

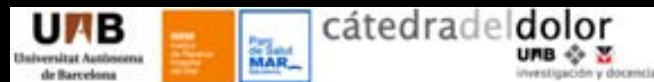
**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA, TERAPÈUTICA I TOXICOLOGIA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA**

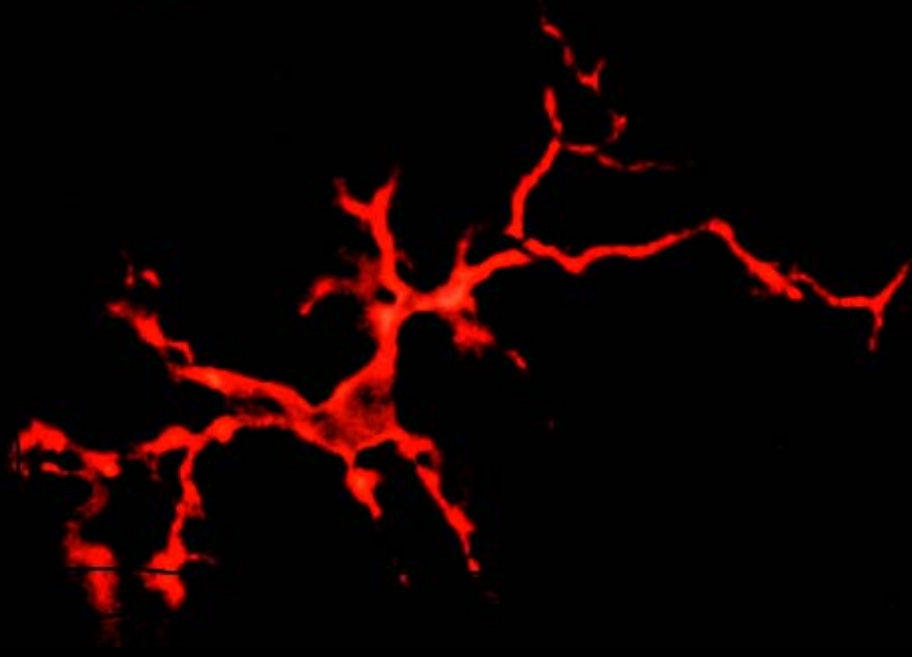
**CÁTEDRA EXTRAORDINARIA DEL DOLOR**

**UAB-PARC DE SALUT MAR-MENARINI**



**TESIS DOCTORAL**

**IMPLICACIÓN DE LA GLÍA EN LA PREVENCIÓN  
DE LA HIPERALGESIA POSTOPERATORIA Y LA  
SENSIBILIZACIÓN LATENTE AL DOLOR  
POSTQUIRÚRGICO EN EL RATÓN**



**Elizabeth Romero Alejo**

**2014**



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA, TERAPÈUTICA I TOXICOLOGIA  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA**

Directoras de la Tesis:

Dra. M<sup>a</sup> Asunción Romero Molina y Dra. Margarita Puig Riera de Conías

Tutora:

Dra. Elisabet Vila Calsina

M<sup>a</sup> ASUNCIÓN ROMERO MOLINA, Doctora en Veterinaria y MARGARITA PUIG RIERA DE CONÍAS, Profesor Titular de Anestesiología del Departamento de Cirugía de la Universitat Autònoma de Barcelona y Catedrático de Farmacología de la Facultad de Medicina de Alicante (en excendencia voluntaria)

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación titulado "*Implicacion de la glía en la prevención de la hiperalgesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor postquirúrgico en el ratón*", presentado por Elizabeth Romero Alejo para optar al grado de Doctor en Farmacología, ha sido realizado bajo nuestra dirección y está en condiciones de ser presentado para su lectura y defensa ante el tribunal correspondiente.

Para que conste y tenga los efectos que corresponda, firmo el presente documento en Barcelona, a 23 de Septiembre de 2014.

Directoras de tesis

Doctoranda

---

Dra. M<sup>a</sup> Asunción Romero Molina  
Dra. Margarita Puig Riera de Conías

---

Elizabeth Romero Alejo



**ÍNDICE**

Abreviaturas .....	7
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Transmisión y modulación nociceptiva .....</b>	<b>11</b>
1.1 Transmisión nociceptiva .....	11
1.1.1 Fibras aferentes primarias y Ganglio de la raíz dorsal .....	11
1.1.2 Estructuras implicadas a nivel espinal y supraespinal .....	15
1.2 Modulación de la transmisión nociceptiva a nivel espinal .....	19
1.2.1 Sistemas descendentes .....	19
1.2.2 Modulación local .....	24
<b>2. Sensibilización nociceptiva .....</b>	<b>25</b>
2.1 Sensibilización nociceptiva inducida por la lesión tisular .....	25
2.1.1 Sensibilización periférica .....	25
2.1.2 Sensibilización central .....	29
<b>3. Papel de la glía en la nocicepción .....</b>	<b>32</b>
3.1 Las células de glía en el sistema nervioso .....	32
3.2 Activación de la glía espinal: estados proinflamatorio y antiinflamatorio .....	34
<b>4. Dolor postoperatorio agudo y crónico .....</b>	<b>42</b>
4.1 <i>Transición</i> del dolor agudo postoperatorio a crónico .....	42
4.2 Dolor postincisional .....	46
<b>5. Farmacología del dolor postoperatorio .....</b>	<b>51</b>
5.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Dexketoprofeno .....	52
5.2 Opioides. Tramadol .....	58
5.3 Adyuvantes .....	64
5.4 Inhibidores de la activación de la glía .....	70
5.5 A-836339, Agonista del receptor cannabinoide tipo II .....	75
5.6 Benzodiazepinas: Midazolam .....	78
5.7 Analgesia Multimodal. Asociaciones o combinaciones de analgésicos .....	80
<b>II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....</b>	<b>82</b>
<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>84</b>

<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	86
1. Animales y estabulación.....	86
2. Cirugía .....	86
3. Evaluación del comportamiento nociceptivo: Test de Von Frey .....	87
4. Evaluación de la inmunoreactividad glial en médula espinal.....	88
4.1 Perfusión, inclusión y preparación de las muestras.....	88
4.2 Inmunohistoquímica.....	88
4.3 Visualización de las muestras, captación de imágenes y cuantificación.....	89
5. Experimentos .....	90
6. Fármacos y vías de administración .....	95
7. Cálculos y análisis estadístico .....	97
7.1 Estudios de comportamiento.....	97
7.2 Inmunohistoquímica.....	101
<b>V. RESULTADOS</b> .....	103
<b>1. Efecto de la cirugía sobre los umbrales nociceptivos y la activación glial</b> .....	103
1.1 Hiperalgnesia postoperatoria (HPO) y sensibilización latente al dolor (SLD).....	103
1.2 Activación de la glía espinal inducido por la lesión quirúrgica.....	106
<b>2. Prevención de la hiperalgnesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor mediante la administración de dexketoprofeno y tramadol individualmente o combinados. Efectos sobre la activación glial</b> .....	112
2.1 Efecto del dexketoprofeno .....	112
2.2 Efecto del tramadol .....	122
2.3 Efecto de la combinación dexketoprofeno y tramadol sobre la hiperalgnesia inducida por la cirugía y la activación glial.....	131
<b>3. Prevención de la hiperalgnesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor mediante la administración de ketamina o gabapentina. Efecto sobre la activación glial</b> .....	149
3.1 Efectos de la ketamina .....	149
3.2 Efecto de la gabapentina .....	159

<b>4. Prevención de la hiperalgesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor mediante la administración de minociclina, A-836339 o midazolam. Efecto sobre la activación glial.....</b>	<b>168</b>
4.1 Efecto de la minociclina .....	168
4.2 Efecto del A-836339 (agonista CB2).....	177
4.3 Efecto del midazolam.....	181
<b>5. Resumen del efecto antihiperalgésico e inhibidor de la activación de la glía espinal de los distintos tratamientos evaluados.....</b>	<b>184</b>
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>187</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>219</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>221</b>



**ABREVIATURAS**

**2-AG:** 2-araquidoil-glicerol

**5-HT:** Serotonina

**AA:** Ácido araquidónico

**AAS:** Ácido acetilsalicílico

**AC:** Adenilato ciclasa

**ADME:** Asta dorsal de la médula espinal

**AEA:** anandamida

**AINES:** antiinflamatorios no esteroideos

**AMPA:**  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5metil-4 isoxazol-propionato

**AMP<sub>c</sub>:** AMP cíclico

**ASICs:** Acid-Sensing Ion Channels

**ATP:** Adenosina trifosfato

**BDNF:** Factor neurotrófico derivado de cerebro (Brain derived neurotrophic factor)

**BK:** Bradiquinina

**Ca<sup>2+</sup>:** Calcio

**CB:** cannabinoides

**CFA:** Adyuvante completo de Freud

**CGRP:** Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (*Calcitonin-gene related peptide*)

**COX:** Ciclooxygenasa

**DAG:** Diacilglicerol

**DAMPs:** patrones moleculares endógenos asociados a una lesión (*Damage-associated molecular patterns*)

**DAP:** Dolor agudo postoperatorio

**DCPQ:** Dolor crónico postquirúrgico

**DEX:** Dexketoprofeno

**EA:** Efecto adverso

**EC:** endocannabinoide

**ENK:** encefalina

**FAAH:** hidrolasas de aminas y ácidos grasos (*fatty acid amide hydrolase*)

**FAP:** Fibra aferente primaria

**GABA:** ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GBP:** Gabapentina

**GFAP:** *Glial Fibrillary Acidic Protein*

**GPCR:** Receptores acoplados a proteína G (*G protein- coupled receptor*)

**GRD:** Ganglio de la raíz dorsal



## Abreviaturas

**HIO:** Hiperalgia inducida por opioides  
**HPO:** Hiperalgia postoperatoria  
**HSP:** *Heat shock proteins*  
**Iba-1:** *Ionized calcium Binding Adaptator molecule 1*  
**IL:** Interleuquina  
**INEX:** Interneurona excitatoria  
**ININ:** Interneurona inhibitoria  
**iNOS:** sintasa inducible del óxido nítrico  
**IP3:** Inositol trifosfato  
**K<sup>+</sup>:** Potasio  
**KET:** Ketamina  
**LC:** *Locus coeruleus*  
**LPS:** Lipopolisacárido  
**M1:** O-desmetiltramadol  
**MAPK:** quinasas activadas por mitógeno (ERK, p38, JNK)  
**MDZ:** Midazolam  
**ME:** Médula espinal  
**Mg<sup>2+</sup>:** magnesio  
**MGL:** Monoacilglicerol lipasa  
**mGluR:** receptor metabotrópico para glutamato  
**MINO:** minociclina  
**MMP:** metaloproteasa  
**MRV:** Médula rostral ventromedial  
**NA:** Noradrenalina  
**Na<sup>+</sup>:** Sodio  
**NArPE:** N-araquidoil-PE  
**Nav 1.7/1.8:** Canales de sodio  
**NF-κB:** factor de transcripción nuclear κB  
**NGF:** *Nerve growth factor*  
**NK1:** Receptor de neuroquinina 1 (receptor sustancia P)  
**NMDA:** N-metil-D-aspartato  
**N-NOC:** neuronas no nociceptivas (*non nociceptive*)  
**NO:** óxido nítrico (*nitric oxid*)  
**NS:** neuronas nociceptivas específicas (*nociceptive specific*)  
**PEA:** N-palmitoiletanolamina  
**PG:** Prostaglandina  
**PGB:** Pregabalina

**PIP2:** Fosfoinositol bifosfato  
**PKA:** Proteína quinasa A  
**PKC:** Proteína quinasa C  
**PLA2:** fosfolipasa A2  
**PLC:** Fosfolipasa C  
**PPAR- $\alpha$ :** Receptor  $\alpha$  activado por proliferadores de peroxisomas  
**RO:** Receptor opioide  
**ROD:** Receptor opioide delta  
**ROK:** Receptor opioide kappa  
**ROM:** Receptor opioide mu  
**SG:** Sustancia gelatinosa  
**SGPA:** Sustancia gris periacueductal  
**SLD:** Sensibilización latente al dolor  
**SNC:** Sistema nervioso central  
**SNP:** Sistema nervioso periférico  
**SP:** Sustancia P  
**TCA:** Ciclo de los ácidos tricarbóxicos  
**TLR:** Toll-like receptor  
**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral (tumor necrosis factor)  
**TrkA:** Tirosina quinasa A  
**TrkB:** Tirosina quinasa B  
**TRM:** Tramadol  
**TRP:** Receptor de potencial transitorio (Transient receptor potencial)  
**TTX-R:** Canales de sodio tetrodotoxina-resistentes  
**TXA2:** Tromboxano  
**WDR:** neuronas de amplio rango dinámico (wide dynamic range)



## I. INTRODUCCIÓN

### 1. TRANSMISIÓN Y MODULACION NOCICEPTIVA

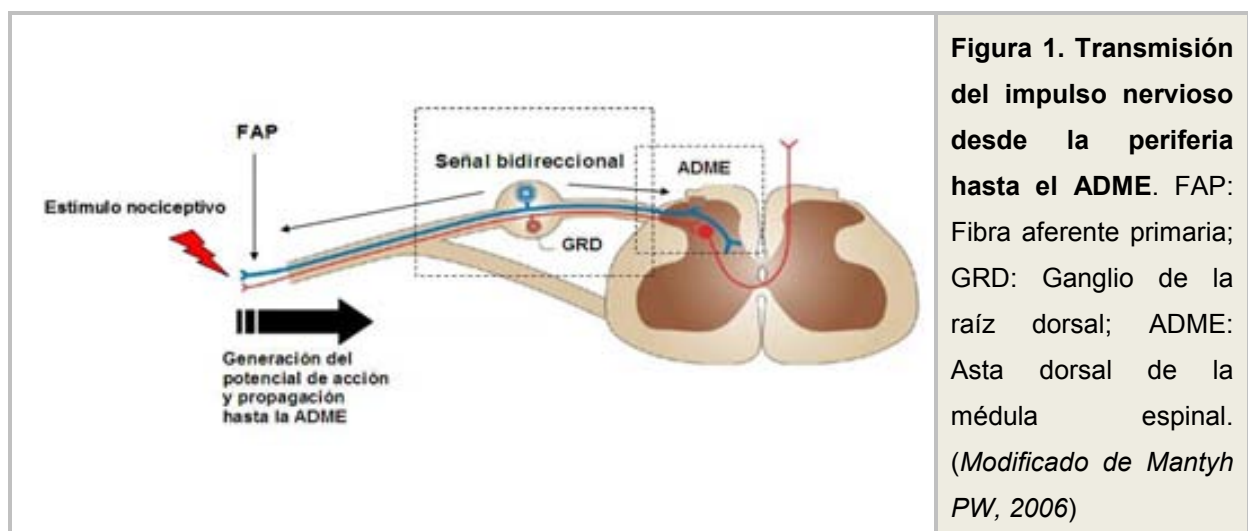
#### 1.1 Transmisión nociceptiva

La *nocicepción* es un proceso por el cual estímulos potencialmente nocivos térmicos, mecánicos o químicos son detectados o captados por una subpoblación de fibras nerviosas localizadas en la periferia llamadas *nociceptores* y transmitidos a centros superiores responsable de la percepción del *dolor* (Julius D y Basbaum AI, 2001). El *dolor* se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular, real o potencial, o descrita en términos de dicho daño (*International Association for the Study of Pain, IASP, 1994*).

A continuación se describe en detalle el proceso por el cual los nociceptores, situados en la piel y distintos organos y tejidos, actúan como receptores sensoriales codificando y transduciendo la información nociceptiva, y como esta información alcanza los centros espinales y posteriormente supraespinales para finalmente generar la sensación dolorosa.

##### 1.1.1. Fibras aferentes primarias y Ganglio de la raíz dorsal

Los estímulos periféricos son conducidos a través de los axones de los nociceptores o fibras aferentes primarias (FAP) hasta el asta dorsal de la médula espinal (ADME); estas neuronas se denominan también *neuronas de primer orden* y tienen los cuerpos celulares en los ganglios del trigémino que inervan la zona de la cabeza y en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) el resto del cuerpo. Las FAP tienen una morfología pseudo-unipolar, de manera que las proteínas y transmisores sintetizados en los ganglios se distribuyen (viajan) de forma bi-direccional hacia las terminaciones centrales (situadas en la médula espinal, ME) y periféricas (**figura 1**).

