflamación, puesto que una reducción de la actividad en la periferia, elimina la hiperalgesia (Andersen et al., 1995). Asimismo, la sensibilización del receptor influye de manera decisiva en la hiperalgesia térmica, pero no en la alodinia e hiperalgesia mecánica (Meyer y Campbell, 1981; Torebjork et al., 1992; Treede et al., 1992).

El principal hecho constatado en este estudio fue que la actividad antihiperalgésica de la MED administrada por vía sistémica depende de la intensidad de la hiperalgesia, o dicho en otras palabras, del momento de la inflamación. En los experimentos de electrofisiología, el efecto fue más pronunciado en animales con la médula espinal intacta que en los animales espinalizados, especialmente en ausencia y en las etapas iniciales de la inflamación. Estos datos indican que la modulación supraespinal es crucial para la efectividad analgésica de la MED, lo que puede ser interpretado como que su principal lugar de actuación es supraespinal, o bien que el efecto sea resultado de una interacción de la actividad antinociceptiva mediada por la MED en zonas espinales y supraespinales.

La MED administrada por vía intraperitoneal redujo las respuestas en todos los test estudiados de forma dosis-dependiente, observándose signos de sedación únicamente con la dosis mayor (80 µg/kg). La dosis que provocó sedación fue similar (Kalso et al., 1991) o menor (Pertovaara et al., 1991) a la observada en estudios previos. El efecto de la MED no fue acompañado de una reducción del nivel de inflamación, lo cual indica que este efecto antinociceptivo fue primario y no secundario a una reducción de las aferencias nociceptivas medulares, como consecuencia de la reducción de la inflamación.

Numerosos estudios han demostrado que los agonistas α_2 -adrenérgicos son fármacos más efectivos como analgésicos durante la inflamación que en situación de normalidad. (Kayser et al., 1992, Green et al., 1998; Brandt y Livingston, 1990). Nuestros experimentos muestran que la actividad antialodínica y antihiperalgésica de la MED es mayor en la fase intermedia de la inflamación, más que en el inicio o en la fase de resolución del proceso. Se han descrito variaciones del efecto analgésico de otros fármacos en función del momento de la inflamación, por ejemplo en los opioides (Kayser y Guilbaud, 1991; Perrot et al., 1998), pero nuestros resultados parecen ser la primera evidencia que demuestra que esto ocurre también en los agonistas α_2 -adrenérgicos.

Por otra parte, los experimentos electrofisiológicos demostraron que la MED fue muy efectiva en animales no espinalizados, con independencia de la presencia o el estadio de la inflamación. Esto no coincide con lo observado en los experimentos de comportamiento y puede ser debido a la presencia de anestesia, aunque serían necesarios más experimentos para averiguar el mecanismo real que explicase esta discrepancia. No obstante, la actividad de la MED fue más intensa cuando la médula espinal estaba intacta que después de la espinalización y por tanto, cuando la modulación supraespinal estaba presente. En experimentos previos se observó que dosis elevadas de agonistas α_2 -adrenérgicos menos selectivos, como la tizanidina, produjeron una intensificación de los reflejos flexores en ratas con espinalización crónica (a los 1-5 días de la operación), mediado por una activación del receptor α_1 -adrenérgico (Kehne et al., 1985; Chen et al., 1987). Esto pudiera explicar por qué la MED fue en nuestros experimentos menos potente en animales espinalizados que en intactos, aunque no parece ser este el caso, ya que la MED es un agonista α_2 -adrenérgico más selectivo que la tizanidina y no se observó en caso alguno, un incremento de las respuestas tras la administración de MED. Además, la espinalización llevada a cabo en nuestros experimentos fue aguda, en vez de crónica, y el antagonista selectivo α_2 -adrenérgico ATI inhibió completamente el efecto de la MED.

La interpretación más plausible, desde nuestro punto de vista, de estos resultados es que la actividad antinociceptiva de la MED está localizada principalmente en lugares supraespinales o, por lo menos, que requiere la activación de áreas centrales. La cuestión de si los efectos antinociceptivos de agonistas α_2 -adrenérgicos están mediados por mecanismos espinales o supraespinales ha sido materia de intenso debate. Algunos experimentos, por ejemplo, demuestran que agonistas α_2 -

adrenérgicos eliminan las respuestas reflejas en animales intactos, pero no en espinalizados (Kehne et al., 1985; Chen et al., 1987). Sin embargo, Clarke et al., (1988), demostraron que la clonidina fue efectiva en la reducción de reflejos espinales en conejos espinalizados (ver también Pertovaara, 1993). Otros estudios han establecido que una dosis elevada (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$), anestésica, de MED administrada por vía sistémica, inhibe el sistema nociceptivo y las respuestas reflejas mediante un mecanismo de acción espinal, aunque el efecto de una dosis sedante (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sólo pudo ser explicado mediante un mecanismo de acción supraespinal (Pertovaara et al., 1991). La actividad supraespinal de la MED también se apoya en el conocido papel de la influencia de los sistemas noradrenérgicos descendentes en las neuronas de la médula espinal, principalmente a través de los receptores α_2 -adrenérgicos, además de por la alta concentración de estos receptores en áreas por encima de la médula espinal (ver por ejemplo, Dahlström y Fuxe, 1965; Unnerstall et al., 1984; Westlund et al., 1990; Carlton et al., 1991).

Nuestros estudios aportan evidencias que indican que las diferencias observadas podrían no ser debidas sólo a las dosis, la anestesia o los agonistas empleados, sino también a la integridad de la modulación espinal y al estadio de la inflamación en el que se hicieron los experimentos. También es posible que, en las presentes condiciones, estuviera implicada en la inhibición de la hiperalgesia y la alodinia una acción periférica de la MED. De hecho, ya fue descrita hace tiempo una atenuación de la excitabilidad de los nociceptores por agonistas α_2 -adrenérgicos en situación de inflamación (Nakamura y Ferreira, 1988; Sato y Perl, 1991) o la reducción de la actividad de las fibras C evocada por estimulación eléctrica mediante clonidina (Gozariu et al., 1996). No se puede descartar completamente esta posibilidad, aunque no parece ser este el caso, puesto que el *wind-up* fue inhibido más intensamente en animales intactos que en espinalizados. El *wind-up* es un fenómeno mediado a nivel central, definido como una facilitación progresiva dependiente de la frecuencia, de las respuestas de las neuronas de la médula espinal, producido al aplicar un estímulo eléctrico repetitivo constante y de alta intensidad. Es un fenómeno que comparte algunos mecanismos comunes con la sensibilización central, siendo mediado por receptores NMDA y NK1 (Davies y Lodge 1987; Dickenson y Sullivan 1987), aunque otros sistemas están implicados en su generación o mantenimiento (ver Herrero et al., 2000). Debido a que el *wind-up* es un fenómeno mediado por la médula espinal, está muy influenciado por sistemas moduladores descendentes, especialmente en situaciones de sensibilización (Herrero y Cerveró, 1996a). El hecho de que la MED inhibiera el *wind-up* más

intensamente en animales normales que en espinalizados sugiere una actividad del agonista principalmente mediada a nivel central, más que una acción periférica.

6. CONCLUSIONES

1.- El presente estudio muestra una clara relación entre la actividad antihiperalgésica de la MED y la evolución de la inflamación inducida por CAR.

2.- La actividad antinociceptiva del agonista α_2 -adrenérgico MED depende, en situación de inflamación, de la integridad de la médula espinal, mostrando mayor actividad en animales intactos que en espinalizados (especialmente en ausencia de inflamación y en la fase temprana de la reacción inflamatoria) y, por lo tanto, posee un efecto localizado principalmente en lugares supraespinales.

CAPITULO II: POTENCIACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA MEDETOMIDINA MEDIANTE SU COMBINACIÓN CON DOSIS SUBANALGÉSICAS DE AINES.

1. OBJETIVOS

1) Determinar si existe una potenciación del efecto antinociceptivo de la MED tras la administración previa de dosis subefectivas de los AINEs PAR y NOP en animales con inflamación de tejido blando.

2) Averiguar si esta combinación de AINEs y MED influye sobre la recuperación del efecto analgésico de la MED a lo largo del tiempo y en presencia del antagonista α_2 -adrenérgico ATI.

2. INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios han demostrado que la antinocicepción está parcialmente modulada a través de los receptores α_2 -adrenérgicos, tanto a nivel espinal como supraespinal (Millan, 1992). De hecho, la administración de agonistas α_2 -adrenérgicos produce una analgesia que es dosis-dependiente y está mediada por diferentes mecanismos de acción (Takano et al., 1993; Eisenach et al., 1996). Entre estos mecanismos estarían implicados receptores α_2 -adrenérgicos con localización periférica, espinal y supraespinal (Asano et al., 2000), receptores de histamina (Arrigo-Reina et al., 1995), receptores supraespinales de GABA (Nguyen et al., 1997), mecanismos colinérgicos de analgesia (Furst et al., 1999), el sistema L-arginina-NO (Przesmycki et al., 1999), vías adrenérgicas inhibitorias descendentes (Cui et al., 1999) y el sistema opioide (Ossipov et al., 1990). En muchos casos se ha descrito la existencia de una potenciación del efecto antinociceptivo de los agonistas α_2 -adrenérgicos al ser administrados de forma conjunta con opioides (Solomon et al., 1994), agonistas serotoninérgicos (Danzebrink et al., 1991), agonistas gabaérgicos (Przesmycki et al., 1998) y AINEs (Malmberg et al., 1993, Miranda et al., 2004). Precisamente, la administración de dosis subefectivas de diferentes AINEs como S-KET o NOP se ha mostrado capaz de mejorar la analgesia de agonistas opioides como el FEN en animales con inflamación (Gaitán et al., 2005).

Por otra parte, los agonistas α_2 -adrenérgicos se muestran más efectivos en el dolor inflamatorio, probablemente debido a que la sensibilización inducida por la inflamación produce una activación del sistema adrenérgico, tanto a nivel supraespinal, con la inhibición descendente de los mecanismos de control nociceptivo (Peng et al., 1996), como en la médula espinal, con el aumento de la expresión de los receptores α_2 (Brandt y Livingston, 1990). En el capítulo anterior describimos como la actividad antihiperalgésica del agonista α_2 -adrenérgico MED en situación de inflamación, dependía del estadio en el que se encontraba el proceso inflamatorio y de la integridad de la médula espinal (Molina y Herrero, 2006).

El PAR y el NOP son inhibidores de las COX, enzimas que se sobreexpresan durante la inflamación. Este hecho nos hizo plantear la hipótesis de que estos fármacos podrían, a dosis bajas, potenciar la acción analgésica de la MED, reduciendo las dosis necesarias para conseguir el mismo efecto antinociceptivo y, además, disminuyendo los efectos adversos asociados a una mayor dosificación, como sedación (MED, Sinclair, 2003) o hepatotoxicidad (PAR, NOP, Moling et al.,

2006). El efecto sería semejante al observado previamente en nuestro laboratorio, combinando estos AINEs con FEN.

En este trabajo tratamos de determinar mediante la técnica de registro de UMAs, si la potencia y duración del efecto antinociceptivo de MED en animales con inflamación de tejido blando se potencia con la administración i.v. de dosis subefectivas de PAR y NOP.

3. MÉTODOS

3.1. Experimentos de electrofisiología

3.1.1. Animales y preparaciones

Los experimentos fueron llevados a cabo en ratas Wistar macho de pesos comprendidos entre 240-302 g empleando la técnica del registro del reflejo de retirada como UMAs, descrito en la sección de Materiales y Métodos. En todos los animales se indujo una inflamación de tejido blando mediante la administración de 100 µl de CAR λ (10 mg/ml, Sigma) bajo breve anestesia con halotano (5% en oxígeno para inducción y 2% para mantenimiento), siguiendo el protocolo descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. La inflamación fue inducida 20 horas antes del experimento, estudiando su evolución mediante la medida del volumen de las patas por pletismometría (Pletismómetro Letica) antes de la administración de CAR y después del experimento. En función del tratamiento administrado, los animales se agruparon en 3 grupos experimentales: animales tratados con MED (n=7), animales tratados con MED y PAR (n=7) y animales tratados con MED y NOP (n=7). En estos dos últimos grupos se administraron en primer lugar los inhibidores de la COX a dosis subefectivas, considerando como tales aquellas dosis que no provocaron una reducción estadísticamente significativa de las respuestas control (20% de reducción máxima). Las respuestas control fueron las obtenidas en los tres ciclos previos a la administración de la primera dosis del fármaco.

En la mitad de los experimentos de cada grupo se trató de revertir el efecto de la MED con una dosis de 100 µg/kg i.v. del antagonista α_2 -adrenérgico ATI, con el objeto de demostrar que el efecto observado se debía a una acción sobre los receptores α_2 -adrenérgicos. En el resto de los casos, se estudió la recuperación de las respuestas en el tiempo hasta los 90-100 minutos.

En la figura II.1 se muestran ejemplos del registro de UMAs y de los protocolos de estimulación.

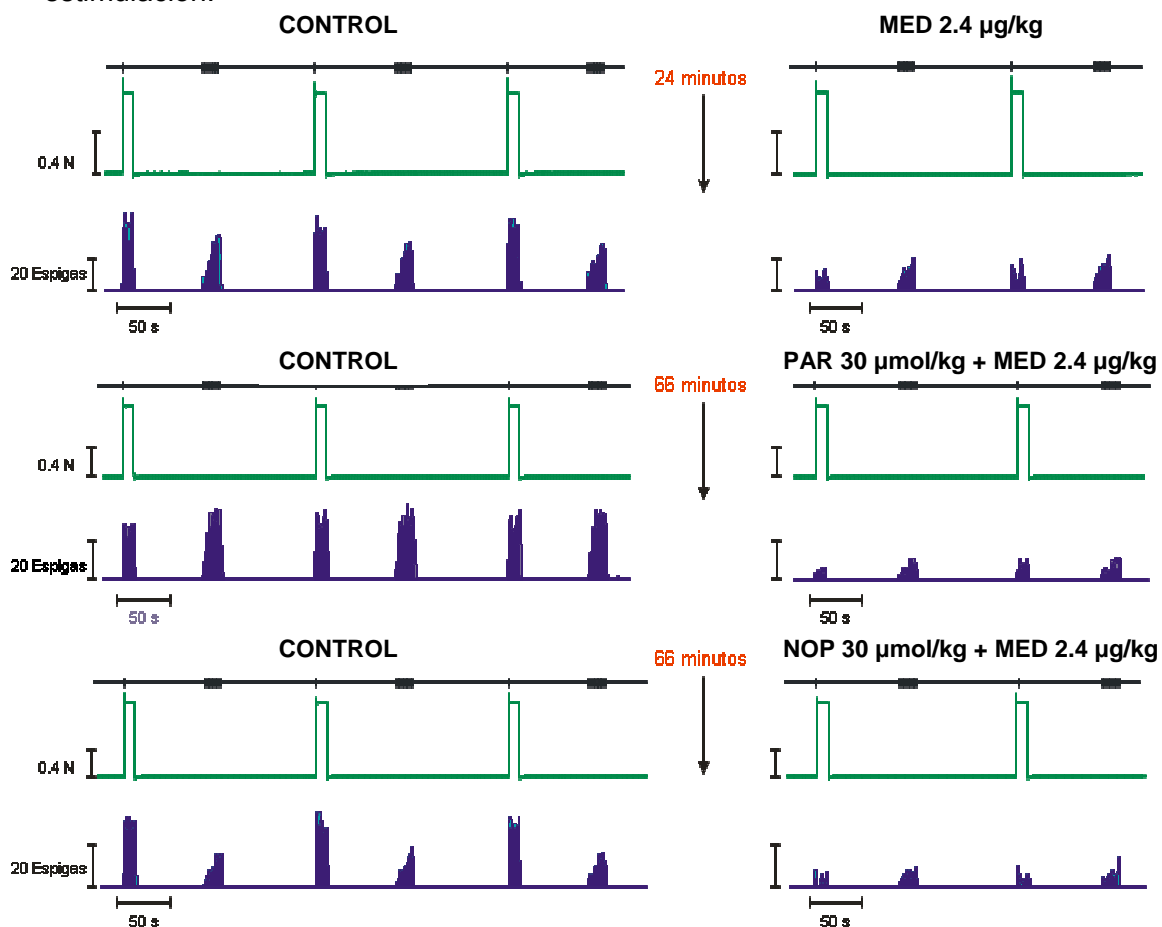


Figura II.1.- Registros originales de UMAs. Las UMAs fueron evocadas en ciclos de tres minutos con estimulación mecánica y eléctrica nocivas en animales con inflamación plantar. Se utilizaron como control las tres respuestas previas a la administración de dosis acumulativas de MED (dosis inicial de 0.3 µg/kg) en ausencia y presencia de dosis subefectivas de PAR y NOP (30 µmol/kg). Se observa la inhibición de las respuestas para cada grupo experimental con la dosis de 2.4 de MED. La administración i.v. de NOP junto con MED produjo una inhibición de las respuestas nociceptivas significativamente mayor que en los animales tratados sólo con MED o con la combinación de PAR y MED.

3.1.2 Fármacos y análisis de datos

La MED fue disuelta en salino en concentraciones de 1-10 µg/ml y administrada i.v. en un volumen total de 0.3 ml en dosis acumulativas en régimen logarítmico en base 2. La dosis inicial fue de 0.3 µg/kg y la final alcanzó un valor máximo de 9.6 µg/kg. Las dosis fueron administradas cada 2 ciclos de estimulación (6 minutos), contando el número de espigas de ambos ciclos y realizando un promedio de las mismas. La media fue comparada con las respuestas control. El ATI se empleó disuelto también en salino y a una concentración de 500 µg/ml, inyectándose vía i.v. en una única dosis de 100 µg/kg en un volumen de 0.3 ml en salino.

Tanto el PAR como el NOP fueron disueltos en DMSO y PEG 300 en una relación 1:1 a una concentración de 50 mM. Fueron administrados por vía i.v. en dosis acumulativas de 15 $\mu\text{mol/kg}$ diluidas en suero salino hasta un volumen de 0.5 ml, de forma que la dosis total inyectada de estos AINEs no superó los 30 $\mu\text{mol/kg}$, con objeto de evitar disminuir las respuestas a estimulación nociva más de un 20% (dosificación subefectiva). El PAR y el NOP fueron administrados cada 7 ciclos de estimulación (21 minutos), contando y promediando únicamente las espigas de los tres últimos ciclos. Los datos se expresaron como la media \pm e.e.m del porcentaje del control, siendo éste la media de las respuestas obtenidas en los tres ciclos previos a la administración del fármaco. La significación estadística se calculó mediante un ANOVA de una vía con post test de Dunnett.

4. RESULTADOS

4.1. Experimentos de electrofisiología

4.1.1. Estimulación mecánica nociva

La MED redujo de forma dosis-dependiente las respuestas nociceptivas a estimulación mecánica en los animales con 20 horas de inflamación. La DME fue de 1.2 $\mu\text{g/kg}$ ($p < 0.01$), la DE_{50} fue de 1.1 \pm 0.06 $\mu\text{g/kg}$ y se obtuvo una inhibición casi total de las respuestas con la dosis de 4.8 $\mu\text{g/kg}$ (8 \pm 3 %, $p < 0.01$, Figura II.1). La administración de una dosis acumulativa total de 30 $\mu\text{mol/kg}$ de PAR no tuvo una repercusión significativa sobre la efectividad antinociceptiva de la MED. En este caso, se obtuvo una DME de 1.2 $\mu\text{g/kg}$ ($p < 0.05$), una DE_{50} de 1.5 \pm 0.09 $\mu\text{g/kg}$ y un efecto máximo de inhibición de las respuestas con la dosis de 4.8 $\mu\text{g/kg}$ muy similar al del grupo de la MED (7 \pm 4.5 %, $p < 0.01$, Figura II.1). Sin embargo la presencia de NOP previa a la MED, administrado en igual dosificación que el PAR, produjo un aumento casi tres veces mayor de la potencia analgésica del agonista α_2 -adrenérgico (DE_{50} de 0.47 \pm 0.07 $\mu\text{g/kg}$, $p < 0.001$, Figura II.1), resultando muy significativa la diferencia de efecto de las dosis de 0.3 a 1.2 $\mu\text{g/kg}$ con respecto a los dos grupos anteriores. La DME fue la menor utilizada (0.3 $\mu\text{g/kg}$, $p < 0.01$) y de nuevo se obtuvo una fuerte reducción de las respuestas con la dosis de 4.8 $\mu\text{g/kg}$, (6 \pm 3.5 %, $p < 0.01$, Figura II.1).

La recuperación del efecto de la MED sobre las respuestas de las UMAs a estimulación mecánica nociva fue estudiada de dos formas: tratando de contrarrestar el efecto de MED con el antagonista α_2 -adrenérgico ATI, para comprobar la acción

sobre receptores α_2 -adrenérgicos, y analizando las respuestas a lo largo de un periodo de tiempo (90-100 minutos), para estudiar la duración del efecto propio de los agonistas α_2 -adrenérgicos (Scheinin et al., 1992). El ATI, administrado i.v. 6 minutos después de la dosis más efectiva de MED, consiguió revertir la inhibición de las respuestas en el grupo de animales tratados sólo con MED (94 ± 9) y en el tratado con PAR y MED (65 ± 17 , Figura II.2). Sin embargo, no se produjo una recuperación de las respuestas en el grupo de los animales tratados previamente con NOP al administrar el ATI (47 ± 13 , $p < 0.01$, Figura II.2). De igual forma, solamente en las ratas tratadas con MED y NOP no se alcanzaron los valores de las respuestas control transcurridos 90-100 minutos de la administración del última dosis (35 ± 12 , $p < 0.001$, Figura II.2). Sí existió recuperación de las respuestas en los otros grupos (74 ± 3 , para la MED y 86 ± 4 , para la combinación de MED y PAR, Figura II.2).

**Efecto de MED en ausencia y presencia de PAR y NOP
(Animales con inflamación 20 horas, Estimulación mecánica)**

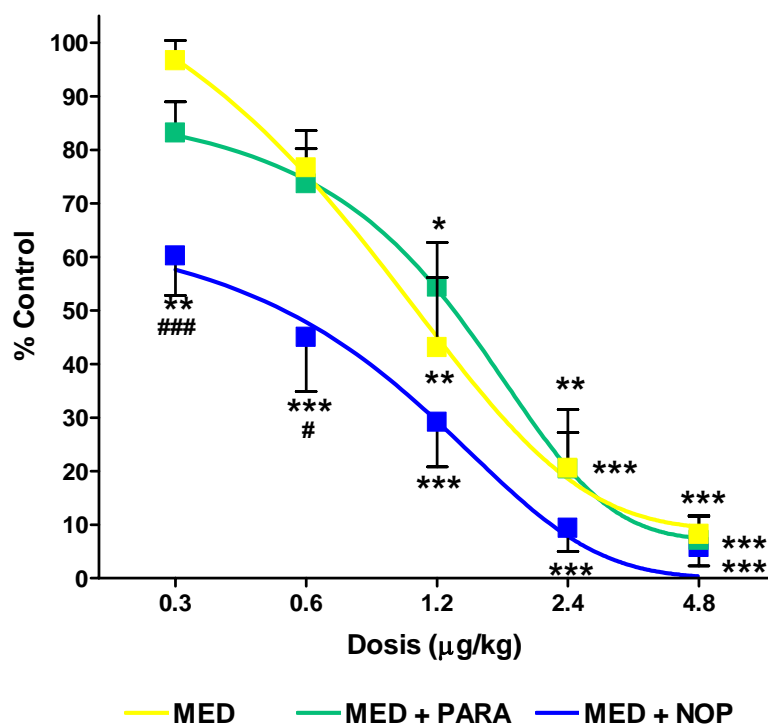
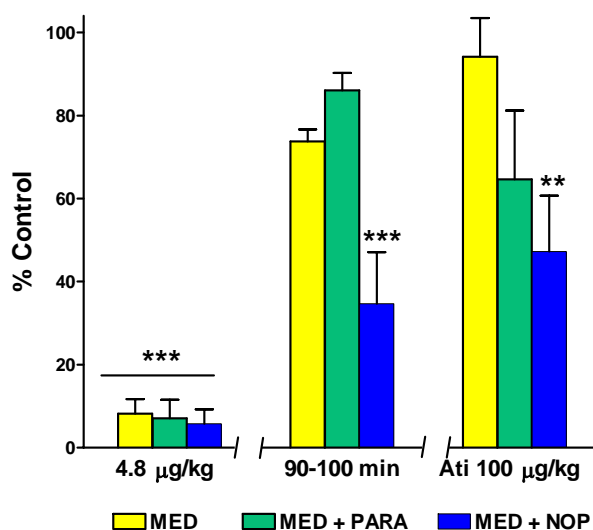


Figura II.1.- Efecto de MED i.v. sobre las respuestas de UMAs activadas por estimulación mecánica nociva. El efecto de la MED fue muy similar en ausencia o presencia de PAR. Sin embargo la administración de dosis subefectivas de NOP indujo un aumento significativo del efecto antinociceptivo de la MED respecto a los otros dos grupos. (Comparación estadística mediante un ANOVA de una vía con post test de Dunnett * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparación vs. las respuestas control. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$, comparación vs. animales tratados con MED o MED y PAR).

**Recuperación del efecto inducido por MED
(Animales con inflamación 20 horas, Estimulación mecánica)**



II.2.- Efecto de ATI i.v. sobre las respuestas de UMAs activadas por estimulación mecánica nociva. En las ratas tratadas con MED o con la combinación de MED y PAR, se observó una recuperación del efecto a los 90-100 minutos o con la administración del ATI. El tratamiento previo con NOP prolongó el efecto de la MED, un efecto que no fue revertido por el ATI (Igual comparación estadística que para la Figura II.1).

Ausencia de efecto de 30 µmol/kg de PAR y NOP sobre respuestas a estimulación mecánica nociva (Inflamación 20 horas)

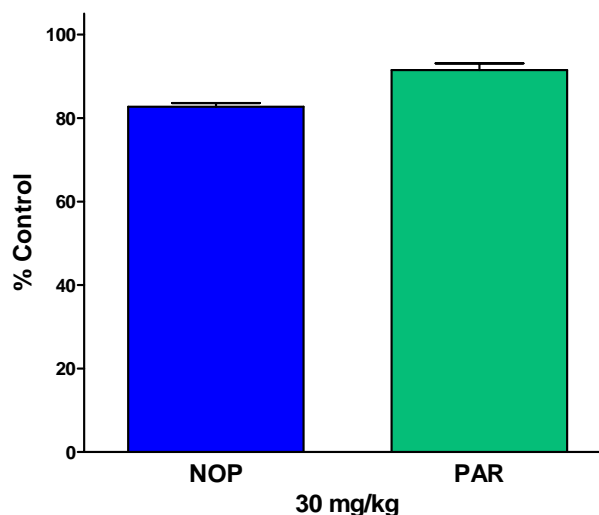


Figura II.3.- Efecto de la dosis de 30 µmol/kg de NOP y PAR sobre las respuestas a estimulación mecánica nociva. Las dosis de 30 µmol/kg de PAR y de NOP en animales con inflamación plantar, no rebajaron las respuestas nociceptivas más de un 80% del valor control, por lo que se consideraron subefectivas y el punto de partida de la administración de la MED.

Por otra parte, con antelación a la administración de MED, se comprobó que la analgesia causada por los AINEs se mantuviese por debajo del umbral del 20 % de reducción de las respuestas control. Este nivel, correspondiente a una dosis subefectiva, se obtuvo tanto para el PAR como para el NOP con la dosis acumulada de 30 $\mu\text{mol/kg}$. En ambos casos las respuestas se mantuvieron por encima del 80% de las respuestas control, con un 91 ± 4 para el PAR y un 83 ± 2 para el NOP (Figura II.3).

4.1.2. Estimulación eléctrica nociva: *wind-up*

Tanto la MED por si misma como en combinación con dosis subefectivas de PAR y NOP, produjo una disminución del *wind-up* que fue dosis-dependiente y no significativamente diferente en ningún grupo. Por tanto, el tratamiento previo con NOP no conllevó un aumento del efecto inhibitorio de la MED sobre el *wind-up* respecto a los otros grupos, en contraste con lo observado en la estimulación mecánica (Figura II.4). La DME fue la misma para los tres grupos ($1.2 \mu\text{g/kg}$, $p < 0.01$, Figura II.5), mientras que la DE_{50} también fue muy similar en todos los casos estudiados (DE_{50} de 1.16 ± 0.12 para MED, $1.56\pm 0.12 \mu\text{g/kg}$ para MED + PAR y $1.13\pm 0.14 \mu\text{g/kg}$ para MED + NOP).

**Efecto de MED en presencia y ausencia de NOP
(Inflamación 20 horas, *wind-up*)**

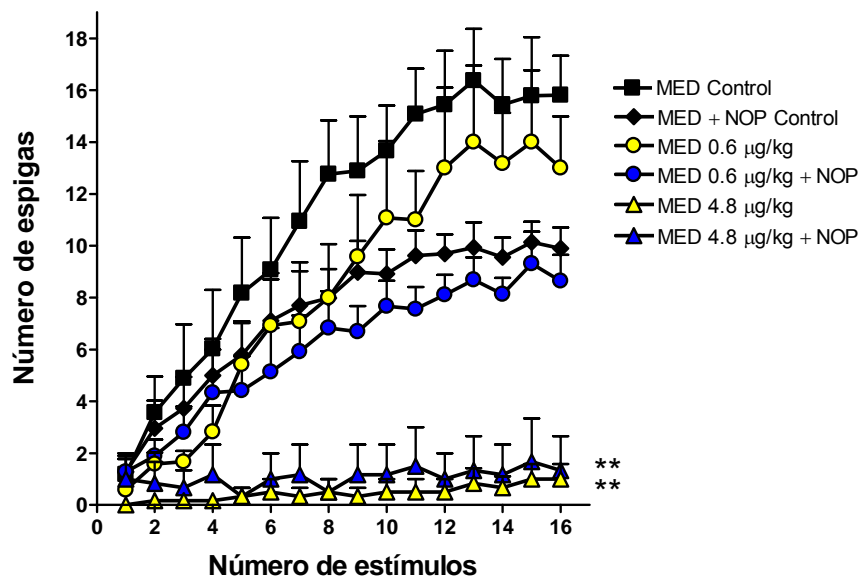


Figura II.4.- Efecto de MED y de su combinación con dosis subefectivas de NOP sobre el *wind-up*. La MED inhibió el *wind-up* de manera dosis-dependiente y con igual intensidad en presencia o ausencia de NOP (Comparación estadística mediante un ANOVA de una vía con post test de Dunnett, $**p < 0.01$ comparación vs. las respuestas control).

El grupo tratado únicamente con MED fue el que mostró una mayor inhibición del *wind-up* con la dosis de 4.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($4 \pm 3.5 \mu\text{g}/\text{kg}$, $p < 0.01$), aunque la diferencia respecto los grupos tratados con AINEs no resultó significativa (17 ± 8 para el PAR y 11 ± 11 para el NOP, Figura II.5).