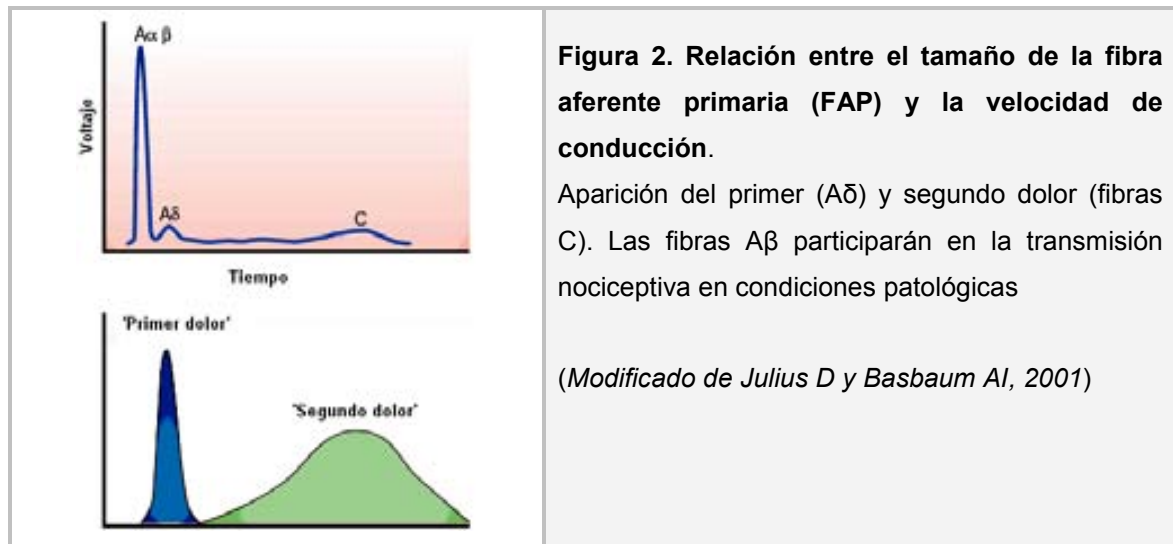


## I. Introducción

Existen tres grupos principales de fibras aferentes primarias que se clasifican bajo criterios de morfología y función (**figura 2**):

- Fibras A $\beta$ : mielinizadas de gran tamaño (>10  $\mu\text{m}$ ) y conducción rápida (30-100 m/s) (Millan MJ, 1999). Transmiten información relacionada con estímulos inocuos (no-dolorosos), como la vibración y el tacto.
- Fibras A $\delta$ : mielinizadas de diámetro medio (1-5  $\mu\text{m}$ ) y conducción rápida (5-30 m/s). Son mediadoras del dolor agudo localizado, también denominado 'primer dolor' o dolor rápido (Basbaum AI y cols., 2009), mediando la primera respuesta adaptativa al dolor (retirada). Basados en estudios electrofisiológicos, estas fibras a su vez se clasifican en dos categorías:
  - Tipo I  $\rightarrow$  Responden tanto a estímulos mecánicos como químicos; presentan umbrales térmicos relativamente altos (52-56°C) y median el '*primer dolor*' agudo ante estímulos mecánicos.
  - Tipo II  $\rightarrow$  En condiciones fisiológicas, responden a la aplicación de estímulos térmicos, pero presentan umbrales más bajos (40-45°C). Por el contrario los umbrales frente a estímulos mecánicos son mucho mayores. Median el '*primer dolor*' agudo ante estímulos térmicos (Giodano J, 2005).
- Fibras C: no mielinizadas, de pequeño diámetro (0,25-1,5  $\mu\text{m}$ ) y conducción lenta (0,5-2 m/s). Transmiten el dolor mal localizado, difuso, lento, o '*segundo dolor*' (Basbaum AI y cols., 2009). La mayoría son nociceptores polimodales, de manera que responden tanto a estímulos térmicos como mecánicos (*CMHs*, *mechano-heat-sensitive C-fiber*) (Perl ER, 2007). De especial interés son los llamados *nociceptores silentes* o silenciosos, que responden a estímulos térmicos pero no mecánicos, exceptuando en el lugar de la lesión tisular donde desarrollan también hipersensibilidad mecánica (Schmidt R y cols., 1995).

En condiciones fisiológicas, las fibras A $\delta$  y C son responsables de la transmisión nociceptiva. En cambio, las fibras A $\beta$ , que normalmente transmiten la sensación de tacto, pueden favorecer la transmisión nociceptiva durante ciertos procesos patológicos (dolor patológico).



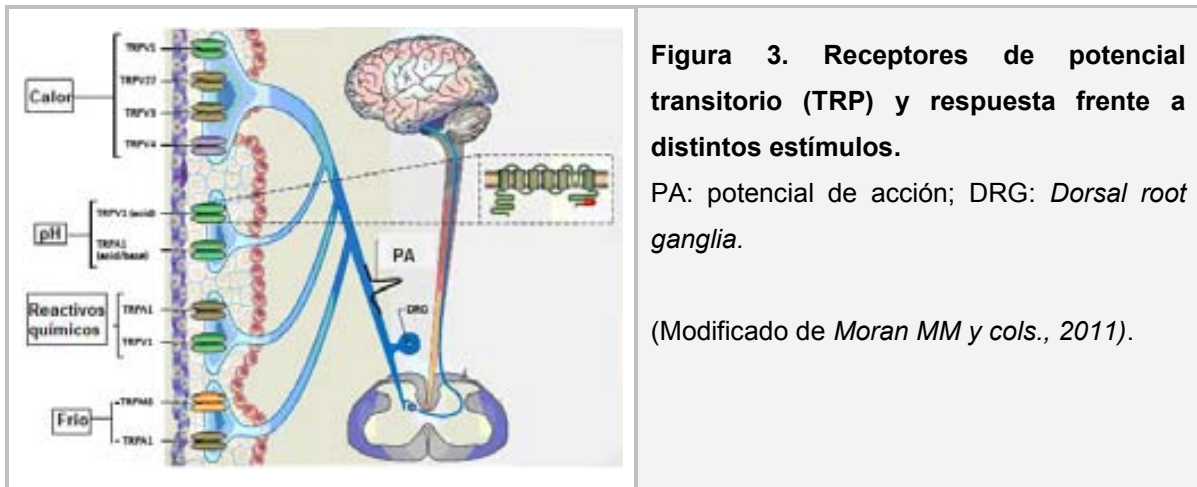
Los nociceptores se distinguen además según los transmisores y proteínas que sintetizan y liberan, y también en función de los canales iónicos que expresan, que les confieren diferentes sensibilidades. De esta forma, en la población de fibras C podemos diferenciar los grupos siguientes:

- Nociceptores peptidérgicos: Sintetizan, almacenan y liberan neuropéptidos tales como la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (*calcitonin-gene related peptide, CGRP*); también expresan el receptor de la neurotrofina tirosina-quinasa A (TrkA) que se activa por el factor de crecimiento nervioso (*nerve growth factor, NGF*).
- Nociceptores 'no peptidérgicos': Entre otras proteínas, expresan el receptor de la neurotrofina *c-ret* que es activado por el factor neurotrófico derivado de la glía (*glial-derived neurotrophic factor, GDNF*), y también por neuroturtina y artemina. Un gran porcentaje de los que expresan *c-ret* también se unen a la isolectina B4 (IB4) y expresan receptores acoplados a proteína G de la familia Mrg (Dong X y cols., 2001), así como algunos subtipos de receptores purinérgicos, especialmente el P2X<sub>3</sub>.

La diversidad funcional y molecular de los nociceptores permite la detección específica de los distintos tipos de dolor. Así, en función de los canales iónicos que expresan en sus terminaciones central y periférica, es posible diferenciar diversos tipos de nociceptores. En la periferia, se expresan principalmente canales iónicos denominados receptores de potencial transitorio (*transient receptor potencial, TRP*), que confieren a las FAP diferente sensibilidad al calor, al frío, a medios ácidos o irritantes químicos. Los TRP son una superfamilia formada por 28 canales iónicos *no selectivos* con diversas funciones fisiológicas. Esta gran familia está formada por seis *subfamilias*: los canales TRP de la subfamilia C (clásico o canónico, TRPC), la subfamilia V (vaniloide, TRPV), la subfamilia M (melastatina, TRPM), la subfamilia A (anquinina, TRPA), la subfamilia policistina (TRPP) y la

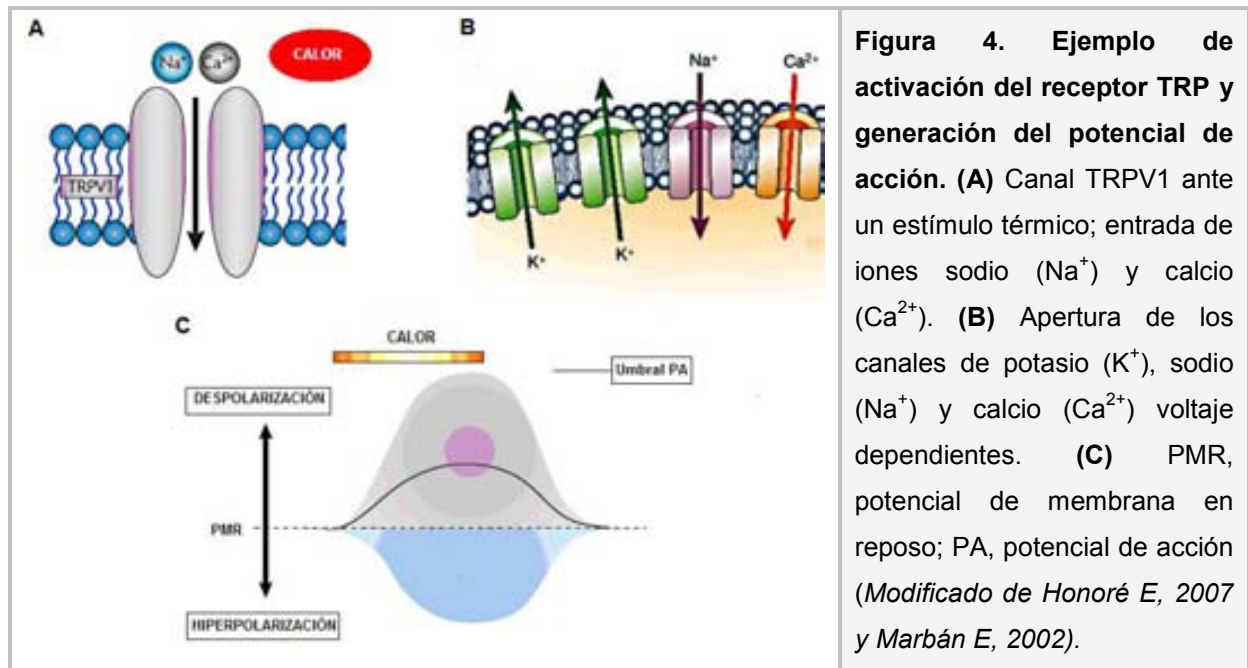
## I. Introducción

subfamilia mucoliptina (TRPML). Entre todos ellos tienen especial relevancia en la nocicepción los TRPV1 (sensibilidad al calor / medios ácidos), el TRPM8 (sensibilidad al frío) y el TRPA1 (sensibilidad a medios ácidos/ irritantes químicos) (**figura 3**).



La detección de estímulos nocivos de calor o de sustancias irritantes como la capsaicina, la llevan a cabo principalmente receptores TRPV1 que se activan cuando se supera su umbral de activación (43°C para el calor). No obstante otros subtipos de TRP vaniloides como los 2, 3 y 4 también responden a estímulos de calor pero a umbrales diferentes. En el caso de estímulos nocivos de frío o sustancias naturales como el mentol, son los receptores TRPM8 los principales sensores, aunque los TRPA1 parece que también se activarían por estímulos similares. En la respuesta ante estímulos mecánicos nocivos, participan canales de  $K^+$  como el KCNK2 (TREK) y KCNK4 (TRAAK) así como también los TRPV2 y TRPA1. Por último, los estímulos químicos nocivos son detectados por los receptores TRPV1 y TRPM8.

La estimulación de los distintos receptores por estímulos térmicos, químicos o mecánicos de suficiente intensidad provoca la apertura de estos canales y la entrada de sodio ( $Na^+$ ) y calcio ( $Ca^{2+}$ ). Como ejemplo de este proceso, mostramos en la **figura 4A** como la llegada de un estímulo térmico nocivo provoca la apertura del canal TRPV1 y la entrada de cationes, induciendo una corriente de despolarización de la membrana. Para que se inicie el potencial de acción, también es crítica la activación de los canales de  $Na^+$  (Nav 1.7 y Nav 1.8) y  $K^+$  voltaje dependientes, que cambian la conductancia para estos cationes (**figura 4B**). Este cambio de conductancia provocará la entrada de  $Na^+$  y la salida de  $K^+$ . La generación del potencial de acción depende de la magnitud del estímulo, así si el estímulo es de suficiente intensidad para despolarizar la membrana alcanzando el umbral del potencial de acción (**figura 4C**), éste se generará y se propagará a lo largo del axón hasta la terminal central (ME) (Honoré E, 2007).



**Figura 4. Ejemplo de activación del receptor TRP y generación del potencial de acción. (A)** Canal TRPV1 ante un estímulo térmico; entrada de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). **(B)** Apertura de los canales de potasio ( $\text{K}^+$ ), sodio ( $\text{Na}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) voltaje dependientes. **(C)** PMR, potencial de membrana en reposo; PA, potencial de acción (Modificado de Honoré E, 2007 y Marbán E, 2002).

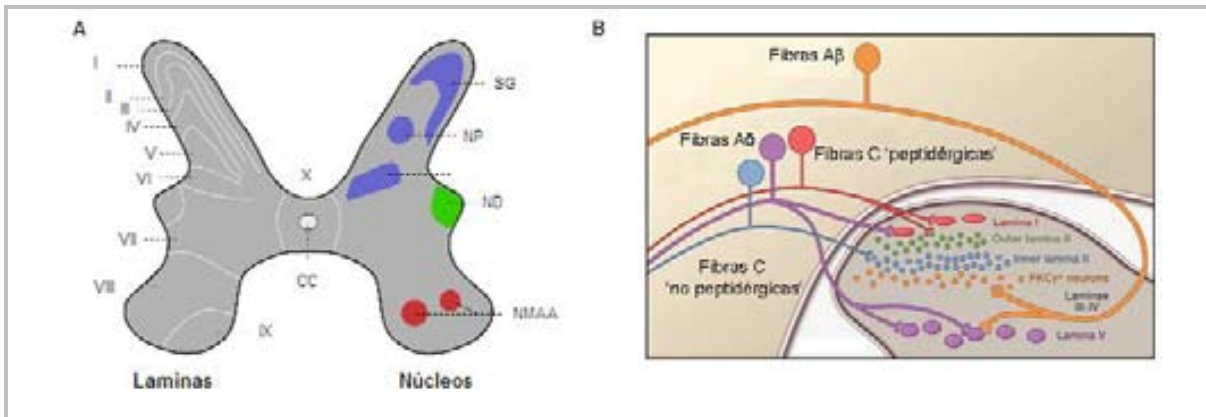
### 1.1.2. Estructuras implicadas a nivel espinal y supraespinal

La terminación central de las FAP (*neuronas de primer orden*), penetra en la ME por las raíces posteriores, haciendo sinapsis con *neuronas de segundo orden* situadas en el ADME. La llegada del potencial de acción a la terminal central de las FAP, provoca la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes (N-, P/Q- y T), permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . El aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular induce la fusión de las vesículas que contienen el neurotransmisor, con la membrana neuronal, y su liberación en la hendidura sináptica. El principal neurotransmisor excitatorio liberado es el glutamato, aunque también se liberan otros péptidos como la SP, el CGRP, la somatostatina, el neuropéptido Y, la galanina o la colecistoquinina. El glutamato y los demás transmisores interactúan con receptores específicos postsinápticos situados en las *neuronas de segundo orden* transmitiendo así la señal nociceptiva.

El ADME, está organizado anatómicamente y electrofisiológicamente en láminas (de Rexed) formadas por distintos grupos celulares (Basbaum AI y cols., 2009). Las fibras A $\delta$  proyectan a las láminas I/II<sub>0</sub> siendo responsables de la transmisión de estímulos nociceptivos; también proyectan a zonas más profundas como las láminas V, VI y X. Además las fibras C, también responsables de la transmisión nociceptiva, tienen sus terminaciones centrales en las láminas superficiales I y II; estas láminas más superficiales se agrupan bajo el nombre de sustancia gelatinosa de Rolando (SG). Por otra parte las fibras A $\beta$ , que transmiten estímulos inocuos (tacto y propiocepción), proyectan a láminas profundas (III, IV y V). Esta marcada estratificación del ADME, está relacionada con los distintos circuitos/vías en los que participan estas fibras (Snider y McMahon, 1998) (**figura 5**).



## I. Introducción



**Figura 5. Conexiones sinápticas de las Fibras Aferentes Primarias en la médula espinal.**

(A) SG, sustancia gelatinosa; NP, Núcleo propio; ND, Núcleo dorsal; NMAA, Neuronas motoras del asta anterior; CC, Canal central. (B) Se muestra la proyección de las diferentes FAPs en el ADME. Las fibras A $\delta$  (morado) proyectan a la lámina I y V, las A $\beta$  (naranja) a las láminas III, IV y V y las C (azul, rojo) a las láminas I y II. (Modificado de Basbaum AI y cols., 2009)

En el ADME, las FAP, hacen sinapsis con diferentes tipos de células, cuyos axones dan origen a las *vías o tractos ascendentes*. En función de la aferencia que reciben podemos distinguir tres tipos de células:

- Neuronas nociceptivas específicas (*Nociceptive Specific, NS*): Responden exclusivamente a estímulos nocivos de alta intensidad mediados por fibras C y A $\delta$  y se localizan en las láminas I (zona marginal), II (SG), V y VI. Están involucradas en la codificación de la localización del dolor
- Neuronas de amplio rango dinámico (*Wide Dynamic Range, WDR*): Responden ante estímulos mecánicos, térmicos y químicos transferidos por FAP A $\delta$ , C y A $\beta$ . Dada la convergencia de fibras que transmiten estímulos nocivos e inocuos, este grupo celular juega un papel fundamental en los mecanismos de modulación inhibitoria del dolor. Las neuronas WDR están localizadas en las láminas I, II, IV, V, VI y X.
- Neuronas No Nociceptivas (*Non Nociceptive, N-NOC*): Responden a estímulos inocuos mecánicos y térmicos de baja intensidad y a también a estímulos propioceptivos transmitidos por fibras A $\delta$  y A $\beta$ . Están localizadas principalmente en las láminas I, II y IV.

En función de si proyectan (o no) a centros supraespinales, las neuronas del ADME también se clasifican en:

- Neuronas de proyección: Aunque representan una pequeña minoría del número total de células del ADME, estas células son las responsables de transmitir la información

nociceptiva a centros supraespinales donde, además, están implicadas en la activación de los sistemas de control descendente

- **Neuronas propioespinales:** La mayoría son interneuronas locales con axones que pueden viajar varios segmentos por encima y por debajo de su soma, haciendo sinapsis con interneuronas y motoneuronas espinales. Sin embargo, algunos axones recorren toda la ME y coordinan los movimientos de los músculos axiales (abdomen, tórax, dorso, lumbares, cuello y cabeza) inervados por diferentes segmentos medulares. También transmiten información entre las dos hemimédulas.
- **Neuronas intrínsecas espinales o interneuronas:** Pueden ser inhibitorias o excitatorias y ejercen un control segmentario sobre la información nociceptiva (Graham BA y cols., 2007). Las interneuronas inhibitorias liberan principalmente ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y/o glicina, y sinapsan a nivel presináptico con las terminaciones de las FAP, y a nivel postsináptico con neuronas NS o WDR. La inhibición presináptica disminuye la liberación de transmisores excitatorios de las FAP, mientras que la inhibición postsináptica reduce la transmisión del estímulo nociceptivo. En cuanto a las interneuronas excitatorias, liberan mayoritariamente glutamato y ejercen un papel modulador relevante sobre la transmisión nociceptiva, que se describe más adelante.

Desde el ADME, los impulsos nociceptivos son conducidos por los axones de las neuronas de proyección (neuronas de segundo orden) a centros supraespinales, formando las *vías o tractos ascendentes*. La mayoría de estos axones decusan (cruzan la línea media) y ascienden contralateralmente hasta alcanzar los centros superiores, aunque algunos viajan ipsilateralmente. A nivel supraespinal se encuentran las *neuronas de tercer orden*, que posteriormente enviarán información a las áreas sensoriales de la corteza cerebral.

Describimos a continuación las principales *vías o tractos ascendentes* que participan en la transmisión de la información nociceptiva hacia centros superiores (Almeida TF y cols., 2004; Fields H., 2004) (**figura 6**):

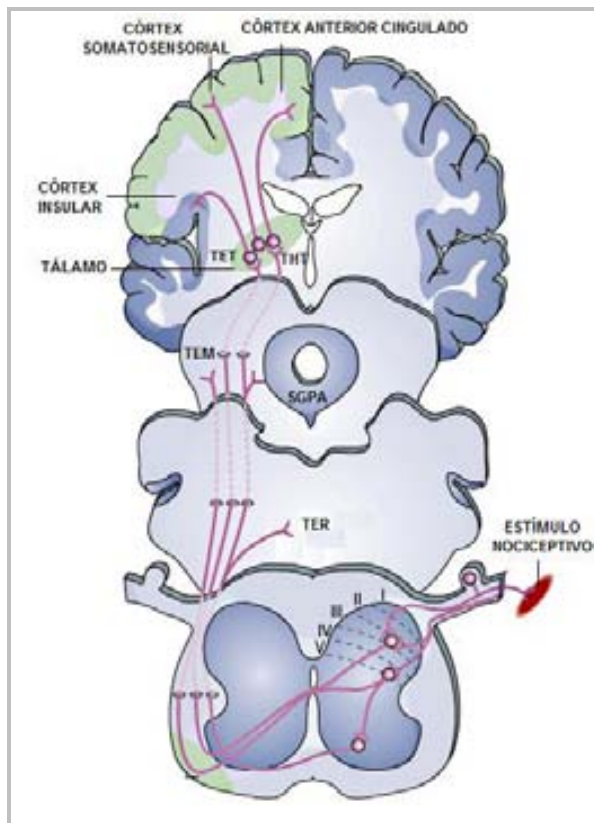
- **Tracto Espino-talámico (TET):** Este tracto se origina a partir de neuronas NS, WDR y N-NOC que transmiten potenciales inocuos y nocivos relacionados con la temperatura, el tacto, el prurito y el dolor. Los cuerpos celulares están localizados principalmente en las láminas I y V, aunque también se encuentran en las láminas II, IV, VI, VII, VIII y X. Es el tracto que está más asociado con la transmisión del dolor y la sensación térmica y proyecta fundamentalmente a las regiones lateral y medial del tálamo. Del tálamo lateral, salen proyecciones que hacen sinapsis en el córtex

## I. Introducción

somatosensorial, donde se procesa la sensibilidad discriminativa del dolor. Por otra parte, de la zona medial del tálamo las neuronas proyectan al sistema límbico (hipocampo y amígdala), que integra funciones relacionadas con la emoción, el aprendizaje y la memoria. Estas vías y sus conexiones permiten establecer la localización, la duración, intensidad y calidad de la sensación dolorosa (Millan MJ, 1999). El tracto espino-talámico también envía aferencias a la formación reticular y a la sustancia gris periacueductal (SGPA).

- **Tracto Espino-reticular (TER):** Este tracto se origina principalmente en las láminas V, VII y VIII, y algo menos en las I y X. Está formado por axones de neuronas NS y WDR, y en menor proporción, neuronas del tipo N-NOC, que transmiten estímulos nocivos e inoocuos. En su recorrido, acompaña al tracto espino-talámico; algunas fibras llegan a los núcleos intralaminares del tálamo, si bien en su mayor parte se desvían al alcanzar el tronco del encéfalo llegando a la formación reticular. A este nivel se integra el componente afectivo del dolor, las respuestas conductuales y vegetativas; se activan también los sistemas moduladores descendentes. En condiciones fisiológicas, este tracto tiene especial relevancia en la modulación inhibitoria de la nocicepción, activando estructuras del tronco del encéfalo que envían fibras descendentes inhibitorias al ADME.
- **Tracto Espino-mesencefálico (TEM):** Se origina a partir de neuronas WDR, SN y N-NOC situadas principalmente de las láminas I, II, IV, V, VI pero también de las VII y X. En función del lugar donde proyectan estas neuronas podemos diferenciar dos vías. La primera formada por neuronas WDR y SN proyecta a la SGPA y transmite información nociceptiva (excitatoria); la segunda, alcanza láminas más profundas del colículo superior y activa también mecanismos inhibitorios. La estimulación de la SGPA y áreas colindantes activa vías descendentes inhibitorias que alcanzan el ADME, modulando la transmisión del dolor; además, induce comportamientos aversivos en presencia de estímulos nocivos y respuestas cardiovasculares, motivacionales y afectivas.
- **Tracto Espino-hipotalámico (THT):** Tiene origen en las láminas I, V, X y algunas regiones alrededor del canal medular (lámina X). Está formado por neuronas SN, WDR y N-NOC y transmite estímulos nocivos e inoocuos procedentes de músculos, tendones, articulaciones, piel y vísceras. Las aferencias al hipotálamo tienen una distribución diferente según el tipo de estímulo, de tal forma que los potenciales no-nociceptivos se propagan directamente por medio del tracto trigémino-hipotalámico, mientras que las señales nociceptivas viajan a través de dos tractos, el trigémino-hipotalámico y el retículo-hipotalámico. Estas proyecciones contribuyen al control

neuroendocrino autonómico, la respuesta motivacional-afectiva y la respuesta de alerta ante una experiencia dolorosa somática o visceral.



**Figura 6. Vías ascendentes del dolor.**

Los axones de las neuronas de segundo orden decusan a la zona contralateral de la médula espinal formando los tractos ascendentes que proyectan al tálamo, la formación reticular y el mesencéfalo. Las neuronas del tálamo proyectan al córtex cerebral, región implicada en la percepción del dolor.

**TET:** Tracto espino-talámico, **TER:** Tracto espino-reticular, **TEM:** Tracto espino-mesencefálico, **THT:** Tracto hipotalámico, **SGPA:** Sustancia gris periacueductal

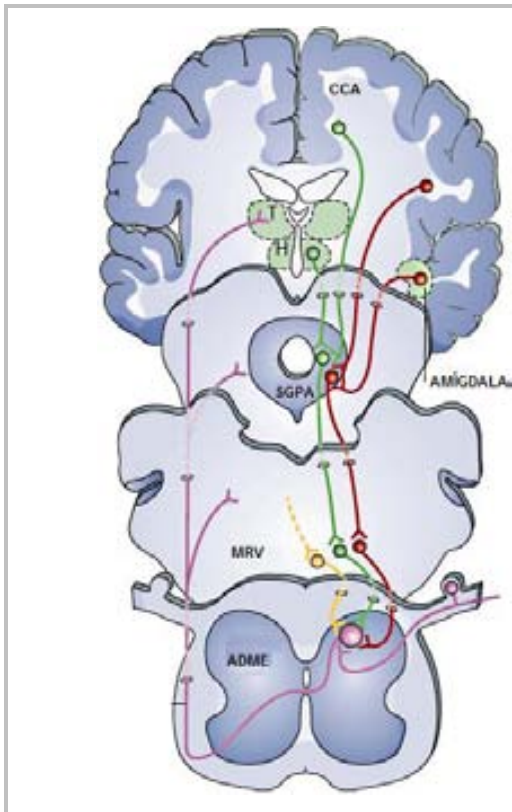
(Modificado de Fields H., 2004).

## 1.2 Modulación de la transmisión nociceptiva a nivel espinal

### 1.2.1 Sistemas descendentes

Las *vías descendentes* implicadas en la modulación del dolor tienen su origen en el tronco del encéfalo y en otras estructuras supraespinales tales como el tálamo/hipotálamo y la amígdala (**figura 7**). Estas vías proyectan a la SGPA y posteriormente a la médula rostral ventromedial (MRV), que a su vez envía señales al ADME, contribuyendo de esta forma a la modulación de la transmisión nociceptiva. Las vías descendentes tienen un papel importante en la integración de la señal nociceptiva a nivel espinal, ejerciendo una modulación *inhibidora* o *excitatoria/facilitadora* (Millan MJ, 1999).

## I. Introducción



**Figura 7. Vías descendentes que participan en la modulación nociceptiva.** El córtex cingulado anterior (CCA), el tálamo / hipotálamo (T, H) y la amígdala, proyectan a la sustancia gris periacueductal (SGPA). Ésta a su vez, envía proyecciones a la médula rostro-ventro-medial (MRV) y/o directamente al asta dorsal de la médula espinal (ADME), donde puede ejercer una modulación inhibitoria (verde) o excitatoria (rojo). En amarillo, se representan las vías descendentes serotoninérgicas.

(Modificado de Fields H., 2004).

La principal vía de modulación nociceptiva descendente es la formada por el sistema SGPA-MRV. En la MRV, se han identificado tres tipos de neuronas que participan en la modulación nociceptiva: *células OFF*, *células ON* y *células neutrales*. Las dos primeras, se activan o inhiben de manera secuencial por impulsos que provienen de la SGPA y mandan fibras descendentes que terminan en el ADME (Mason P y Fields HL, 1989).

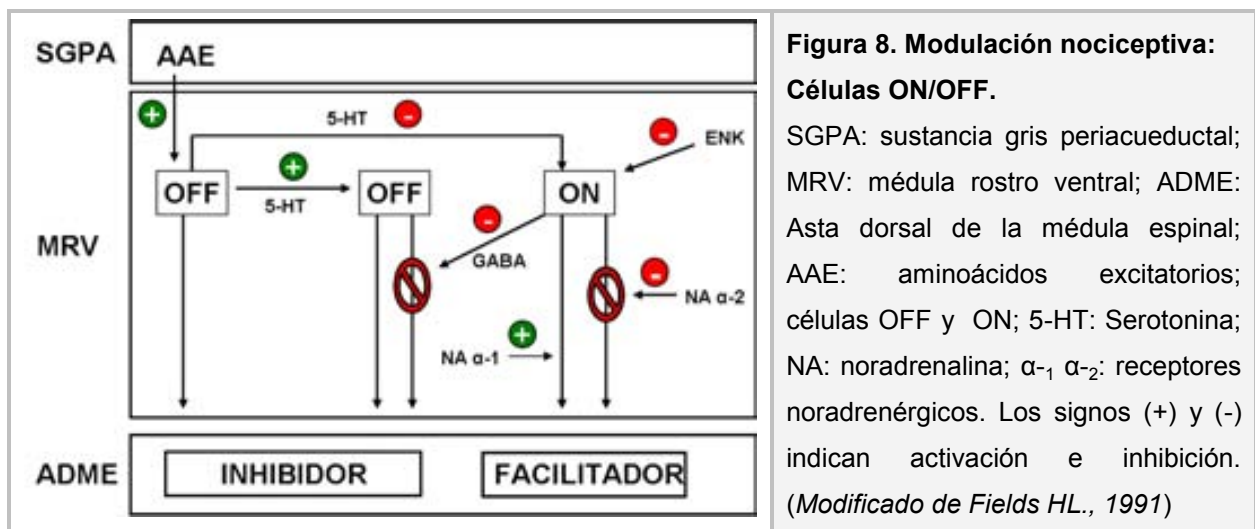
Las *células ON* proyectan desde la MRV al ADME y se activan tras la llegada de un estímulo nociceptivo, ejerciendo una acción permisiva o facilitadora (pronocicepción). La administración sistémica de opioides inhibe su activación (Barbaro NM y cols., 1986). Además, participan también en el reflejo de retirada, así, se produce inactivación de las células ON unos pocos milisegundos antes de que se produzca la retirada, momento en el cual se activan las células OFF. Contribuyen a la hiperexcitabilidad neuronal observada durante procesos inflamatorios o lesiones nerviosas (Almeida TF y cols., 2004).

Las *células OFF* también proyectan al ADME, pero en este caso tras su activación ejercen un papel inhibitorio de la transmisión nociceptiva (antinocicepción). La administración sistémica o microinyección en la SGPA de opioides como la morfina, activan selectivamente estas neuronas (Fields HL y cols., 1991).

Las *células neutrales*, aparentemente no están relacionadas con el comportamiento nociceptivo, ya que no se activan por estímulos dolorosos y por tanto en condiciones fisiológicas de dolor agudo, no contribuirían a la modulación descendente. Se ha propuesto que estas células podrían ser reclutadas para convertirse en células ON u OFF durante el

desarrollo de dolor crónico (Miki K y cols., 2002). Algunas de estas células son serotoninérgicas, y dada la relevancia de este transmisor en la modulación nociceptiva, se ha postulado su posible implicación en la modulación del dolor (Winkler CW y cols., 2006).

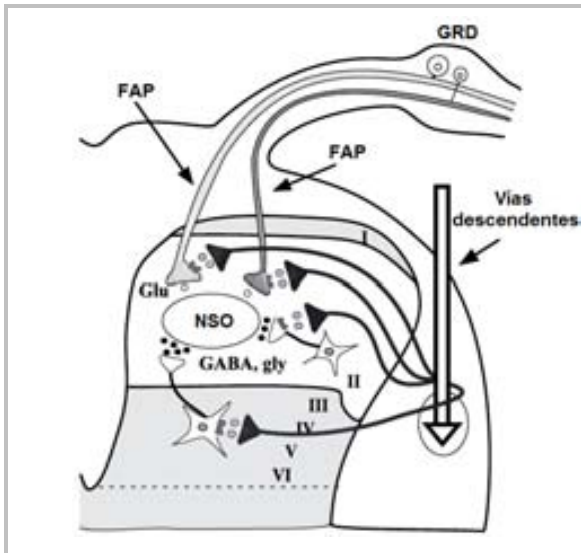
La activación o inhibición de estas células también está regulada por la liberación de diversas sustancias procedentes de células extrínsecas, como la noradrenalina (NA) o intrínsecas de la MRV, como las encefalinas (ENK) (**figura 8**). Las neuronas de la SGPA tienen aminoácidos excitatorios (como glutamato) que al proyectar a la MRV, excitan/activan las células OFF, las cuales al proyectar al ADME ejercen un efecto neto inhibitorio sobre la transmisión nociceptiva. Además, algunas de las células OFF contienen serotonina (5-HT, 5- hidoxitriptamina), de modo que activaran otras células OFF, gracias a sus proyecciones en la propia MRV, inhibiendo a su vez las células ON. Las células ON pueden ser también inhibidas directamente por células intrínsecas de la MRV que liberan encefalinas (ENK). Por otra parte, la gran mayoría de la células ON contienen GABA; cuando se activan y liberan este neurotransmisor, al actuar sobre las células OFF las inhibe produciendo un efecto neto facilitador de la transmisión nociceptiva (Fields HL., 1991). La NA induce ambos efectos según el tipo de receptor al que se una; así la unión al receptor  $\alpha_1$  incrementa la actividad de las células ON (pronocicepción), mientras que la activación del receptor  $\alpha_2$  inhibe las células ON (antinocicepción) (**figura 8**). Existe una cierta controversia respecto al papel de la 5-HT, puesto que podría ejercer tanto un efecto antinociceptivo como pronociceptivo en función del receptor con el que interacciona (Viguié F y cols., 2013).