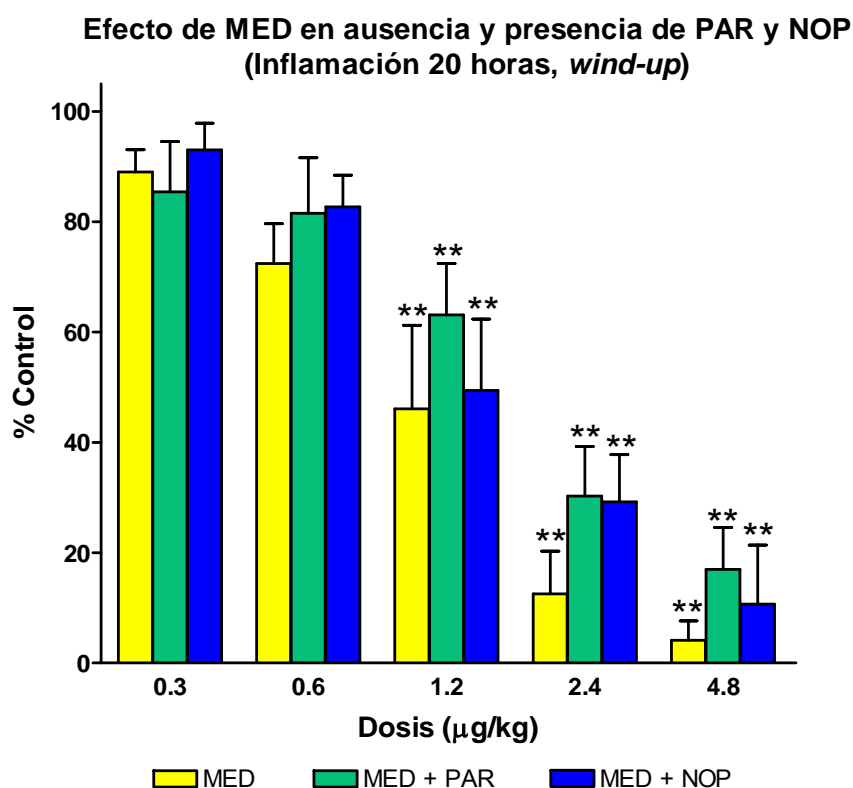


Figura II.5.- Efecto de MED y su combinación con PAR y NOP sobre el *wind-up* en animales con 20 horas de inflamación. El efecto de la MED sobre el *wind-up* fue más intenso, aunque no significativamente diferente, respecto a los grupos tratados también con PAR o NOP. (Igual comparación estadística que para la Figura II.4).

5. DISCUSIÓN

La principal observación realizada en este estudio ha sido la existencia de una potenciación del efecto analgésico de la MED al ser administrada en presencia de dosis subefectivas de NOP, en animales con una inflamación de tejido blando inducida por CAR. En trabajos previos, ya se había descrito un aumento de la eficacia antinociceptiva como consecuencia de la combinación de agonistas adrenérgicos como la clonidina (fármaco menos selectivo que la MED) con AINEs como el piroxicam o el PAR (Miranda et al, 2004) o el naproxen o el meloxicam (Jain et al. 2002). Sin embargo, es la primera vez que se observa una interacción entre un AINE donador de NO y un agonista selectivo de los receptores α_2 -adrenérgicos. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Gaitán et al., 2005) habíamos observado una potenciación del efecto analgésico entre el opiáceo FEN y el NOP.

En el presente trabajo observamos una interacción semejante entre este AINE y la MED, lo que puede abrir nuevos caminos en la terapia analgésica del dolor inflamatorio.

En nuestros experimentos hemos observado que la administración i.v. de dosis subefectivas de NOP produce un aumento no sólo de la potencia analgésica de la MED, sino también de la duración del efecto con respecto a los animales no tratados o pretratados con PAR. Este efecto fue también observado en la administración conjunta de NOP con FEN (Gaitán et al., 2005) indicando una posibilidad muy importante de aumento de la duración de la analgesia por la combinación de estos fármacos. Además, la acción analgésica no fue revertida por el antagonista de los receptores α_2 -adrenérgicos ATI. Este hecho concuerda con lo observado al administrar NOP junto con FEN (Gaitán et al., 2005) y, aunque de difícil interpretación, parece indicar que no es el NOP el agente causante de la potenciación del efecto analgésico de la MED. La interpretación más lógica es que la MED potencia la acción del NO-AINE, de esta forma se explicaría la falta de reversibilidad del antagonista α_2 -adrenérgico ATI así como la mayor duración del efecto analgésico, más propio de un AINE que de un agonista α_2 -adrenérgico.

La MED no indujo en ningún grupo experimental cambios en el nivel de inflamación. Por lo tanto, al carecer de acción antiinflamatoria, el efecto analgésico alcanzado no fue en ningún caso, secundario a una disminución de la inflamación. Queda por tanto descartada una modulación de la reacción inflamatoria en las presentes condiciones experimentales y se confirma, de esta manera, una acción analgésica selectiva.

El distinto comportamiento del PAR y su derivado donador de NO fue observado también en la administración conjunta con FEN (Gaitán et al., 2005) y podría ser debido a la existencia de un mecanismo de acción independiente de la inhibición de COX característico de los NO-AINEs, como han sugerido algunos autores (Del Soldato, et al., 1999, Fiorucci, 2001, Kiss y Vizi, 2001), o bien debido a un efecto directo o indirecto de la molécula de NO. El NO es una molécula que desempeña una serie de importantes funciones fisiológicas, entre las que se encuentra ser un agente vasodilatador (Furchgott y Zawadzki, 1980), lo cual podría permitir una mejor distribución del PAR, facilitando su entrada en el SNC. Sin embargo, el PAR i.v. es capaz por si mismo de atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica (Bannwarth, et al., 1985). Por otra parte el NO liberado por el NOP podría tener un efecto antinociceptivo por si mismo, pero no parece ser el caso, como se ha resaltado en

estudios previos (Romero-Sandoval, et al, 2002). Recientes trabajos han mostrado que el NO podría estar implicado en la mediación a nivel central de la actividad analgésica de agonistas α_2 -adrenérgicos como la clonidina (Aronov, et al. 2005, Ge et al., 2006), aunque también se ha especulado sobre una acción inhibitoria directa de la COX (Fiorucci, 2001).

En nuestros experimentos, la MED en presencia del NOP mostró una mayor eficacia respecto a los otros grupos únicamente sobre la estimulación mecánica nociva, manteniéndose su efecto sobre las respuestas a la estimulación eléctrica en valores no significativamente diferentes. En efecto, la MED por si sola o combinada con NOP o PAR, fue capaz de producir una inhibición prácticamente completa del *wind-up* con la dosis más alta empleada, de 4.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Podemos decir, por tanto, que el efecto del NOP sobre la acción de la MED mejoró sustancialmente su capacidad analgésica a nivel periférico, no teniendo mayor influencia sobre el efecto a nivel central, puesto que la reducción del *wind-up* fue de igual intensidad que cuando se administró la MED por si sola. Un efecto predominante en tejidos periféricos explicaría la falta de potenciación de la inhibición del *wind-up* y, aunque no puede descartarse esta explicación, la facilidad con la que el NOP atraviesa la barrera hematoencefálica y sus acciones centrales, comentadas previamente, parecen descartar esta probabilidad. La MED es capaz de provocar una inhibición completa del *wind-up* a dosis muy bajas (probablemente por su intensa acción central) como se puede observar en la figura II.4, por ello, una explicación más sencilla es que se trata de la máxima potencia y efectividad inhibitoria que se puede observar y, simplemente, no puede potenciarse con la administración conjunta de otros fármacos.

En conclusión, los resultados de este trabajo podrían abrir la posibilidad de una utilización en clínica de un tratamiento combinado de MED y NOP, con las consecuencias beneficiosas sobre los efectos secundarios que supone el uso de dosis menores de ambos fármacos.

6. CONCLUSIONES

- 1.- La MED es un agente antinociceptivo efectivo en el sistema de registro de UMAs en respuestas a estimulación mecánica nociva en animales con inflamación de tejido blando.
- 2.- No se observó potenciación del efecto antinociceptivo de la MED con la administración previa de dosis subanalgésicas de PAR.
- 3.- La administración de dosis subanalgésicas de NOP provocó un incremento significativo de la potencia y duración del efecto analgésico de la MED, en respuestas a estimulación natural.
- 4.- La potenciación del efecto analgésico no afectó a las respuestas a estimulación eléctrica repetitiva (*wind-up*), bien por una predominante acción periférica o bien por una saturación del efecto inhibitor.

**CAPITULO III: LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE ÁCIDO RETINOICO
AUMENTA LAS RESPUESTAS NOCICEPTIVAS EN RATAS CON
INFLAMACIÓN DE TEJIDO BLANDO.**

1. OBJETIVOS

- 1) Estudiar la posible implicación del ATRA en el desarrollo y mantenimiento del dolor inflamatorio inducido por CAR en experimentos de comportamiento.

2. INTRODUCCIÓN

Como hemos comentado en la introducción general, no existe información sobre la posible implicación de los retinoides en el procesamiento de la información nociceptiva. Sin embargo, se ha descrito que el uso tópico de bexaroteno, un agonista selectivo de los receptores X de retinoides, empleado en el tratamiento de alteraciones cutáneas, está asociado a la aparición de eczema, prurito y dolor (Lowe et al., 2000). Este hecho, junto con la presencia y participación de los retinoides en el SNC y su papel en la inflamación nos llevó a plantear la hipótesis de que los retinoides podrían estar implicados en la nocicepción y especialmente en situaciones de hiperalgesia derivada de inflamación.

En este trabajo estudiamos la intensidad y evolución de las respuestas nociceptivas al reflejo de retirada en ratas control y ratas tratadas con ATRA. Asimismo, comparamos estas respuestas en presencia y ausencia de inflamación inducida por CAR.

3. MÉTODOS

3.1. Experimentos de comportamiento

3.1.1. Animales y preparaciones

Los experimentos fueron realizados en ratas Wistar macho de pesos comprendidos entre 240-340 g, mantenidas en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y provistas de agua y comida *ad libitum*. En todos los casos y con objeto de facilitar su habituación, los animales fueron trasladados al lugar de experimentación 3 días antes del comienzo de las pruebas, tomando contacto con el experimentador al menos 15 minutos antes del comienzo de las mismas. Se emplearon dos grupos experimentales: animales tratados con ATRA (n=25) o con su vehículo (n=19).

El ATRA (Sigma) se suspendió en una solución de CMC al 0.5% y fue administrado p.o. en un volumen final de 0.5 ml. Una cantidad similar de CMC fue administrada a los animales del grupo control. El tratamiento, tanto con ATRA como con el vehículo, se prolongó durante 7 días y consistió en una dosis de 15 mg/kg los dos primeros días (días A y B) y una dosis de 10 mg/kg los restantes 5 días (días 1 a 5). Todas las dosis fueron administradas a las 10:30 AM cada día y los experimentos se realizaron desde el día 1 al 5.

La inflamación del tejido blando fue inducida el día 1, inmediatamente después de la administración del ATRA o CMC, y en las condiciones descritas en la sección de Materiales y Métodos (páginas 30-31). El nivel de inflamación se evaluó midiendo el volumen de las patas mediante pletismometría (Letica, Panlab) antes de la administración de CAR o salino y después de cada test.

El efecto inducido por la administración del ATRA fue estudiado en respuestas al reflejo de retirada evocado por estimulación mecánica y térmica. Estos métodos han sido descritos en detalle en el capítulo de Materiales y Métodos de esta tesis.

Las curvas intensidad-respuesta para estimulación mecánica fueron obtenidas mediante la aplicación de 10 estímulos en la superficie de la planta de cada pata trasera en series de intensidad creciente, empleando filamentos de Von Frey de 50, 60, 80, 100, 200, 300 y 500 mN. El umbral para la estimulación mecánica se calculó, a partir de la frecuencia de las respuestas obtenidas, como la mínima fuerza necesaria para inducir un 50% de respuestas positivas. Las curvas control se obtuvieron con anterioridad a la inyección de CAR y salino (10:30 AM). Otras 7 curvas fueron estudiadas a las 4:30 PM y 10:30 AM durante los siguientes 4 días y medio, con el fin de comprobar el desplazamiento de la línea base y seguir la evolución de la alodinia y la hiperalgesia.

La hiperalgesia térmica fue determinada midiendo el tiempo de latencia del reflejo de retirada de la pata tras aplicar un estímulo nocivo mediante calor radiante (55° C) generado por un algesímetro, como se comenta en detalle en la sección de métodos.

Los experimentos de comportamiento fueron realizados en colaboración con el Dr. D. Alfonso Romero-Sandoval de nuestro laboratorio.

3.1.2. Análisis de datos

Todos los experimentos fueron realizados sin que el experimentador conociera el tratamiento empleado. Los datos se expresan como la media \pm e.e.m. Las curvas intensidad-respuesta se compararon mediante un ANOVA de una vía con post test de Dunnett. La comparación de hiperalgesia, alodinia, umbral y volumen de la pata se realizó mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney.

4. RESULTADOS

4.1. Experimentos de comportamiento

4.1.1. Curvas de intensidad-respuesta

La aparición de efectos tóxicos en los animales fue comprobada dos veces al día, inmediatamente antes de las pruebas, no observándose un aumento de agresividad o irritabilidad, pérdida de pelo, cambio significativo de peso, letargia o fatiga.

Con anterioridad a la inyección de CAR, la aplicación de filamentos de Von Frey provocó un aumento del número de respuestas que fue proporcional al aumento de la intensidad de estimulación. Las intensidades de 50 y 60 mN no produjeron respuestas, mientras que la de 500 mN llevó a una saturación de las mismas (ver curvas control en la Figura III.1). Seis horas después de la administración de CAR (día 1), se observó un desplazamiento de la curva hacia la izquierda, que fue significativo en todos los casos ($p < 0.01$). La administración de 100 μ l de salino en la pata contralateral no supuso ningún cambio sustancial en la curva control.

Las pruebas realizadas por la mañana (AM) y por la tarde (PM) desde el segundo al quinto día mostraron una recuperación progresiva de las respuestas de la línea base. En los animales tratados con ATRA, la frecuencia de las respuestas fue siempre mayor por las tardes que en las mañanas. Puesto que esta diferencia no fue significativa, los datos fueron combinados y presentados como la media de las respuestas obtenidas cada día. Las curvas estudiadas durante los días 2 y 3 en los animales tratados con ATRA, fueron significativamente diferentes de las respuestas control, mientras que en los animales tratados con vehículo, sólo se observó una diferencia significativa en el día 2 AM.

La principal diferencia fue observada en el test realizado el día 2 PM (Figura III.1). En ese momento, la curva de los animales tratados con vehículo se había desplazado parcialmente de vuelta a la derecha, de manera que no era ya significativamente diferente de la curva control. Sin embargo, en los animales tratados con ATRA, la curva estaba todavía desplazada hacia la izquierda, existiendo una diferencia significativa con la curva control ($p < 0.01$) y con la curva obtenida en los animales tratados con vehículo ($p < 0.05$, Figura III.1).

ATRA vs. Vehículo Día 2 PM

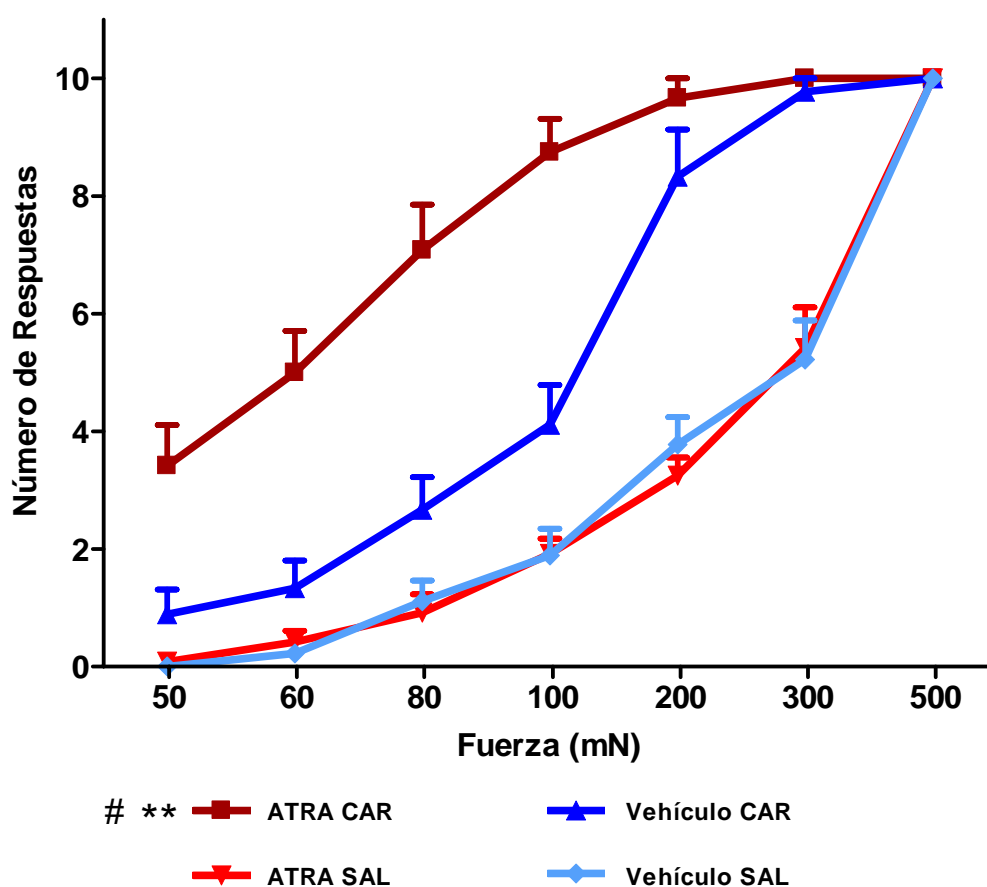


Figura III.1.- Comparación de las respuestas nociceptivas en animales tratados con ATRA y vehículo en el día 2 PM, tras la inflamación. La principal diferencia en las curvas de intensidad-respuesta se observó en las pruebas realizadas en la tarde del día 2. La curva obtenida para los animales tratados con ATRA fue significativamente distinta del control y de la de los animales tratados con vehículo (** $p < 0.01$ comparación frente al control; # $p < 0.05$, comparación frente al vehículo, mediante un ANOVA de una vía con post test de Dunnett).

4.1.2. Umbral, volumen de la pata, hiperalgesia y alodinia

El umbral para la estimulación mecánica fue muy parecido en todos los grupos experimentales antes de la administración de CAR: 298 ± 14 mN y 315 ± 26 mN. La CAR produjo una intensa reducción de los umbrales, que fue mayor en los animales tratados con ATRA (29 ± 4 mN, $p < 0.001$) que en los tratados con vehículo (60 ± 6 mN, $p < 0.001$). La diferencia entre los grupos fue también evidente en los siguientes dos días ($p < 0.001$, día 2; $p < 0.05$, día 3). La reducción de los umbrales para la estimulación mecánica se acompañó de un aumento significativo del volumen de la pata ($p < 0.001$), con valores similares en los dos grupos experimentales (ATRA: 2.9 ± 0.1 ml; vehículo: 3.2 ± 0.1 ml). El nivel de inflamación se recuperó parcialmente durante los siguientes 5 días, sin observarse diferencias entre los grupos.

La Figura III.2 muestra la evolución de la alodinia e hiperalgesia mecánica en animales tratados con ATRA o con vehículo a lo largo de la semana. La administración de CAR aumentó significativamente el número de respuestas en todos los grupos de animales. La alodinia se manifestó durante los cinco días del estudio en los animales tratados con ATRA, pero sólo fue observada los dos días posteriores a la inducción de la inflamación en los animales control. La diferencia entre los grupos fue significativa los tres primeros días ($p < 0.01$, días 1 y 2; $p < 0.05$, día 3; Figura III.2). La hiperalgesia se observó los primeros tres días tras la inflamación en los animales tratados con ATRA, mientras que en el grupo control, sólo apareció los dos primeros días. Además, fue más intensa en el grupo tratado con ATRA que en el control, de forma significativa los primeros dos días del estudio ($p < 0.01$, día 1; $p < 0.001$, día 2; Figura III.2).

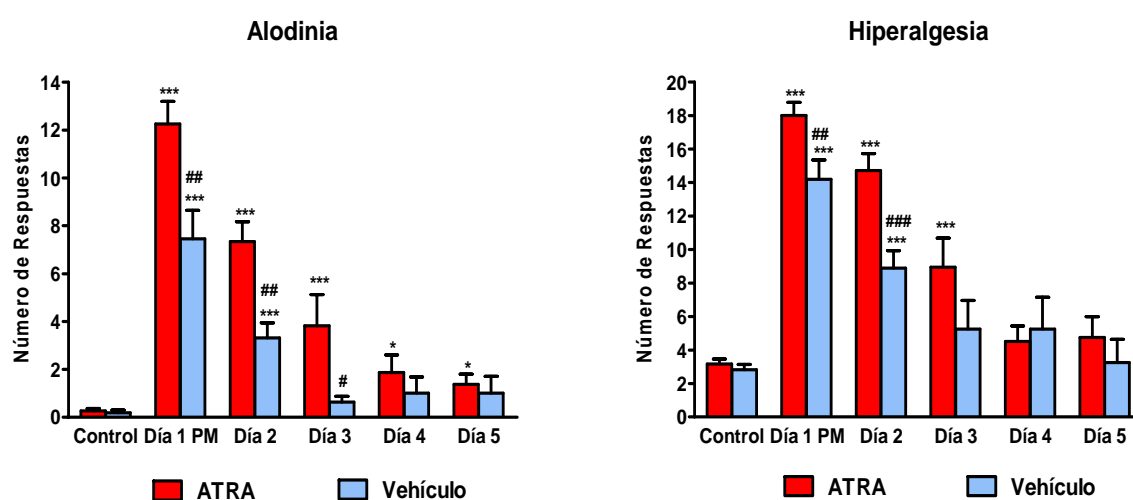


Figura III.2.- Evolución de la alodinia y la hiperalgesia en animales tratados con ATRA y vehículo. La alodinia y la hiperalgesia fueron más intensas en animales tratados con ATRA en comparación con los tratados con el vehículo. De igual modo, la recuperación de las respuestas fue más lenta en los animales con ATRA (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, comparación frente a las respuestas control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, comparación frente al vehículo, empleando el test no paramétrico de Mann-Whitney).

La latencia para la estimulación nociva térmica en las pruebas control fue significativamente menor en los animales tratados con ATRA (8.3 ± 0.2 s) que en los tratados con vehículo (11.9 ± 0.2 s, $p < 0.001$, día 1; Figura III.3). Esta diferencia continuó siendo significativa en los animales no inflamados el resto de los días ($p < 0.01$, día 1 y $p < 0.001$, días 2 y 3; Figura III.3). La hiperalgesia térmica se hizo patente durante los dos primeros días tras la inflamación, observándose una recuperación de las respuestas hasta los valores controles el tercer día post CAR.

Como ocurría para los animales no inflamados, la hiperalgesia térmica se vio influenciada por el tratamiento con ATRA, observándose unas respuestas significativamente más bajas en los animales con ATRA ($p < 0.001$, días 2 y 3; Figura III.3).

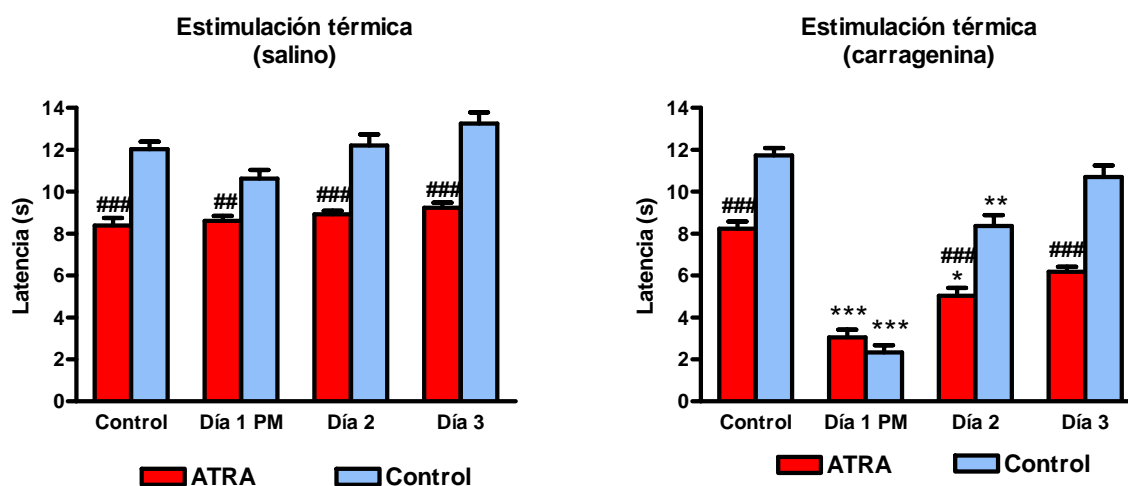


Figura III.3.- Latencia ante estimulación térmica nociva. La administración de ATRA redujo la latencia del reflejo de retirada evocado por estimulación térmica nociva tanto en la pata normal (salino) como en la inflamada (CAR). Las diferencias fueron observadas hasta tres días después de la administración de CAR o salino (igual comparación estadística que en la Figura III.2).

5. DISCUSIÓN

La administración de ATRA por vía oral produjo un aumento de las respuestas nociceptivas en animales con inflamación inducida por CAR. Esto sugiere que el ATRA podría estar implicado en el procesamiento de la información nociceptiva. Las dosis de ATRA utilizadas en este estudio se eligieron de acuerdo con experimentos preliminares y dosis estudiadas en otros trabajos. La elección de una única dosis en lugar de varias dosis se debió a que se ha demostrado una mejor tolerancia al AR al administrarlo en dosis individuales (Teelmann, 1989). Las dosis utilizadas en este estudio han demostrado poseer propiedades antiinflamatorias en modelos experimentales de nefropatía (Moreno-Manzano et al., 2001), así como inducir un aumento en la concentración de PG E2 en ratas. (Devaux et al. 2001). Aunque se emplearon dosis mucho menores de las consideradas tóxicas en especies similares (Teelmann, 1989), se prestó atención a la aparición de efectos adversos en todos los animales. La ausencia de efectos adversos hace poco probable que el aumento de

las respuestas nociceptivas pueda explicarse como consecuencia de toxicidad inducida por el ATRA.

La administración de CAR en animales tratados con vehículo indujo una potente inflamación en la pata que se acompañó de una intensa sensibilización, como puede observarse por los niveles de alodinia e hiperalgesia. El efecto máximo se obtuvo a las 6 horas de la inyección de CAR, observándose durante los siguientes días una recuperación progresiva, similar a la observada en trabajos anteriores (Fletcher et al., 1997; Perrot et al., 1998; Mazario et al., 2001). En los animales tratados con ATRA, el nivel de respuestas nociceptivas fue más alto que en los animales tratados con vehículo y, aunque también se recuperó progresivamente a lo largo de los 5 días siguientes, la recuperación fue más lenta en los animales con ATRA, observándose la diferencia máxima entre los dos grupos experimentales el día 2 PM. Esta diferencia en las respuestas nociceptivas se manifestó en todos los parámetros estudiados: alodinia, hiperalgesia y el umbral para estimulación mecánica.

Puesto que el protocolo experimental fue similar en los dos grupos de animales, concluimos que el ATRA está implicado en el procesamiento de la información nociceptiva y que, en las condiciones experimentales estudiadas, su administración oral produce una intensificación de las respuestas nociceptivas. El ATRA se une a receptores de AR (RARs), pero no a receptores X de retinoides (RXRs) (Kastner et al., 1995). En consecuencia, los efectos observados podrían estar relacionados con los receptores RAR. De hecho, se han descubierto niveles altos de AR en la médula espinal de rata (Werner et al., 2002), aunque la activación de los receptores RXR se ha demostrado esencial para el desarrollo de la médula espinal (Solomin et al., 1998). Por otra parte, el AR podría formar isómeros *in vivo*, que activarían receptores RAR o RXR (Moreno-Manzano et al., 2003). Todo esto impide asegurar que, con los experimentos realizados, los receptores RAR sean los responsables únicos del efecto observado.

La inyección intraplantar de salino no indujo un aumento significativo del volumen de la pata. Las pruebas realizadas en esta pata empleando estimulación mecánica no mostraron ninguna diferencia significativa entre los animales tratados con vehículo y los animales tratados con ATRA. Sí se observó diferencias al aplicar estimulación térmica, con una latencia de las respuestas significativamente menor en los animales tratados con ATRA. Es posible, por tanto, que los retinoides estén implicados no sólo en el procesamiento de la información nociceptiva en situaciones de sensibilización,

sino también en situaciones agudas. De hecho, no hay duda de que los retinoides participan en la regulación de los procesos inflamatorios en numerosos tejidos, con actividad antiinflamatoria en la mayoría de los casos. Este efecto ha sido descrito en la piel (Larsen et al., 1992) en el sistema digestivo (Desreumaux et al., 2001) y en el riñón (Moreno-Manzano et al., 2003), aunque existe muy poca información sobre el efecto en el sistema nervioso y nada respecto al sistema nociceptivo.

En las preparaciones *in vitro*, el ATRA parece regular la expresión de neuropéptido Y en células humanas de neuroblastoma a través de receptores RAR (Magni et al., 2000). El AR también participa en la regulación de la expresión de receptores μ -opioides y RNAs mensajeros C-fos en algunas células de neuroblastoma, con un efecto dosis dependiente (Jenab et al., 2002). La regulación de la síntesis de PGs por ATRA no está plenamente demostrada en preparaciones *in vivo*. No obstante, se ha observado que el ATRA aumenta en ratas las concentraciones plasmáticas y hepáticas de PGs, en especial de PG E2, mediante un aumento de la expresión de COX 1, siendo este efecto mucho mayor en presencia de lipopolisacárido (Devaux et al., 2001). Es bien conocido el hecho de que las COX y las PGs participan en el procesamiento central de la información nociceptiva (Vanegas et al., 2001), especialmente en situaciones de inflamación. Todos estos datos apoyan la idea de que el aumento de la expresión de COX y, por tanto, de la actividad de las PGs, pudiera ser un mecanismo de acción que explicase el incremento de las respuestas nociceptivas que el ATRA produjo en nuestros experimentos.