Las *fibras inhibitorias descendentes* que se originan en la SGPA y el MRV liberan 5-HT y NA en la médula espinal (fibras noradrenérgicas y serotoninérgicas), que actúa a nivel pre (FAP, interneuronas) y post-sináptico (neuronas de segundo orden) (**figura 9**).



## I. Introducción



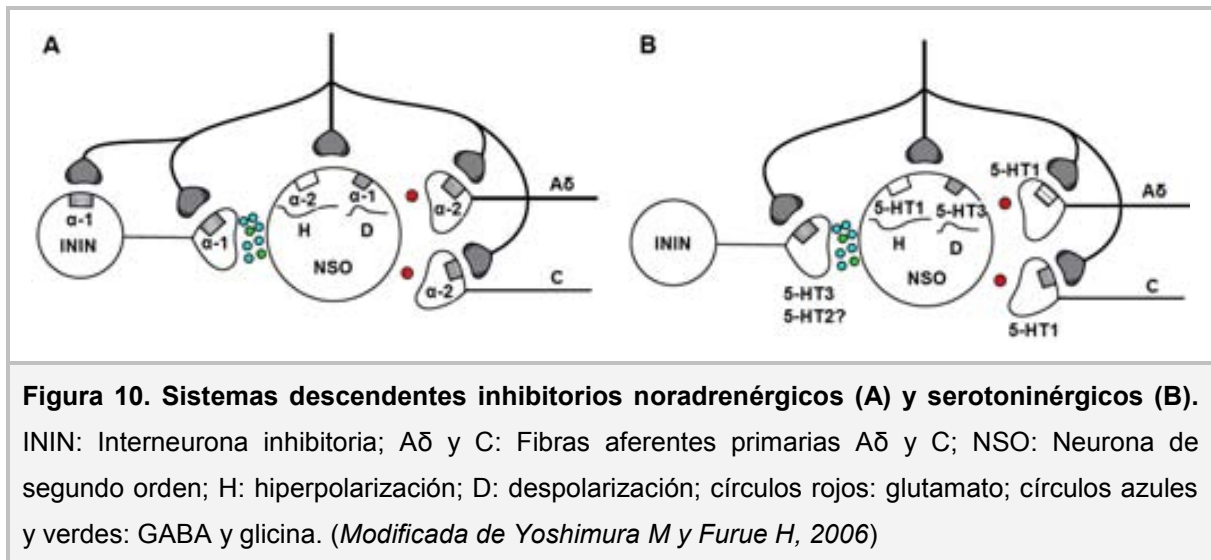
**Figura 9. Vías descendentes noradrenérgicas y serotoninérgicas.**

GRD: ganglio de la raíz dorsal; FAP: fibra aferente primaria; NSO: neurona de segundo orden; Glu: glutamato; gly: glicina.

(Modificado de Yoshimura M and Furue H, 2006).

A nivel presináptico, la NA puede actuar favoreciendo o inhibiendo la liberación de transmisores en la hendidura sináptica. En el primer caso, la unión de la NA a los receptores  $\alpha_1$  presinápticos, induce la liberación de transmisores inhibitorios (GABA, glicina) situados en interneuronas gabaérgicas y glicinérgicas (Baba H y cols., 2000). Por su parte, la activación de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos presinápticos (situados en la terminación central de las FAP A $\delta$  y C), disminuye la liberación de transmisores excitatorios como el glutamato (Yoshimura M y Furue H., 2006); actúa además sobre las interneuronas excitatorias, disminuyendo también la liberación de glutamato a este nivel. A nivel postsináptico, la NA activa los receptores  $\alpha_2$  situados en las neuronas de segundo orden, resultando en la apertura de los canales de  $K^+$  e hiperpolarización de la membrana, inhibiendo de esta forma la transmisión de la señal nociceptiva (**figura 10A**).

La liberación de 5-HT en el ADME puede tener también efectos tanto pro- como antinociceptivos (**figura 10B**); se ha postulado que el efecto antinociceptivo se produce por interacción de la 5-HT con diferentes subtipos de receptores 5-HT<sub>1</sub> presinápticos, localizados en las terminales centrales de las FAP; como consecuencia de la activación, se inhibe la liberación de glutamato, reduciéndose la transmisión excitatoria. La interacción de la 5-HT con receptores 5-HT<sub>3</sub> y posiblemente 5-HT<sub>2</sub> presinápticos que se encuentran en las interneuronas inhibitorias, induciría la liberación de GABA (transmisor inhibitorio). A nivel postsináptico, la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en las neuronas de segundo orden inhibiría la transmisión excitatoria por hiperpolarización de la membrana (Ito A y cols., 2000), por lo que en su conjunto, la acción de las fibras serotoninérgicas descendes en la ME, parecería ser predominantemente inhibitorio.



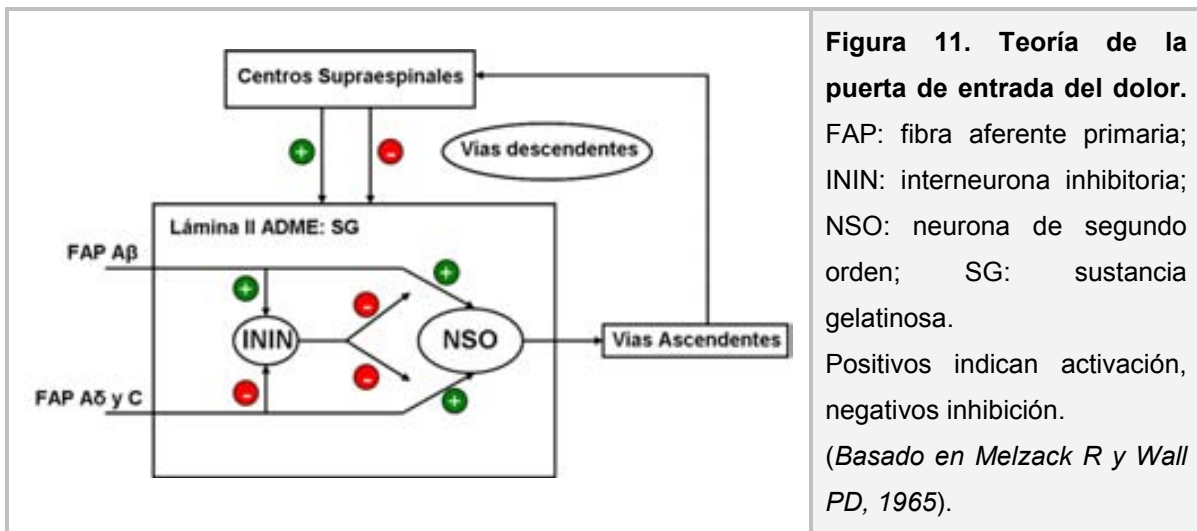
El papel pronociceptivo de la 5HT es controvertido, y algunos autores postulan que los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>7</sub> podrían ser responsables de las acciones facilitadoras de la 5-HT a nivel espinal (Mickle A y cols., 2012; Chang EY y cols., 2013), mientras que otros sostienen que su activación participa en la modulación inhibitoria de la nocicepción (Hayashida K y cols., 2012; Brenchat A y cols., 2012; Yanarates y cols., 2010). Es probable que en condiciones fisiológicas exista un balance entre los sistemas excitatorios e inhibitorios, que podría descompensarse en condiciones patológicas por un cambio del patrón de expresión de los receptores, favoreciendo un balance neto excitatorio (Viguiet F y cols., 2013).

Por último fisiológicamente el sistema opioide endógeno (SOE) juega un papel relevante en la modulación inhibitoria en la médula espinal. Por una parte se han descrito fibras descendentes inhibitorias que desde el MRV proyectan a la medula espinal liberando localmente dinorfina (Tan-No K y cols., 2009); también se encuentran ENK en interneuronas inhibitorias de la ME. Los receptores opioides (RO)  $\mu/\delta$  se encuentran tanto anivel pre (FAP) como postsináptico (neuronas de segundo orden), inhibiendo la liberación de neurotransmisores excitatorios (pre) e induciendo hiperapolarización de la membrana. Como consecuencia se produce la inhibición de la transmisión nociceptiva (Stein C y Zöllner C, 2009). En el organismo de los mamíferos, el SOE es el principal modulador inhibitorio de la nocicepción y constituye la base para la utilización de los opioides como fármacos analgésicos en humanos.



### 1.2.2 Modulación local

A nivel de la ME las neuronas reciben señales de las FAP, de las interneuronas locales (excitatorias, e inhibitorias) y de las vías descendentes (principalmente fibras noradrenérgicas y serotoninérgicas,); también participan en la modulación las sustancias liberadas a partir de las células de glía (Milligan ED y Watkins LR, 2009) [ver apartado 3]. Estos sistemas actúan a nivel pre- y postsináptico integrando las señales durante la transmisión nociceptiva. La modulación nociceptiva espinal fue planteada por Melzack R y Wall PD en 1965, cuando propusieron la teoría de la ‘puerta de entrada del dolor’ (*‘The gate control theory’*) (figura 11). El modelo propone que las señales periféricas transmitidas por las FAP de mediano y pequeño tamaño ( $A\delta$  y C, respectivamente) activan las neuronas de segundo orden localizadas en la ME, inhibiendo a la vez las interneuronas inhibitorias. De este modo se permite la transmisión a través de la señal a centros supraespinales (situación de ‘puerta abierta’). Por el contrario, la activación de las neuronas de segundo orden por parte FAP de mayor calibre ( $A\beta$ ) activaría las interneuronas inhibitorias, inhibiendo de esta forma la transmisión nociceptiva (‘puerta cerrada’) (Moayedi M y Davis KD, 2013). Esta teoría también postulaba que “la puerta de entrada” estaba controlada por mecanismos supraespinales, los cuales fueron corroborados posteriormente.



**Figura 11. Teoría de la puerta de entrada del dolor.** FAP: fibra aferente primaria; ININ: interneurona inhibitoria; NSO: neurona de segundo orden; SG: sustancia gelatinosa. Positivos indican activación, negativos inhibición. (Basado en Melzack R y Wall PD, 1965).

## 2. SENSIBILIZACIÓN NOCICEPTIVA

### 2.1 Sensibilización nociceptiva inducida por la lesión tisular

La lesión tisular induce una reacción inflamatoria local que se caracteriza por enrojecimiento, edema, calor, dolor y disminución de los umbrales nociceptivos (sensibilización al dolor). Durante la reacción inflamatoria se liberan sustancias químicas procedentes de las células del tejido lesionado y del sistema inmune residentes en el lugar de la lesión. Aparece también vasodilatación y extravasación de plasma y de células sanguíneas, que a su vez liberan mediadores inflamatorios, manteniendo de esta forma el proceso inflamatorio. Las sustancias químicas liberadas pueden estimular directamente los nociceptores e inducir dolor; la estimulación continuada de los nociceptores (FAP), induce además una serie de cambios plásticos en el SNP y SNC responsables de la sensibilización periférica y central. Desde un punto de vista funcional, la lesión tisular aumenta la sensibilidad al dolor en el área lesionada (*hiperalgesia primaria*), hecho que está en relación a la sensibilización de los nociceptores, por lo que se denomina *sensibilización periférica*. La hipersensibilidad a estímulos nocivos se observa también en zonas contiguas a la lesión (*hiperalgesia secundaria*) y se produce en relación a cambios plásticos en el SNC, durante el proceso denominado *sensibilización central* (Hucho T y Levine JD 2007) (**figura 12**).



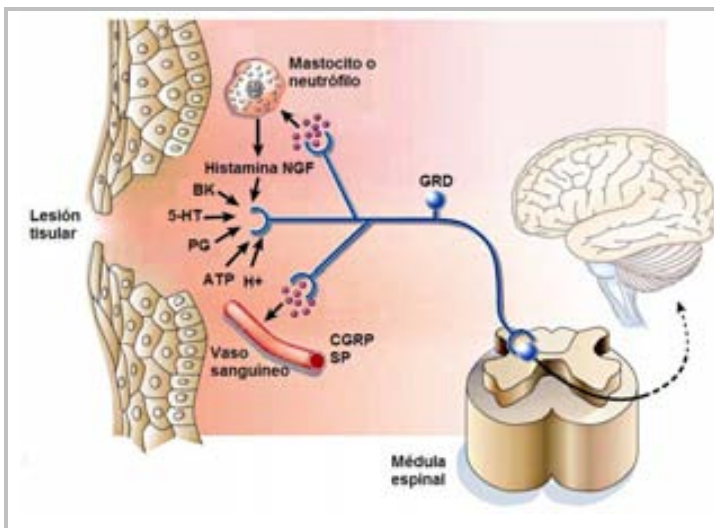
Por su importancia en el presente proyecto, los fenómenos de sensibilización nociceptiva se describen detalladamente en los apartados siguientes.

#### 2.1.1 Sensibilización periférica

La lesión tisular induce una reacción inflamatoria local con liberación de múltiples sustancias químicas procedentes del tejido lesionado y de células del sistema inmune residentes y reclutadas al lugar de la lesión. Entre las células inmunes encontramos mastocitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, queratinocitos y fibroblastos, entre otras; estas células liberan múltiples moléculas de *señalización*, incluyendo neurotransmisores (5-HT), péptidos (bradiquinina, BK), sustancias lipídicas como

## I. Introducción

prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), tromboxanos y leucotrienos, endocannabinoides, neurotrofinas (NGF), citoquinas, quimoquinas, proteasas extracelulares y protones (H<sup>+</sup>). Estas sustancias forman la denominada 'sopa inflamatoria' (Basbaum AI y cols., 2009) y actúan sobre receptores específicos situados en las terminaciones periféricas de los nociceptores, induciendo su activación y como consecuencia la aparición de dolor. La exposición continua de las FAP a los mediadores de la inflamación induce cambios plásticos en estas terminaciones periféricas de los nociceptores, responsables de la sensibilización periférica. Además, la activación de las terminaciones periféricas inicia el proceso denominado *inflamación neurogénica*. Durante el mismo, la activación de los nociceptores provoca la liberación de neuropéptidos (SP y CGRP) que actúan sobre los vasos sanguíneos provocando vasodilatación, disrupción del endotelio vascular y extravasación de plasma y células sanguíneas; contribuyen de esta forma al reclutamiento de células inmunes procedentes de la circulación. Los neuropéptidos favorecen la degranulación de los mastocitos y neutrófilos que liberan entre otros mediadores, 5-HT e histamina; estas sustancias contribuyen a la aparición de dolor localizado en el área lesionada (**figura 13**)



**Figura 13. Esquema de los eventos inducidos por la lesión tisular. Sensibilización periférica.**

PG: prostaglandinas; 5HT: serotonina; BK: bradiquinina; NGF: Factor de crecimiento neuronal; CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina; SP: Sustancia P.

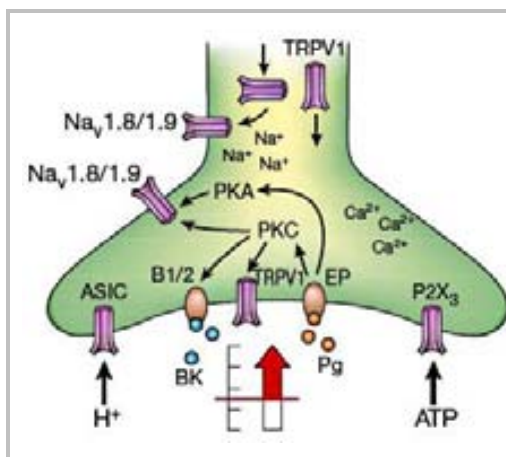
(Modificada de Julius y Basbaum, 2001).

La inflamación periférica induce modificaciones en el patrón de expresión de proteínas y transmisores (por ejemplo TRPV1, SP, etc) a nivel de las terminaciones periféricas y centrales de los nociceptores. El proceso requiere el transporte retrógrado de la señal desde la periferia a los cuerpos celulares situados en el GRD; a este nivel, se activan también cascadas de señalización intracelular, y se inducen cambios en la transcripción, traducción y transporte anterógrado (y retrógrado) de las proteínas que se expresan en las terminaciones periféricas y centrales.

Entre los receptores que se sobreexpresan durante los procesos de sensibilización periférica destacan los canales de Na<sup>+</sup> voltaje dependiente, como el Na<sub>v</sub>1.8/1.9. El incremento de estos canales permite un aumento de la excitabilidad de la membrana de manera suficiente

para generar potenciales de acción espontáneos, fenómeno conocido como *actividad ectópica*; como consecuencia aumentan los impulsos excitatorios que alcanzan la terminal central de las FAP. Los canales de  $\text{Na}_v$  son fosforilados por las quinasas PKA y PKC, que a su vez se activan por la acción de algunos mediadores inflamatorios como las prostaglandinas (PGs), BK o neurotrofinas; además, sustancias como los  $\text{H}^+$  y el adenosín trifosfato (ATP) del medio al interactuar con sus respectivos receptores (*Acid-Sensing Ion Channel* (ASICs) y  $\text{P2X}_3$ , potencian la respuesta (**figura 14**).

La lesión tisular inflamatoria induce también la liberación de citoquinas como la interleuquina (IL)  $\text{IL-1}\beta$  y la  $\text{IL-6}$  y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  ( $\text{TNF-}\alpha$ ) (Ritner y cols., 2009). A pesar de que hay evidencias que apoyan la acción directa de estas citoquinas sobre los nociceptores, su principal contribución a la hipersensibilidad es la potenciación de la respuesta inflamatoria incrementando la liberación de sustancias proalgésicas como las PGs, el NGF, la BK y los  $\text{H}^+$ .

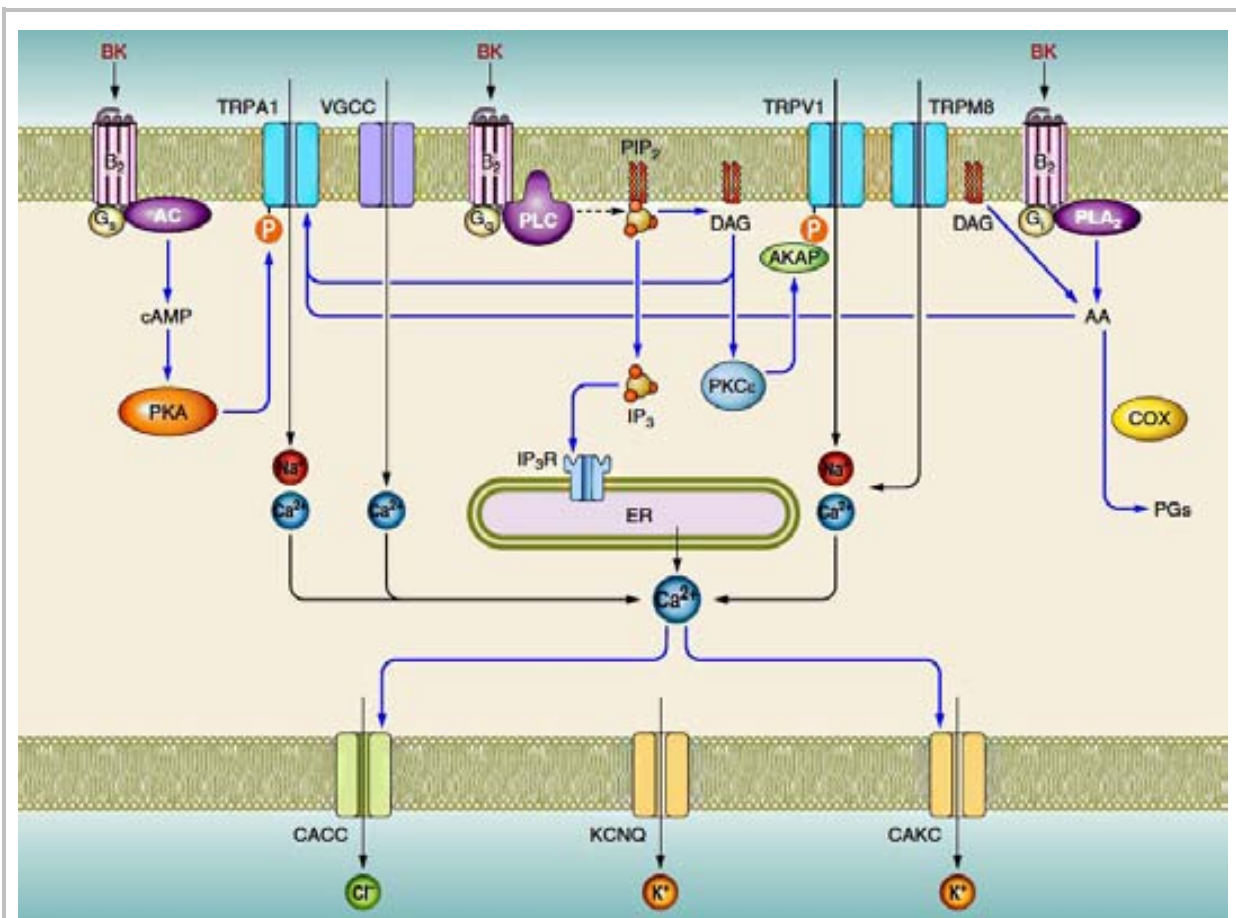


**Figura 14. Sensibilización Periférica.** BK: bradiquinina; B1/2: receptores 1 y 2 de la bradiquinina; Pg: prostaglandina; EP: receptor de prostaglandina;  $\text{H}^+$ : protones; ASIC: *Acid-Sensing Ion Channels*; ATP: adenosin trifosfato;  $\text{P2X}_3$ : receptor purinérgico; PKA, PKC: proteín-quinasas A y C;  $\text{Ca}^{2+}$ : calcio;  $\text{Na}^+$ : sodio;  $\text{Na}_v1.8/1.9$ : canales de sodio; TRPV1: *Transient receptor potencial Vanilloid 1*. (Modificado de Scholz J y Woolf CJ, 2002)

La BK y las PGs, actúan sobre sus receptores B1/2 y EP, respectivamente, ambos acoplados a proteínas G (*G protein-coupled receptor*, GPCR) activando diferentes cascadas de señalización (**figura 15**). La figura muestra que la BK liberada por diferentes tipos celulares en el lugar de la lesión, se une a su receptor (B) situado en las terminales periféricas de las FAP (**figura 15**), activando las proteínas G ( $G_s$ ,  $G_q$  y  $G_i$ ). La activación de la  $G_s$  induce la activación de la adenilato ciclasa (AC), aumentando los niveles de adenosín monofosfato cíclico ( $\text{AMP}_c$ ) y facilitando así la activación de la PKA. La PKA activará (fosforilando) receptores como el TRPA1 que permiten el paso de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y contribuyen a aumentar la excitabilidad neuronal y la liberación de más sustancias pronociceptivas. La activación de la proteína  $G_q$ , activa la cascada de señalización de la fosfolipasa C (PLC); en el proceso se libera diacilglicerol (DAG), que activará la PKC, quinasa que en última instancia fosforilará el receptor TRPV1, disminuyendo el umbral de activación del receptor, e incrementando así la magnitud de las respuestas. El receptor TRPV1 se encuentra sobreexpresado en procesos inflamatorios y modula la

## I. Introducción

hipersensibilidad inducida tras la lesión tisular (Basbaum AI y cols., 2009). Además, tras la activación de la vía de señalización de la PLC, también se libera inositol trifosfato ( $IP_3$ ), molécula que al interactuar con su receptor ( $IP_3R$ ) en el retículo endoplasmático facilita la salida de  $Ca^{2+}$  al citosol. Por último, la unión de la BK a sus receptores acoplados a proteína  $G_i$  activa la cadena de señalización de la fosfolipasa  $A_2$  ( $PLA_2$ ); esta enzima libera ácido araquidónico (AA), el cual, además de interactuar y activar directamente sobre los receptores TRPA1, es el sustrato principal de las ciclooxigenasas (COX) para la formación de PGs, entre ellas la  $PGE_2$  que es pronociceptiva (**figura 15**).



**Figura 15. Esquema simplificado de la activación receptores neuronales acoplados a proteínas G durante la sensibilización periférica. Efecto de la bradiquinina.** BK: bradiquinina; B2: receptor bradiquinina; TRPA1, TRPV1, TRPM8: receptores de potencial transitorio A1, vaniloide 1, M8; AC: adenilato ciclasa; PKA, PKC: proteína quinasa A y C; PLC: fosfolipasa C;  $PIP_2$ : fosfoinositol bifosfato; DAG: diacilglicerol;  $IP_3$ : inositol trifosfato;  $PLA_2$ : fosfolipasa  $A_2$ ; AA: ácido araquidónico; COX: ciclooxigenasa; PGs: prostaglandinas; VGCC, CACC, KCNQ, CAKC: canales de calcio, cloro y potasio. (Modificado de Pethö G y Reeh PW, 2012)

De manera similar, la interacción de las PGs ( $PGE_2$  y  $PGI_2$  entre otras) con sus receptores (EP) acoplados a proteínas  $G_{s/q}$  también induce la activación de las PKA y PKC, las cuales

activan entre otros los receptores los Nav<sub>1.8/1.9</sub> (TTX-R, que son canales de Na<sup>+</sup> tetrodotoxina-resistentes). Igual que en el caso anterior la vía de la PLC permite la salida de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplasmático.

En ambos ejemplos (BK y PGs), la activación de los canales permite el flujo (entrada y salida) de iones que facilitan la despolarización, disminuyendo los umbrales de activación y la transmisión de la señal, aumentando así la excitabilidad neuronal. Por otro lado, la entrada de Ca<sup>2+</sup> o salida desde el RE favorece la liberación de sustancias pronociceptivas como la SP o CGRP.

Otro elemento importante en el proceso de sensibilización periférica es el NGF. Esta neurotrofina actúa uniéndose al receptor TrkA expresado en la membrana de los nociceptores peptidérgicos C (Ritner HL y cols., 2009; Chao MV y cols., 2006). La activación de este receptor activa vías de señalización intracelular como son las PLC, las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) y la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K). Como resultado, se potencian también las respuestas mediadas por receptores como el TRPV1. Además de los efectos inmediatos, el NGF es transportado retrógradamente al núcleo celular del soma de las FAP situado en el GRD (Coutaux A y cols., 2005), donde promueve la expresión de proteínas pronociceptivas y/o receptores; entre ellas encontramos SP, CGRP, factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), TRPV1 y Nav1.8 (Ji RR y cols., 2002). Este proceso se produce mediante la activación de segundos mensajeros (ERK, p38 y JNK) que a su vez se translocan al núcleo activando los factores de transcripción CREB, ATF y c-Jun.

### 2.1.2 Sensibilización central

La activación continua de las terminaciones periféricas por el proceso inflamatorio desencadena un incremento de la excitabilidad y la eficacia sináptica en el ADME, así como un aumento del campo efector de las neuronas, que puede extenderse a centros supraespinales (Woolf CJ, 2011). En la ME, el incremento en la eficacia sináptica se produce tanto en las terminaciones centrales de los nociceptores (facilitación homosináptica) como en las sinapsis de las FAP no-nociceptivas, como son las fibras A $\beta$  (facilitación heterosináptica) (Woolf CJ y King AE, 1990); ambas contribuyen a la disminución de los umbrales nociceptivos y a la hiperalgesia secundaria.

En la sensibilización central participan mecanismos tempranos y tardíos; entre los primeros, se encuentra el denominado *wind-up*, que es consecuencia de la facilitación homosináptica y que se caracteriza por un incremento de los potenciales de acción en relación a la llegada de estímulos continuos y repetidos de las fibras C. En ausencia de inflamación, estas fibras liberan glutamato, SP y CGRP, produciendo potenciales sinápticos lentos; sin embargo, tras

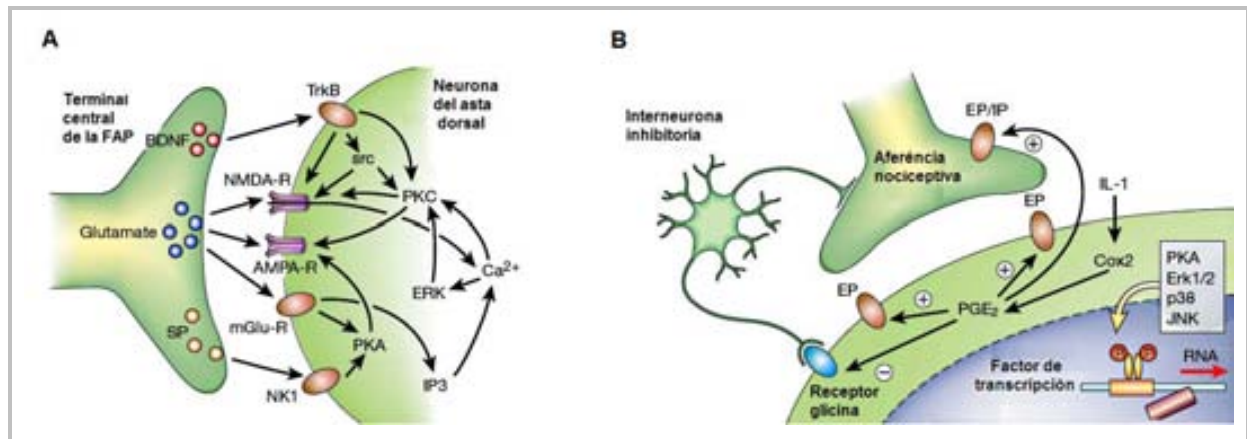


## I. Introducción

la lesión tisular, la suma temporal de estos potenciales induce una despolarización de la membrana postsináptica suficiente para activar el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), eliminando el bloqueo del magnesio ( $Mg^{2+}$ ) que lo mantiene inactivo en condiciones fisiológicas. Como consecuencia se incrementa la sensibilidad del receptor del glutamato, aumentando progresivamente la respuesta ante estímulos procedentes de la periferia (Ji RR y Woolf CJ, 2001). Durante este proceso se reclutan además otras aferencias sensoriales (fibras  $A\beta$ ).

Los transmisores excitatorios liberados por las terminales centrales de las FAP (neurona presináptica) en el hendidura sináptica actúan sobre receptores postsinápticos (localizados en la neurona de segundo orden) como el NMDA, AMPA, NK1 y el receptor de neurotrofinas tirosina quinasa B (TrkB) entre otros, activando cascadas de señalización intracelular; como consecuencia, aumentan la expresión de canales iónicos y/o la actividad y el tráfico de receptores, incrementando la eficacia sináptica (**figura 16A**) (Woolf CJ y Salter MW, 2000). De especial relevancia entre las quinasas intracelulares activadas son la quinasa Src y la ERK, así como la  $Ca^{2+}$ /calmodulina proteína quinasa II (CamKII); la primera es la principal responsable de fosforilar las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA, contribuyendo a que este receptor permanezca activo. Por su parte las ERK son responsables de la activación de la PKC que, a su vez, contribuye a la fosforilación de receptores de glutamato (NMDA, AMPA).

A nivel molecular, en el ADME, el proceso inflamatorio periférico también induce cambios plásticos a largo plazo en la eficacia sináptica. Algunas proteínas que incrementan su expresión están codificadas por genes de expresión temprana, como el c-fos y la COX-2, y otros en genes de expresión tardía como los que codifican la prodinorfina, el receptor NK1 y receptor TrkB. Estos últimos, se transcriben cuando la señal nociceptiva es intensa y continua/sostenida, contribuyendo al mantenimiento de la sensibilización central, tanto a nivel espinal como supraespinal. De especial interés durante el proceso de sensibilización central es la síntesis de PGE2 inducida por la expresión de la enzima COX-2 (Telleria-Diaz A y cols., 2010). Esta PG actúa sobre receptores (EP) pre y postsinápticos, induciendo una despolarización directa de las neuronas del ADME; reduce también la actividad del receptor de glicina, por lo que disminuye su efecto modulador-inhibidor sobre la transmisión nociceptiva (**figura 16B**).



**Figura 16. Sensibilización Central. (A)** FAP: Fibras aferentes primarias; PKA, PKC, ERK y Src: quinasas intracelulares; receptores de glutamato NMDA, AMPA, mGlu; SP: sustancia P y su receptor NK1; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro y su receptor TrkB. **(B)** PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>; COX-2: ciclooxigenasa 2; ERK1/2, p38 y JNK: quinasas activadas por mitógeno (*Modificado de Scholz J y Woolf CJ, 2002*).

Se ha descrito que la síntesis a nivel espinal, del producto proteico c-Fos participa en las cascadas de señalización implicadas en cambios plásticos a largo plazo; por sus características se ha utilizado ampliamente como marcador de excitabilidad neuronal en modelos de dolor (Coggeshall RE, 2005).