Puesto que los experimentos de comportamiento, mostraron una actividad pronociceptiva del ATRA y debido a que el AR ha sido relacionado con la modulación de la expresión de las enzimas COX, establecimos la hipótesis de que las COX estuvieran implicadas en el mecanismo de acción de ATRA. De esta forma, D^a. Matilde Alique Aguilar y la Dra. D^a. Victoria Moreno Manzano, bajo la dirección del Dr. D. Javier de Lucio Cazaña, llevaron a cabo, mediante técnicas de western blot, una serie de experimentos utilizando la médula espinal de ratas tratadas con ATRA y preparaciones *in vitro* de dos líneas celulares de neuroblastomas. En estos experimentos, se observó un aumento de la expresión de COX 2 en la médula espinal de las ratas tratadas con ATRA (Figura III.4) y en las dos líneas celulares (Figura III.5), lo cual está de acuerdo con lo observado en trabajos similares realizados en riñón, SNC (Vane et al., 1998) y neuronas del asta dorsal (Samad et al., 2001) y en otras líneas celulares de neuroblastoma, como las células humanas CHP 100 y las de ratón HT4 (Corasaniti et al., 2003, Rockwell et al., 2000).

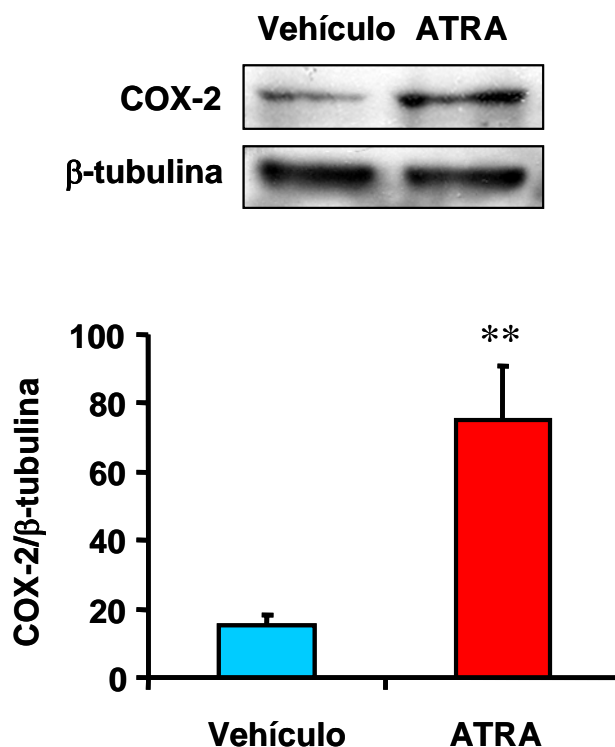


Figura III.4.- Aumento de la expresión de COX 2 en el segmento lumbar de la médula espinal de ratas tratadas con ATRA p.o. La figura muestra los valores relativos de COX 2, normalizados para β -tubulina, inducidos por el tratamiento de los animales con vehículo o ATRA (Western blot; n=6 ratas por grupo; **p<0.01, comparación frente al vehículo, empleando el test no paramétrico de Mann-Whitney). (Experimentos realizados por M. Alique, V. Moreno y J. de Lucio).

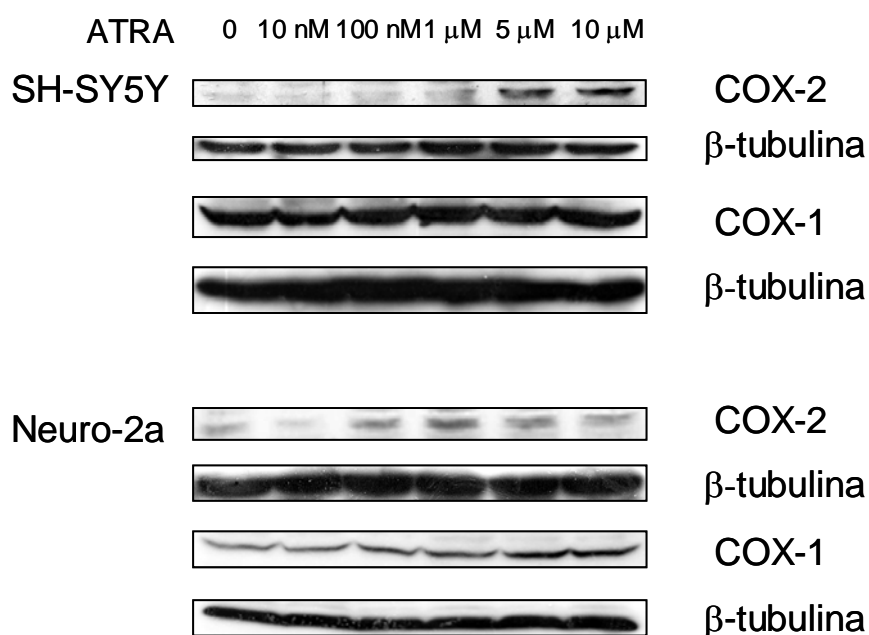


Figura III.5.- Efecto de ATRA sobre la expresión de COX 1 y COX 2 en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y en células de neuroblastoma de ratón Neuro-2a. Las células fueron tratadas durante 16 horas con 0-10 μ M de ATRA. Los niveles de proteínas de COX 1 y COX 2 fueron determinados por Western blot, empleando un anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina como control de carga. (Experimentos realizados por M. Alique, V. Moreno y J. de Lucio).

Se observó una evidente, aunque pequeña, expresión constitutiva de COX 2 en la médula espinal de las ratas tratadas con vehículo, mientras, por el contrario, en animales tratados con ATRA, se obtuvo un importante aumento de la expresión de COX 2, que fue significativamente mayor que el observado en los animales tratados con vehículo ($p < 0.01$, Figura III.4). Además, los resultados obtenidos en los experimentos parecen mostrar una clara relación entre la concentración de ATRA y la expresión de COX 2 en células neuronales. Por ello, la modulación de COX 2 podría explicar la actividad pronociceptiva observada en los experimentos *in vivo*. El efecto sobre la COX 2 fue mucho más específico que sobre la COX 1, ya que la modulación de esta enzima no fue tan evidente en las células de neuroblastoma como en el caso anterior. Se observaron bajos niveles basales de COX 1 en ambas líneas celulares, lo cual se corresponde con las expresiones constitutivas observadas en la mayoría de los tipos celulares (Vane et al., 1998). Sin embargo, aunque en las células Neuro2a los niveles de COX 1 fueron sustancialmente incrementados con el tratamiento de altas concentraciones de ATRA, no se observó este cambio en la expresión de COX 1 en las células SH-SY5Y. Esta discrepancia entre las dos líneas celulares de neuroblastoma sugiere que el ATRA no tiene una clara acción en la regulación de la expresión de COX 1 en sistemas *in vitro* (Figura III.5).

6. CONCLUSIONES

1.- El presente estudio es el primero en demostrar una clara relación entre la administración oral de ATRA y el aumento de las respuestas nociceptivas, medidas como reflejos de retirada.

**CAPITULO IV: LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE ÁCIDO RETINOICO
INDUCE SENSIBILIZACIÓN EN LA MÉDULA ESPINAL.**

1. OBJETIVOS

- 1) Comparar las respuestas de las neuronas de la médula espinal de ratas tratadas con ATRA p.o. en situación de normalidad y en situación de inflamación inducida con CAR.

2. INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior vimos que los retinoides podrían estar implicados en el procesamiento de la información nociceptiva, especialmente en situaciones de hiperalgesia debida a inflamación. En este capítulo, nos propusimos determinar si la administración oral de ATRA induce cambios en las respuestas de las neuronas de la médula espinal compatibles con los observados en la sensibilización debida a un proceso inflamatorio.

Es bien sabido que la inflamación de tejidos periféricos conlleva la sensibilización de los nociceptores, expuestos a los mediadores inflamatorios, y a la sensibilización central, debida a la facilitación de las sinapsis en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal. Como consecuencia, se produce una exagerada sensación de dolor denominada hiperalgesia (Treede et al., 1992). La sensibilización central se manifiesta como un cambio en las propiedades de las neuronas de la médula espinal. Estos cambios incluyen una bajada de los umbrales para estimulación mecánica y eléctrica, así como un aumento del tamaño de los campos receptores cutáneos (Woolf, 1983; McMahon y Wall, 1984; Schaible y Schmidt, 1985; Laird y Cerveró, 1989; Woolf y King, 1990; Dubner y Ruda, 1992). La alteración en la intensidad de liberación de neuromediadores, entre otros mecanismos, permite mantener ese estado de elevada actividad neuronal. Así, la producción de PGs, en especial la PG E₂, y de IL1 β se activan con la administración de lipopolisacárido (Watkins et al., 1994) o con la inflamación (Safieh-Garabedian et al., 1995), situación en la que también se produce un aumento de la expresión de COX 2 tanto en tejido periférico (Maier et al., 1990) como en la médula espinal (Samad et al., 2001). Los mecanismos que controlan la regulación de IL1 β o COX 2 y de otros sistemas endógenos implicados en la sensibilización aún no son conocidos.

Los retinoides podrían constituir uno de los sistemas aún no identificados implicados en la generación y/o mantenimiento de la inflamación. Por lo tanto, estudiamos el efecto del ATRA p.o. sobre las respuestas de las neuronas de la médula espinal frente a estimulación mecánica y eléctrica nocivas en ratas normales y con inflamación.

3. MÉTODOS

3.1. Experimentos de electrofisiología

Los presentes experimentos fueron realizados en colaboración con el Dr. Alfonso Romero Sandoval.

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas con pesos comprendidos entre 240-340 g divididos en 4 grupos experimentales: animales normales tratados con ATRA (n=17), animales normales tratados con vehículo (n=11), animales con inflamación inducida por CAR tratados con ATRA (n=20) y animales con inflamación tratados con vehículo (n=9). La inflamación fue inducida 15 horas antes del experimento siguiendo el protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos. La efectividad de la CAR en la inducción de la inflamación fue determinada mediante la medida del volumen de las patas por pletismometría (Pletismómetro Letica) antes de la administración de CAR y después del experimento.

El ATRA fue suspendido en CMC y administrado por vía oral en un volumen final de 0.5 ml. Una misma cantidad de CMC se administró a los animales del grupo control. El tratamiento con ATRA o vehículo p.o. se mantuvo en ambos casos durante 4 días y consistió en una dosis de 15 mg/kg los dos primeros días y una dosis de 10 mg/kg los siguientes 2 días. Las dosis y el protocolo de administración fueron elegidos de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de comportamiento realizados previamente en nuestro laboratorio (ver capítulo anterior).

Tras la cirugía preparatoria, se procedió al registro del reflejo de retirada como UMAs, descrito en la sección de Materiales y Métodos. Las UMAs no fueron seleccionadas específicamente, sino que la primera unidad aislada fue la utilizada en el experimento. Una vez aislada la unidad, la preparación se dejó reposar durante 10 minutos. A continuación se procedió a la caracterización de la unidad utilizando el siguiente protocolo:

- (1) Determinación del umbral para estimulación mecánica mediante filamentos de Von Frey, que fueron aplicados en el área más sensible del campo receptor cutáneo, habitualmente el primer dedo. Los filamentos empleados fueron de 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 80, 100 y 200 mN.

(2) Determinación del umbral para la activación de fibras C mediante estimulación eléctrica (pulsos de 2 ms de duración), empleando dos agujas de 0.2 mm insertadas en la dermis del área más sensible del campo receptor (Solano y Herrero, 1997). Para el análisis de los datos obtenidos con la estimulación eléctrica se consideraron las respuestas evocadas entre 150 y 650 ms tras cada pulso (Herrero y Cerveró, 1996b). En la figura IV.1A se representa un registro original de las respuestas observadas tras un estímulo eléctrico. Cada prueba fue repetida 3 veces en intervalos de 3 minutos, utilizando el valor medio para el análisis.

(3) Trazado de un mapa del campo receptor empleando un filamento de 500 mN, capaz de inducir el reflejo nociceptivo de retirada en el animal consciente y considerado como un estímulo nocivo (Romero-Sandoval et al., 2004). Un esquema de la técnica y un registro original se muestran en las figuras IV.1B y IV.1C. El área de los campos receptores fue señalada en la piel y copiada en un papel de calco. Las áreas dorsal y plantar fueron consideradas sólo para análisis y medida, utilizando un tablero digitalizador. Los datos se presentan como la media \pm e.e.m. La significación estadística se calculó mediante un ANOVA de una vía con post test de Dunnett.

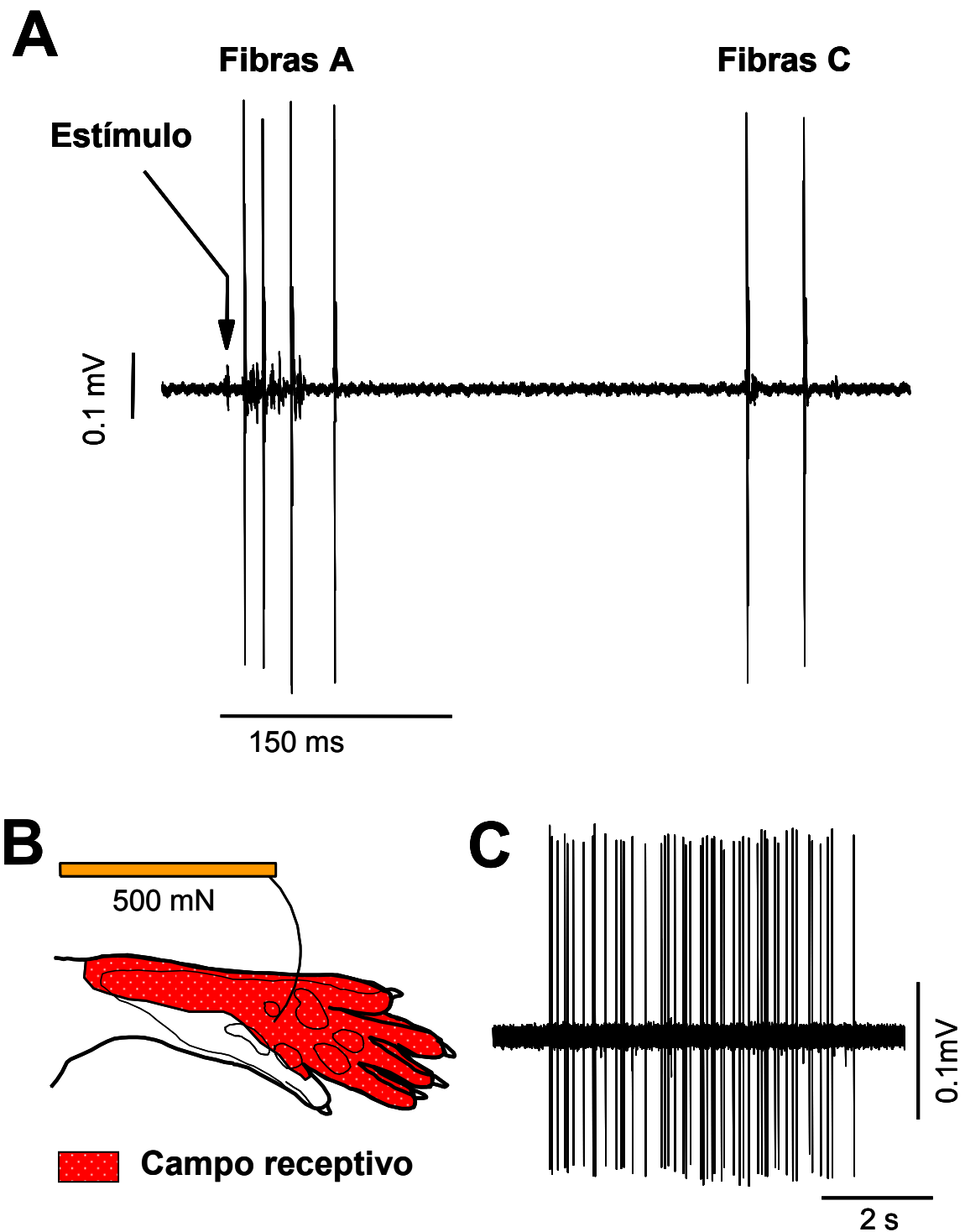


Figura IV.1.- Ilustración de los métodos seguidos en los experimentos de electrofisiología. (A) Registro original de las respuestas de las fibras A y C tras un estímulo eléctrico. El umbral para la activación de las fibras C fue determinado mediante la aplicación de pulsos eléctricos cuadrados de 2 ms. Los datos para la estimulación eléctrica fueron analizados contando las respuestas evocadas entre 150 y 650 ms después de cada pulso. (B) Los campos receptores cutáneos fueron mapeados en las caras dorsal y plantar de la pata empleando un filamento de 500 mN. (C) Ilustración de un registro original de una unidad activada mediante la aplicación de un filamento de 500 mN durante 5 segundos en el área más sensible del campo receptor cutáneo.

4. RESULTADOS

4.1. Experimentos de electrofisiología

4.1.1. Umbrales

El estudio de los umbrales para estimulación mecánica mostró diferencias significativas entre los animales tratados con ATRA y los tratados con vehículo (Figura IV.2). En los animales normales tratados con vehículo, la intensidad media umbral fue de 64 ± 1.6 mN, mientras que en los animales tratados con ATRA, el umbral fue significativamente menor: 54 ± 1.6 mN ($p < 0.001$). De igual forma, en los animales con inflamación, la intensidad umbral fue significativamente menor en ratas pretratadas con ATRA: 24 ± 1.5 mN frente a 30 ± 1.2 mN ($p < 0.01$). La administración de CAR indujo un aumento similar en el volumen de la pata de los animales tratados con vehículo y ATRA: 1.4 ± 0.1 ml (volumen inicial: 1.63 ± 0.1 ml; volumen final: 3.02 ± 0.1 ml) y 1.5 ± 0.1 ml (volumen inicial: 1.72 ± 0.1 ml; volumen final: 3.22 ± 0.1 ml). En ambos casos, el volumen de la pata fue significativamente mayor tras la administración de CAR ($p < 0.001$).

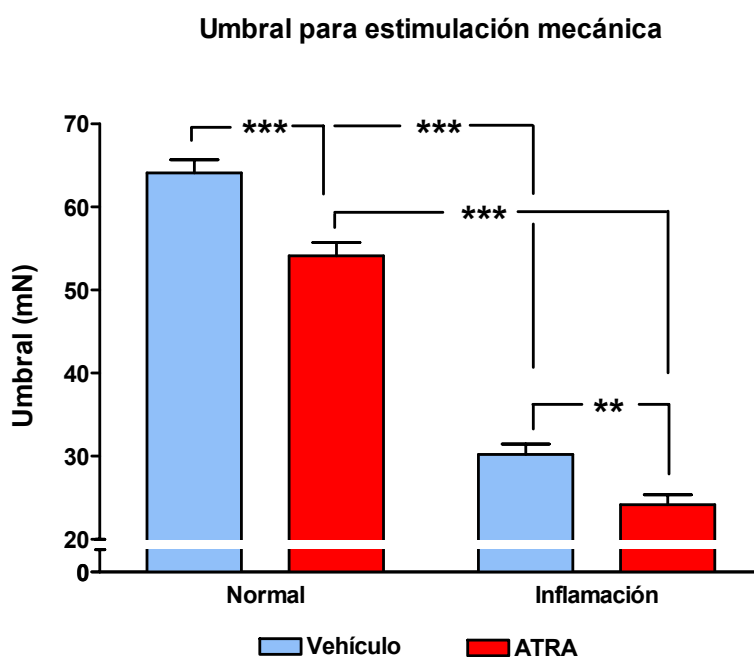


Figura IV.2.- Intensidad de los umbrales para estimulación mecánica en animales tratados con vehículo o ATRA en situación de normalidad e inflamación. Los umbrales para la activación de las unidades fueron menores en los animales con inflamación. En los animales normales tratados con ATRA p.o, los umbrales fueron significativamente menores que en los tratados con vehículo. Asimismo, el umbral fue menor en los animales con inflamación tratados con ATRA que en las ratas control (* $p < 0.05$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$, comparación estadística mediante un ANOVA de una vía con post test de Dunnett).

Con respecto a la activación de fibras C mediante estimulación eléctrica, también se obtuvo un umbral significativamente menor en las UMAs de los animales tratados con ATRA, en comparación con los animales control (Figura IV.3). En los animales normales la intensidad de los umbrales fueron 0.6 ± 0.1 mA en el grupo de las ratas tratadas con vehículo y 0.28 ± 0.1 mA ($p < 0.05$) en las que se administró ATRA. En los animales con inflamación, los umbrales fueron 0.2 ± 0.05 mA en las ratas control y 0.08 ± 0.03 mA ($p < 0.05$) en las ratas tratadas con ATRA (Figura IV.3).

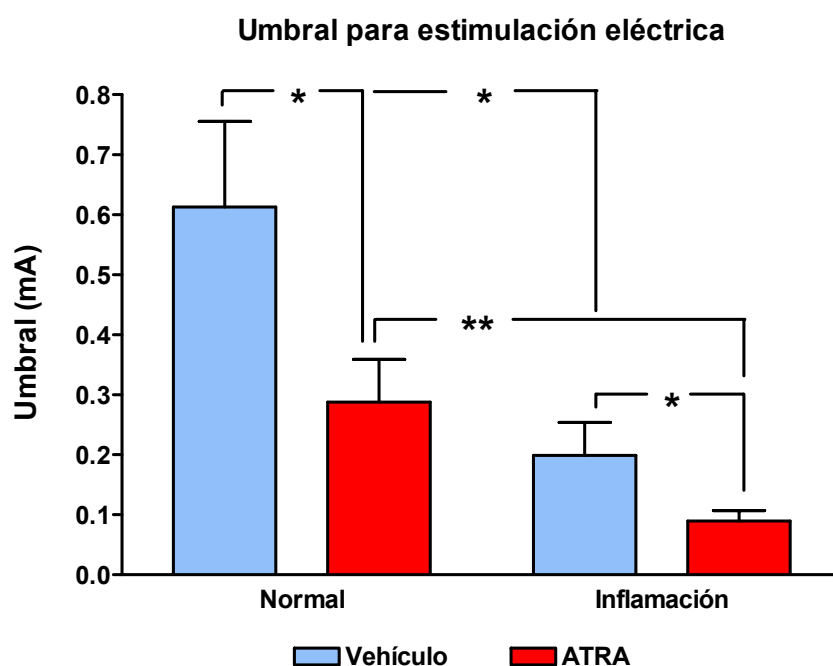


Figura IV.3.- Intensidad de los umbrales para estimulación eléctrica en animales tratados con vehículo o ATRA en situación de normalidad e inflamación. Los umbrales para la activación de las fibras C fueron menores en los animales tratados con ATRA que en los tratados con vehículo. Como ocurría en la estimulación mecánica, la diferencia se mantuvo tanto en la situación de normalidad como en inflamación. Por otra parte, el umbral de los animales normales tratados con ATRA fue muy similar al observado en el grupo control de ratas con inflamación (misma comparación estadística que para la figura IV.2).

4.1.2. Campos receptores

La figura IV.4 muestra la distribución del campo receptor cutáneo de las unidades estudiadas con un filamento de Von Frey de 500 mN, así como las áreas cuantificadas en los cuatro grupos de animales. En los animales normales tratados con vehículo, los campos receptores se localizaron en la región lateral de la pata, incluyendo los dedos cuarto y quinto, tanto en la superficie dorsal como en la plantar, con un área cuantificada total de 1.3 ± 0.3 cm². En los animales normales tratados con ATRA, los campos receptores cutáneos fueron mayores, con un área de 2.9 ± 0.3 cm² ($p < 0.01$), incluyendo zonas de los últimos tres dedos y las áreas media y posterior de la pata.

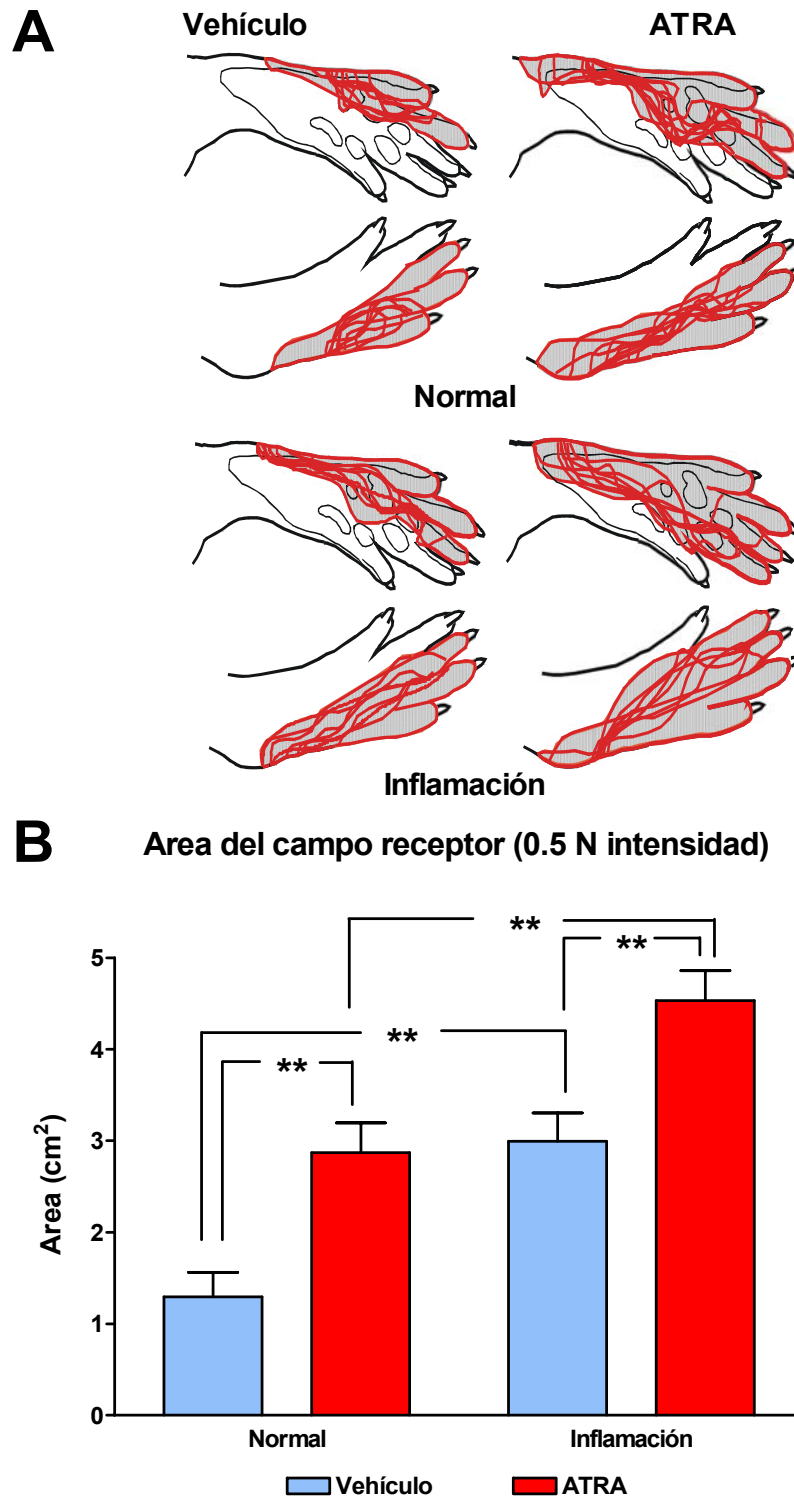


Figura IV.4.- Campos receptores cutáneos en ratas tratadas con vehículo o ATRA en situación de normalidad e inflamación. (A) Extensión de los campos receptores cutáneos representados para cada unidad en las caras dorsal y plantar de la pata de animales tratados con vehículo o ATRA en condiciones de normalidad o inflamación. Se observa una gran similitud en la forma y el tamaño de los campos de los animales normales tratados con ATRA y de los animales con inflamación tratados con vehículo. **(B)** Cuantificación de las áreas de los campos en las cuatro condiciones experimentales. El tamaño de los campos de las unidades estudiadas en los animales tratados con ATRA fue mayor que en los tratados con vehículo, tanto en ratas normales como en ratas con inflamación (misma comparación estadística que para la figura IV.2).

Estos campos fueron muy similares en forma y tamaño a los de las unidades de los animales con inflamación tratados con vehículo, cuya área cuantificada fue de $2.99 \pm 0.3 \text{ cm}^2$. El área de los campos receptores de los animales con inflamación tratados con ATRA fue de nuevo mayor que el obtenido en los animales tratados con vehículo, con un área media de $4.5 \pm 0.3 \text{ cm}^2$ ($p < 0.01$), e incluyó los últimos cuatro dedos y la mayoría de la cara dorsal y plantar de la pata (Figura IV.4).

5. DISCUSIÓN

El registro de unidades motoras activadas por estimulación nociva periférica es una buena técnica para estudiar las respuestas neuronales nociceptivas de la médula espinal. Estos experimentos permiten estudiar los procesos fisiológicos y farmacológicos implicados en la nocicepción *in vivo*, de una manera menos invasiva que el registro directo de neuronas de la médula espinal (Herrero y Headley, 1996; Herrero y Cerveró, 1996b; Solano y Herrero, 1999), disminuyendo la alteración del procesamiento de la información nociceptiva observada en otros experimentos debida a la cirugía espinal (Herrero y Headley, 1996). Esta técnica también ha sido utilizada para el estudio de los cambios que ocurren en la médula espinal durante el procesamiento de la información nociceptiva, en situaciones de sensibilización inducida por inflamación (Solano y Herrero, 1999). En esta situación, la inflamación de los tejidos periféricos conduce a una sensibilización periférica del nociceptor, expuesto a los mediadores de la inflamación, y a una sensibilización central, como consecuencia del aumento de la información recibida. Como consecuencia de ello, se produce hiperalgesia y alodinia (Treede et al., 1992).

La sensibilización central se manifiesta en forma de cambios en las propiedades de las neuronas de la médula espinal. Estos cambios incluyen la disminución de los umbrales para estimulación natural y eléctrica y una ampliación de los campos receptores cutáneos (Woolf, 1983; McMahon y Wall, 1984; Schaible y Schmidt, 1985; Laird y Cerveró, 1989; Woolf y King, 1990; Treede et al., 1992; Dubner y Ruda, 1992). En experimentos de comportamiento previos (Capítulo III), observamos que los animales con inflamación inducida por CAR tratados con ATRA mostraban una alodinia e hiperalgesia más intensas y duraderas que los animales control (Romero-Sandoval et al., 2004). En los experimentos de este capítulo, comprobamos que el ATRA indujo cambios en las respuestas de las neuronas de la médula espinal de animales normales sin inflamación, similares a los observados en los procesos de sensibilización, es decir, disminución de umbrales y aumento del tamaño de los

campos receptores cutáneos. En otras palabras, los resultados sugieren que la administración de ATRA induce cambios parecidos a los que provoca la sensibilización en las propiedades de las neuronas de la médula espinal. De hecho, el tamaño de los campos receptores cutáneos fue prácticamente idéntico en los animales con inflamación y en los animales normales tratados con ATRA. Asimismo, el umbral para la activación de las fibras C fue muy similar en estos dos grupos experimentales. Por otra parte, los animales con inflamación tratados con ATRA, presentaron umbrales menores y campos receptores mayores que los animales tratados con vehículo, lo cual indica que el ATRA es efectivo también en la inflamación, o que incrementa los cambios generados por la inflamación. La sensibilización inducida por ATRA en estos experimentos podría ser la explicación al aumento de la alodinia e hiperalgesia observado en los experimentos de comportamiento llevados a cabo en nuestro laboratorio (Romero-Sandoval et al., 2004). También explicaría la sensación de dolor referida con el uso tópico de los retinoides (Lowe y Plosker, 2000).

Los cambios observados en el sistema nociceptivo durante la inflamación, implican a la mayoría de los mediadores químicos que participan en el procesamiento nociceptivo. Es, por lo tanto, difícil determinar el mecanismo o mecanismos implicados en la acción del ATRA. Además, hay que tener en cuenta que el ATRA participa en la regulación de muchos neuromoduladores que a su vez, están implicados en las respuestas nociceptivas e inflamatorias, tales como el receptor opioide y c-fos (Jenab y Inturrisi, 2002). No obstante, la modulación de COX y de la actividad de PGs por parte del ATRA y de otros retinoides está bien documentada en la literatura (Nusing et al., 1995; Hill et al., 1996; Kanekura et al., 2000; Devaux et al., 2001; Li et al., 2002). La implicación de las COX y de las PGs en los cambios del sistema nociceptivo que llevan a la sensibilización, son también conocidos (Schaible y Grubb, 1993; Millan, 1999; Vanegas y Schaible, 2001). Además, pudimos constatar en estudios previos (Romero-Sandoval et al., 2004) que el ATRA induce un aumento de la expresión de enzimas COX en dos líneas diferentes de neuroblastomas y en la médula espinal de ratas (Capítulo III). Basándonos en estas observaciones, nos preguntamos si el tratamiento con ATRA en las condiciones experimentales expuestas en este capítulo, iba asociado con un cambio en la expresión de COX 1 y COX 2 en la hemimédula sensibilizada y en la hemimédula control del mismo animal. Para responder a esta cuestión, D^a. Matilde Alique Aguilar y el Dr. D. Javier de Lucio Cazaña, realizaron experimentos de western blot, siguiendo el mismo protocolo de tratamiento con ATRA que en los experimentos de electrofisiología. Los resultados

de estos experimentos mostraron la existencia de niveles basales bajos de COX 1 y COX 2 en las hemimédulas normales sin sensibilización (Figura IV.5). Se observó un ligero aumento no significativo de la expresión de ambas isoenzimas en las hemimédulas sensibilizadas de los animales tratados con vehículo. Sin embargo, en los animales tratados con ATRA se produjo un incremento significativo de la expresión de COX 2 ($p < 0.05$), aunque no en la de COX 1, tanto en las hemimédulas control como en las sensibilizadas, en relación a las de los animales tratados con vehículo (Figura IV.5). Este podría ser uno de los mecanismos que explicase el efecto de sensibilización observado con la administración de ATRA en los experimentos de electrofisiología.

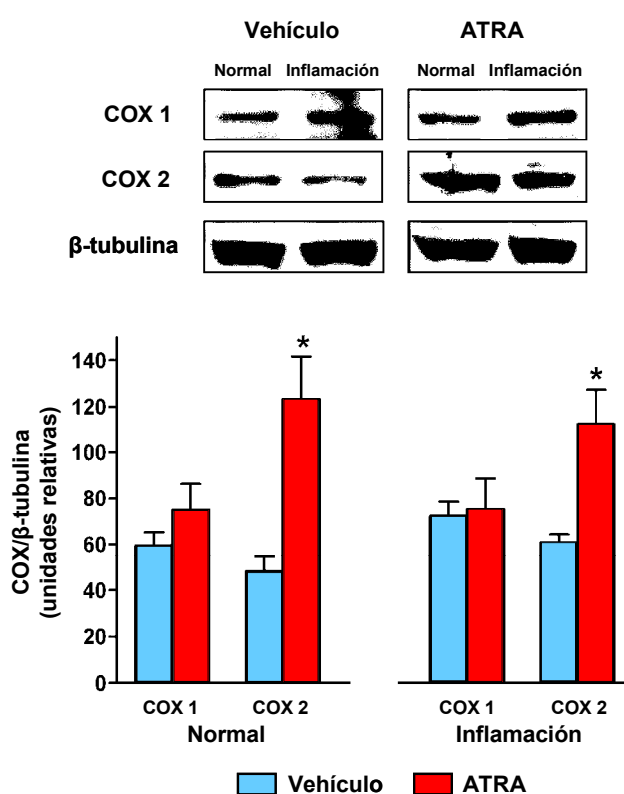


Figura IV.5.- Expresión de COX 1 y COX 2 en el segmento lumbar de la médula espinal de ratas tratadas con ATRA o vehículo. La hemimédula ipsilateral (Inflamación) y contralateral (Normal) a la pata inflamada fueron estudiadas por separado. Los resultados muestran un aumento significativo en la expresión de COX 2, pero no de COX 1, tanto en la hemimédula ipsilateral como en la contralateral de las ratas tratadas con ATRA ($n=7$) frente a las tratadas con el vehículo ($n=7$). Los datos se expresan como valores relativos de proteína COX (análisis western blot) normalizados para β -tubulina ($*p < 0.05$, comparación frente al vehículo mediante un ANOVA de una vía con post test de Dunnett). En la parte superior se muestra un western blot típico. (Experimentos realizados por M. Alique, y J. de Lucio).

Como hemos dicho, en los animales con inflamación no tratados con ATRA, se observó un ligero aumento de COX 2 en comparación con los animales normales, sin inflamación. Esta diferencia no significativa, fue mucho menor que la observada tras el tratamiento con ATRA. Sin embargo, el aumento de la expresión de COX 2 en cultivos celulares tras la administración de mediadores de la inflamación, está bien documentado en la literatura (Hla y Neilson, 1992; O'Sullivan et al., 1992; Seibert et al., 1994; Ichitani et al., 1997). El ligero aumento de la expresión de COX 2 inducido por CAR en nuestros experimentos, podría sugerir que la técnica empleada pudo detectar los grandes incrementos en la expresión inducidos por ATRA, pero que no era lo suficientemente sensible para medir aumentos de menor cuantía. Esta interpretación se apoya en el hecho de que en estudios previos con la misma técnica, también se observó un aumento no significativo de la expresión de COX 2 en médula espinal (Goppelt-Struebe y Beiche, 1997).

Para confirmar estos hallazgos y estudiar la distribución de la expresión de COX 2 a lo largo de la médula espinal, la Dra. D^a. Victoria Moreno Manzano y el Dr. D. Javier de Lucio Cazaña, realizaron experimentos de inmunohistoquímica, siguiendo el mismo protocolo de tratamiento con ATRA que en los experimentos previos. Los resultados mostraron un aumento importante de COX 2 en la médula espinal de los animales tratados con ATRA, frente a los animales tratados con vehículo (Figura IV.6), confirmando el aumento de la expresión de COX 2 observado en los experimentos de western blot. Los resultados parecen confirmar que el protocolo de tratamiento con ATRA seguido en estos experimentos indujo una modulación positiva de la expresión de COX 2 en la médula espinal. El marcaje de células no se restringió sólo a las neuronas del asta dorsal, sino que abarcó todas las áreas de la médula espinal, incluyendo las motoneuronas, tal y como había sido observado en estudios anteriores de expresión de COX 2 en situación de sensibilización inducida por inflamación (Willingale et al., 1997).

Finalmente, la modulación de la expresión de COX 2 en la médula espinal observada en estos experimentos, estuvo asociada al tratamiento oral con ATRA y con cambios en las propiedades de las neuronas de la médula espinal, similares a los observados en situación de inflamación. No obstante, aunque una sobreexpresión de COX 2 podría explicar el fenómeno de sensibilización, este valor fue similar en animales normales y en animales con inflamación, por lo que no parece probable que la sobreexpresión de COX 2 sea el único sistema implicado en la sensibilización mediada por ATRA. Por tanto, es más razonable pensar que también otros sistemas

podrían estar implicados, teniendo en cuenta, además, el elevado número de mediadores de la inflamación que participan en la respuesta inflamatoria y están relacionados con la actividad de los retinoides. En conjunto, los resultados indican que la vitamina A y sus metabolitos podrían ser uno de los sistemas, no identificados hasta el momento, responsable del inicio de la sensibilización y la hiperalgesia y, por lo tanto, podrían proporcionar una estrategia prometedora para el tratamiento de situaciones de dolor patológico

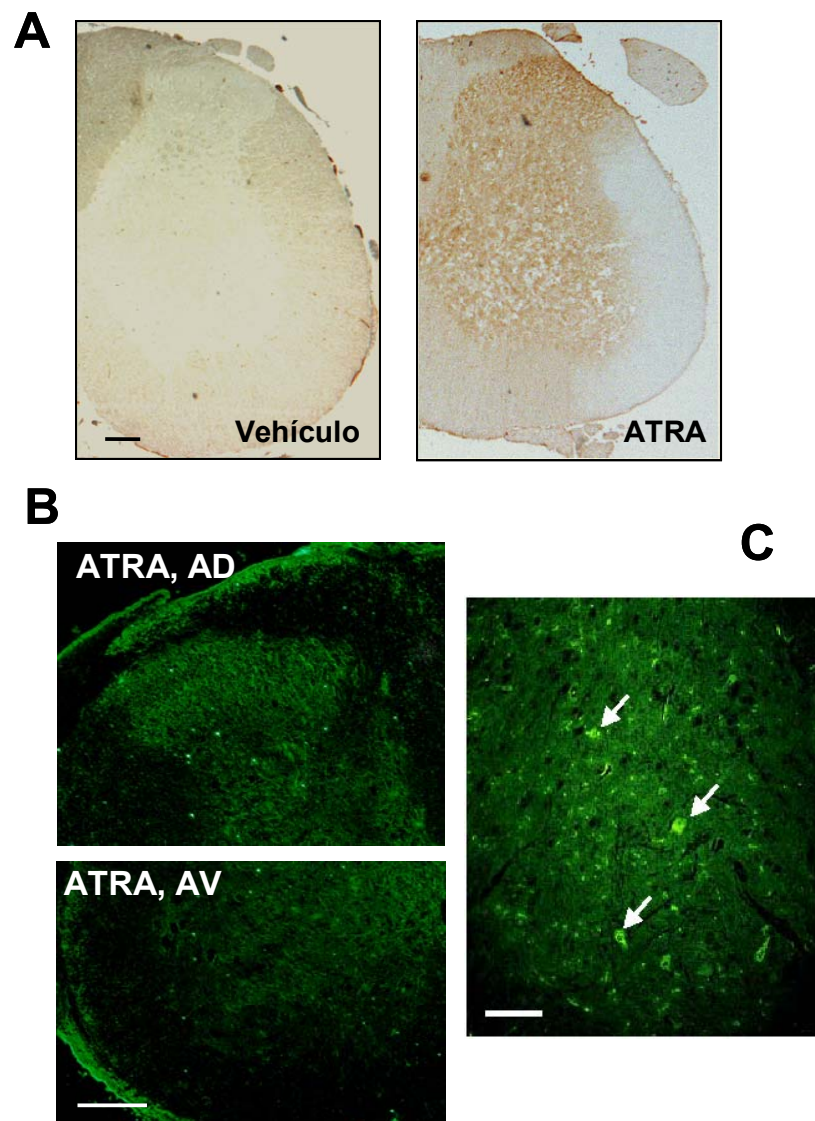


Figura IV.6.- Efecto del ATRA sobre la expresión de COX 2 en la médula espinal de animales con inflamación inducida por CAR. (A) Los experimentos mostraron un aumento homogéneo de la inmunorreactividad en los animales tratados con ATRA (n=6) frente a los tratados con el vehículo (n=6). (B) Se observa un número elevado de células positivas tanto en el asta dorsal como en el ventral. (C) Imagen en detalle que muestra motoneuronas del asta ventral marcadas (flechas). Barra de escalas: A y B, 250 μ m; C, 50 μ m. (Experimentos realizados por V. Moreno y J. de Lucio).

El efecto de sensibilización de la médula espinal inducido por ATRA p.o. observado en estos experimentos, dejó abiertos una serie de interrogantes sobre su mecanismo de acción. Nos preguntamos si el efecto de sensibilización del ATRA era resultado de una acción sobre la médula espinal y/o tejidos periféricos, por ejemplo, sobre los nociceptores, o se trataba de una acción básicamente espinal; si la actividad pronociceptiva del ATRA era inespecífica o estaba mediada por el receptor del ácido retinoico (RAR) y/o el receptor X de retinoides (RXR); si un inhibidor de COX podría bloquear el efecto pronociceptivo de ATRA en la médula espinal; o si la actividad pronociceptiva de ATRA se asociaba únicamente a una sobreexpresión de enzimas COX o existía algún otro mecanismo ligado al efecto.

Para contestar estas preguntas, se llevaron a cabo una serie de experimentos de comportamiento en los que se valoró el efecto por vía intratecal de ATRA, antagonistas específicos de receptores RAR y RXR, dexketoprofeno como inhibidor no selectivo de COX y un antagonista del receptor IL1ra (Alique et al., 2006). Estos experimentos fueron realizados por D^a. Matilde Alique, bajo la supervisión del Dr. Juan F. Herrero y el Dr. Javier de Lucio, y permitieron observar, de nuevo, la inducción de cambios en la médula espinal similares a los observados en la inflamación, con la administración del ATRA. Además, se comprobó que el efecto de sensibilización inducido por ATRA fue mediado por receptores RAR y asociado con una sobreexpresión de COX 2 e IL1. Todo esto parece demostrar la implicación del ATRA en los mecanismos que regulan el inicio y/o mantenimiento de la sensibilización en la médula espinal

6 CONCLUSIONES

1.- El tratamiento oral con ATRA en ratas induce cambios en la médula espinal similares a los observados en la inflamación, y podría explicar el aumento de alodinia e hiperalgesia observado en los experimentos de comportamiento del capítulo anterior.

2.- El ATRA podría estar implicado en los mecanismos que controlan el inicio y/o mantenimiento de la sensibilización en la médula espinal.

**CAPITULO V: LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE ÁCIDO RETINOICO
MEJORA LA EFECTIVIDAD ANALGÉSICA DEL PARACETAMOL Y EL
NITROPARACETAMOL.**

1. OBJETIVOS

- 1) Estudiar la actividad analgésica del PAR en presencia y ausencia de ATRA administrado p.o. en ratas normales y en ratas con monoartritis inducida con CAR.

- 2) Estudiar la actividad analgésica del NOP en presencia y ausencia de ATRA administrado p.o. en situaciones de normalidad y monoartritis.

2. INTRODUCCIÓN

Como ya se ha dicho, los AINEs son fármacos con propiedades analgésicas cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de las COX, impidiendo así la formación de PGs (Vane, 1971). Por lo tanto, muchos inhibidores de COX son analgésicos efectivos en el dolor inflamatorio, pero no en el dolor agudo (Collier y Schneider, 1972). En ausencia de inflamación, la síntesis de PGs no se ve aumentada y los AINEs no tienen un sustrato sobre el que actuar. Así, hemos observado la ausencia de efecto de inhibidores de la COX como flurboprofeno (Mazarío et al., 2001) o PAR (Romero-Sandoval et al., 2002) en casos de dolor agudo. Las PGs son liberadas en el área inflamada, aunque también producen efectos en el SNC. Ya hace tiempo que se sugirió que la hiperalgesia inducida por inflamación se debía a la activación de las COX y a la liberación central y periférica de PGs (Ferreira et al, 1978). Esto incluye la médula espinal, un lugar donde los AINEs tienen una intensa actividad (Vanegas y Schaible, 2001).

En un trabajo previo llevado a cabo en nuestro laboratorio (Romero-Sandoval et al., 2004), observamos un desarrollo de la alodinia e hiperalgesia más intenso en animales tratados con ATRA. Este aumento de la alodinia y la hiperalgesia tras el tratamiento con ATRA, se asoció con una sobreexpresión de COX, tanto en células de neuroblastoma como en la médula espinal. El aumento de la expresión de COX en la médula espinal fue similar al observado en inflamación, situación en la que inhibidores de las COX como el PAR son analgésicos efectivos. Por otra parte, los retinoides también están implicados en la generación de NO (Seguin-Devaux et al., 2002). Basándonos en estas observaciones, nos preguntamos si el tratamiento de animales normales con ATRA podría afectar a la actividad analgésica de inhibidores de las COX, y a sus derivados donadores de NO, en el dolor agudo. Por lo tanto, comparamos la actividad antinociceptiva del PAR y del NOP, derivado donador de NO, en animales normales, animales con monoartritis y en animales normales y con monoartritis tratados con ATRA, mediante la técnica del registro de UMAs. Estos experimentos podrían aportar nuevas evidencias sobre la implicación del ATRA en el procesamiento de la información nociceptiva y permitir el desarrollo de estrategias más efectivas en el tratamiento del dolor.

3. MÉTODOS

3.1. Experimentos de electrofisiología

3.1.1. Animales y preparaciones

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas con pesos comprendidos entre 240-340 g divididos en 8 grupos experimentales: animales normales tratados con PAR (n=6), o NOP (n=9); animales con monoartritis tratados con PAR (n=10) o NOP (n=15); animales normales con pretratamiento con ATRA y PAR (n=11) o NOP (n=6) y animales con monoartritis pretratados con ATRA y PAR (n=9) o NOP (n=7). Asimismo, se realizaron experimentos control con CMC, vehículo del PAR y NOP, en animales normales y con monoartritis. La monoartritis fue inducida 16 horas antes del experimento bajo breve anestesia con halotano (5% en oxígeno para inducción y 2% para mantenimiento) mediante la administración intraarticular en la rodilla derecha de 50 μ l de CAR (10 mg/ml, Sigma). Para control de la inflamación, se compararon las medidas del perímetro de la rodilla antes de la administración de CAR y al finalizar el experimento.

Tras la cirugía preparatoria, se procedió al registro del reflejo de retirada como UMAs, descrito en la sección de Materiales y Métodos. La Figura V.1 muestra varios registros originales, con los protocolos y ciclos de estimulación en las tres condiciones experimentales.

3.1.2. Fármacos y Análisis de datos

El ATRA (Sigma) fue suspendido en CMC y administrado p.o. en un volumen final de 0.5 ml. Una misma cantidad de CMC se administró a los animales del grupo control. El tratamiento con ATRA o vehículo p.o. se mantuvo durante 4 días y consistió en una dosis de 15 mg/kg los dos primeros días y una dosis de 10 mg/kg los siguientes 2 días. Los experimentos se realizaron el cuarto día de tratamiento. Las dosis y el protocolo de administración fueron elegidos de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de comportamiento realizados previamente en nuestro laboratorio (Romero-Sandoval et al., 2004). El PAR y el NOP (Nicox) se disolvieron en DMSO (Sigma) y PEG 300 (1:1, Panreac) en una concentración de 50 mM y fueron administrados i.v. diluidos en salino. La dosis inicial fue de 15 μ mol/kg, siendo la dosis de 480 μ mol/kg la más alta empleada. Tanto el PAR como el NOP fueron

administrados i.v. en dosis acumulativas de forma logarítmica en base 2 cada 7 ciclos de estimulación (21 minutos).

Los datos para la estimulación mecánica se han expresado como porcentaje del control, siendo el control la media de los tres ciclos previos a la administración de la primera dosis. Solamente se utilizaron para el análisis los datos correspondientes a

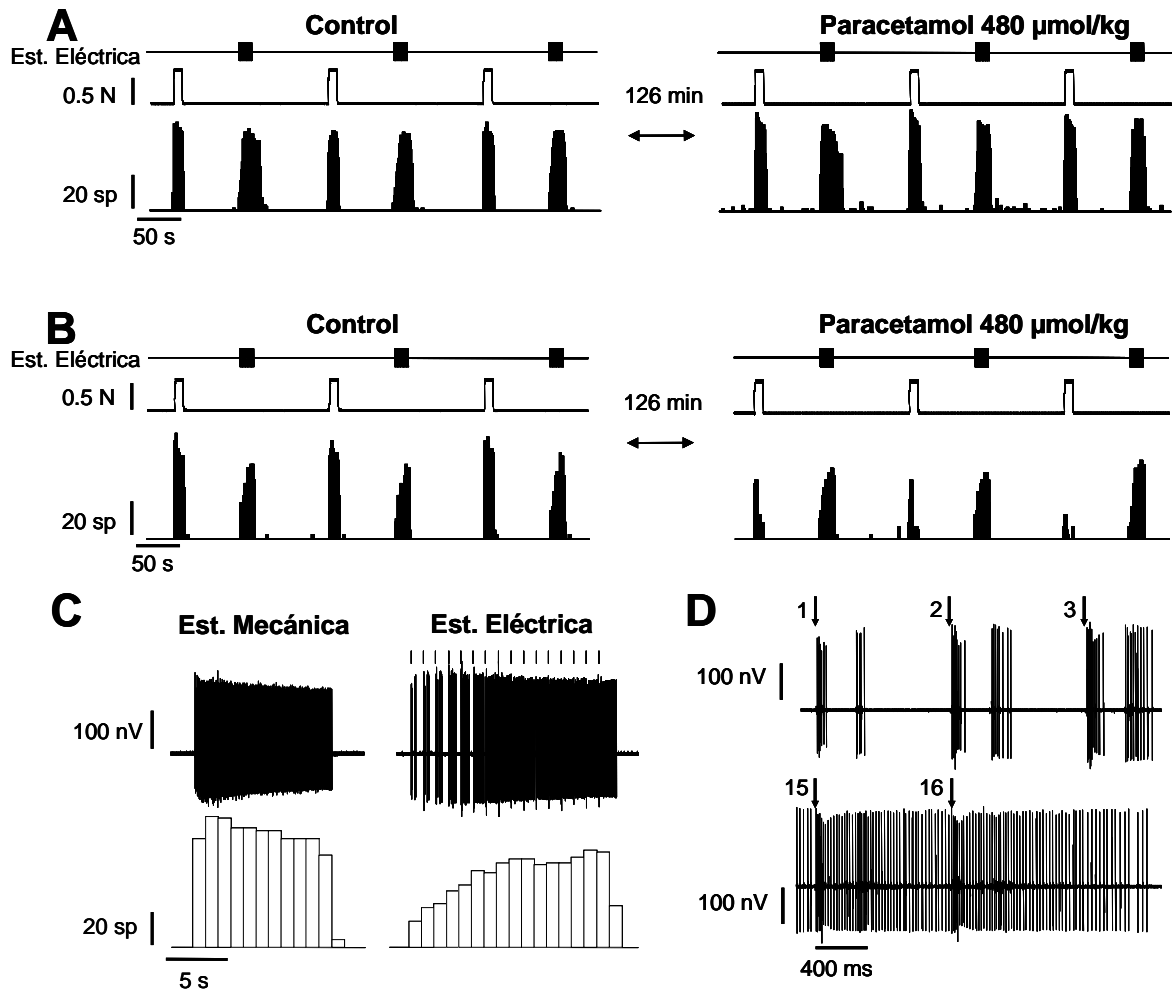


Figura V.1.- Registros originales de las respuestas de UMAs evocadas por estimulación nociva mecánica y eléctrica en animales normales (A) y en animales normales pretratados con ATRA p.o. (B).- Se muestran tres respuestas control previas a la administración de dosis acumulativas de PAR y el efecto observado tras la administración de la mayor dosis estudiada: 480 µmol/kg. En la figura también se observa la intensidad (N), forma y duración de la estimulación mecánica así como los 16 estímulos eléctricos. La administración i.v. de PAR no modificó ninguna de las respuestas nociceptivas en los animales normales (A), sin embargo, sí inhibió intensamente las respuestas a estimulación mecánica nociva, aunque no el wind-up, en los animales pretratados con ATRA (B). En esta figura también se muestran las espigas originales obtenidas durante un ciclo de estimulación (C). Cada ciclo tuvo una duración de tres minutos y consistió en 10 s de estimulación nociva mecánica (Est. Mecánica) y 16 pulsos eléctricos (Est. Eléctrica, las líneas verticales indican el momento de cada pulso). Los estímulos eléctricos indujeron el fenómeno de wind-up (D), con un aumento del número de respuestas de fibras C desde el pulso 1 al 16 (D, flechas). Sólo fueron contadas para el análisis del wind-up, las espigas obtenidas entre 150 y 650 ms después de cada pulso.

los dos últimos ciclos de estimulación (18-21 minutos) de cada dosis. Las respuestas del *wind-up* se han expresado como el número medio de espigas registradas por estímulo. Además, las respuestas del *wind-up* fueron analizadas como porcentaje del control, con el fin de cuantificar la magnitud de la inhibición inducida por los fármacos y comparar los efectos entre los diferentes grupos más fácilmente. Se utilizó un ANOVA de una vía con post test de Dunnett para la comparación entre la estimulación mecánica y el control, y para el análisis de las curvas de *wind-up*. Los datos se presentan como la media \pm e.e.m.

4. RESULTADOS

4.1. Experimentos de electrofisiología

4.1.1. Estimulación mecánica nociva

La administración de CAR en la articulación de la rodilla indujo un aumento significativo de la circunferencia de la misma, de 66 ± 0.6 mm antes de la inducción de la inflamación a 73 ± 1.3 mm después del experimento ($p < 0.001$). Como sucedió en estudios anteriores (Romero-Sandoval et al., 2004), no se observó una reducción significativa del nivel de inflamación tras la administración de ATRA, PAR o NOP. La media de espigas registradas en los ciclos control para estimulación mecánica fue de 359 ± 37 en animales normales, 305 ± 18 en animales con monoartritis, 336 ± 30 en animales normales tratados con ATRA y 340 ± 28 en animales con monoartritis tratados con ATRA. En la Figura V.1 se observan dos registros originales del efecto del PAR sobre UMAs activadas por estímulos nocivos mecánicos y eléctricos. El conjunto de los resultados del PAR sobre las respuestas a estimulación mecánica nociva se muestra en la Figura V.2. Trabajos anteriores en nuestro laboratorio (Romero-Sandoval et al., 2002), mostraron que la administración i.v. de PAR en animales normales no producía una reducción en las respuestas nociceptivas. De nuevo obtuvimos el mismo resultado, incluso se observó con algunas dosis, un pequeño aumento de la amplitud de las respuestas que fue independiente de la dosis (Figura V.2). Sin embargo, en los animales normales pretratados con ATRA, el PAR redujo la actividad nociceptiva evocada por estimulación nociva mecánica de forma dosis-dependiente, con una DME de $30 \mu\text{mol/kg}$, una DE_{50} de $305\pm 4 \mu\text{mol/kg}$ (47 mg/kg), y un efecto máximo de $35\pm 9 \%$ del control ($p < 0.01$).

Efecto del paracetamol sobre las respuestas a estimulación nociva mecánica

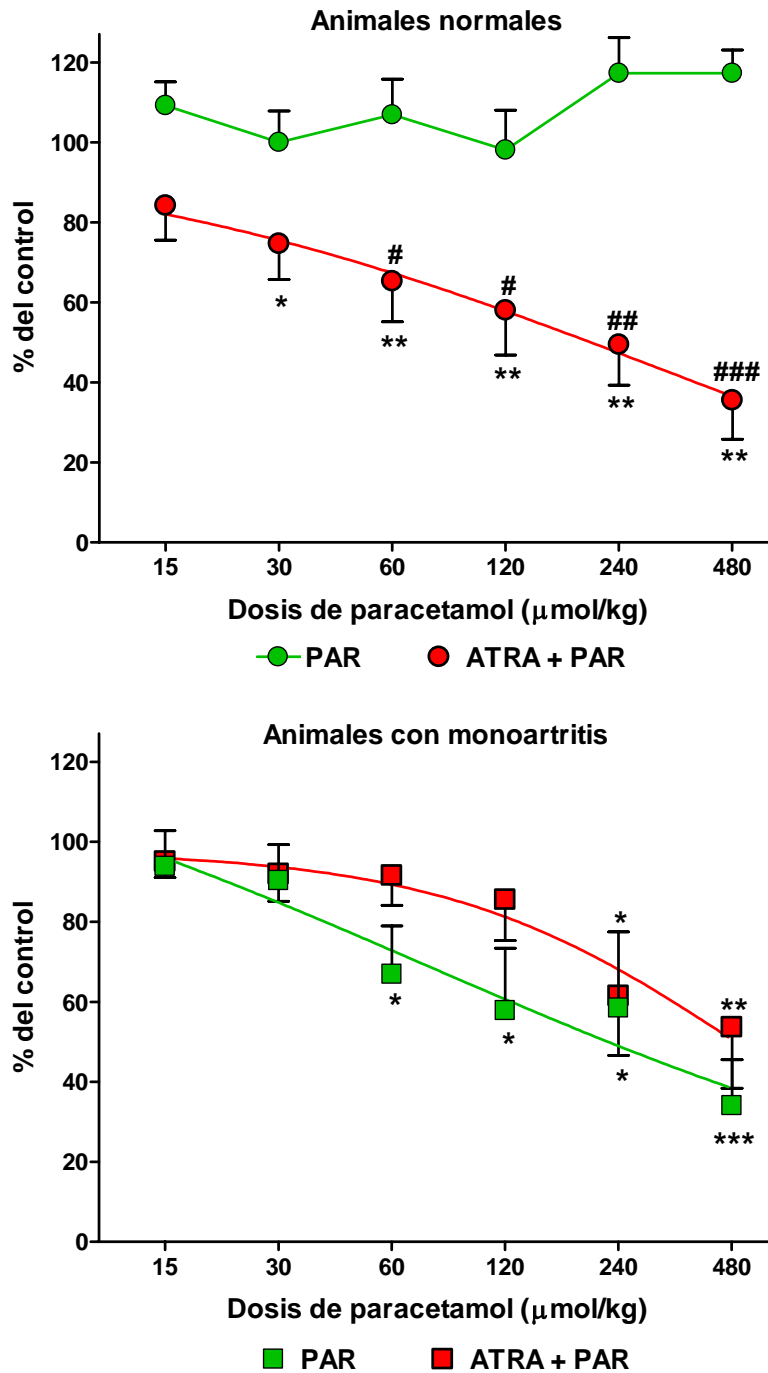


Figura V.2.- Efecto del PAR sobre las respuestas de UMAs evocadas por estimulación mecánica nociva en ratas normales y con monoartritis.- La administración de PAR no indujo ningún efecto significativo en animales normales. Por el contrario, en los animales normales tratados con ATRA, el PAR fue muy efectivo (gráfico superior). En las ratas con monoartritis (gráfico inferior), el PAR redujo de forma dosis-dependiente las respuestas nociceptivas, tanto en ausencia como en presencia de ATRA (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparación vs. repuestas control; siendo el control la media de las tres repuestas previas a la primera dosis de cada fármaco; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$, comparación con el efecto en ausencia de ATRA, comparación estadística mediante un ANOVA de una vía con post test de Dunnett).