Entre los genes de expresión tardía, la activación del gen de la prodinorfina induce la síntesis de dinorfina, que podría participar en la sensibilización al dolor mediante la activación directa o indirecta de receptores opioides ( $\kappa$ ) y no opioides. También el aumento en la síntesis de los receptores NK1 y TrkB tiene un papel importante, puesto que favorecen que persista la sensibilización nociceptiva.

Los cambios transcripcionales en las neuronas del ADME se observan también en las FAP, debido a cambios fenotípicos en el GRD, como la expresión de SP y BDNF en las fibras A $\beta$ , que de esta forma contribuyen a la sensibilización central.

Por último, las células de glía situadas en el SNC y SNP, desempeñan un papel importante en la sensibilización nociceptiva, liberando citoquinas y sustancias excitatorias. Puesto que las células de glía son objeto de estudio en el presente trabajo, sus principales funciones y participación en la sensibilización nociceptiva se describe detalladamente el **apartado 3** de la presente introducción.



### 3. PAPEL DE LA GLÍA EN LA NOCICEPCIÓN

#### 3.1 Las células de glía en el sistema nervioso

En el SNC, el número de células gliales es muy superior a las neuronas, de tal forma que por cada neurona existen entre 10 y 50 células de glía, ocupando más de la mitad del volumen del cerebro humano. Estas células son de vital importancia durante el desarrollo y el normal funcionamiento del sistema nervioso adulto.

Durante los últimos años, las células de glía han despertado gran interés por su papel en la transmisión/modulación nociceptiva, ya que participan tanto en el inicio como en la persistencia o mantenimiento de las señales nociceptivas (Scholz J y Woolf CJ, 2007). Por este motivo, las células de glía en la ME, concretamente los astrocitos y la microglía, se consideran hoy día posibles dianas farmacológicas en la prevención y tratamiento del dolor crónico en humanos (Milligan ED y Watkins LR, 2009). Las células de glía son muy versátiles y los estímulos nociceptivos inducen cambios a corto y largo plazo destacando: cambios morfológicos, alteraciones en la liberación de mediadores proinflamatorios y proalgésicos, variaciones en su capacidad de inducir neurotoxicidad y proliferación, y pérdida de la función que modifica la neurotransmisión, entre otros.

Las células gliales en el SNC se pueden dividir en dos grandes grupos llamados *microglía* y *macroglía*. Los astrocitos (macroglía) y la microglía son los más importantes en relación a la transmisión nociceptiva, y se describen a continuación puesto que son objeto del presente estudio.

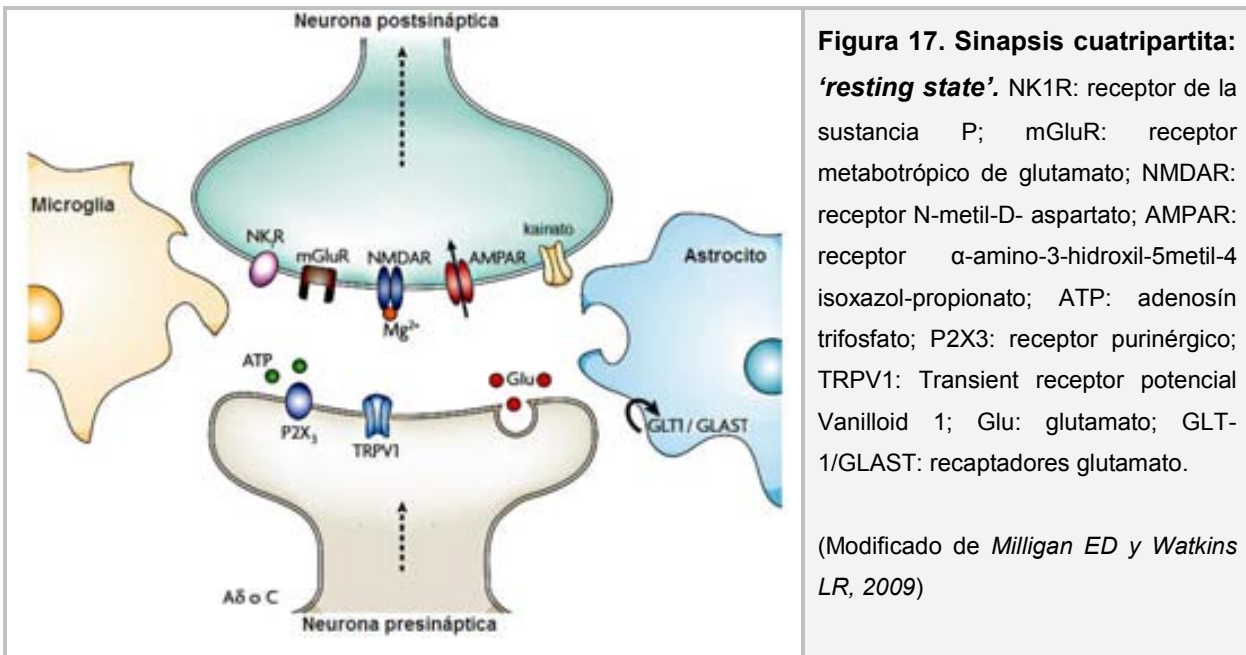
Los **astrocitos** son las células gliales más abundantes en el SNC; a nivel fisiológico, además de su función de soporte metabólico de las neuronas, modulan la comunicación interneuronal al estar directamente en contacto con los somas neuronales (Haydon PG, 2001). La transmisión de las señales entre neuronas se produce mediante la liberación de neurotransmisores a nivel presináptico y su unión a receptores neuronales postsinápticos. Por su parte, las células de glía expresan receptores funcionales para los mismos neurotransmisores: receptores ionotrópicos NMDA y no-NMDA y metabotrópicos para el glutamato (mGluR3 y mGluR5), receptores purinérgicos y receptores para SP (Porter JT y McCarthy KD, 1997), entre otros. Después de ejercer su acción sobre los receptores (neuronales y gliales), los neurotransmisores son eliminados por las células de glía que actúan de *scavenger*, regulando además la concentración de iones (principalmente K<sup>+</sup>), y manteniendo la homeostasis del medio (Araque A y Navarrete M, 2010). La eliminación de transmisores de las sinapsis (glutamato por ejemplo) es una función de vital importancia,

ya que cuando un transmisor liberado por la neurona presináptica ha actuado sobre su receptor (postsináptico), su rápida eliminación de la hendidura sináptica previene la desensibilización del receptor, evitando cambios en la transmisión neuronal. Aunque el glutamato es crítico para el normal funcionamiento del SNC, un exceso a nivel extracelular puede ser perjudicial, ya que induce un flujo continuo de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  a las neuronas, resultando en una señalización incontrolada y neurotoxicidad. El glutamato es eliminado o retirado de la hendidura sináptica por recaptación y en los astrocitos, los principales recaptadores de glutamato se denominan EAAT1/GLAST y EAAT2/GLT-1.

La interacción entre las células de glía y las neuronas es compleja y, en distintas regiones del sistema nervioso, se ha observado que los astrocitos entran en contacto directo con las sinapsis formando las *sinapsis tripartitas*, dispuesta de tal forma que los astrocitos están asociados a las neuronas pre- y postsinápticas. En este estado fisiológico, los astrocitos se considera que están en *reposo*, *quiescentes* o *no-activos/reactivos* (Milligan ED y Watkins LR, 2009).

La **microglía** está formada por células inmunes residentes en la ME y en el cerebro. En los mamíferos, el desarrollo del SNC va acompañado de un aumento en la densidad de la microglía parenquimal, que alcanza un porcentaje de aproximadamente el 15% de la población celular total. Estas células son responsables de eliminar el *debris* y las células apoptóticas, estando también involucradas en la preservación y protección de las sinapsis con el fin de mantener circuitos neuronales apropiados. Por su contribución a la neuroplasticidad y la sensibilización central en condiciones patológicas de inflamación y lesión nerviosa, la microglía ha sido incluida también como un elemento importante en la modulación de la transmisión sináptica, formando las denominadas *sinapsis cuatripartitas* (De Leo JA y cols., 2006; Milligan ED y Watkins LR, 2009) (**figura 17**). En condiciones fisiológicas, la microglía tiene una morfología ramificada caracterizada por un pequeño cuerpo celular con prolongaciones finas las cuales presentan ramificaciones secundarias; en este estado la microglía está en *reposo* (*resting microglia*), *quiescente* o *no-activa/reactiva*.

## I. Introducción

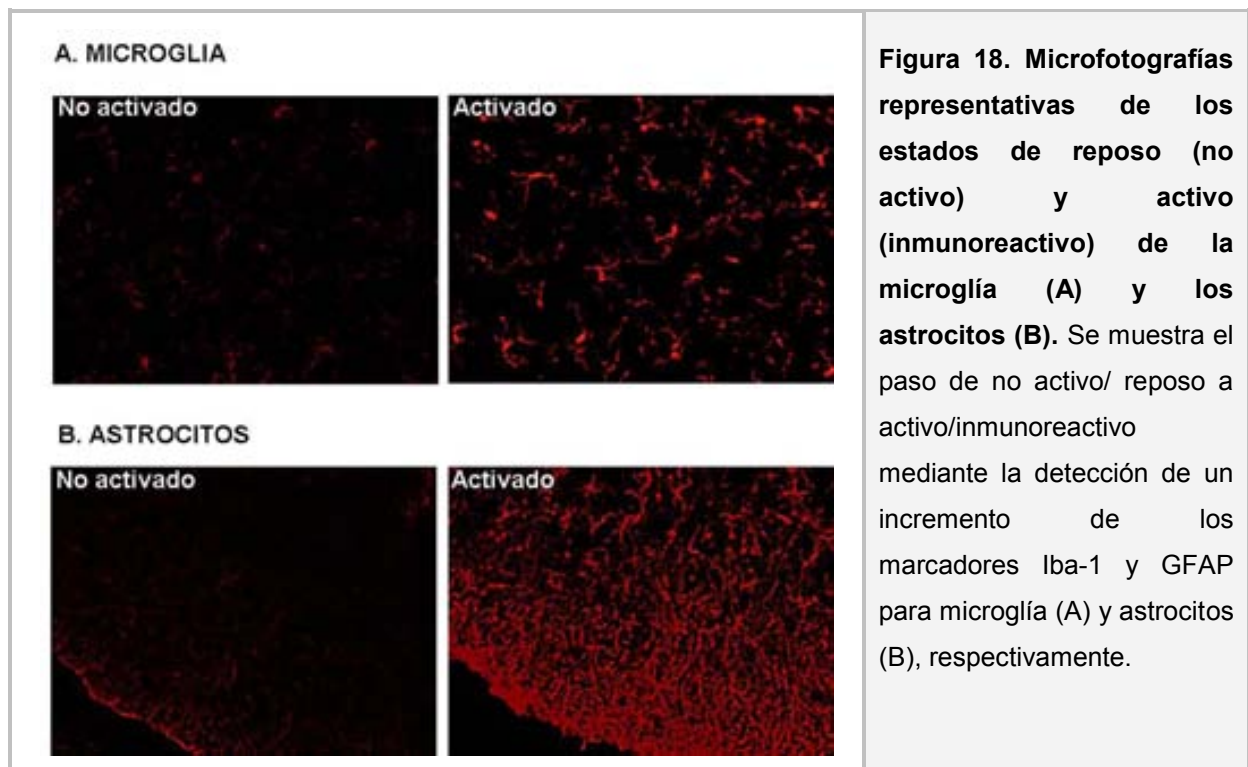


### 3.2 Activación de la glía espinal: estados proinflamatorio y antiinflamatorio

Tal como se ha descrito en el apartado 2 de la introducción, en la ME, la lesión tisular (inflamatoria, nerviosa), induce la liberación presináptica de glutamato y otros transmisores excitatorios (SP, CGRP) que además de activar la neurona postsináptica e inducir la transmisión de la señal, provocan cambios fenotípicos en los astrocitos y la microglía que pasan del estado de 'reposo' a 'activo/reactivo'. La acción de los transmisores sobre las células gliales del SNC induce respuestas proinflamatorias liberando moléculas de señalización como son las *citoquinas* y *quimioquinas*; como consecuencia, se favorece la hiperexcitabilidad neuronal y la neurotoxicidad, procesos que forman parte de los fenómenos de sensibilización central y amplificación de la señal en el dolor crónico. Sin embargo, la activación glial en el SNC también puede tener consecuencias beneficiosas como son la liberación de moléculas antiinflamatorias y la activación de procesos que conducen al reestablecimiento del estado inicial y a la protección neuronal. La activación de la microglía y astrocitos podrían considerarse redundantes, ya que ambos contribuyen a la excitabilidad neuronal, aunque en algunos casos liberando diferentes isoformas de los distintos mediadores. Es por ello que describiremos los principales mediadores y sus funciones de forma conjunta, utilizando el término glía que engloba a ambos tipos celulares

Cuando se evalúan los procesos de activación de la glía a lo largo del tiempo, diversos estudios sugieren que la liberación de mediadores a partir de la microglía activada participaría en los estados más tempranos de la respuesta a la lesión tisular (inflamatoria, neuropática), mientras que los astrocitos contribuirían a su mantenimiento a largo plazo.

La activación de la glía espinal induce hipertrofia celular y cambios morfológicos. Para visualizar estos cambios en los *astrocitos*, el marcador molecular más utilizado es el GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), proteína que forma parte de los filamentos que conforman el citoesqueleto. Un aumento del marcador GFAP está asociado con los cambios morfológicos que experimentan los astrocitos tras su activación. La expresión de GFAP está regulada por numerosos mecanismos incluyendo la presencia de citoquinas liberadas durante el estímulo nocivo (Hanani M, 2010). En el caso de la *microglía*, uno de los principales marcadores es el Iba-1 (*Ionized calcium Binding Adaptator molecule 1*). Durante la lesión tisular y otros procesos patológicos, la microglía en reposo pasa rápidamente a su estado activo, cambiando su morfología (ameboide) y aumentando la expresión de Iba-1 (Ohsawa K y cols., 2004) (**figura 18**).



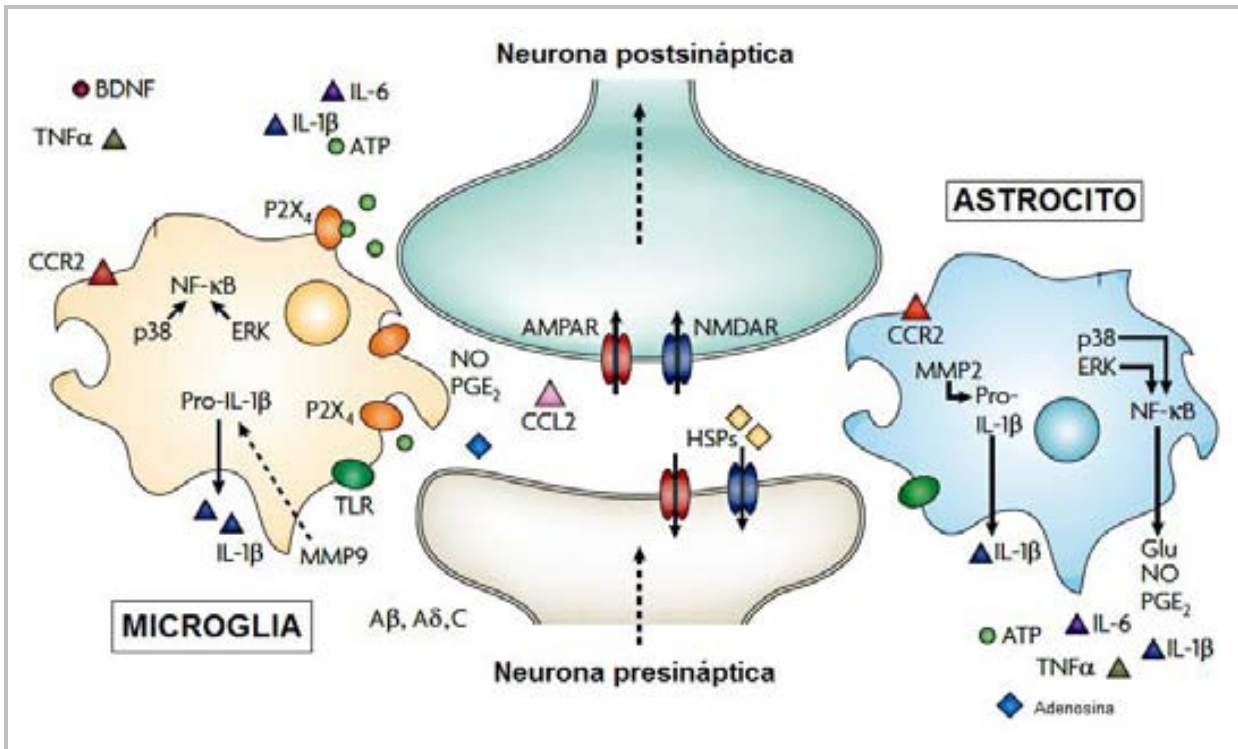
A continuación describimos brevemente los principales eventos que acontecen tras la activación de la glía, detallando los estados *proinflamatorio* y *antiinflamatorio*.