Las diferencias observadas entre el efecto del PAR en animales normales tratados con ATRA o sin tratamiento fueron significativas con las dosis de 60 a 480 $\mu\text{mol/kg}$ (Fig. V.2). La administración de PAR en animales normales tratados con ATRA fue tan efectiva como el PAR solo en animales con monoartritis (Figura V.2). En este caso, la DME fue de 60 $\mu\text{mol/kg}$, la DE_{50} fue de 472 ± 2 $\mu\text{mol/kg}$ (72 mg/kg), y la máxima reducción de las respuestas observada fue de un 34 ± 11 % de las respuestas control ($p<0.001$) con la dosis más alta estudiada. El efecto del PAR en los animales con monoartritis pretratados con ATRA fue similar al observado en ausencia de ATRA (Figura V.2).

La administración i.v. de NOP redujo de forma dosis-dependiente la actividad evocada por estimulación nociva mecánica en animales normales y con monoartritis, lo cual ya había sido observado en experimentos anteriores (Romero-Sandoval et al., 2002, 2003; Figura V.3). El efecto antinociceptivo del NOP fue, no obstante, más intenso en animales normales pretratados con ATRA (Figura V.3). La DE_{50} fue de 147 ± 2 $\mu\text{mol/kg}$ vs. 46 ± 2 $\mu\text{mol/kg}$ (41 vs. 13 mg/kg; Figura 3; $p<0.001$). El NOP fue un eficaz agente antinociceptivo en animales con monoartritis (Figura V.3), con un efecto similar al observado previamente (Romero-Sandoval et al., 2003). Sin embargo, no se produjo un aumento de su acción analgésica con la administración oral de ATRA (DE_{50} : 327 ± 2 vs. 470 ± 3 $\mu\text{mol/kg}$; Figura V.3).

Al igual que en los experimentos anteriores (Romero-Sandoval et al., 2002 y 2003), se estudiaron los efectos de dosis equivalentes del vehículo utilizado para disolver el PAR y el NOP en ratas normales ($n=6$) y con monoartritis ($n=6$), sin que se observara una reducción de las respuestas nociceptivas en ningún caso.

4.1.2. Estimulación eléctrica: *wind-up*

Todas las unidades estudiadas mostraron un incremento progresivo del número de espigas con la estimulación eléctrica (Figura V.1). El *wind-up* no sufrió ninguna modificación con la administración de PAR en animales normales (Figura V.4). El pretratamiento con ATRA indujo un ligero aumento del efecto del PAR sobre el *wind-up* (Figura V.4), aunque este efecto no fue ni significativo ni dosis-dependiente. En las ratas con monoartritis (Figura V.5), el PAR siempre careció de efecto sobre el *wind-up*, tanto en ausencia como en presencia de ATRA. No se observó, ni en ratas normales ni en ratas con monoartritis una reducción significativa del *wind-up* después de la administración de cantidades equivalentes del disolvente.

Efecto del nitroacetamol sobre las respuestas a estimulación nociva mecánica

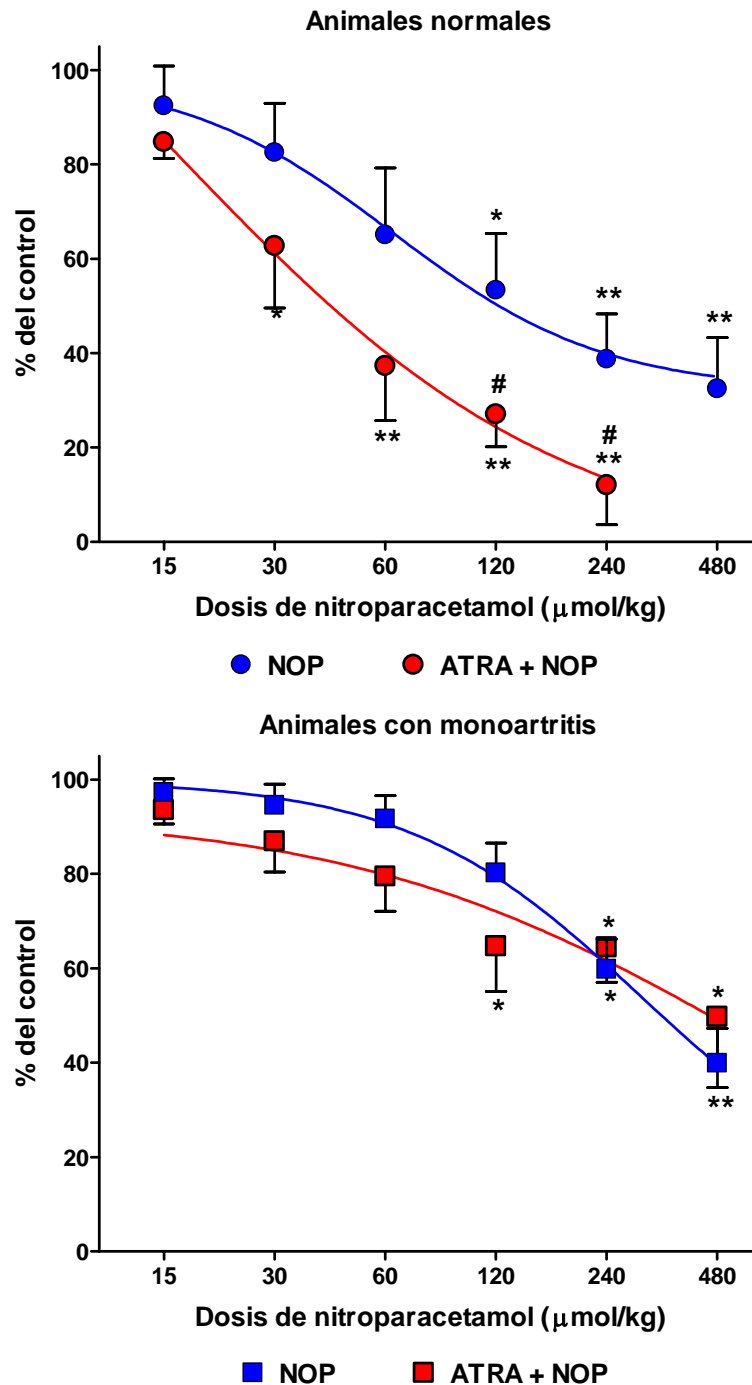


Figura V.3.- Efecto de NOP sobre las respuestas de UMAs evocadas por estimulación mecánica nociva en ratas normales y con monoartritis.- En animales normales, la administración de NOP indujo una reducción significativa y dosis-dependiente de las respuestas nociceptivas, tanto en ausencia como con el pretratamiento con ATRA. Sin embargo, el efecto del NOP fue tres veces más potente en los animales tratados con ATRA (gráfico superior). Como en el caso del PAR, el efecto del NOP no varió con el pretratamiento con ATRA en las ratas con monoartritis (gráfico inferior; igual comparación estadística que en la Figura V.2.).

Al contrario que el PAR, el NOP redujo de forma dosis-dependiente el *wind-up* en los animales normales, como ya habíamos visto en estudios previos (Romero-Sandoval et al., 2002), con un efecto máximo de $46\pm 1\%$, con la dosis de $480\ \mu\text{mol/kg}$ ($p < 0.001$). En los animales normales pretratados con ATRA, el NOP indujo una reducción más fuerte del *wind-up*, con una DME de $120\ \mu\text{mol/kg}$ (Figura V.4). En este caso, el efecto observado con la dosis de $240\ \mu\text{mol/kg}$ fue del $33\pm 3\%$ del control, significativamente más intensa que la producida con la misma dosis en ausencia de ATRA ($p < 0.001$; Figura V.4). En los animales con monoartritis, (Figura V.5), el NOP disminuyó el *wind-up* de forma parecida a como lo hizo en los animales normales. En este caso, el pretratamiento con ATRA no modificó la intensidad del efecto (Figura V.5).

5. DISCUSIÓN

La principal observación realizada en este estudio es la mejora del efecto antinociceptivo del PAR y del NOP en animales sin inflamación tratados con ATRA p.o. Esta es la primera ocasión en la que se describe un efecto antinociceptivo del PAR en ausencia de sensibilización debida a inflamación, y parece ser consecuencia del tratamiento con ATRA.

La importancia de los retinoides en el desarrollo del cerebro y la médula espinal ha sido puesta de relieve en estudios previos (Solomin et al., 1998; Duester et al., 2003). Los retinoides también están presentes en el sistema nervioso central de ratas adultas y se les ha relacionado con funciones como el aprendizaje espacial y la memoria (Misner et al., 2001). Por otra parte, se han hallado niveles relativamente altos de AR en la médula espinal de ratas adultas (Werner y Deluca, 2002), aunque el efecto de los retinoides en la médula espinal del animal adulto, no es bien conocido. En la médula espinal humana y de ratones, el AR estimula la maduración de las neuronas (Corcoran et al., 2002), una acción que ha sido relacionada con las neurotrofinas (McCaffery y Drager, 2000), citocinas (Mey, 2001) u otros factores de crecimiento. Además, se ha sugerido que el AR podría tener un efecto protector en las lesiones medulares de rata, mediante una migración activa de células capaces de sintetizar AR desde la aracnoides hasta la zona dañada (Mey et al., 2005). La acción del AR durante la inflamación ha sido relacionada con la generación de NO (Seguin-Devaux et al., 2002), PGs en plasma e hígado (Devaux et al., 2001) y la modulación de la expresión de COX 1 (Nusing et al., 1995) y COX 2 (Kanekura et al., 2000; Li et al., 2002) en cultivos celulares.

Efecto del paracetamol y nitroparacetamol sobre el wind-up

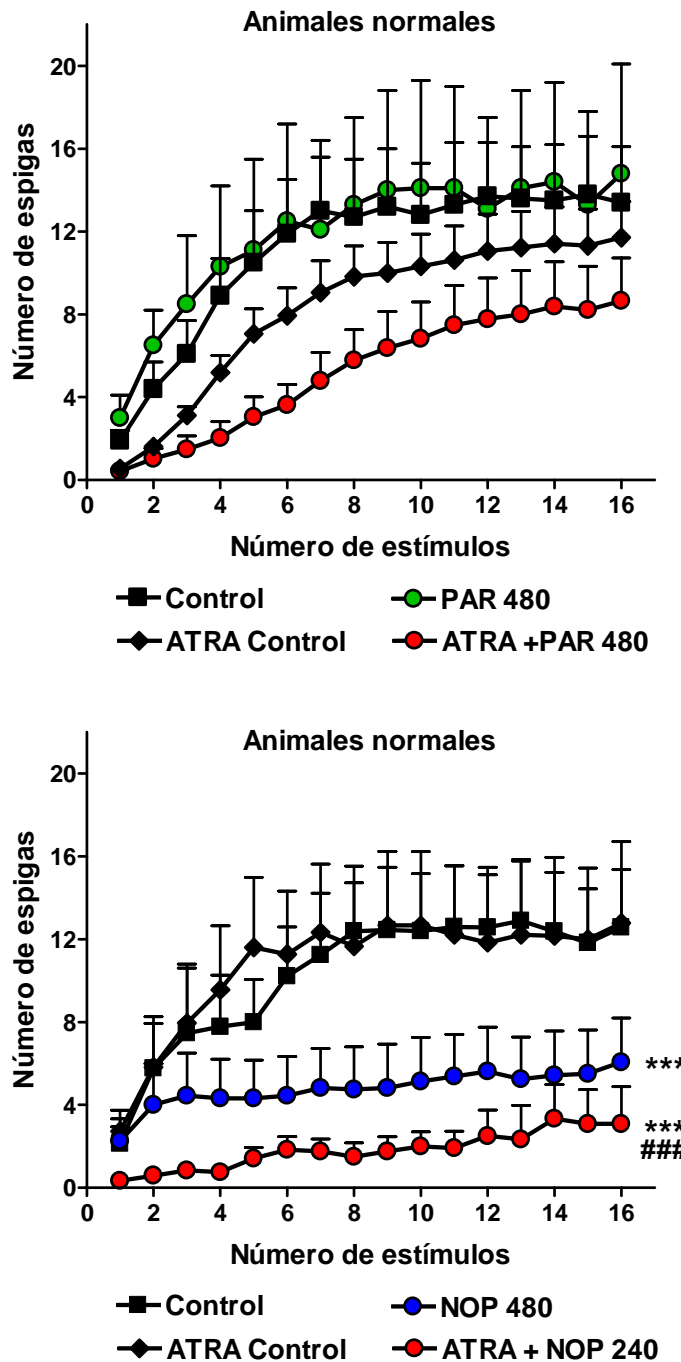


Figura V.4.- Efecto del PAR y del NOP sobre las respuestas del wind-up en animales normales.- La administración de PAR no modificó el fenómeno de wind-up en animales normales, tanto en ausencia como en presencia de ATRA. Sin embargo, aunque el NOP fue efectivo en la reducción del wind-up, el efecto fue más potente en los animales tratados con ATRA. La figura sólo muestra el efecto observado con la dosis más alta estudiada (480 $\mu\text{mol/kg}$) excepto en el caso del NOP en presencia de ATRA (gráfico inferior). En estas condiciones, una dosis de 240 $\mu\text{mol/kg}$ produjo un efecto mayor que la dosis de 480 $\mu\text{mol/kg}$ de NOP en ausencia de ATRA. (Misma comparación estadística que para la Figura V.2.).

Efecto del paracetamol y nitroparacetamol sobre el wind-up

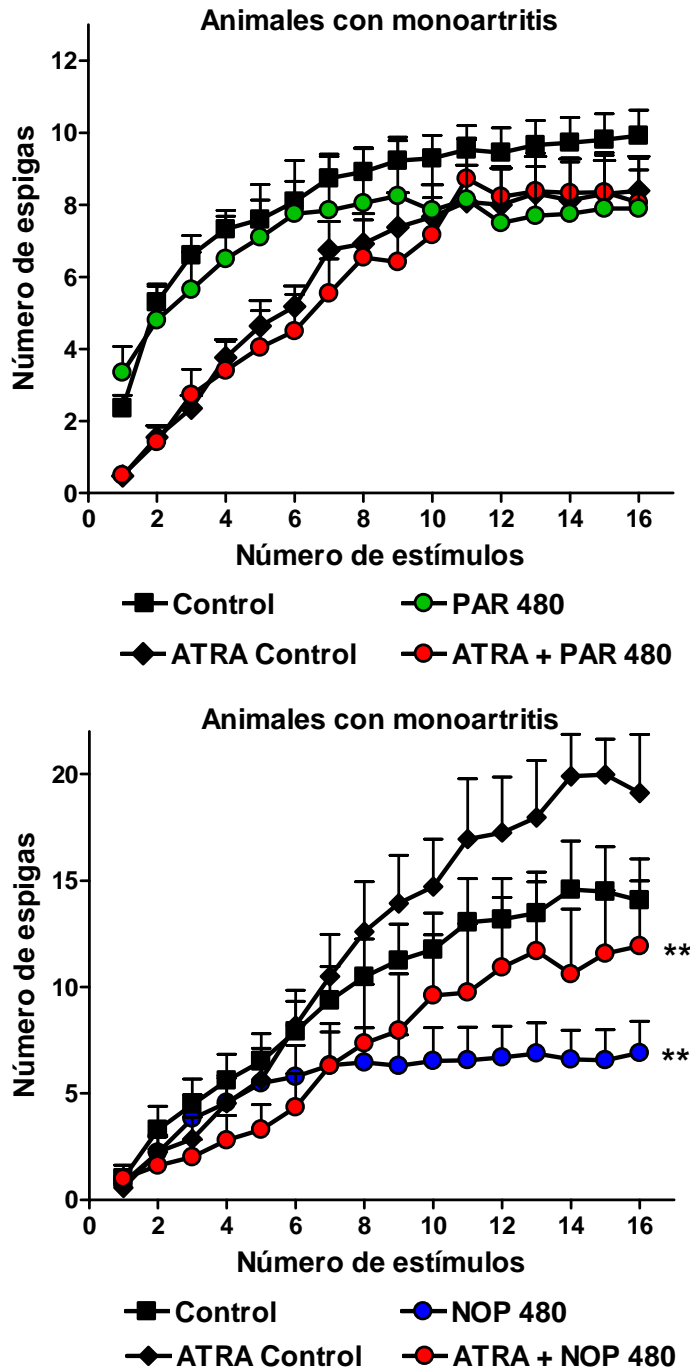


Figura V.5.- Efecto del PAR y del NOP sobre las respuestas del wind-up en animales con monoartritis.- Como en los animales normales, la administración de PAR no modificó el fenómeno de wind-up, tanto en ausencia como en presencia de ATRA. El NOP fue efectivo en la reducción del wind-up, pero, en este caso, el pretratamiento con ATRA no modificó la intensidad del efecto. (Misma comparación estadística que para la Figura V.2.).

En nuestro laboratorio hemos demostrado que el ATRA está también relacionado con la expresión de COX en la médula espinal de rata (Romero-Sandoval et al., 2004). Esto podría sugerir que el AR está directamente implicado en algunos aspectos de la respuesta inflamatoria, como la regulación de la expresión de COX, tanto en tejido periférico como en el sistema nervioso central.

Los resultados obtenidos en el presente estudio respecto a las respuestas frente a estimulación mecánica (natural) nociva, indican que, en animales normales tratados con ATRA, el PAR es tan eficaz como en animales con monoartritis sin tratar con ATRA. Asimismo, el efecto del NOP es más intenso tras el tratamiento con ATRA en animales normales. Ciertamente, es muy difícil establecer el mecanismo de acción del ATRA a partir de estos experimentos, pero como antes se dijo, la administración de ATRA p.o. aumenta la expresión de COX, principalmente de COX 2, y por tanto, aumenta la cantidad del sustrato sobre el que realizan su acción el PAR y otros inhibidores de COX (Flower y Vane, 1972). Esta es la razón que explicaría porqué la mayoría de los AINEs son mejores analgésicos en situación de inflamación que en dolor agudo (Collier y Schneider, 1972).

Por tanto, es probable que la administración de ATRA pudiera mejorar la efectividad de algunos inhibidores de COX como PAR o NOP en dolor agudo, mediante el aumento de la expresión de COX. De hecho, aunque generalmente se ha aceptado que el PAR es un inhibidor débil de PGs, recientes estudios han demostrado que el mecanismo de acción del PAR es precisamente la inhibición de la producción de PGs a través del bloqueo de COX 2 y/o de la variante sensible a PAR de COX 2 (Simmons et al., 1999; Graham y Scott 2005; Kis et al., 2005a y b). Esta evidencia apoya nuestra hipótesis. Sin embargo, la mejora de la actividad analgésica de PAR y NOP observada en los animales tratados con ATRA sólo fue observada en ratas normales, pero no en las que se indujo la monoartritis. De hecho, la potencia del PAR en los animales con monoartritis tratados con ATRA y la del NOP en esos animales, con o sin ATRA, fueron menores. Aunque se necesitarán nuevos experimentos para explicar esta situación, parece lógico pensar que si una sobreexpresión de COX fuera la causa de la mejora del efecto farmacológico de PAR y NOP, ya no sería posible una mayor potenciación de este efecto, puesto que la expresión de COX ya está aumentada en los animales con la articulación inflamada. Por otra parte, puesto que esta menor potencia se observó tanto en presencia como en ausencia de ATRA, se puede deducir que se trata de un efecto independiente de ATRA, que podría atribuirse a una acción depresora más débil de estos fármacos, debido al alto grado de excitabilidad de las

neuronas de la médula espinal durante la hiperalgesia. Este menor efecto sobre las ratas con hiperalgesia ha sido previamente descrito con NOP (Romero-Sandoval et al., 2002).

También es importante destacar que, aunque el efecto del PAR en presencia de ATRA tendió a producir una disminución del *wind-up*, dicho efecto no fue nunca dosis-dependiente ni significativo. De hecho, con anterioridad habíamos observado en experimentos similares, que el PAR no modificaba el fenómeno de *wind-up*, mientras que otros inhibidores de COX sí lo hacían (Romero-Sandoval et al., 2002). Finalmente, parece lógico concluir que el pretratamiento con ATRA puede mejorar algunos efectos de un fármaco, pero no inducir nuevas acciones. Así, el NOP resultó muy eficaz en la reducción del *wind-up* (como se observó en Romero-Sandoval et al., 2002) y en los presentes experimentos, el pretratamiento con ATRA mejoró significativamente el efecto del NOP. El *wind-up* es un fenómeno mediado por las neuronas nociceptivas de la médula espinal, en el que participan receptores de glutamato y taquicinina. La reducción del *wind-up* indica una acción a un nivel superior al de los nociceptores periféricos, sobre cualquiera de los sistemas implicados en su generación (Herrero et al., 2000), aunque una reducción de señales periféricas que llegan a la médula pueden también cambiar la forma de la curva de *wind-up* (Herrero et al., 2000). Se ha logrado una reducción del *wind-up* con otros inhibidores de COX, como metamizol (Mazarío y Herrero, 1999) o indometacina (Willingale et al., 1997), presumiblemente gracias a una acción en la médula espinal. La acción central de los inhibidores de COX está bien documentada (Vanegas y Schaible, 2001) e incluye al PAR (Flower y Vane, 1972; Pelissier et al., 1995; Pini et al., 1997). Puesto que el *wind-up* está mediado a nivel central, y no observamos ningún cambio en la forma de la curva (Herrero et al., 2000), la mejora de la reducción del *wind-up* producida por NOP en animales normales tratados con ATRA, sugiere una acción del ATRA en lugares centrales, presumiblemente en la médula espinal, más que en la periferia. No obstante, el efecto periférico del ATRA ha sido bien descrito en tejidos periféricos con inflamación (ver la introducción de este capítulo), por lo que no puede rechazarse una acción cerca del nociceptor. Por otro lado, en este estudio, los estímulos nocivos fueron aplicados en tejidos sanos (habitualmente en el primer dedo de la pata, ver sección de materiales y métodos) y alejados de la articulación inflamada. Una disminución de las respuestas nociceptivas de la médula espinal, evocadas por estimulación del dedo, no puede ser, por tanto, consecuencia de una reducción de la hiperexcitabilidad, inducida por la inflamación, de los nociceptores. Esta idea se sustenta en el hecho de que no se

observase en ningún caso, ya se tratase de ATRA, PAR o NOP, una variación en la intensidad de la inflamación.

6 CONCLUSIONES

- 1.- El tratamiento oral con ATRA en ratas induce una actividad antinociceptiva del PAR en animales normales, similar a la observada en inflamación, y mejora la actividad antinociceptiva del NOP también en animales normales.

- 2.- La mejora de la actividad analgésica del PAR y del NOP en dolor agudo, tras el tratamiento con ATRA, no se observa en situación de hiperalgesia inducida por inflamación.

- 3.- Los resultados sugieren una acción del ATRA localizada preferentemente en la médula espinal. Un efecto periférico no puede ser, sin embargo, descartado.

- 4.- Estos datos describen por vez primera, la implicación del ATRA, un metabolito activo de la vitamina A, en el procesamiento de la información nociceptiva y en la acción analgésica de algunos fármacos como PAR y NOP.

**CAPITULO VI: ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ANTINOCICEPTIVA DEL
ÁCIDO RETINOICO CON EL S-KETOPROFENO, EL FENTANILO Y LA
MEDETOMIDINA.**

1. OBJETIVOS

- 1) Estudiar la actividad analgésica del S-KET en presencia y ausencia de ATRA administrado p.o. en animales sin inflamación.
- 2) Estudiar la actividad analgésica del FEN en presencia y ausencia de ATRA administrado p.o. en animales sin inflamación.
- 3) Comparar la efectividad analgésica de la MED y de su combinación con dosis subefectivas de NOP en presencia y ausencia de ATRA administrado p.o. en animales normales e inflamados.

2. INTRODUCCIÓN

Sabemos que el mecanismo de acción de los AINEs consiste en inhibir las COX y así, impedir la formación de PGs (Vane, 1971). En situación de inflamación, la síntesis de PGs aumenta y los AINEs disponen de un sustrato sobre el que actuar, siendo entonces analgésicos efectivos en el dolor inflamatorio, pero no en el dolor agudo. Aunque este grupo de fármacos presentan un mecanismo de acción similar, se trata de compuestos muy heterogéneos, con diferentes estructuras moleculares y propiedades químicas. La estructura molecular del AINE determina el grado de absorción y penetración en el SNC y, por tanto, influye decisivamente sobre el lugar en el que tienen lugar sus efectos antinociceptivos y antiinflamatorios. Uno de los AINEs más empleados en clínica es el S-KET, fármaco del grupo de los ácidos 2-aril-propiónicos (Brune et al., 1992), capaz de atravesar rápidamente la barrera hemato-encefálica (Netter et al., 1985) y que tiene efectos antinociceptivos en diferentes modelos de dolor (McCormack, 1994; Hummel et al., 1995). El S-KET ha mostrado ser efectivo en la reducción de los reflejos nociceptivos de la médula espinal activados por estimulación mecánica y eléctrica en animales con inflamación (Herrero et al., 1997).

En el capítulo anterior observamos que el tratamiento oral con ATRA en ratas indujo una actividad antinociceptiva del PAR en animales normales, similar a la observada en inflamación. Esta mejora de la actividad analgésica del PAR en dolor agudo, tras el tratamiento con ATRA, no se observó en situación de hiperalgesia inducida por inflamación. Es probable que la administración de ATRA mejore, mediante el aumento de la expresión de COX, la efectividad de algunos inhibidores de COX, como el PAR, en dolor agudo. En base a estas observaciones, nos planteamos estudiar el efecto antinociceptivo del S-KET, un inhibidor más selectivo de COX que el PAR, en ratas normales y en ratas normales tratadas con ATRA p.o. El efecto del S-KET se valoró vía i.v. mediante la técnica del registro de UMAs, comparando los resultados obtenidos con animales control tratados p.o. con el vehículo del ATRA.

Por otra parte, también tratamos de averiguar si el ATRA, al igual que ocurría en los inhibidores de las COX, podría modular la acción de otros elementos implicados en procesamiento de la información nociceptiva, tales como el sistema α_2 -adrenérgico o el sistema opioide. Estos experimentos podrían aportar nuevas evidencias sobre la

participación del ATRA en la nocicepción y permitir el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento del dolor.

Por lo tanto, estudiamos la influencia del pretratamiento con ATRA en el efecto analgésico del agonista α_2 -adrenérgico MED y del FEN, un agonista de los receptores μ -opioides. En el caso de la MED, comparamos la influencia del ATRA en situación de normalidad e inflamación. Ya habíamos observado una potenciación de la duración e intensidad del efecto de la MED al ser administrada junto con dosis subefectivas de NOP (Capítulo II). Asimismo, habíamos comprobamos que el tratamiento con ATRA mejoraba la actividad antinociceptiva del NOP en animales normales, pero no en condiciones de inflamación (Capítulo V). Por ello, estudiamos el efecto conjunto de MED y NOP en un único grupo de animales con inflamación y pretratados con ATRA. La MED y el FEN siguieron el mismo protocolo de administración del ATRA y la misma valoración de su efecto, mediante la técnica de registro de UMAs, que los utilizados para el S-KET.

3. MÉTODOS

3.1. Experimentos de electrofisiología

3.1.1. Animales y preparaciones

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas con pesos comprendidos entre 260-322 g divididos en 7 grupos experimentales: animales normales a los que se les administró S-KET tras un tratamiento con ATRA (n=6) o vehículo (n=8); animales normales tratados con FEN, tras un pretratamiento con ATRA (n=7) o vehículo (n=3), y animales pretratados con ATRA en los que se administró sólo MED en condiciones de normalidad (n=6) e inflamación (n=4), o MED y NOP en situación de inflamación (n=3).

Tras la cirugía preparatoria, se procedió al registro del reflejo de retirada como UMAs, descrito en detalle en la sección de Materiales y Métodos. La inflamación del tejido blando en las ratas de los dos grupos tratados con MED, fue inducida 20 horas antes del comienzo del registro de las UMAs en las condiciones descritas en la sección de Materiales y Métodos. El nivel de inflamación se evaluó midiendo el volumen de las patas mediante pletismometría (Letica, Panlab) antes de la administración de CAR y al finalizar el experimento.

3.1.2. Fármacos y Análisis de datos

El ATRA (Sigma) fue suspendido en CMC (Sigma) y administrado p.o. en un volumen final de 0.5 ml. Una misma cantidad de CMC se administró a los animales del grupo control. El tratamiento con ATRA o vehículo p.o. se mantuvo durante 4 días y consistió en una dosis de 15 mg/kg los dos primeros días y una dosis de 10 mg/kg los siguientes 2 días. Los experimentos se realizaron el cuarto día de tratamiento. El S-KET (Nicox) se disolvió en DMSO (Sigma) y PEG 300 (1:1, Panreac) en una concentración de 10 mM. Fue administrado i.v. en un volumen total de 0.5 ml en salino en dosis acumulativas de forma logarítmica en base 2 cada 7 ciclos de estimulación (21 minutos). La dosis inicial fue de 0.1 $\mu\text{mol/kg}$, siendo la última dosis empleada de 6.4 $\mu\text{mol/kg}$. El FEN (Sigma) se disolvió en suero salino en una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Se utilizaron dosis acumulativas desde 1 a 32 $\mu\text{g/kg}$ de forma logarítmica en base 2 cada 2 ciclos de estimulación (6 minutos). Las dosis fueron administradas en un volumen total de 0.5 ml en salino por vía i.v. La MED (Pfizer) fue disuelta en salino en concentraciones de 1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$ y administrada i.v. en dosis de 0.3 a 9.6 $\mu\text{g/kg}$, en un volumen total de 0.3 ml en salino, cada 2 ciclos de estimulación. El NOP (Nicox) se disolvió en DMSO y PEG 300 en una concentración de 50 mM y fue administrado i.v. diluido en salino. Las dosis empleadas fueron de 15 $\mu\text{mol/kg}$ y 30 $\mu\text{mol/kg}$, de forma que se nunca se redujeron las respuestas control en más de un 80 %. Al igual que el S-KET, el NOP fue administrado i.v. cada 7 ciclos de estimulación.

Los datos para la estimulación mecánica se han expresado como porcentaje del control, siendo el control la media de los tres ciclos previos a la administración de la primera dosis. Solamente se utilizaron para el análisis los datos correspondientes a los dos únicos (3-6 minutos, FEN y MED) o los dos últimos (18-21 minutos, S-KET y NOP) ciclos de estimulación de cada dosis. Las respuestas de *wind-up* fueron expresadas como el número medio de espigas registradas por estímulo y como porcentaje del control, con el fin comparar los efectos entre los diferentes grupos más fácilmente. Los datos se presentan como la media \pm e.e.m. La significación estadística se calculó mediante un ANOVA de una vía con post test de Dunnett.

4. RESULTADOS

4.1. Influencia del ATRA en el efecto antinociceptivo del S-KET

4.1.1. Estimulación mecánica nociva

La administración i.v. de S-KET en animales normales, no produjo una reducción en las respuestas nociceptivas a estimulación mecánica nociva significativamente distinta en ausencia o presencia de ATRA (Figura VI.1). La media de espigas registradas en los ciclos control para estimulación mecánica fue de 303 ± 23 en animales normales tratados con ATRA y de 311 ± 23 en animales tratados con vehículo. Tanto en los animales normales pretratados con ATRA p.o., como en los que se administró CMC, el S-KET redujo la actividad nociceptiva evocada por estimulación nociva mecánica de forma dosis-dependiente, con una DE_{50} de 2.2 ± 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ en los animales tratados con ATRA y una DE_{50} de 1.7 ± 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ en los animales tratados con el vehículo. Estos resultados para el S-KET son similares a los observados con anterioridad en nuestro laboratorio (Gaitán et al., 2004). La reducción de las respuestas nociceptivas fue significativa desde la dosis de 1.6 $\mu\text{mol/kg}$ (0.41 mg/kg), tanto para el ATRA como para el vehículo. La dosis más alta empleada fue de 6.4 $\mu\text{mol/kg}$ (1.64 mg/kg) y redujo las respuestas hasta un $25 \pm 7\%$ del control en presencia de ATRA y hasta un $37 \pm 14\%$ de las respuestas control en ausencia de ATRA ($p < 0.01$ vs. control, Figura VI.1).

4.1.2. Estimulación eléctrica: *wind-up*

En los animales tratados con ATRA, el S-KET produjo una ligera disminución del *wind-up*, considerando el efecto de cada dosis como porcentaje del control. El control fue la media de la suma de las respuestas obtenidas en cada uno de los pulsos de la estimulación eléctrica (16 pulsos de 2 ms de duración, una frecuencia de 1 Hz y el doble de la intensidad umbral para aferencias de fibras C) en los tres ciclos previos a la administración de la primera dosis. Se observó una reducción significativa del *wind-up* desde la dosis de 1.6 $\mu\text{mol/kg}$ (0.41 mg/kg , $p < 0.05$), con un efecto máximo de disminución del *wind-up* del $61 \pm 9\%$ de las respuestas control con la dosis de 3.2 $\mu\text{mol/kg}$ (0.82 mg/kg , $p < 0.01$, Figura VI.2A). Sin embargo, si comparamos las curvas con las respuestas para cada dosis frente a la curva control, observamos que el S-KET careció de efecto sobre el *wind-up* en los animales con el pretratamiento con ATRA (Figura VI.2C).

Efecto del S-ketoprofeno sobre las respuestas a estimulación mecánica nociva en presencia y ausencia de ATRA

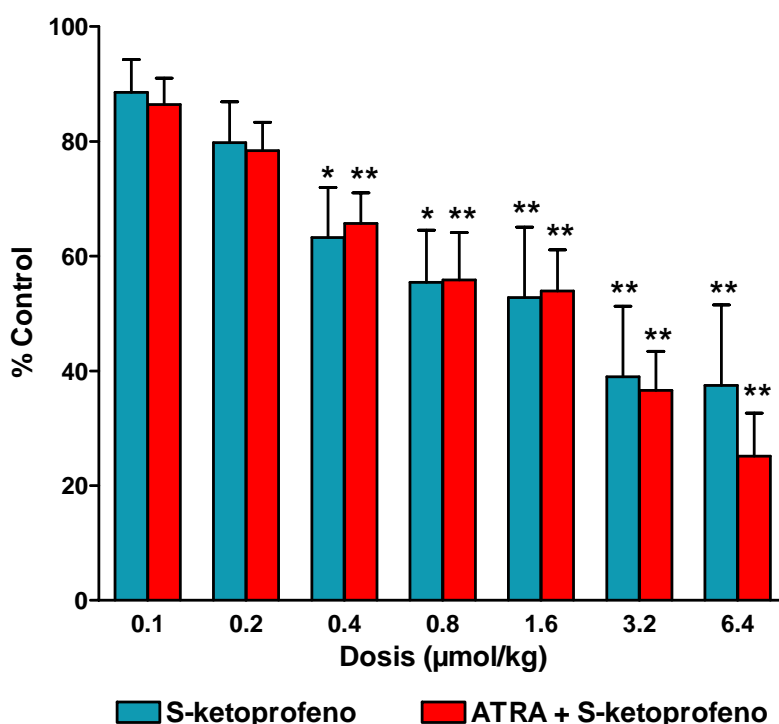


Figura VI.1.- Efecto del S-KET sobre las respuestas de UMAs evocadas por estimulación mecánica nociva en ratas normales.- Tanto en los animales tratados con ATRA como en los tratados con vehículo, el S-KET tuvo un efecto dosis-dependiente en la reducción de las respuestas nociceptivas. Sin embargo, no hubo una diferencia significativa en el efecto del S-KET entre los animales pretratados con ATRA o con vehículo (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparación vs. repuestas control; siendo el control la media de las tres respuestas previas a la primera dosis de cada fármaco, comparación estadística mediante un ANOVA de una vía con post test de Dunnett).

En los animales tratados con el vehículo del ATRA, el S-KET produjo una disminución del *wind-up*, expresado como porcentaje del control, que fue dosis-dependiente y un poco más intensa que la observada en los animales con ATRA. La reducción *wind-up* fue significativa desde la dosis de 1.6 μmol/kg (0.41 mg/kg, $p < 0.05$), con un efecto máximo de disminución del *wind-up* del $47 \pm 10\%$ de las respuestas control con la dosis de 3.2 μmol/kg (0.82 mg/kg, $p < 0.01$, Figura VI.2A). Además, al contrario de lo ocurrido en los animales pretratados con ATRA, en los animales tratados con el vehículo el S-KET también mostró un efecto inhibitorio dosis-dependiente en las curvas de *wind-up* (Figuras VI.2B y C). La DME fue de 0.8 μmol/kg (0.41 mg/kg, $p < 0.05$), y la máxima reducción de las respuestas se obtuvo con dosis mayor (6.4 μmol/kg, 1.64 mg/kg, $p < 0.01$, Figura VI.2B).

En cualquier caso, el pretratamiento con ATRA no indujo un aumento del efecto del S-KET sobre el *wind-up* respecto a los animales tratados con vehículo (Figura VI.2).

Efecto del S-ketoprofeno sobre el *wind-up* en animales normales tratados con ATRA o vehículo

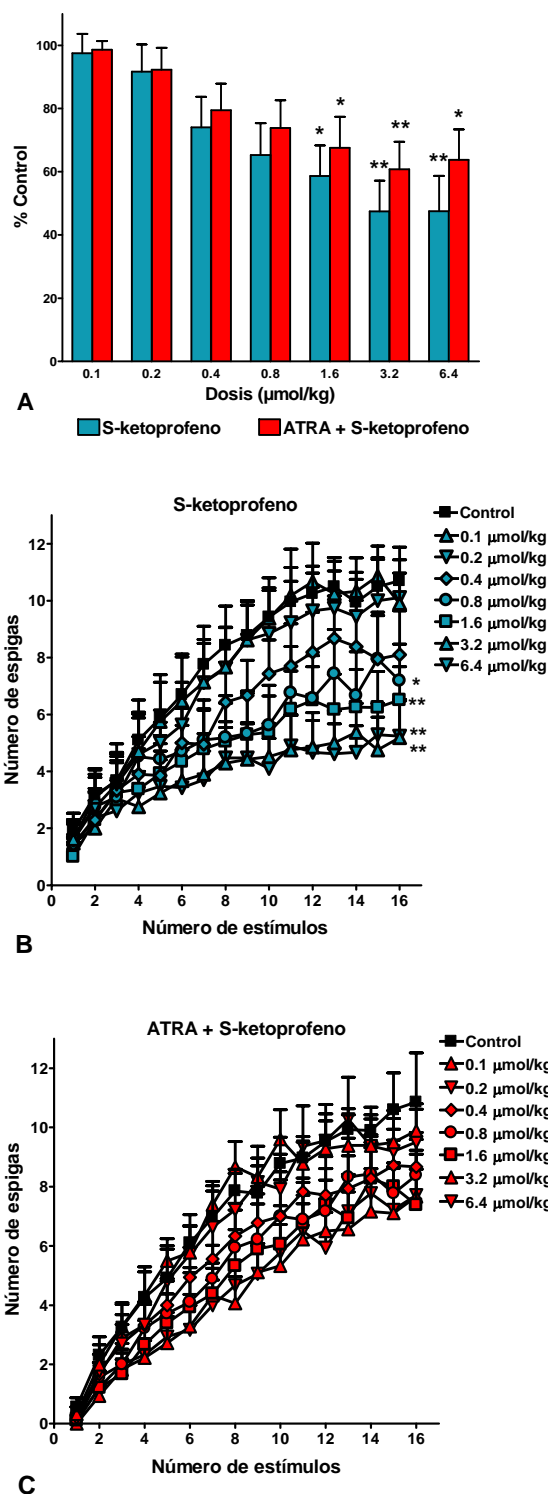


Figura VI.2.- Efecto del S-KET sobre las respuestas del *wind-up* en animales normales.- El S-KET produjo una inhibición del *wind-up* (expresado como porcentaje del control) muy similar y dosis-dependiente en animales tratados p.o. con ATRA o con vehículo (A). Sin embargo, el S-KET tuvo efecto significativo sobre el *wind-up* (expresado como curvas de dosis-respuesta) en las ratas control (B), pero no en los animales pretratados con ATRA (C). (Misma comparación estadística que para la Figura VI.1).

4.2. Influencia del ATRA en el efecto antinociceptivo del FEN

4.2.1. Estimulación mecánica nociva

El FEN administrado i.v. en animales normales, no produjo un efecto sobre las respuestas nociceptivas a estimulación mecánica nociva significativamente distinto en ausencia o presencia de ATRA (Figura VI.3). Tanto en los animales normales pretratados con ATRA p.o., como en los que administró el vehículo del ATRA, el FEN redujo la actividad nociceptiva evocada por estimulación nociva mecánica de forma dosis-dependiente, con una DE_{50} de 11.8 ± 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en los animales tratados con ATRA y una DE_{50} de 12.1 ± 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en los animales tratados con CMC. Estos resultados del FEN son similares a los observados con anterioridad en nuestro laboratorio para animales sin inflamación y sin tratamiento previo alguno (Gaitán et al., 2003, Gaitán y Herrero, 2002). En ambos grupos de animales, la DME fue de 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p < 0.01$), y la máxima reducción de las respuestas se obtuvo con la dosis de 32 $\mu\text{g}/\text{kg}$, con valores del $3.7 \pm 1.8\%$ del control en presencia de ATRA y del $4.8 \pm 1.8\%$ de las respuestas control en ausencia de ATRA ($p < 0.01$, Figura VI.3).

Efecto del Fentanilo sobre las respuestas a estimulación mecánica nociva en presencia y ausencia de ATRA

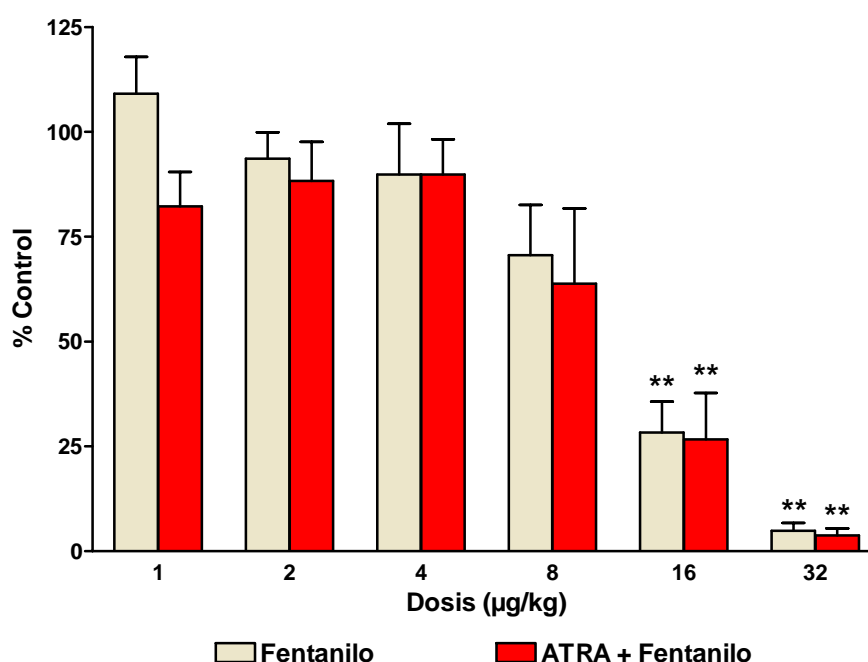


Figura VI.3.- Efecto del FEN sobre las respuestas de UMAs evocadas por estimulación mecánica nociva en ratas normales.- En los animales tratados con ATRA y en los controles, el FEN mostró un efecto dosis-dependiente en la reducción de las respuestas nociceptivas a estimulación mecánica. No obstante, la administración de FEN no indujo un efecto significativamente diferente entre ambos grupos de animales (Misma comparación estadística que para la Figura VI.1).

4.2.2. Estimulación eléctrica: *wind-up*

En los animales tratados con ATRA, el FEN indujo una disminución del *wind-up* similar a la observada en nuestro laboratorio en experimentos anteriores (Gaitán et al., 2003). Considerando el efecto de cada dosis como porcentaje del control, el FEN indujo una reducción significativa del *wind-up* en las dos últimas dosis empleadas, con una DME de 16 µg/kg ($p < 0.05$) y un efecto máximo de disminución del *wind-up* del $11.2 \pm 6.7\%$ de las respuestas control con la dosis de 32 µg/kg ($p < 0.01$, Figura VI.4A). Al representar el efecto del FEN como curvas de respuestas frente al número de estímulos, se observó de nuevo, un efecto máximo y significativo para la dosis de 32 µg/kg ($p < 0.01$, Figura VI.4C).

En los animales tratados con el vehículo del ATRA, el FEN disminuyó el *wind-up* con una intensidad muy similar a la del grupo del ATRA. La reducción *wind-up* fue significativa con la dosis de 32 µg/kg ($p < 0.01$, Figura VI.4A), con un efecto máximo de disminución del *wind-up* del $27 \pm 8.5\%$ de las respuestas control con la dosis de 32 µg/kg ($p < 0.01$, Figura VI.4A). El efecto del FEN en las curvas de respuestas frente al número de estímulos, se observó de nuevo, un efecto máximo y significativo para la dosis de 32 µg/kg ($p < 0.01$, Figura VI.4B).

Entre el grupo de ratas tratadas con ATRA y el de las tratadas con CMC, no se observó un efecto significativamente distinto del FEN sobre el *wind-up*. Por lo tanto, la presencia o ausencia del ATRA no supuso un factor diferenciador del efecto del FEN sobre el *wind-up* (Figura VI.4).

Efecto del Fentanilo sobre el *wind-up* en animales normales tratados con ATRA o vehículo

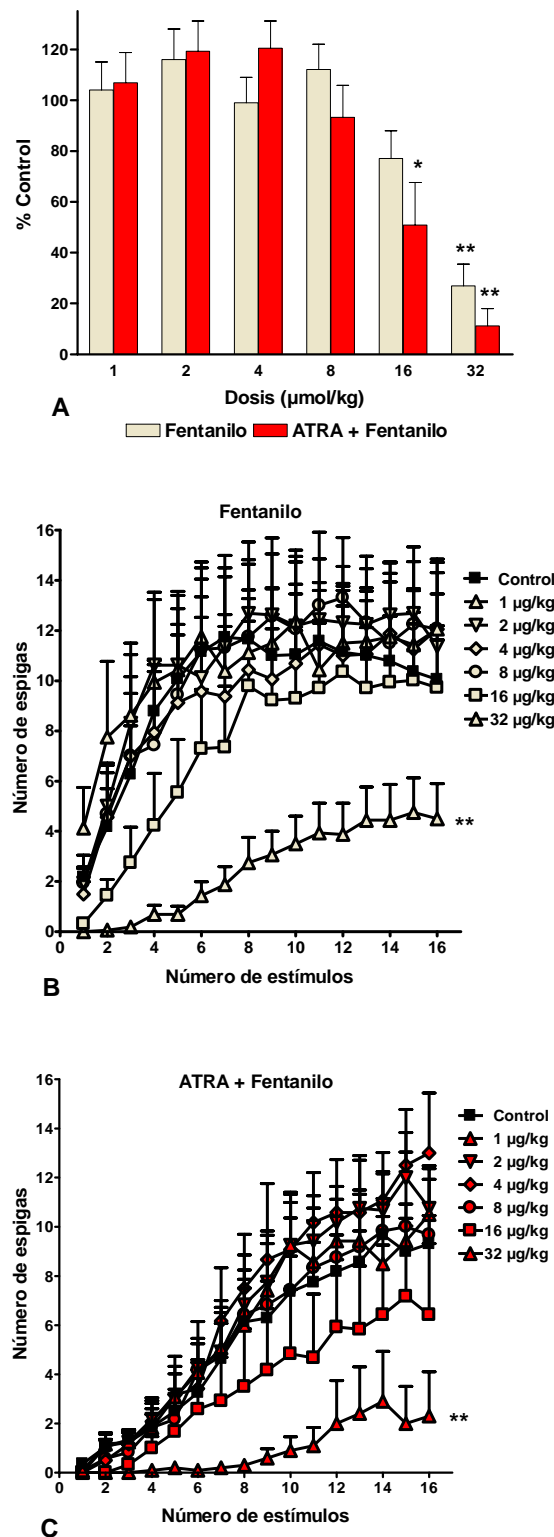


Figura VI.4.- Efecto del FEN sobre las respuestas del *wind-up* en animales normales.- El FEN inhibió el *wind-up* de forma muy similar en ratas tratadas con vehículo (A y B) o con ATRA (A y C), sin diferencias significativas entre ambos grupos. (Misma comparación estadística que para la Figura VI.1).

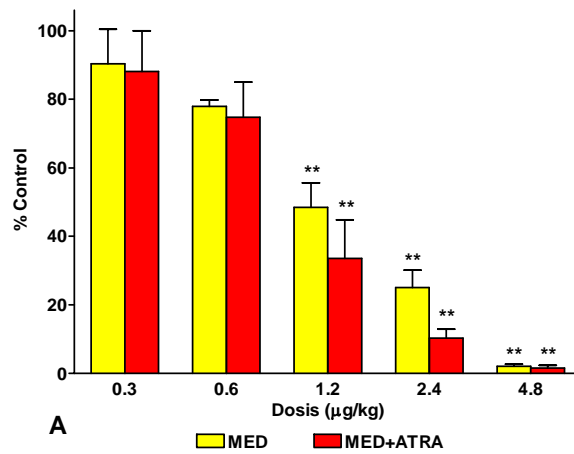
4.3. Influencia del ATRA en el efecto antinociceptivo de la MED

4.3.1. Estimulación mecánica nociva

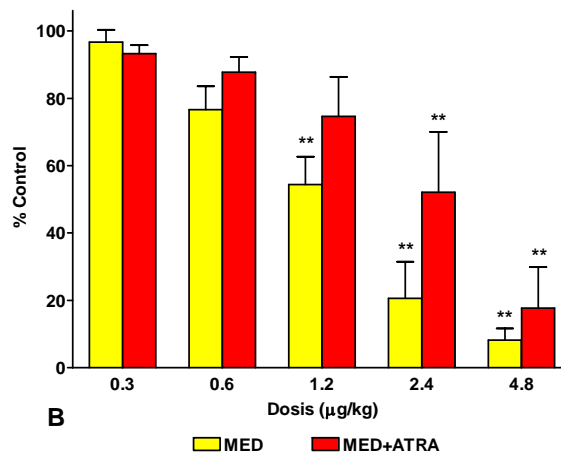
La media de espigas registradas en los ciclos control para estimulación mecánica fue de 330 ± 23 en animales normales tratados con ATRA y de 352 ± 31 en animales sin tratamiento. En los animales normales pretratados con ATRA p.o., la MED i.v. mostró un efecto dosis-dependiente en la reducción de las respuestas nociceptivas a estimulación mecánica nociva, con una DE_{50} de 0.98 ± 0.09 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La DME fue de 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p < 0.01$), consiguiendo una inhibición casi completa de las respuestas con la dosis de 4.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (1.5 ± 0.8 del control, $p < 0.01$, Figura VI.5A). Estos resultados fueron muy parecidos a los observados en animales sin tratamiento con ATRA, en experimentos realizados en nuestro laboratorio (DE_{50} de 1.18 ± 0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$, DME de 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p < 0.01$), y una inhibición de 2 ± 0.7 del control con la dosis de 4.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Molina y Herrero, 2006, Figura VI.5A). Por tanto, la administración de ATRA no supuso un aumento de la acción analgésica conocida de la MED sobre las respuestas a estimulación nociva mecánica.

En situación de inflamación, la media de espigas registrada para los controles fue 356 ± 38 en las ratas pretratadas con ATRA y de 309 ± 21 en las no tratadas. La administración i.v. de MED en animales con inflamación de tejido blando, produjo una reducción en las respuestas nociceptivas a estimulación mecánica nociva de diferente intensidad en ausencia o presencia de ATRA (Figura VI.5B). De hecho, aunque en las ratas con inflamación tratadas con ATRA, la MED tuvo un efecto inhibitorio de las respuestas mecánicas que fue dosis-dependiente, este efecto fue la mitad del observado en los animales sin tratamiento (DE_{50} de 2.3 ± 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en los animales tratados con ATRA vs. DE_{50} de 1.25 ± 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y todavía menor que el observado en los animales tratados con ATRA, pero sin inflamación (DE_{50} de 2.3 ± 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vs. DE_{50} de 0.98 ± 0.09 $\mu\text{g}/\text{kg}$). La reducción de las respuestas nociceptivas fue significativa a partir de la dosis de 2.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en las ratas con pretratamiento con ATRA (1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en las no tratadas), mientras que la dosis más alta empleada de 4.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ redujo las respuestas hasta un $18 \pm 12\%$ del control, frente a un $8 \pm 3.5\%$ de las respuestas control en ausencia de ATRA ($p < 0.01$ vs. control, Figura VI.5B). Así pues, en el caso de inflamación, la administración de ATRA no supuso un aumento de la efectividad analgésica de la MED, sino que incluso, disminuyó su capacidad de inhibición de las respuestas nociceptivas en relación con la eficacia mostrada en ausencia de ATRA o en situación de normalidad.

**Efecto de MED en presencia y ausencia de ATRA
(Animales normales, Estimulación mecánica)**



**Efecto de MED en presencia y ausencia de ATRA
(Animales con inflamación de tejido blando, Estimulación mecánica)**



**Efecto de MED y NOP en presencia y ausencia de ATRA
(Animales con inflamación de tejido blando, Estimulación mecánica)**

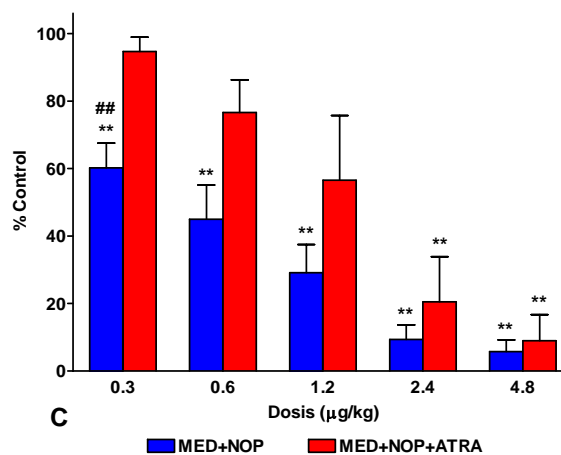


Figura VI.5.- Efecto de MED sobre las respuestas de UMAs evocadas por estimulación mecánica nociva en ratas normales.- En las ratas tratadas con ATRA, la MED mostró un efecto análogo al observado en ausencia de ATRA en condiciones de normalidad (A), o incluso inferior en condiciones de inflamación, ya fuera por si misma (B) o en combinación con NOP (C) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparación vs. control; ; ## $p < 0.01$ comparación MED+NOP vs. MED+NOP+ATRA mediante un ANOVA de una vía con post test de Dunnett).

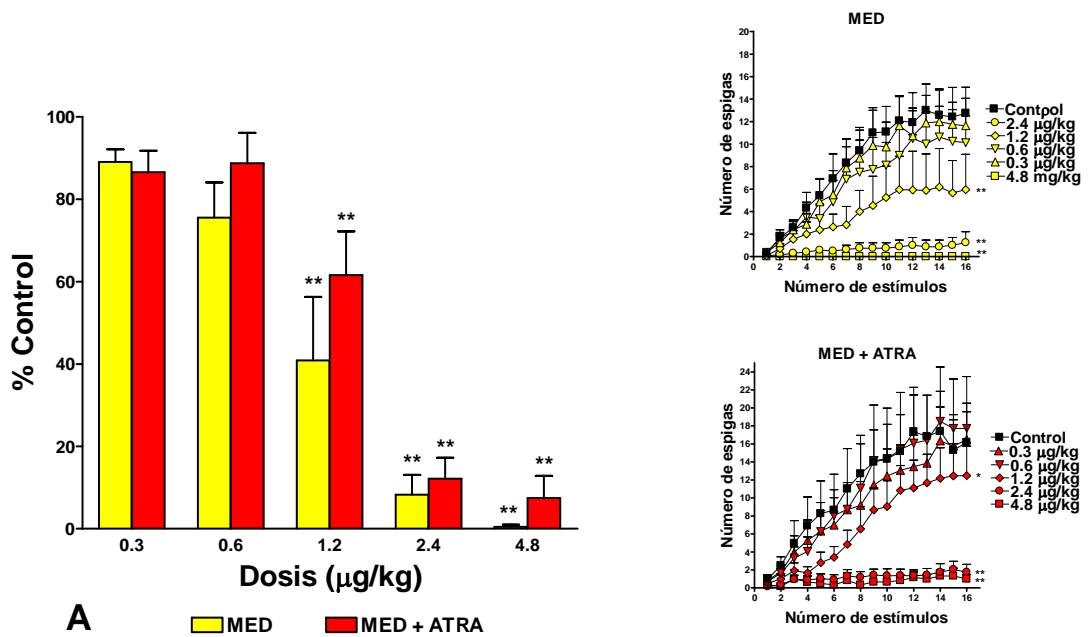
Por último, la administración i.v. de MED junto con dosis subefectivas de NOP, que mostró ser muy eficaz como combinación antinociceptiva en experimentos anteriores llevados a cabo en animales con inflamación de tejido blando (Capítulo II), no mostró una eficacia mayor con el pretratamiento con ATRA (Figura VI.5C). En realidad, la administración de ATRA p.o. redujo el efecto analgésico de la combinación de MED y el NOP, ya que la DE_{50} fue casi tres veces mayor (DE_{50} 1.29 ± 0.17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vs. DE_{50} de 0.47 ± 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en animales sin tratamiento) y la DME fue ocho veces mayor (2.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vs. 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $p < 0.01$). Sin embargo, la máxima reducción de las respuestas nociceptivas fue muy similar ($9 \pm 7.8\%$ del control, frente a un $5.8 \pm 3.5\%$ de las respuestas control en ausencia de ATRA) y se obtuvo en ambos casos con la dosis de 4.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p < 0.01$ vs. control, Figura VI.5C).

4.3.2. Estimulación eléctrica: *wind-up*

En los animales normales tratados con ATRA, la MED produjo una disminución del *wind-up* que fue dosis-dependiente con una DE_{50} de 1.37 ± 0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$, considerando el efecto de cada dosis como porcentaje del control. Al igual que para la estimulación mecánica, la DME fue de 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p < 0.01$), observándose una inhibición de un 7 ± 5 del total de las respuestas control con la dosis de 4.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p < 0.01$, Figura VI.6A). De nuevo estos resultados de la MED fueron muy parecidos a los observados en animales sin tratamiento con ATRA, en experimentos realizados en nuestro laboratorio (DE_{50} de 1.15 ± 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$, DME de 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $p < 0.01$, y una inhibición casi total del control con la dosis de 4.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Figura VI.6A). Esto implica que la administración de ATRA no influyó en la efectividad inhibitoria de la MED sobre las respuestas a estimulación eléctrica en animales normales, puesto que no existió diferencia significativa entre las dos condiciones estudiadas.