### Estado proinflamatorio

En su *estado proinflamatorio*- (**figura 19**), la activación de la glía por el efecto de los transmisores / mediadores excitatorios neuronales, induce la entrada de  $Ca^{2+}$  y la activación de segundos mensajeros, activando cascadas de señalización intracelular (en la glía), en las

## I. Introducción

que participan MAPKs como ERK, p38 o JNK. Todo ello en última instancia activará el factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B induciendo la transcripción y liberación de factores proinflamatorios, entre los que se incluyen, PGE, óxido nítrico (NO), glutamato, ATP y citoquinas. La comunicación neurona-glia es muy estrecha y bidireccional, de tal forma que algunas de las moléculas liberadas por la glía, actúan sobre receptores neuronales y viceversa, incrementando en ambos casos (directa o indirectamente), la excitabilidad neuronal y la sensibilización central.



**Figura 19. Activación glial: Estado proinflamatorio.** BDNF: *Brain derived neurotrophic factor*; TNF $\alpha$ : *Tumor necrosis factor  $\alpha$* ; IL: NF- $\kappa$ B: Factor de transcripción; ATP: adenosin trifosfato; p38, ERK: quinasas activadas por mitógenos P2X<sub>4</sub>: receptor purinérgico; MMP: metaloproteasa; NO: óxido nítrico; PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>; TLR: *Toll-like receptor*; CCL2: quimioquina; CCR2: receptor quimioquina; AMPAR, NMDAR: receptores glutamato; HSPs: Heat shock proteins; Glu: glutamato. (Modificado de Milligan ED y Watkins LR, 2009)

Entre las citoquinas liberadas por la glía se encuentran la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , que actúan sobre receptores específicos presentes tanto en la superficie de las neuronas y como en las propias células gliales. La unión de estos mediadores (citoquinas) a sus receptores (neuronales y gliales) inicia cascadas de señalización que induce la síntesis de sustancias excitatorias. Por tanto, la liberación de estas citoquinas tiene un efecto doble: contribuir a la sensibilización central activando directamente las neuronas y mantener la activación glial (*retroalimentación* positiva). Las citoquinas, aumentan también la expresión y la conductividad de los receptores AMPA y NMDA en la membrana neuronal, incrementando

también de esta forma la excitabilidad neuronal y favoreciendo la transmisión sináptica (Beattie EC y cols., 2002; Stellwagen D y cols., 2006). En cuanto a la IL-1 $\beta$  liberada por la glía, induce la fosforilación de la subunidad NR1 del receptor NMDA, favoreciendo la entrada de Ca<sup>2+</sup> y aumentando la producción de NO y PGE<sub>2</sub>, ambos involucrados en el aumento de la excitabilidad neuronal en la ME. La D-serina es otra sustancia liberada por las células de glía, que también favorece la conductividad de los canales NMDA (Petrenko AB y cols., 2003), por lo que se considera un co-agonista del NMDA; la producen sobre todo los astrocitos que transforman L- en D-serina, capaz de unirse al receptor NMDA en el lugar de unión de la glicina. En el caso del TNF- $\alpha$  y las metaloproteasas (MMP) liberadas por la microglía (MMP9) y los astrocitos (MMP2), se ha descrito que inducen el paso de pro-IL-1 $\beta$  a IL-1 $\beta$ . A su vez el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ , también activan la p38 y el NF- $\kappa$ B lo que incrementa aún más la síntesis de citoquinas contribuyendo manera aparentemente redundante a la activación glial y neuronal (Svensson CI y cols., 2005; Kawasaki Y y cols., 2008; Milligan ED y Watkins LR, 2009) (**figura 19**).

También se ha descrito un incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la activación de p38, después de la unión del ATP (de origen neuronal o glial) a receptores purinérgicos P2X<sub>4</sub> situados en la superficie de la microglía. La activación de este receptor induce liberación de más ATP y BDNF; en las neuronas espinales, estas sustancias cambian las corrientes de despolarización activadas por el GABA (neurotransmisor inhibitorio), que pasa a ser excitatorio, favoreciendo la excitación de las neuronas espinales (Coull JA y cols., 2005). El ATP liberado por la glía, interacciona también con receptores purinérgicos postsinápticos induciendo un aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular en la neurona, que promueve la inserción de más receptores AMPA en la membrana neuronal y favorece también la transmisión sináptica (Gordon GRJ y cols., 2005).

Las quimioquinas liberadas por las neuronas, al actuar sobre sus receptores gliales, contribuyen también al mantenimiento de la activación glial, y la sensibilización central durante el dolor neuropático. Así, la CCL2 y su receptor CCR2 que no se expresan en condiciones fisiológicas, aparecen en el GRD y en neuronas del ADME tras una lesión nerviosa periférica (Zhang J y De Koninck Y, 2006); esta expresión va acompañada de la activación de los astrocitos y la microglía. Es interesante mencionar que en el modelo de ligadura del ciático, la activación de la microglía circundante a las neuronas que expresan CCL2 tiene un pico a los 14 días post-lesión, que coincide con la aparición del dolor neuropático; sin embargo, los astrocitos circundantes se mantienen activados hasta 150 días, periodo que podría corresponder a la fase tardía/crónica del dolor neuropático (Zhang J y De Koninck, 2006). Así este y otros estudios sugieren que los astrocitos podrían estar implicados en el desarrollo de dolor persistente.

## I. Introducción

La fractalina (CX<sub>3</sub>CL1) es otra quimioquina que también podría estar involucrada en el mantenimiento del dolor crónico; liberada por las neuronas, se une a un único receptor (CX<sub>3</sub>CR1) expresado principalmente en microglía. Como consecuencia, se produce la liberación de quimioquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6); en modelos animales de nocicepción, la administración de fractalina exógena produce efectos similares sobre la activación de la microglía (Milligan ED y cols., 2005) (**figura 19**).

Es importante mencionar, que las células de glía expresan en su membrana *toll-like receptors* (TLRs) que tienen un papel relevante en la activación glial y el inicio / mantenimiento del dolor patológico. Son glicoproteínas transmembrana que reconocen patrones nocivos (patógenos) moleculares conservados (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*), presentes en bacterias, virus, levaduras, hongos o parásitos (Medzhitov R, 2001). Existen varias isoformas de los TLRs y hasta el momento se han descrito 13 en roedores y 11 en humanos; las que podrían estar involucradas en el dolor patológico son los TLR2 y TLR4 (en la microglía) y TLR3 y TLR4 (astrocitos) (Obata K y cols., 2008). Las moléculas endógenas liberadas de tejidos y células dañadas/activadas activan los TLRs como señal de peligro ante la lesión. El reconocimiento por los TLRs de patrones moleculares endógenos asociados a una lesión (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*), activa vías de señalización intracelular, que inducen la transcripción de genes relacionados con la reparación tisular y con respuestas inflamatorias autoinmunes (Lee H y cols., 2013). Entre las principales proteínas endógenas liberadas durante la lesión tisular capaces de activar los TLRs encontramos las *heat shock proteins* (HSP), el fibrinógeno y la fibronectina (Vabulas RM y cols., 2001; Smiley ST y cols., 2001; Okamura Y y cols., 2001). Las HSP, son chaperonas expresadas constitutivamente, involucradas en el pliegue y conformación de las proteínas; se sobreexpresan en presencia de daño o estrés celular (inflamación, lesión nerviosa), para mantener la conformación de las proteínas, y sirven además de ligandos endógenos de los TLRs gliales, promoviendo la liberación adicional de sustancias proinflamatorias (Van Noort JM y cols., 2008). El fibrinógeno, es una proteína soluble de sangre implicada en la adhesión de células inmunes y la facilitación de la respuesta quimiotáctica durante el proceso inflamatorio; también es reconocida como DAMP por los TLRs de superficie de la glía. Por su parte la fibronectina se considera el ligando endógeno de los receptores TLR4 que se expresan sobre todo en la microglía (Nasu-Tada K y cols., 2006). La relevancia de estos receptores en el dolor patológico se puso de manifiesto al observar que su bloqueo con antagonistas del receptor TLR4 (LPS modificado genéticamente a partir de cepas mutadas de *Escherichia coli* y *Rhodobacter sphaeroides*), desaparecía parcialmente el dolor neuropático inducido por la ligadura del nervio ciático en la rata (Hutchinson MR y cols., 2008). Asimismo, también se demostró que los antagonistas

de los receptores opioides naloxona y naltrexona también bloqueaban la señal a través de los receptores TLR4 de forma no- estereoselectiva (Hutchinson MR y cols., 2008).

La lesión tisular (inflamatoria, nerviosa), además de la liberación de citoquinas / quimioquinas y la activación de TLR, induce otros cambios que facilitan la excitación neuronal y contribuyen al aumento de la transmisión nociceptiva. El más importante está en relación a la disminución y/o desregulación de los recaptadores astrocitarios de glutamato (GLT1 y GLAST), que se produce tras la exposición prolongada a niveles elevados del transmisor; se entraría entonces en un círculo vicioso ya que si el glutamato no se elimina de la sinapsis se favorece la transmisión excitatoria y la citotoxicidad (Sung B y cols., 2003). Otro cambio está en relación al aumento en la expresión de las proteínas de unión entre los astrocitos (*gap junctions*), que sirven de puente de comunicación entre ellos. Cuando se activan los astrocitos aumenta la liberación de  $Ca^{2+}$ , que se propaga a través de estas proteínas a los astrocitos próximos provocando su activación y ampliando la excitabilidad a otras regiones distales del origen.

### **Estado antiinflamatorio**

La glía activada durante los procesos patológicos, puede presentar un estado anti-inflamatorio y acciones neuroprotectoras (**figura 20**), sustentados por la liberación de ciertas citoquinas, la activación de receptores de membrana y sus funciones de *scavenger* (eliminación de neuronas muertas y restos celulares, etc) funciones que comportan también un efecto neuroprotector (Milligan ED y Watkins LR, 2009).

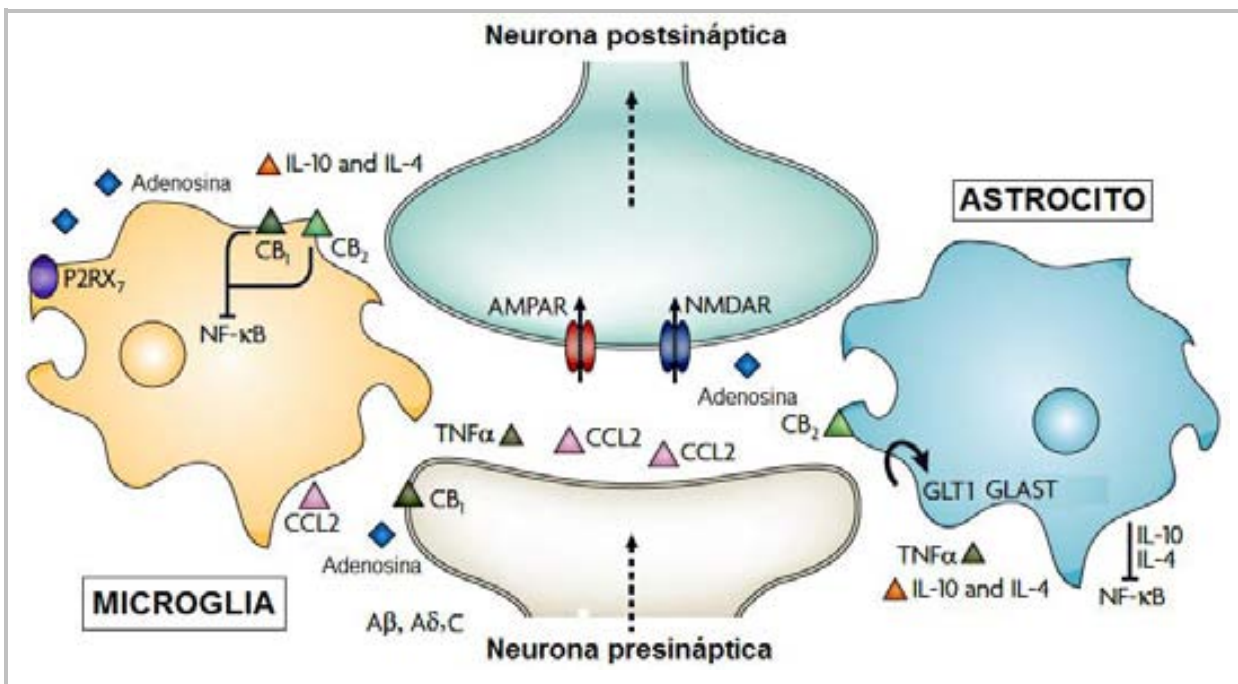
La estimulación de los receptores TLR4 por los DAMPs también induce la liberación de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y la IL-4 (Olson JK y Miller SD, 2004), que actuarían bloqueando el NF- $\kappa$ B y la síntesis de citoquinas proinflamatorias. Es interesante mencionar que el NF- $\kappa$ B también se bloquea por la activación de los receptores canabinoides (CB1 y CB2) expresados en la microglía y astrocitos. El CB1 se expresa constitutivamente en la microglía, mientras que el CB2 se induce como respuesta a la activación de la microglía (Stella N, 2010 y 2011). En modelos de dolor crónico (inflamatorio, neuropático), aumenta la expresión de los receptores CBs en la glía, especialmente el CB2 (Bisogno T y Di Marzo V, 2010), aumentando también los niveles de sus agonistas endógenos anandamida (AEA) y 2-araquidol-glicerol (2-AG) (Franklin A y cols., 2003). La activación de estos receptores tienen como consecuencia (entre otras), la supresión de la activación del NF- $\kappa$ B (Ribeiro R y cols., 2013). Todo ello, induce una disminución de la transcripción de genes que codifican proteínas proinflamatorias (citoquinas, quimioquinas, NO) favoreciendo el estado antiinflamatorio. Además, la activación de los receptores CB1



## I. Introducción

presentes en la neurona presináptica reduce la liberación de neurotransmisores y como consecuencia la excitotoxicidad postsináptica (Marsicano G y cols., 2003).

Los receptores purinérgicos P2RX<sub>7</sub>, presentes en la microglía, se activan por el ATP que también puede ser neuroprotector; su activación conduce a la liberación de TNF $\alpha$ , que protege a las neuronas de la toxicidad debida al exceso de glutamato, disminuyendo así la muerte celular (Suzuki T y cols., 2004). Curiosamente, la activación por ATP de los receptores purinérgicos P2RX<sub>4</sub>, también induce liberación de TNF $\alpha$  pero en este caso contribuye al mantenimiento del dolor neuropático. Así la misma molécula (ATP), interaccionando con distintos receptores, puede ejercer tanto efectos anti- como proinflamatorios mediante la liberación del mismo mediador (TNF $\alpha$ ) (Inoue K, 2006). Estos estudios sugieren que el tipo de estímulo que induce la activación de la microglía es primordial para el resultado neto de los efectos observados sobre en las células contiguas (figura 19).



**Figura 20. Activación glial: Estado antiinflamatorio.** P2RX<sub>7</sub>: receptor purinérgico; IL: interleuquina; CB: receptor cannabinoide; CCL2: quimioquina; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ ; AMPAR, NMDAR: receptores glutamato; GLT1/GLAST: recaptadores glutamato; NF- $\kappa$ B: Factor de transcripción (Modificado de Milligan ED y Watkins LR, 2009).

La mayoría de las acciones antiinflamatorias que realizan las células de glía activadas, se producen debido a la disminución de la liberación de mediadores proinflamatorios; esta disminución, a su vez, permitirá a los transportadores de glutamato GLT1 y GLAST

recuperar su función, contribuyendo así a la disminución de la neurotoxicidad por glutamato (Sung B y cols., 2003).

Por último, las células gliales al activarse, ejercen su función de *scavenger*, es decir, reducen la degeneración del tejido mediante eliminación de las neuronas muertas y restos celulares. Esta función fagocítica de la glía comporta también un efecto neuroprotector (Milligan ED y Watkins LR, 2009).

A modo de resumen, la glía espinal (astrocitos y microglía) juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del dolor crónico, donde la liberación de mediadores inflamatorios gliales, contribuyen a la sensibilización central y plasticidad neuronal. Sin embargo, la activación de la glía también contribuye a la resolución del proceso patológico mediante la liberación de mediadores antiinflamatorios, sus funciones de *scavenger* y el fomento de la supervivencia neuronal, ejerciendo así una función beneficiosa. Todo ello sugiere que, quizás, la inhibición de la activación glial no sería el tratamiento adecuado para evitar el desarrollo de dolor crónico, sino que, lo que podría ser efectivo sería la inhibición de los sistemas proinflamatorios y el aumento de los antiinflamatorios (bloqueo citoquinas proinflamatorias (IL1- $\beta$ ) + agonistas CB, por ejemplo) (Milligan ED y Watkins LR, 2009).