La MED administrada i.v. en animales con inflamación, redujo el *wind-up* con diferente intensidad en función de la ausencia o presencia de ATRA (Figura VI.6B). En las ratas con inflamación tratadas con ATRA, la MED mostró un efecto inhibitorio dosis-dependiente del *wind-up*. Sin embargo, igual que sucedió en las respuestas a estimulación mecánica, la efectividad de la MED fue casi la mitad de la observada en los animales sin tratamiento (DE_{50} de 2.26 ± 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en los animales tratados con ATRA vs. DE_{50} de 1.17 ± 0.12 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y que la observada en los animales tratados con ATRA, pero sin inflamación (DE_{50} de 2.26 ± 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vs. DE_{50} de 1.37 ± 0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$). La primera dosis capaz de reducir el *wind-up* de forma significativa fue de 2.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en las ratas con pretratamiento con ATRA, mientras que para las ratas no tratadas,

Efecto de MED en presencia y ausencia de ATRA
(Animales normales, *Wind-up*)



Efecto de MED en presencia y ausencia de ATRA
(Animales con inflamación, *Wind-up*)

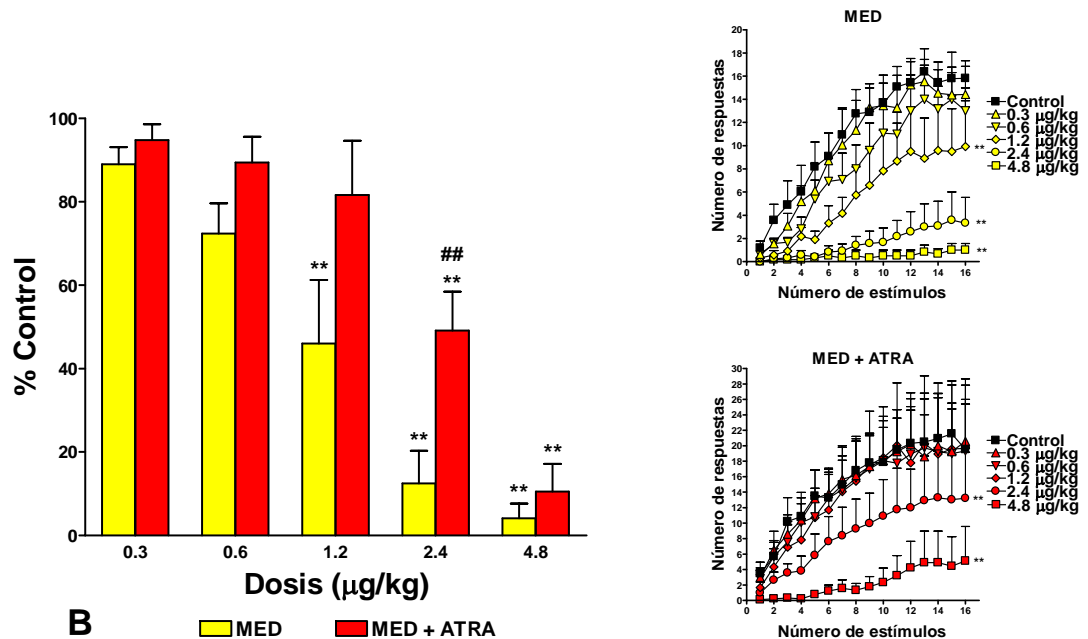
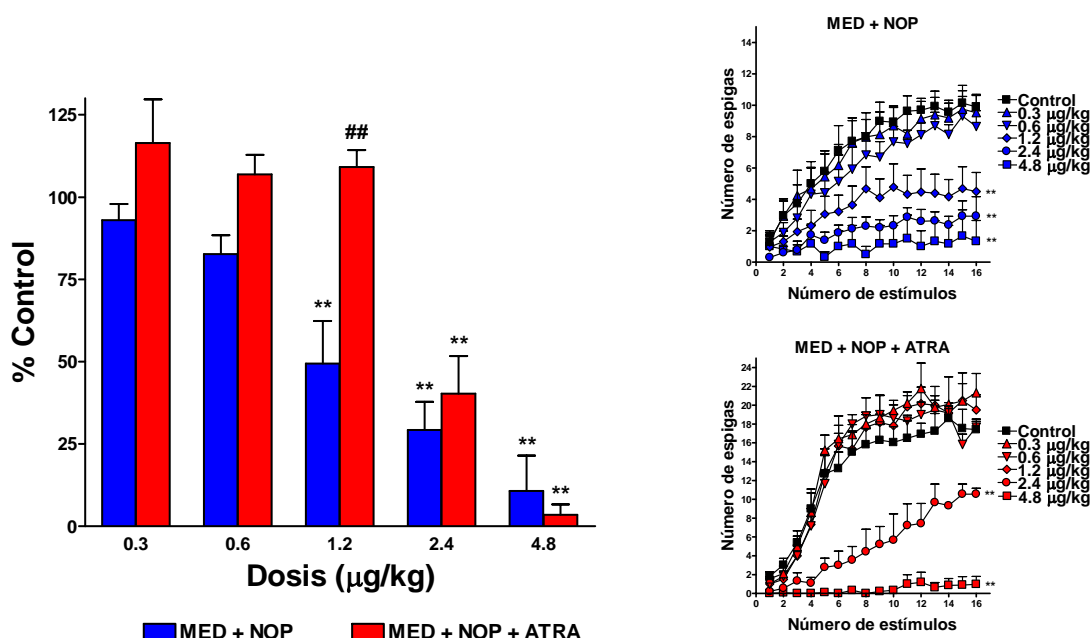


Figura VI.6.- Influencia del ATRA en el efecto de la MED sobre el wind-up en animales normales y con inflamación.- La MED inhibió el wind-up de forma dosis-dependiente en las ratas tratadas con ATRA, aunque la potencia fue muy similar a la observada en ratas normales sin tratar (A) o menor que la obtenida en ausencia de ATRA en ratas con inflamación (B). (Igual comparación estadística que en la Figura VI.5).

la DME fue de 1.2 µg/kg ($p < 0.01$ vs. ratas sin ATRA, Figura VI.6B). La dosis más alta empleada de 4.8 µg/kg redujo el *wind-up* hasta un $10.5 \pm 7\%$ del control, por un $4 \pm 3.5\%$ de las respuestas control en ausencia de ATRA ($p < 0.01$ vs. control, Figura VI.6B). Por tanto, el efecto de la MED sobre el *wind-up* en animales inflamados siguió la misma tendencia que en las respuestas a estimulación mecánica nociva, es decir, que el tratamiento con ATRA no aumentó de la efectividad analgésica de la MED, sino que la disminuyó respecto a lo observado en ausencia de ATRA o en situación de normalidad (Figura VI.6A y B).

Finalmente, la administración en animales con inflamación de MED i.v. en combinación con dosis subefectivas de NOP, mostró una menor potencia con el pretratamiento con ATRA (Figura VI.7). Así, la administración de ATRA p.o. redujo el efecto analgésico de la combinación de MED y el NOP casi a la mitad (DE_{50} 2.16 ± 0.05 µg/kg vs. DE_{50} de 1.13 ± 0.14 µg/kg en animales sin tratamiento) y la DME fue el doble de la necesaria en los animales no tratados (2.4 µg/kg vs. 1.2 µg/kg, $p < 0.01$ vs. ratas sin ATRA, Figura VI.7). Prácticamente se obtuvo una inhibición completa del *wind-up* con la dosis de 4.8 µg/kg ($3.5 \pm 3\%$, $p < 0.01$ vs. control, Figura VI.7).

Efecto de MED y NOP en presencia y ausencia de ATRA (Animales con inflamación, *Wind-up*)



5. DISCUSIÓN

En este estudio hemos observado que la administración de ATRA p.o. no mejora en la técnica de la UMAs el efecto antinociceptivo de S-KET, el FEN o la MED en animales sin inflamación, ni tampoco la acción analgésica de la MED por si misma o combinada con dosis subefectivas de NOP en animales con inflamación de tejido blando.

Resulta especialmente contradictoria la ausencia de mejora en la efectividad analgésica del S-KET, teniendo en cuenta que habíamos observado que el tratamiento oral con ATRA en ratas normales había inducido actividad antinociceptiva en el PAR, con una potencia similar a la observada en inflamación (Capítulo V). Esta mejora de la actividad analgésica de PAR en dolor agudo, se asoció con el aumento de la expresión de COX debida al ATRA (Romero-Sandoval et al., 2006). Por lo tanto, podríamos esperar un aumento de la efectividad analgésica de otros inhibidores de COX en presencia de ATRA, debido a un aumento de la cantidad del sustrato sobre el que realizan su acción. El S-KET es un inhibidor más selectivo de COX que el PAR, motivo por el que se eligió para estudiar la influencia de la administración previa de ATRA. Se valoró la acción antinociceptiva del S-KET en animales normales, ya que en ratas con inflamación tratadas con ATRA p.o., el PAR no mostró una mayor potencia analgésica. Sin embargo los resultados obtenidos en las UMAs no indicaron que existiese una modulación del efecto del S-KET, puesto que no se apreciaron diferencias significativas entre el grupo de animales tratados con ATRA y el grupo control. Es posible que la vía de administración y, por tanto, el lugar donde puedan interaccionar ambos fármacos, sea crucial para poder observar la potenciación del efecto analgésico. De hecho, el PAR atraviesa muy fácilmente la barrera hematoencefálica (Bannwarth, et al., 1985) y tal y como comentamos en capítulos previos, la acción principal se localiza a nivel medular. Por ello, en un grupo de experimentos realizados en nuestro laboratorio por D^a. Matilde Alique, bajo la supervisión del Dr. Juan F. Herrero y el Dr. Javier de Lucio, se estudió esta hipótesis administrando S-KET por vía intratecal en presencia y ausencia de ATRA (Alique et al., 2006). En este caso, se observó una intensa potenciación del efecto antinociceptivo del S-KET. Parece, por tanto, que el efecto del ATRA se localiza en el sistema nervioso central, concretamente en la médula espinal y se pone de manifiesto la implicación de los retinoides en el procesamiento de la información nociceptiva, aunque serán necesarios nuevos experimentos para establecer con mayor claridad la forma en que regulan este proceso.

Diversos estudios han puesto de relieve el aumento de la potencia analgésica de la combinación de AINEs y opioides respecto a la acción individual de cada fármaco. (Malmberg y Yaksh, 1993). Se ha propuesto que los opioides suprimen la influencia inhibitoria del GABA en neuronas que forman parte de las vías antinociceptivas descendentes a nivel de la SGP. Esta inhibición de la transmisión sináptica gabaérgica por parte de los opioides se ve potenciada por los inhibidores de COX (Vaughan et al., 1997). En nuestro laboratorio hemos comprobado que dosis subefectivas de S-KET trometamol son capaces de aumentar la analgesia inducida por el FEN en animales sin inflamación, probablemente a través de una interacción entre el sistema opioide endógeno y las COX (Gaitán et al., 2002). Teniendo en cuenta la sobreexpresión de COX inducida por ATRA, hubiéramos podido esperar una disminución de la potencia antinociceptiva del FEN en presencia del ATRA, en lugar del efecto prácticamente idéntico obtenido. Sin embargo otras acciones ligadas al ATRA podrían favorecer el efecto del FEN, tales como el aumento de la expresión de receptores opioides μ (Beczowska et al., 1997). De esta forma, el ATRA podría modular la acción del FEN a distintos niveles y de forma antagónica, alcanzando un equilibrio que se manifestase en una aparente ausencia de influencia. Aunque son necesarios más experimentos en los que se estudiase esta interacción a través de otras vías y protocolos de administración, es lógico concluir que en condiciones normales, la administración oral de ATRA no potencia el efecto analgésico del FEN.

En relación con la influencia del ATRA sobre el efecto antinociceptivo de la MED, cabe señalar como principal observación, que resulta determinante la existencia de inflamación. Así en las ratas con inflamación de tejido blando, el pretratamiento con ATRA produce una disminución del efecto de la MED en relación con los animales no tratados, mientras que en animales en situación de normalidad, la ausencia o presencia de ATRA no parece afectar al efecto analgésico de la MED. Por otra parte, el empeoramiento de la actividad analgésica de la combinación de MED y NOP en los animales con inflamación tratados con ATRA respecto a los no tratados, está de acuerdo con la observación de que el NOP también mostrase menor potencia en esas circunstancias, es decir, en ratas inflamadas y tratadas con ATRA (Capítulo V). En los animales con inflamación la expresión de COX esta aumentada, por lo que el ATRA sólo tendría una acción saturante de este sistema, sin que se tradujese en una mejora del efecto farmacológico de NOP. Además, el NOP presenta un menor efecto en ratas con inflamación, que podría deberse a una acción depresora más débil de este fármaco, debido al alto grado de excitabilidad de las neuronas de la médula espinal durante la hiperalgesia (Romero-Sandoval et al., 2002). Todo esto apunta a la

necesidad de llevar a cabo experimentos en animales sin inflamación y en presencia de ATRA, donde el efecto del NOP podría potenciarse y beneficiar así la combinación con la MED.

6 CONCLUSIONES

1.- El tratamiento oral con ATRA en ratas normales induce una actividad antinociceptiva del S-KET similar a la observada en ausencia de tratamiento. Sin embargo, experimentos independientes posteriores muestran una potenciación del efecto analgésico tras la administración intratecal, demostrando una localización central del efecto.

2.- La administración de ATRA no produce una mejora significativa de la actividad analgésica del FEN en animales normales respecto a los animales no tratados.

3.- La intensidad de la acción analgésica de la MED sobre el dolor agudo se mantiene en los mismos niveles con el pretratamiento con ATRA, pero resulta significativamente menor en situación de inflamación.

4.- La eficacia antinociceptiva de la combinación de MED con dosis subefectivas de NOP en la hiperalgesia inducida por inflamación no se ve potenciada con el tratamiento previo con ATRA.

CONCLUSIONES FINALES

CONCLUSIONES FINALES

- 1.- La actividad antinociceptiva del agonista α_2 -adrenérgico MED depende de la fase del proceso inflamatorio y de la integridad de la médula espinal, mostrando una mayor actividad en animales intactos que en espinalizados (especialmente en ausencia de inflamación y en la fase temprana de la reacción inflamatoria) y, por lo tanto, posee un efecto localizado principalmente en lugares supraespinales.
- 2.- La MED es un agente antinociceptivo efectivo en el sistema de registro de UMAs en respuestas a estimulación mecánica nociva en situación de inflamación.
- 3.- La administración de dosis subanalgésicas de NOP provoca un aumento significativo de la potencia y duración del efecto analgésico de la MED, en respuestas a estimulación natural, pero no sobre el *wind-up*, bien por una predominante acción periférica o bien por una saturación del efecto inhibitor.
- 4.- El tratamiento oral con ATRA, un metabolito activo de la vitamina A, induce un aumento de las respuestas nociceptivas, medidas como reflejos de retirada y un efecto de sensibilización en las respuestas de las neuronas de la médula espinal, similar al observado en ratas en situación de inflamación.
- 5.- El ATRA, por tanto, parece estar implicado en los mecanismos que controlan el inicio y/o mantenimiento de la sensibilización en la médula espinal y por tanto, en el procesamiento de la información nociceptiva.
- 6.- El tratamiento oral con ATRA en animales normales induce una actividad antinociceptiva del PAR, que es similar a la observada en inflamación, y mejora la actividad antinociceptiva del NOP.
- 7.- La administración oral de ATRA no mejora significativamente la actividad analgésica del FEN, la MED, o el S-KET, aunque para este último se ha observado una potenciación de su efecto tras administración intratecal, demostrando una localización central del efecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Albe-Fessard, D., Berkley, K.J., Kruger, L., Ralston, H.J.3rd., Willis, W.D.Jr., 1985. Diencephalic mechanisms of pain sensation. *Brain Res.* 356, 217-296.
- Allenby, G., Bocquel, M.T., Saunders, M., Kazmer, S., Speck, J., Rosenberger, M., Lovey, A., Kastner, P., Grippo, J.F., Chambon, P., et al., 1993. Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *PNAS* 90, 30-34.
- Alique, M., Lucio, F.J., Herrero, J.F., 2006. Vitamin A active metabolite, all-trans retinoid acid, induces spinal cord sensitization. II. Effects after intrathecal administration. *Br J Pharmacol.* 149, 65-72.
- Almasan, A., Mangelsdorf, D.J., Ong, E.S., Wahl, G.M., Evans, R.M., 1994. Chromosomal localization of the human retinoid X receptors. *Genomics.* 20, 397-403.
- Al-Swayeh, O.A., Clifford, R.H., Del Soldato, P., Moore, P.K., 2000. A comparison of the antiinflammatory and antinociceptive activity of nitroaspirin and aspirin. *Br J Pharmacol.* 129, 343-350.
- Ahluquist, R.P., 1948. *Am. J. Physiol.* 153, 586.
- Andersen, O.K., Gracely, R.H., Arendt-Nielsen, L., 1995. Facilitation of the human nociceptive reflex by stimulation of A β -fibres in a secondary hyperalgesic area sustained by nociceptive input from the primary hyperalgesic area. *Acta Physiol. Scand.* 155, 87-97.
- Aronov, S., Ben-Abraham, R., Givati-Divshi, D., Katz, Y., 2005. Cerebroventricular injection of clonidine causes analgesia mediated by a nitrogen pathway. *Drug Metabol Drug Interact.* 21, 55-66.
- Arrigo-Reina, R., Chiechio, S., 1995. Histaminergic mechanisms in clonidine induced analgesia in rat tail-flick test. *Inflamm Res.* 44, 21-23.
- Asano, T., Dohi, S., Ohta, S., Shimonaka, H., Iida, H., 2000. Antinociception by epidural and systemic α_2 -adrenoceptor agonists and their binding affinity in rat spinal cord and brain. *Anesth Analg.* 90, 400-407.
- Ayoub, S.S., Botting, R.M., Goorha, S., Coville-Nash, P.R., Willoughby, D.A., Ballou, L.R., 2004. Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxid synthase 1 gene-derived protein. *PNAS* 101, 11165-11169.
- Bannwarth, B., Netter, P., Pourel, J., Royer, R.J., Gaucher, A., 1989. Clinical pharmacokinetics of nonsteroidal antiinflammatory drugs in the cerebrospinal fluid. *Biomed Pharmacother.* 43, 121-126.
- Basbaum, A.I., Jessell, T.M., 2000. The perception of Pain. *Principles of Neural Science* (4^a Edición). Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. McGraw-Hill, 472-491.
- Bean, B.P., 1989. Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340, 153-156. Brandt, S., Livingston, A., 1990. Receptor changes in the spinal cord of sheep associated with exposure to chronic pain. *Pain* 42, 323-329.
- Beiche, F., Klein, T., Nusing, R., Neuhuber, W., Goppelt-Struebe, M., 1998. Localization of cyclooxygenase 2 and prostaglandin E2 receptor EP3 in the rat lumbar spinal cord. *J Neuroimmunol.* 89, 26-34.
- Berde, C., Sundel, R. COX 2 Inhibitors: A Status Report. Technical Corner from IASP Newsletter. Sep-Oct 1998.
- Bley, K.R., Hunter, J.C., Eglen, R.M., Smith, J.A., 1998. The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends Pharmacol Sci.* 19, 141-147.

- Brandt, S.A., Livingston, A., 1990. Receptor changes in the spinal cord of sheep associated with exposure to chronic pain. *Pain* 42, 323-329.
- Budal, D., Harasawa, K., Fields, H.L., 1998. Midbrain periaqueductal gray (PAG) inhibits nociceptive inputs to sacral dorsal horn nociceptive neurons through α_2 -adrenergic receptors. *J. Neurophysiol.* 80, 2244-2254.
- Buerkle, H., Schapsmeier, M., Bantel, C., Marcus, M.A., Wusten, R., Van Aken, H., 1999. Thermal and mechanical antinociceptive action of spinal vs. peripherally administered clonidine in the rat inflamed knee joint model. *Br. J. Anaesth.* 83, 436-441.
- Bylund, D. B., 1988. Subtypes of α_2 -adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge. *TIPS* 9, 356-361.
- Bylund, D.B., Eikenberg, D.C., Hieble, J.P., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Molinoff, P.B., Ruffolo, R.R., Trendelenburg, U., 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 46, 121-136.
- Carlton, S.M., Honda, C.N., Willcockson, W.S., Lacrampe, M., Zhang, D., Denoroy, L., Chung, J.M., Willis, W.D., 1991. Descending adrenergic input to the primate spinal cord and its possible role in modulation of spinothalamic cells. *Brain Res.* 543, 77-90.
- Casey, K.L., Minoshima, S., Berger, K.L., Koeppe, R.A., Morrow, T.J., Frey, K.A., 1994. Positron emission tomographic analysis of cerebral structures activated specifically by repetitive noxious heat stimuli. *J. Neurophysiol.* 71, 802-807.
- Cerveró, F., Laird, J.A., 1991. One pain or many pains?: a new look at pain mechanisms. *News Physiol Sci.* 6, 268-273.
- Chan, C.C., Boyce, S., Brideau, C., Charleson, S., Cromlish, W., Ethier, D., Evans, J., Ford-Hutchinson, A.W., Forrest, M.J., Gauthier, J.Y., Gordon, R., Gresser, M., Guay, J., Kargman, S., Kennedy, B., Leblanc, Y., Leger, S., Mancini, J., O'Neill, G.P., Ouellet, M., Patrick, D., Percival, M.D., Perrier, H., Prasit, P., Rodger, I., et al., 1999. Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone]: a potent and orally active cyclooxygenase 2 inhibitor. Pharmacological and biochemical profiles. *J Pharmacol Exp Ther.* 290, 551-560.
- Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., Simmons, D.L., 2002. COX 3, a cyclooxygenase 1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *PNAS* 99, 13926-13931.
- Chen, D.F., Bianchetti, M., Wiesendanger, M., 1987. The adrenergic agonist tizanidine has differential effects on flexor reflexes of intact and spinalized rat. *Neuroscience* 23, 641-647.
- Choi, W.H., Ji, K.A., Jeon, S.B., Yang, M.S., Kim, H, Min, K.J., Shong, M., Jou, I., Joe, E.H., 2005. Antiinflammatory roles of retinoic acid in rat brain astrocytes: Suppression of interferon- γ -induced JAK/STAT phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 329, 125-131.
- Clark, D.L., Boutros, N.N., 1999. *The brain and behaviour.* Blackwell Science, Oxford.
- Clarke, R.W., Ford, T.W., Taylor, J.S., 1988. Adrenergic and opioidergic modulation of a spinal reflex in the decerebrated rabbit. *J. Physiol.* 404, 407-417.
- Cocco, S., Diaz, G., Stancampiano, R., Diana, A., Carta, M., Curreli, R., Sarais, L., Fadda, F., 2002. Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* 115, 475-482.
- Coghill, R.C., McHaffie, J.G., Yen, Y.F., 2003. Neural correlates of interindividual differences in the subjective experience of pain. *PNAS* 100, 8538-8542.

- Coghill, R.C., Sang, C.N., Maisong, J.M., Jadarola, M.J., 1999. Pain intensity processing within the human brain: a bilateral, distributed mechanism. *J. Neurophysiol.* 82, 1934-1943.
- Cohen, S.M., Ito, N., 2002. A critical review of the toxicological effects of carrageenan and processed eucheuma seaweed on the gastrointestinal tract. *Crit Rev Toxicol.* 32, 413-444.
- Collier, H.O., Schneider, C., 1972. Nociceptive response to prostaglandins and analgesic actions of aspirin and morphine. *Nat New Biol.* 236, 141-143.
- Corasaniti, M.T., Bellizzi, C., Russo, R., Colica, C., Amantea, D., Di Renzo, G., 2003. Caspase-1 inhibitors abolish deleterious enhancement of COX 2 expression by HIV-1 gp120 in human neuroblastoma cells. *Toxicol Lett.* 139, 213-219.
- Corcoran, J., So, P.L., Barber, R.D., Vincent, K.J., Mazarakis, N.D., Mitrophanous, K.A., Kingsman, S.M., Maden, M., 2002. Retinoic acid receptor β_2 and neurite outgrowth in the adult mouse spinal cord in vitro. *J Cell Sci.* 115, 3779-3786.
- Coutaux, A., Adam, F., Willer, J.C., Le Bars, D., 2005. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine.* 72, 359-371.
- Cui, M., Feng, Y., McAdoo, D.J., Willis, W.D., 1999. Periaqueductal gray stimulation-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats is associated with the release of norepinephrine, serotonin and amino acids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 868-876.
- Dahlström, A., Fuxe, K., 1965. Evidence for the existence of an outflow of noradrenaline nerve fibres in the ventral roots of the rat spinal cord. *Experientia* 21, 409-410.
- Danzebrink, R.M., Gebhart, G.F., 1991. Intrathecal coadministration of clonidine with serotonin receptor agonists produces supra-additive visceral antinociception in the rat. *Brain Res.* 26, 35-42.
- Davies, J., 1989. Effects of tizanidine, eperisone and afloqualone on feline dorsal horn neuronal responses to peripheral cutaneous noxious and innocuous stimuli. *Neuropharmacology.* 28, 1357-62.
- Davies, S.N., Lodge, D., 1987. Evidence for the involvement of Nmethylaspartate receptors in *wind-up* of class 2 neurons in the dorsal horn of the rat. *Brain Res.* 424, 402-406.
- Debier, C., Larondelle, Y., 2005. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *Br J Nutr.* 93, 153-174.
- De Felipe, C., Herrero, J.F., O'Brien, J.A., Palmer, J.A., Doyle, C.A., Smith, A.J., Laird, J.M., Belmonte, C., Cerveró, F., Hunt, S.P., 1998. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature.* 392, 394-397.
- Del Soldato, P., Sorrentino, R., Pinto, A., 1999. NO-aspirins a class of new antiinflammatory and antithrombotic agents. *Trends Pharmacol Sci.* 20, 319-323.
- Derbyshire, S.G., Jones, A.P., Gyulai, F., Clark, S., Townsend, D., Firestone, L.L., 1997. Pain processing during three levels of noxious stimulation produces differential patterns of central activity. *Pain* 73, 431-445.
- Desreumaux, P., Dubuquoy, L., Nutten, S., Peuchmaur, M., Englaro, W., Schoonjans, K. et al., 2001. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med.* 193, 827-838.
- Devaux, Y., Seguin, C., Grosjean, S., De Talance, N., Schwartz, M., Burlet, A. et al., 2001. Retinoic acid and lipopolysaccharide act synergistically to increase prostanoid concentrations in rats in vivo. *J Nutr.* 131, 2628-2635.

- Devinsky, O., Morrell, M.J., Vogt, B.A., 1995. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain* 118, 279-306.
- Dickenson, A.H., Sullivan, A.F., 1987. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurons following C fiber stimulation. *Neuropharmacology* 26, 1235-1238.
- Dubner, R. Ruda, M.A., 1992. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci.* 15, 96-103.
- Duester, G., Mic, F.A., Molotkov, A., 2003. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue specific metabolism to retinoic acid. *Chemico-Biological Interactions* 143, 201-210.
- Eisenach, J.C., De Kock, M., Klimscha, W., 1996. α_2 -adrenergic agonists for regional anesthesia. A clinical review of clonidine (1984–1995). *Anesthesiology* 85, 655–674.
- Ewing, K.K., Mohammed, H.O., Scarlett, J.M., Short, C.E., 1993. Reduction of isoflurane anesthetic requirement by medetomidine and its restoration by atipamezole in dogs. *Am J Vet Res.* 54, 294-299.
- Fairbanks, C.A., Stone, L.S., Kitto, K.F., Nguyen, H.O., Posthumus, I.J., Wilcox, G.L., 2002. α_2 -Adrenergic receptors mediate spinal analgesia and adrenergic-opioid synergy. *J Pharmacol Exp Ther.* 300, 282-290.
- Fanselow, M.S., 1994. Neural organization of the defensive behaviour system responsible for fear. *Psychon. Bull. Rev.* 1, 429-438.
- Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B., Correa, F.M., 1978. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur J Pharmacol.* 53, 39-48.
- Fields, H.L., Basbaum, A.L., 1984. Endogenous pain control mechanisms. Wall, P.D., Melzack, R. (ed.). *Text book of pain*. Churchill Livingstone. Edimburg 142-152.
- Fiorucci, S., 2001. NO-releasing NSAIDs are caspase inhibitors. *Trends in Immunology* 22, 232-235.
- Fletcher, D., Kayser, V., Guilbaud, G., 1997. The influence of the timing of bupivacaine infiltration on the time course of inflammation induced by two carrageenin injections seven days apart. *Pain* 69, 303-309.
- Flower, R.J., Vane, J.R., 1972. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the antipyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature* 240, 410-411.
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Furst, S., 1999. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull.* 48, 129-141.
- Gaitán, G., Ahuir, F.J., Herrero, J.F., 2005. Enhancement of fentanyl antinociception by subeffective doses of nitroparacetamol (NCX-701) in acute nociception and in carrageenan-induced monoarthritis. *Life Sci.* 77, 85-95.
- Gaitán, G., Del Soldato, P., Herrero, J.F., 2003. Subeffective doses of dexketoprofen trometamol or nitroparacetamol enhance the effectiveness of fentanyl in responses to noxious mechanical stimulation and wind-up. *Eur. J. Pharmacol.* 481, 181-188.
- Gaitán, G., Herrero, J.F., 2002. Subeffective doses of dexketoprofen trometamol enhance the potency and duration of fentanyl antinociception. *Br J Pharmacol.* 135, 393-398.

- Gaitán, G., Herrero, J.F., 2005. Subanalgesic doses of dexketoprofen and HCT-2037 (nitrodexketoprofen) enhance fentanyl antinociception in monoarthritic rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 80, 327-332.
- Ge, Y.X., Xin, W.J., Hu, N.W., Zhang, T., Xu, J.T., Liu, X.G., 2006. Clonidine depresses LTP of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn via NO-cGMP pathway. *Brain Res.* Aug 31; [Epub ahead of print].
- Giesler, G.J. Jr, Katter, J.T., Dado, R.J., 1994. Direct spinal pathways to the limbic system for nociceptive information. *Trends Neurosci.* 17, 244-250.
- Gilchrist, D.H., Allard, B.L., Simone, D.A., 1996. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. *Pain* 67, 179-188.
- Go, V. L., Yakshl, T.L., 1987. Release of Substance P from the cat spinal cord. *J Physiol.* 391, 141-167.
- Goodman, L.S., Gilman, A., Eds., 1975. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 5th ed. New York, MacMillan Publishing Co., p 477.
- Goppelt-Struebe, M. Beiche, F., 1997. Cyclooxygenase 2 in the spinal cord: localization and regulation after a peripheral inflammatory stimulus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 433, 213-216.
- Gozariu, M., Bustamante, D., Le Bars, D., Willer, J.C., 1996. Effects of clonidine on a C-fiber reflex in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 313, 51-62.
- Graham G.G., Scott K.F., 2005. Mechanism of action of paracetamol. *Am J Ther.* 12, 46-55.
- Green, G.M., Lyons, L., Dickenson, A.H., 1998. α_2 -adrenoceptor antagonists enhance responses of dorsal horn neurons to formalin induced inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 347, 201-204.
- Grosjean, S., Devaux, Y., Seguin, C., Meistelamn, C., Zannad, F., Mertes, P.M. et al., 2001. Retinoic acid attenuates inducible nitric oxide synthase (NOS2) activation in cultured rat cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 33, 933-945.
- Guo, T.Z., Daviesk, M.F., Kingery, W.S., Patterson, A.J., Limbird, L.E., Maze, M., 1999. Nitrous oxide produces antinociceptive response via α_{2B} or α_{2C} adrenoceptor subtypes in mice. *Anesthesiology* 90, 470-476.
- Habler, H.J., Hilbers, K., Janig, W., Koltzenburg, M., Kummel, H., Lobenberg-Khosravi, N., Michaelis, M. 1993. Viscero-sympathetic reflex responses to mechanical stimulation of pelvic viscera in the cat. *J Auton Nerv Syst.* 38, 147-58.
- Handy, D.E., Flordellis, C.S., Bogdanova, N.N., Bresnahan, M.R., Gavras, H., 1993. Diverse tissue expression of rat α_2 -adrenergic receptor genes. *Hypertension* 21, 861-865.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32, 77-88.
- Harris, L.S., Pierson, A.K., 1964. Some narcotic antagonists in the benzomorphan series. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 143, 141-148.
- Hawkey, C.J., 2002. Cyclooxygenase inhibition: Between the devil and the deep blue sea. *Gut* (Suppl III), iii25-iii30.
- Hemler, M., Lands, W.E., 1976. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J Biol Chem.* 251, 5575-5579.

- Herrero, J.F., Cerveró, F., 1996a. Supraspinal influences on the facilitation of rat nociceptive reflexes induced by carrageenan monoarthritis. *Neurosci. Lett.* 209, 21-24.
- Herrero, J.F., Cerveró, F., 1996b. Changes in nociceptive reflex facilitation during carrageenan-induced arthritis. *Brain Res.* 717, 62-68.
- Herrero, J.F., Headley, P.M., 1991. The effects of sham and full spinalization on the systemic potency of μ - and κ -opioids on spinal nociceptive reflexes in rats. *Br. J. Pharmacol.* 104, 166-170.
- Herrero, J.F., Headley, P.M., 1995. The dominant class of somatosensory neurone recorded in the spinal dorsal horn of awake sheep has wide dynamic range properties. *Pain* 61, 133-138.
- Herrero, J.F., Headley, P.M., 1996. Reversal by naloxone of the spinal antinociceptive actions of a systemically-administered NSAID. *Br. J. Pharmacol.* 118, 968-972.
- Herrero, J.F., Laird, J.M.A., Lopez-García, J.A., 2000. Wind-up of spinal cord neurons and pain sensation: much ado about something? *Prog. Neurobiol.* 61, 169-203.
- Herrero, J.F., Romero-Sandoval, E.A., Gaitán, G., Mazarío, J., 2003. Antinociception and the new COX inhibitors: research approaches and clinical perspectives. *CNS Drug Rev.* 9, 227-252.
- Herrero, J.F., Solano, R.E., 1999. The antinociceptive effect of the μ -opioid fentanyl is reduced in the presence of the α_2 -adrenergic antagonist idazoxan in inflammation. *Brain Res.* 840, 106-114.
- Hill, E.M., Bader, T., Nettesheim, P., Eling, T.E., 1996. Retinoid-induced differentiation regulates prostaglandin H synthase and cPLA2 expression in tracheal epithelium. *Am J Physiol.* 270, L854-862.
- Hirokawa, K., Oshaughnessy, K.M., Ramrankha, P., Wilkins, M.R., 1994. Inhibition of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle by retinoids. *Br J Pharmacol.* 113, 1448-1454.
- Hla, T. Neilson, K., 1992. Human cyclooxygenase 2 cDNA. *PNAS* 89, 7384-7388.
- Ho, L.J., Lin, L.C., Hung, L.F., Wang, S.J., Lee, C.H., Chang, D.M., Lai, J.H., Tai, T.Y., 2005. Retinoic acid blocks pro-inflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase production by down-regulating JNK-AP-1 signaling in human chondrocytes. *Biochem Pharmacol.* 70, 200-208.
- Hofbauer, R.K., Rainville, P., Duncan, G. H., Bushnell, M.C., 2001. Cortical representation of the sensory dimension of pain. *J Neurophysiol.* 86, 402-411.
- Hutchison, W.D., Luhn, M.A., Schmidt, R.F., 1992. Knee joint input into the peripheral region of the ventral posterior lateral nucleus of cat thalamus. *J Neurophysiol.* 67,1092-1104.
- Hylden, J.L., Thomas, D.A., Iadarola, M.J., Nahin, R.L., Dubner, R., 1991. Spinal opioid analgesic effects are enhanced in a model of unilateral inflammation/hyperalgesia: a possible involvement of noradrenergic mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 194, 135-143.
- IASP, 1979. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. *Pain* 6, 249-252.
- IASP, 1986. A current list with definitions and notes on usage. *Pain* 3, 216-221.
- Ichitani, Y., Shi, T., Haeggstrom, J.Z., Samuelsson, B. Hokfelt, T., 1997. Increased levels of cyclooxygenase 2 mRNA in the rat spinal cord after peripheral inflammation: an in situ hybridization study. *Neuroreport.* 8, 2949-2952.
- Idänpään-Heikkilä, J.J., Kalso, E.A., Seppälä, T., 1994. Antinociceptive actions of dexmedetomidine and the κ -opioid agonist U-50488H against noxious thermal, mechanical and inflammatory stimuli. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271, 1306-1313.

- Jain, N.K., Kulkarni, S.K., Singh, A., 2002. Modulation of NSAID-induced antinociceptive and antiinflammatory effects by α_2 -adrenoceptor agonists with gastroprotective effects. *Life Sci.* 70, 2857-2869.
- Jenab, S., Inturrisi, C.E., 2002. Retinoic acid regulation of mu opioid receptor and c-fos mRNAs and AP-1 DNA binding in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Mol Brain Res.* 99, 34-39.
- Jones, A.K., Derbyshire, S.W., 1996. Cerebral mechanisms operating in the presence and absence of inflammatory pain. *Ann Rheum Dis.* 55, 411-420.
- Kalso, E.A., Poyhia, R., Rosenberg, P.H., 1991. Spinal antinociception by dexmedetomidine, a highly selective α_2 -adrenergic agonist. *Pharmacol. Toxicol.* 68, 140-143.
- Kanekura, T., Higashi, Y., Kanzaki, T., 2000. Inhibitory effects of 9-cisretinoic acid and pyrrolidinedithiocarbamate on COX 2 expression and cell growth in human skin squamous carcinoma cells. *Cancer Lett.* 161, 177-183.
- Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., 1995. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83, 859-869.
- Kawamata, T., Omote, K., Kawamata, M., Namiki, A., 1999. Analgesic effect of intrathecal desipramine on carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the rat. *Br. J. Anaesth.* 83, 449-452.
- Kayser, V., Guilbaud, G., 1991. Physiological relevance and time course of a tonic endogenous opioid modulation of nociceptive messages, based on the effects of naloxone in a rat model of localized hyperalgesic inflammation. *Brain Res.* 567, 197-203.
- Kayser, V., Guilbaud, G., Besson, J.M., 1992. Potent antinociceptive effects of clonidine systemically administered in an experimental model of clinical pain, the arthritic rat. *Brain Res.* 593, 7-13.
- Kehne, J.H., Gallager, D.W., Davis, M., 1985. Spinalization unmasks clonidine's α_1 -adrenergic mediated excitation of the flexor reflex in rats. *J. Neurosci.* 5, 1583-1590.
- Kis B., Snipes J.A., Simandle S.A., Busija D.W., 2005a. Acetaminophen-sensitive prostaglandin production in rat cerebral endothelial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288, 897-902.
- Kis B., Snipes J.A., Busija D.W., 2005b. Acetaminophen and the COX 3 Puzzle: Sorting out Facts, Fictions and Uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther.* DOI:10.1124/jpet.105.085431.
- Kiss, J.P. y Vizi, E.S., 2001. Nitric oxide: a novel link between synaptic and non-synaptic transmission. *TINS* 24, 211-215.
- Klein, T., Magerl, W., Hopf, H.C., Sandkuhler, J., Treede, R.D., 2004. Perceptual correlates of nociceptive long-term potentiation and long-term depression in humans. *J Neurosci.* 24, 964-971.
- Lahdesmaki, J., Scheinin, M., Pertovaara, A., Mansikka, H., 2003. The α_2 -adrenoceptor subtype is not involved in inflammatory hyperalgesia or morphine-induced antinociception. *Eur. J. Pharmacol.* 468, 183-189.
- Laird, J.M. Cerveró, F., 1989. A comparative study of the changes in receptive-field properties of multireceptive and nociceptive rat dorsal horn neurons following noxious mechanical stimulation. *J. Neurophysiol.* 62, 854-863.
- Larsen, F.G., Nielsen-Kudsk, F., Jakobsen, P., Weismann, K., Kragballe, K., 1992. Pharmacokinetics and therapeutic efficacy of retinoids in skin diseases. *Clin Pharmacokinet.* 23, 42-61.

- Lawson, S.N., 1996. Peptides and cutaneous polymodal nociceptor neurones. *Prog Brain Res.* 113, 369-385.
- Levine, J., 1987. The peripheral nervous system and the inflammatory process. *Pain, Suppl 4*, S109.
- Li, M., Song, S., Lippman, S.M., Zhang, X.K., Liu, X., Lotan, R. et al., 2002. Induction of retinoic acid receptor- β suppresses cyclooxygenase 2 expression in esophageal cancer cells. *Oncogene* 21, 411-418.
- Limbird, L.E., 1988. Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms. *FASEB J.* 2, 2686-2695.
- Lipscombe, D., Kongsamut, S., Tsien, R.W., 1989. α -adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature* 340, 639-642.
- Liu, L., Gudas, L.J., 2002. Retinoic acid induces expression of the interleukin 1 β gene in cultured normal human mammary epithelial cells and in human breast carcinoma lines. *J Cell Physiol.* 193, 244-252.
- López García, J.A., Herrero, J.F., 1998. Somestesia: mecanorrecepción, termorrecepción y nocicepción. *Manual de Neurociencia.* Delgado, J.M., Ferrús, A., Mora, F., Rubia, F.J.,. Editorial Síntesis, 457-482.
- Lowe, M.N., Plosker, G.L., 2000. Bexarotene. *Am J Clin Dermatol.* 1, 245-250.
- MacDonald, E., Scheinin, M., 1995. Distribution and pharmacology of α_2 -adrenoceptors in the central nervous system. *J Physiol Pharmacol.* 46, 241-258.
- Magni, P., Beretta, E., Scaccianoce, E., Motta, M., 2000. Retinoic acid negatively regulates neuropeptide Y expression in human neuroblastoma cells. *Neuropharmacology* 39, 1628-1636.
- Maier, J.A., Hla, T., Maciag, T., 1990. Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 265, 10805-10808.
- Malmberg, A.B., Yaksh, T.L., 1995. 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.* 15, 2768-2776.
- Mansikka, H., Pertovaara, A., 1995. Influence of selective α_2 -adrenergic agents on mustard oil-induced central hyperalgesia in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 281, 43-48.
- Mansikka, H., Zhou, L., Donovan, D.M., Pertovaara, A., Raja, S.N., 2002. The role of μ -opioid receptors in inflammatory hyperalgesia and α_2 -adrenoceptor-mediated antihyperalgesia. *Neuroscience* 113, 339-349.
- Masson, P., Leung, C.G., 1996. Physiological functions of pontomedullary raphe and medial reticular neurons. *Prog. Brain Res.* 107, 269-282.
- Mazarío, J., Gaitan, G., Herrero, J.F., 2001. Cyclooxygenase 1 vs. cyclooxygenase 2 inhibitors in the induction of antinociception in rodent withdrawal reflexes. *Neuropharmacology* 40, 937-945.
- Mazarío, J., Herrero, J.F., 1999. Antinociceptive effects of metamizol (dipyrone) in rat single motor units. *Neurosci. Letters.* 274, 179-182.
- McCaffery, P., Drager, U.C., 2000. Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 233-249.

- McMahon, S.B., Koltzenburg, M., 1990. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. *Trends Neurosci.* 6, 199-201.
- McMahon, S.B., Wall, P.D., 1984. Receptive fields of rat lamina 1 projection cells move to incorporate a nearby region of injury. *Pain* 19, 235-247.
- Melzack, R., 1999. From the gate to neuromatrix. *Pain Suppl* 6, S121-126.
- Mendel, L.M., Wali, P.D., 1965. Response of single dorsal cord cells to peripheral cutaneous unmyelinated fibers. *Nature* 206, 97-99.
- Mey, J., Morassutti, D., Brook, G., Liu, R.H., Zhang, Y.P., Koopmans, G., McCaffery, P., 2005. Retinoic acid synthesis by a population of NG2-positive cells in the injured spinal cord. *Eur J Neurosci.* 21, 1555-1568.
- Meyer, R.A., Campbell, J.N., 1981. Myelinated nociceptive afferents account for the hyperalgesia that follows a burn to the hand. *Science* 213, 1527-1529.
- Millan, M.J., 1992. Evidence that an α_{2A} -adrenoceptor subtype mediates antinociception in mice. *Eur J Pharmacol.* 215, 355-356.
- Millan, M.J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 57, 1-164.
- Miranda, H.F. y Pinardi, G., 2004. Isobolographic analysis of the antinociceptive interactions of clonidine with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Pharmacological Research* 50, 273-278.
- Misner, D.L., Jacobs, S., Shimizu, Y., De Urquiza, A.M., Solomin, L., Perlmann, T. et al., 2001. Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *PNAS* 98, 11714-11719.
- Molina, C., Herrero, J.F., 2006. The influence of the time course of inflammation and spinalization on the antinociceptive activity of the α_2 -adrenoceptor agonist medetomidine. *Eur J Pharmacol.* 532, 50-60.
- Moling, O., Cairon, E., Rimenti, G., Rizza, F., Pristera, R., Mian, P., 2006. Severe hepatotoxicity after therapeutic doses of acetaminophen. *Clin Ther.* 28, 755-760.
- Moreno-Manzano, V., Mampaso, F., Sepulveda-Muñoz, J.C., Alique, M., Chen, S., Ziyadeh, F.N. et al., 2003. Retinoids as a potential treatment for experimental puromycin-induced nephrosis. *Br J Pharmacol.* 139, 823-831.
- Nakamura, M., Ferreira, S.H., 1988. Peripheral analgesic action of clonidine: mediation by release of endogenous enkephalin-like substances. *Eur. J. Pharmacol.* 146, 223-228.
- Nguyen, T.T., Matsumoto, K., Yamasaki, K., Watanabe, H., 1997. Involvement of supraspinal GABA receptors in majonoside-R2 suppression of clonidine-induced antinociception in mice. *Life Sci.* 61, 427-436.
- Nichols, J.A., Ruffolo, R.R.Jr., 1991. Functions mediated by α -adrenoceptors. In: Ruffolo Jr., R.R., Editor, , 1991. *α -Adrenoceptors: Molecular Biology, Biochemistry, and Pharmacology.* Progress in Basic and Molecular Pharmacology, Karger, Basel, pp. 115-179.
- Nielsen, C.K., Lewis, R.J., Alewood, D., Drinkwater, R., Palant, E., Patterson, M., Yaksh, T.L., McCumber, D., Smith, M.T., 2005. Antiallodynic efficacy of the chi-conopeptide, Xen2174, in rats with neuropathic pain. *Pain* 118, 112-124.
- Nusing, R.M., Mohr, S., Ullrich, V., 1995. Activin A and retinoic acid synergize in cyclooxygenase-1 and thromboxane synthase induction during differentiation of J774.1 macrophages. *Eur J Biochem.* 227, 130-136.

- O'Sullivan, M.G., Huggins, E.M., Meade, E.A., Dewitt, D.L., McCall, C.E., 1992. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 in alveolar macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 187, 1123-1127.
- Ossipov, M.H., Harris, S., Lloyd, P., Messineo, E., 1990. An isobolographic analysis of the antinociceptive effect of systemically and intrathecally administered combinations of clonidine and opiates. *J Pharmacol Exp Ther.* 255, 1107-1116.
- Pelissier, T., Alloui, A., Paeile, C., Eschaliere, A., 1995. Evidence of a central antinociceptive effect of paracetamol involving spinal 5HT₃ receptors. *Neuroreport.* 6, 1546-1548.
- Peng, Y.B., Lin, Q., Willis, W.D., 1996. Involvement of α_2 -adrenoceptors in the periaqueductal gray-induced inhibition of dorsal horn cell activity in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 125-135.
- Penning, T.D., Talley, J.J., Bertenshaw, S.R., Carter, J.S., Collins, P.W., Docter, S., Graneto, M.J., Lee, L.F., Malecha, W., Miyashiro, J.M., Rogers, R.S., Rogier, D.J., Yu, S.S., Anderson, G.D., Burton, E.G., Cogburn, J.N., Gregory, S.A., Koboldt, C.M., Perkins, W.E., Seibert, K., Veenhuizen, A.W., Zhang, Y.Y., Isakson, P.C., 1997. Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase 2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem.* 40, 1347-1365.
- Perrot, S., Idänpään-Heikkilä, J.J., Guilbauda, G., Kaysera, V., 1998. The enhancement of morphine antinociception by a CCKB receptor antagonist in the rat depends on the phase of inflammation and the intensity of carrageenin-induced hyperalgesia. *Pain* 74, 269-274.
- Pertovaara, A., 1993. Antinociception induced by α_2 -adrenoceptor agonists, with special emphasis on medetomidine studies. *Prog. Neurobiol.* 40, 691-709.
- Pertovaara, A., Kauppila, T., Jyvasjarvi, E., Kalso, E., 1991. Involvement of supraspinal and spinal segmental α_2 -adrenergic mechanisms in the medetomidine-induced antinociception. *Neuroscience* 44, 705-714.
- Petrovic, P., Ingvar, M., 2002. Imaging cognitive modulation of pain processing. *Pain* 95, 1-5.
- Petrovic, P., Petersson, K.M., Ghatan, P.H., Stone-Elander, S., Ingvar, M., 2000. Pain-related cerebral activation is altered by a distracting cognitive task. *Pain* 85, 19-30.
- Philipp, S., Monti, J., Pagel, I., Langenickel, T., Notter, T., Ruschitzka, F., Luscher, T., Dietz, R., Willenbrock, R., 2002. Treatment with darusentan over 21 days improved cGMP generation in patients with chronic heart failure. *Clin Sci (Lond).* 103, Suppl 48, 249S-253S.
- Pini, L.A., Vitale, G., Ottani, A., Sandrini, M., 1997. Naloxone-reversible antinociception by paracetamol in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 280, 934-940.
- Przesmycki, K., Dzieciuch, J.A., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., 1998. An isobolographic analysis of drug interaction between intrathecal clonidine and baclofen in the formalin test in rats. *Neuropharmacology* 37, 207-214.
- Przesmycki, K., Dzieciuch, J.A., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., 1999. Nitric oxide modulates spinal antinociceptive effect of clonidine but not that of baclofen in the formalin test in rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 9, 115-121.
- Pudovkina, O.L., Westerink, B.H., 2005. Functional role of α_1 -adrenoceptors in the locus coeruleus: a microdialysis study. *Brain Res.* 1061, 50-56.
- Raja, S.N., Campbell, J.N., Meyer, R.A., 1984. Evidence for different mechanisms of primary and secondary hyperalgesia following heat injury to the glabrous skin. *Brain* 107, 1179-1188.

- Ramos-Zepeda, G., Schroder, W., Rosenow, S., Herrero, J.F., 2004. Spinal vs. supraspinal antinociceptive activity of the adenosine α_1 -receptor agonist cyclopentyl-adenosine in rats with inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 499, 247-256.
- Ren, K., Dubner, R., 1996. Enhanced descending modulation of nociception in rats with persistent hindpaw inflammation. *J. Neurophysiol.* 76, 3025-3037.
- Rockwell, P., Yuan, H., Magnusson, R., Figueiredo-Pereida, M.E., 2000. Proteasome inhibition in neuronal cells induces a proinflammatory response manifested by up-regulation of cyclooxygenase 2, its accumulation as ubiquitin conjugates and production of the prostaglandin PGE₂. *Arch Biochem Biophys.* 374, 325-333.
- Romero-Sandoval, E.A., Alique, M., Moreno-Manzano, V., Molina, C., Lucio, F.J., Herrero, J.F., 2004. The oral administration of retinoic acid enhances nociceptive withdrawal reflexes in rats with soft-tissue inflammation. *Inflamm. Res.* 53, 297-303.
- Romero-Sandoval, E.A., Del Soldato, P., Herrero, J.F., 2003. The effect of sham and full spinalization on the antinociceptive effects of NCX-701 (nitroparacetamol) in monoarthritic rats. *Neuropharmacology* 45, 412-419.
- Romero-Sandoval, E.A., Mazarío, J., Howat, D., Herrero, J.F., 2002. NCX-701 (nitroparacetamol) is an effective antinociceptive agent in rat withdrawal reflexes and *wind-up*. *Br. J. Pharmacol.* 135, 1556-1562.
- Romero-Sandoval, E.A., McCall, C., Eisenach, J.C., 2005. α_2 -adrenoceptor stimulation transforms immune responses in neuritis and blocks neuritis-induced pain. *J. Neurosci.* 25, 8988-8994.
- Romero-Sandoval, E.A., Molina, C., Alique, M., Moreno-Manzano, V., Lucio, F.J., Herrero, J.F., 2006. Vitamin A active metabolite, all-trans retinoid acid, induces spinal cord sensitization. I. Effects after oral administration. *Br J Pharmacol.* 149, 56-64.
- Safieh-Garabedian, B., Poole, S., Allchorne, A., Winter, J., Woolf, C.J., 1995. Contribution of interleukin 1 β to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 115, 1265-1275.
- Samad, T.A., Moore, K.A., Sapirstein, A., Billet, S., Allchorne, A., Poole, S. et al., 2001. Interleukin 1 β -mediated induction of COX 2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 410, 471-475.
- Samad, T.A., Sapirstein, A., Woolf, C.J., 2002. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends Mol Med.* 8, 390-396.
- Sandkuhler, J., 2000. Learning and memory in pain pathways. *Pain* 88, 113-118.
- Sarkar, S., Hobson, A.R., Hughes, A., Growcott, J., Woolf, C.J., Thompson, D.G., Aziz, Q., 2003. The prostaglandin E₂ receptor 1 (EP-1) mediates acid-induced visceral pain hypersensitivity in humans. *Gastroenterology* 124, 18-25.
- Sato, J., Perl, E.R., 1991. Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. *Science* 251, 1608-1610.
- Saunders, C., Limbird, L.E., 1999. Localization and trafficking of α_2 -adrenergic receptor subtypes in cells and tissues. *Pharmacol Ther.* 84, 193-205.
- Sawamura, S., Kingery, W.S., Davies, M.F., Agashe, G.S., Clark, J.D., Kobilka, B.K., Hashimoto, T., Maze, M., 2000. Antinociceptive action of nitrous oxide is mediated by stimulation of noradrenergic neurons in the brainstem and activation of α_{2B} adrenoceptors. *J Neurosci* 20, 9242-9251.

- Schaible, H.G., Grubb, B.D., 1993. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 55, 5-54.
- Schaible, H.G., Nebe, J., Neugebauer, V., Ebersberger, A., Vanegas, H., 2000. The role of high-threshold calcium channels in spinal neuron hyperexcitability induced by knee inflammation. *Prog Brain Res.* 129,173-90.
- Schaible, H.G., Schmidt, R.F., 1985. Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. *J. Neurophysiol.* 54, 1109-1122.
- Scheinin, H., Karhuvaara, S., Oikkola, K.T., Kallio, A., Anttila, M., Vuorilehto, L., Scheinin, M., 1992. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of intramuscular dexmedetomidine. *Clin Pharmacol Ther.* 52, 537-546.
- Schmidt, R., Schmelz, M., Torebjork, H.E., Handwerker, H.O., 2000. Mechano-insensitive nociceptors encode pain evoked by tonic pressure to human skin. *Neuroscience* 98, 793-800.
- Schomburg, E.D., Steffens, H., 1986. Synaptic responses of lumbar α -motoneurons to selective stimulation of cutaneous nociceptors and low threshold mechanoreceptors in the spinal cat. *Exp Brain Res.* 62, 335-342.
- Schouenborg, J., Weng, H.R., 1994. Sensorimotor transformation in a spinal motor system. *Exp. Brain Res.* 100, 170-174.
- Schwab, J.M., Beschorner, R., Meyermann, R., Gozalan, F., Schluesener, H.J., 2002. Persistent accumulation of cyclooxygenase 1-expressing microglial cells and macrophages and transient upregulation by endothelium in human brain injury. *J Neurosurg.* 96, 892-899.
- Schwab, J.M., Schluesener, H.J., Meyermann, R., Serhan, C.N., 2003. COX 3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69, 339-343.
- Seguin-Devaux, C., Devaux, Y., Latger-Cannard, V., Grosjean, S., Rochette-Egly, C., Zannad, F. et al., 2002. Enhancement of the inducible NO synthase activation by retinoic acid is mimicked by RAR α -agonist in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 283, 525-535.
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., Isakson, P., 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *PNAS* 91, 12013-12017.
- Sherman, S.E., Luo, L., Dostrovsky, J.O. 1997. Altered receptive fields and sensory modalities of rat VPL thalamic neurons during spinal strychnine-induced allodynia. *The Journal of Neurophysiology* 78, 2296-2308.
- Sherrington, C.S., 1906. *The Integrative Action of the Nervous System.* Yale University Press, New Haven.
- Sherrington, C.S., 1910. Flexion-reflex of the limb, crossed extension reflex, and reflex stepping and standing. *Journal of Physiology* 40, 28-121.
- Simmons, D.L., Botting, R.M., Robertson, P.M., Madsen, M.L., Vane, J.R., 1999. Induction of an acetaminophen-sensitive cyclooxygenase with reduced sensitivity to non-steroid antiinflammatory drugs. *PNAS* 96, 3275-3280.
- Sinclair, M.D., 2003. A review of the physiological effects of α_2 -agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *Can Vet J.* 44, 885-897.
- Small, K.M., Liggett, S.B., 2001. Identification and functional characterization of α_2 -adrenoceptor polymorphisms. *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 471-477.

- Solano, R., Herrero, J.F., 1997. Cutaneous responsiveness of rat single motor units activated by natural stimulation. *J. Neurosci. Methods* 73, 135-140.
- Solano, R., Herrero, J.F., 1999. Response properties of hind limb single motor units in normal rats and after carrageenan-induced inflammation. *Neuroscience* 90, 1393-1402.
- Solomin, L., Johansson, C.B., Zetterstrom, R.H., Bissonnette, R.P., Heyman, R.A., Olson, L. et al., 1998. Retinoid-X receptor signalling in the developing spinal cord. *Nature* 395, 398-402.
- Solomon, R.E., Gebhart, G.F., 1994. Synergistic antinociceptive interactions among drugs administered to the spinal cord. *Anesth Analg.* 78, 1164-1172.
- Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman, D.S., 1994. The retinoids, editors. In: *Biology, Chemistry and Medicine*. 2nd Ed. Raven Press, New York.
- Stamford, J.A., 1995. Descending control of pain. *Brit. J. Anaesthesia* 75, 217-227.
- Stanfa, L.C., Dickenson, A.H., 1994. Enhanced α_2 -adrenergic controls and spinal morphine potency in inflammation. *NeuroReport* 5, 469-472.
- Stock, J.L., Shinjo, K., Burkhardt, J., Roach, M., Taniguchi, K., Ishikawa, T., Kim, H.S., Flannery, P.J., Coffman, T.M., McNeish, J.D., Audoly, L.P., 2001. The prostaglandin E2 EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure. *J Clin Invest.* 107, 325-331.
- Stone, L.S., MacMillan, L.B., Kitto, K.F., Limbird, L.E., Wilcox, G.L., 1997. The α_{2A} -adrenergic receptor subtype mediates spinal analgesia evoked by α_2 -agonists and is necessary for spinal adrenergic-opioid synergy. *J Neurosci.* 17, 7157-7165.
- Takano, M., Takano, Y., Yaksh, T.L., 1993. Release of calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P (SP), and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) from rat spinal cord: modulation by α_2 -agonists. *Peptides* 14, 371-378.
- Teilmann, K., 1989. Retinoids: toxicology and teratogenicity to date. *Pharmacol Ther.* 40, 29-43.
- Tonai, T., Taketani, Y., Ueda, N., Nishisho, T., Ohmoto, Y., Sakata, Y., Muraguchi, M., Wada, K., Yamamoto, S., 1999. Possible involvement of interleukin 1 in cyclooxygenase 2 induction after spinal cord injury in rats. *J Neurochem.* 72, 302-309.
- Torebjork, H.E., Lundberg, L.E., LaMotte, R.H., 1992. Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. *J. Physiol.* 448, 765-780.
- Treede, R.D., Apkarian, A.V., Bromm, B., Greenspan, J.D., Lenz, F.A., 2000. Cortical representation of pain: functional characterization of nociceptive areas near the lateral sulcus. *Pain* 87, 113-119.
- Treede, R.D., Meyer, R.A., Raja, S.N., Campbell, J.N., 1992. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog. Neurobiol.* 38, 397-421.
- Unnerstall, J.R., Kopajtic, T.A., Kuhar, M.J., 1984. Distribution of α_2 -agonist binding sites in the rat and human central nervous system: analysis of some functional, anatomic correlates of the pharmacologic effects of clonidine and related adrenergic agents. *Brain Res.* 319, 69-101.
- Vainio, O., 1997. α_2 -Adrenergic agonists and antagonists. 6th Proc Int Cong Vet Anaes. 75-77.
- Vane, J.R., 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.* 231, 232-235.

- Vane, J.R., Bakhle, Y.S., Botting, R.M., 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharm Toxicol.* 38, 97-120.
- Vanegas, H., Schaible, H.G., 2001. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog Neurobiol.* 64, 327-363.
- Virtanen, R., Savola, J.M., Saano, V., Nyman, L., 1988. Characterization of the selectivity, specificity and potency of medetomidine as an α_2 -adrenoceptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.* 150, 9-14.
- Virtanen, R., Savola, J.M., Saano, V., 1989. Highly selective and specific antagonism of central and peripheral α_2 -adrenoceptors by atipamezole. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 297, 190-204.
- Wagsater, D., Jatta, K., Ocaya, P., Dimberg, J., Sirsjo, A., 2006. Expression of IL1 β , IL1 receptor type I and IL1 receptor antagonist in human aortic smooth muscle cells: effects of all-trans-retinoic acid. *J Vasc Res.* 43, 377-382.
- Wallace, J.L., Del Soldato, P., Cirino, Muscara, M.N., 1999a. Nitric oxide-releasing NSAIDs: GI-safe antithrombotics. *Idrugs* 2, 321-326.
- Wallace, J.L., Vergnolle, N., Muscara, M.N., Asfaha, S., Chapman, K., McKnight, W., Del Soldato, P., Morelli, A., Fiorucci, S., 1999b. Enhanced antiinflammatory effects of a nitric oxide-releasing derivative of mesalamine in rats. *Gastroenterology* 117, 557-566.
- Warren, R.A., Golshani, P., Jones, E.G., 1997. GABA(B)-receptor-mediated inhibition in developing mouse ventral posterior thalamic nucleus. *J Neurophysiol.* 78, 550-553.
- Warren, S., Capra, N.F., Yeziarski, R.P. 1997. The somatosensory system II: Non-discriminative touch, temperature and nociception. A: Haines D.E, *Fundamental neuroscience.* Churchill Livingstone, Nova York, pp 237-253.
- Watkins, L.R., Wiertelak, E.P., Goehler, L.E., Smith, K.P., Martin, D., Maier, S.F., 1994. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res.* 15, 15-26.
- Weil-Fugazza, J., Godefroy, F., Manceau, V., Besson, J.M., 1986. Increased norepinephrine and uric acid levels in the spinal cord of arthritic rats. *Brain Res.* 374, 190-194.
- Werner, E.A., Deluca, H.F., 2002. Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282, E672-678.
- Westlund, K.N., Carlton, S.M., Zhang, D., Willis, W.D., 1990. Direct catecholaminergic innervation of primate spinothalamic tract neurons. *J. Comp. Neurol.* 299, 178-186.
- Wilcox, G.L., Carlsson, K.H., Jochim, A., Jurna, I., 1987. Mutual potentiation of antinociceptive effects of morphine and clonidine in rat spinal cord. *Brain Res.* 405, 84-93.
- Williams, J.T., Henderson, G., North, R.A., 1985. Characterization of α_2 -adrenoceptors which increase potassium conductance in rat locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 14, 95-101.
- Willingale, H.L., Gardiner, N.J., McLymont, N., Giblett, S., Grubb, B.D., 1997. Prostanoids synthesized by cyclo-oxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. *Br. J. Pharmacol.* 122, 1593-1604.
- Willoughby, D.A., Moore, A.R., Colville-Nash, P.R., 2000. COX 1, COX 2, and COX 3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 355, 646-648
- Woolf, C.J., 1983. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 306, 686-688.

Woolf, C.J., King, A.E., 1990. Dynamic alterations in the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 10, 2717-2726.

Woolf, C.J., Salter, M.W., 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288, 1765-1769.

Xu, M., Kontinen, V.K., Kalso, E., 2000. Effects of radolmidine, a novel α_2 -adrenergic agonist compared with dexmedetomidine in different pain models in the rat. *Anesthesiology* 93, 473-481.

Zhang, C., Davies, M.F., Guo, T.Z., Maze, M., 1999. The analgesic action of nitrous oxide is dependent on the release of norepinephrine in the dorsal horn of the spinal cord. *Anesthesiology* 91, 1401-1407.

Zetterstrom, R.H., Simon, A., Giacobini, M.M., Eriksson, U., Olson, L., 1994. Localization of cellular retinoid-binding proteins suggests specific roles for retinoids in the adult central nervous system. *Neuroscience* 62, 899-918.