## 4. DOLOR POSTOPERATORIO AGUDO Y CRÓNICO

### 4.1 *Transición* del dolor agudo postoperatorio a crónico

El dolor agudo postoperatorio (DAP) es un problema clínico importante (Brennan TJ, 2011), puesto que aproximadamente un 60% de pacientes intervenidos quirúrgicamente presentan dolor moderado-severo a pesar de recibir tratamiento analgésico (Wu CL y Raja SN, 2011); además el dolor postoperatorio puede convertirse en crónico en un elevado porcentaje de pacientes (15-60%) (Lavand'homme P, 2011).

El DAP aparece inmediatamente tras la cirugía, es de carácter nociceptivo y responde bien a los analgésicos convencionales (opioides, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y analgésicos/antipiréticos). A pesar de que la mayoría de los pacientes tras la cicatrización de la herida vuelven a su vida normal, algunos desarrollan dolor crónico postquirúrgico (DCPQ), que se define como aquel dolor que persiste varios meses tras la cirugía y que no está relacionado con otras causas tales como recurrencia tumoral, infección crónica o persistencia de la patología inicial. Existen discrepancias respecto al marco temporal que define el DCPQ y actualmente se acepta que el dolor tiene que persistir al menos 3-6 meses después de la intervención (Vandenkerkhof EG y cols., 2013). Por lo general, el DCPQ es de intensidad leve-moderada aunque en algunos casos puede llegar a ser incapacitante provocando una disminución de la calidad de vida del paciente y un coste social y sanitario elevados.

Se han propuesto diversos factores que podrían correlacionar con la frecuencia de aparición del DAP, su intensidad y/o el consumo de analgésicos. Entre ellos encontramos factores demográficos y factores pre-, intra- y postoperatorios. Entre los *factores demográficos*, la edad correlaciona negativamente con el consumo de analgésicos (Aubrum F y cols., 2003) y con la intensidad del DAP (Gagliese I y cols., 2008). Esta correlación negativa, sugiere que los jóvenes son los que padecerían un DAP más intenso así como necesitarían más tratamiento analgésico. En cuanto al género, diversos estudios clínicos muestran que las mujeres presentan una mayor sensibilidad al dolor, con una mayor intensidad de DAP comparado con los hombres (Fillingim RB y cols., 2009). El exceso de peso, o un elevado índice de masa corporal (IMC), también sería un factor de riesgo a sufrir un DAP intenso (Auffinger B y cols., 2013). En el *preoperatorio*, se han identificado *factores psicológicos* de riesgo como la ansiedad, otros trastornos psicológicos y la capacidad para afrontar el dolor; todos ellos correlacionan positivamente con la intensidad del DAP y el consumo postoperatorio de analgésicos. La ansiedad, el estado de ánimo, el afecto u otros rasgos tales como la hostilidad o tendencia neurótica (Wu CL y Raja SN, 2011) también correlacionan con la intensidad del DAP y el consumo de analgésicos. El dolor presente

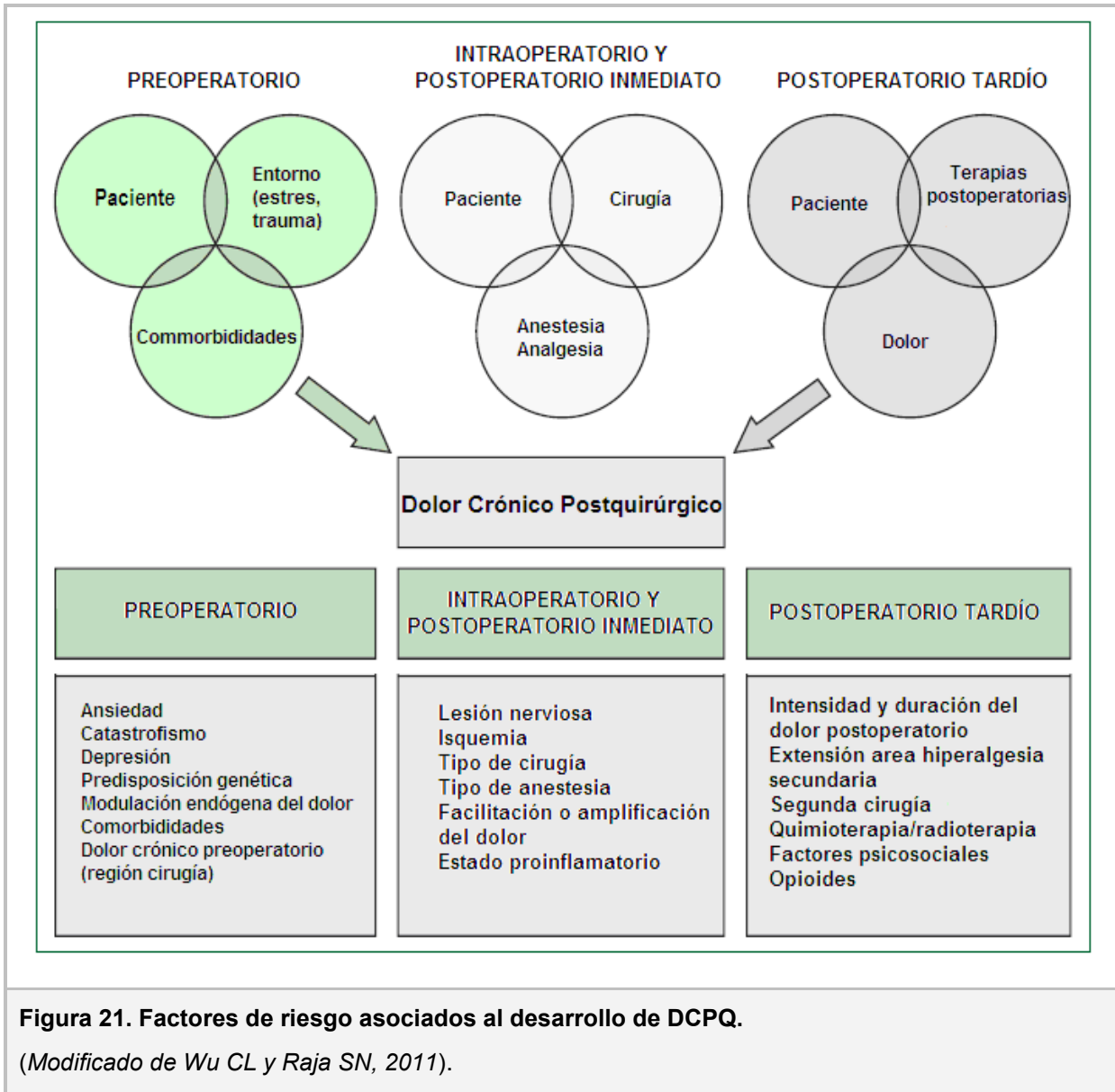
antes de la cirugía (Rudin A y cols., 2008), la percepción (de la magnitud por ejemplo) del dolor o la analgesia (Pan PH y cols., 2006) o los umbrales del dolor del individuo (Hsu YW y cols., 2005) también se han descrito como factores que predisponen a padecer un DAP intenso y consumir más analgésicos tras la cirugía. El tipo de cirugía (Ip HYV y cols., 2009), la administración intraoperatoria de opioides (Joly V y cols., 2005), las intervenciones que implican procesos cancerosos (Chang KY y cols., 2006) o cirugías de larga duración (Gagliese L y cols., 2008) aumentan el riesgo de DAP y de un mayor consumo de analgésicos. Por último, tras la cirugía, la administración de dosis altas de opioides en el postoperatorio pueden conducir también a un incremento de la intensidad del DAP (Chu LF y cols., 2008).

A modo de resumen, entre todos los parámetros descritos, la presencia de dolor antes de la cirugía, la ansiedad y otros problemas psicológicos, la edad y la administración de opioides, podrían considerarse las variables mejor caracterizadas como predictivas del DAP.

Los factores predictivos para la aparición de DCPQ coinciden en algunos casos con los descritos anteriormente para el DAP, mientras que otros están relacionados con la intensidad del dolor postoperatorio. Factores demográficos, tales como edad y sexo han podrían predisponer al desarrollo de DCPQ. En el caso de la edad ha habido más controversia y se han visto diferencias según la cirugía, sin embargo, estudios recientes apuntan a la juventud como factor de riesgo (Gjeilo KH y cols., 2014; Bruce J y cols., 2014). En cuanto al género, las mujeres tienen más predisposición a sufrir DAP y por consiguiente, a la aparición de DCPQ (Katz J y cols., 2005). En la **figura 21** mostramos un resumen de los principales factores que se asocian al desarrollo del DCPQ; en el preoperatorio encontramos los factores psicológicos y/o ambientales (ansiedad, catastrofismo, depresión (Peters ML y cols., 2007). La predisposición genética y la actividad de los sistemas endógenos moduladores descendentes (inhibidores y facilitadores) también podrían predisponer a la transformación de dolor agudo en crónico (Devor M y cols., 2004). Otros factores incluyen: la presencia de otras patologías, el dolor crónico preoperatorio en la zona de la cirugía y la administración crónica de opioides (Gerbershagen HJ y cols., 2009). Durante la cirugía, la lesión nerviosa (Perkins FM y Kehlet H, 2000), la isquemia tisular o el tipo de cirugía y anestesia también se han postulado como factores de riesgo, aunque su relevancia es controvertida. En el postoperatorio, el tamaño (cm<sup>2</sup>) del área de hiperalgesia/alodinia que aparece alrededor de la herida quirúrgica (hiperalgesia secundaria), correlaciona con la aparición de DCPQ (Eisenach JC, 2006; Martínez V y cols., 2012). De hecho, la duración e intensidad del DAP, se ha propuesto como un factor clave en el desarrollo de DCPQ. En el postoperatorio, la quimioterapia, radioterapia, una segunda cirugía en la misma región

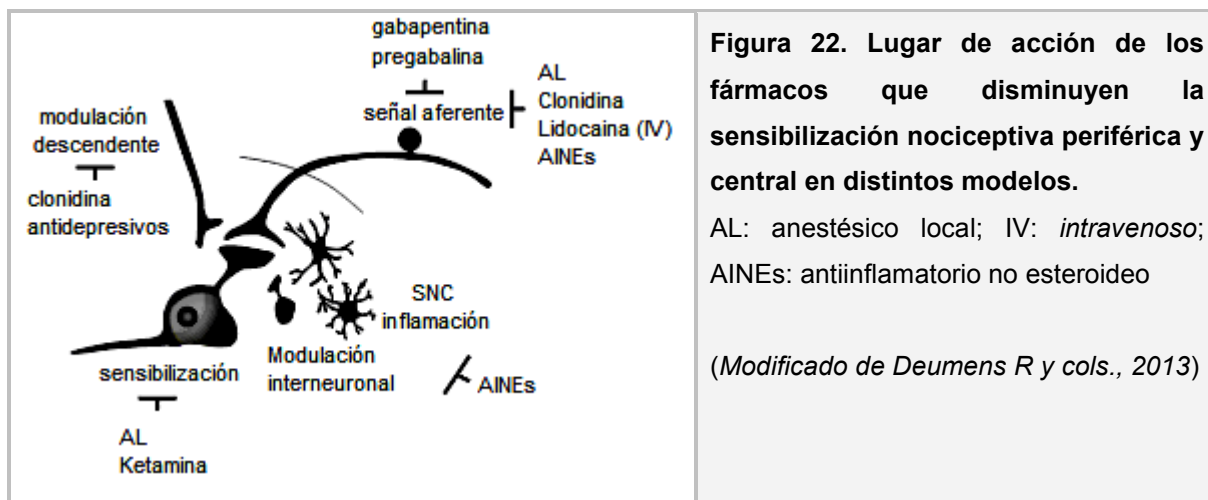
## I. Introducción

(Cabañero D y cols., 2009) o factores psicosociales (estados anímicos, capacidad de afrontar el dolor) pueden favorecer al desarrollo de DCPQ.



Como ya se ha mencionado, los factores de riesgo a sufrir DAP o DCPQ, coinciden en la mayoría de casos. En la actualidad el tratamiento farmacológico del DAP se basa en protocolos de analgesia multimodal, cuyas principales características se describen en el **Apartado 5**; la correcta asociación de fármacos analgésicos, antihiperalgésicos y bloqueos nerviosos, consigue en muchos casos el adecuado control del DAP. Para la prevención del dolor crónico postquirúrgico, las actuaciones clínicas actuales incorporan a los protocolos de analgesia multimodal, antagonistas de los receptores NMDA (ketamina, KET), anticonvulsivantes (gabapentina GBP, o pregabalina PGB), agonistas alfa-2 adrenérgicos (clonidina), anestésicos locales endovenosos (lidocaína) o antidepresivos, entre otros

(figura 22). La mayoría de estos fármacos son antihiperalgésicos, y cuando se asocian a fármacos analgésicos (AINEs, opioides, etc) consiguen reducir la sensibilización periférica y central, y prevenir al menos en parte, la aparición de DCPQ.



En la **Tabla 1** mostramos las familias de fármacos que han sido utilizados en humanos, en el tratamiento del DAP y la prevención del DCPQ. Entre ellos el que los gabapentinoides y la ketamina son los únicos para los que se dispone de evidencia suficiente para justificar su uso (Chaparro LE y cols., 2013; Clarke H y cols., 2012).

Sobre la base de su mecanismos de acción y su utilización clínica, en el presente trabajo hemos investigado en un modelo animal de dolor incisional, el efecto de la ketamina, la gabapentina, la minociclina, el dexketoprofeno, el tramadol, el midazolam y el A-836339 (agonista CB2) como posibles candidatos para prevenir la hiperalgnesia postoperatoria (HPO), la sensibilización latente al dolor (SLD, como manifestación de la aparición de DCPQ), y la activación de la glía espinal (astrocitos y microglía). La descripción detallada de las principales características de estos fármacos y su utilización en la prevención de la hiperalgnesia postoperatoria / DAP y el dolor DCPQ se describen en el **apartado 5**.

## I. Introducción

FÁRMACO	Disminución de la intensidad del DAP	Prevención del DCPQ
KETAMINA	+	+
	<i>Laskowski K y cols., 2011</i>	<i>Chaparro LE y cols., 2013</i>
GABAPENTINOIDES	±	±
	MacCormick Z y cols., 2014 Imani F y Rahimzadeh P 2012 Yu L y cols., 2013	Clarke H y cols., 2012 Schmidt PC y cols., 2013
INHIBIDORES GLÍA	?	±
		<i>Martinez V y cols., 2013</i>
AINEs	+	?
	De Oliveira Jr GS y cols., 2012	
TRAMADOL	+	?
	Stamer UM y cols., 2003	
CANNABINOIDES	±	?
	Blake DR y cols., 2006 ; Ashton JC y Milligan ED, 2008; Langford RM y cols., 2013; Ostenfeld T y cols., 2011	
ANSIOLÍTICOS	±	±
	<i>Gupta R y cols., 2012</i>	<i>Frölich MA y cols., 2013</i>

**Tabla 1. Efecto analgésico / antihiperálgico en humanos de los fármacos utilizados en el presente estudio.** DAP: dolor agudo postoperatorio; DCPQ: dolor crónico postquirúrgico (DCPQ). + = efecto demostrado; ± = resultados no concluyentes; ?= no hay evidencia

### 4.2 Dolor postincisional

Se ha postulado que la incisión quirúrgica induce un dolor característico (intenso, persistente), distinto al inducido por otros tipos de lesión periférica, por lo que su tratamiento es especialmente difícil. El desarrollo de modelos animales de dolor postoperatorio, que aproximadamente reproducen las condiciones clínicas en humanos, ha sido de gran importancia y utilidad para el estudio de los mecanismos implicados en el dolor postincisional. En 1996, Brennan TJ y colaboradores, describieron un modelo de dolor postoperatorio en rata, que ha permitido investigar la hipersensibilidad nociceptiva, reproduciendo la hiperálgia / alodinia que aparece en los pacientes en zonas adyacentes

a la lesión quirúrgica. En el modelo de Brennan se observa una disminución de los umbrales nociceptivos en la zona situada aproximadamente a 10mm de la herida quirúrgica, que corresponde al área de hiperalgesia secundaria. El modelo ha resultado muy útil para investigar la HPO y nuestro grupo puso en funcionamiento (validó) el mismo modelo en el ratón, lo que reduce los costes y facilita algunos aspectos de la experimentación conductual (Célérier E y cols., 2006).

En cuanto al modelo, es importante mencionar que la incisión plantar no induce fenómenos espontáneos de comportamiento nociceptivo tales como *licking* (lamido), *biting* (morderse) y/o *flinching* (encoger la pata), característicos de la respuesta nociceptiva después de la inyección subplantar de un irritante químico como la formalina. El hecho de que no se observen las respuestas características de dolor espontáneo tras la incisión quirúrgica, es posible que esté en relación con las características de activación de las distintas fibras nociceptivas aferentes primarias. Así, las descargas espontáneas de las fibras A $\delta$  y C que se registran tras la cirugía podrían contribuir al dolor espontáneo (no evocado) tras la incisión. Estas descargas tienen una frecuencia de aproximadamente 15 Hz (Pogatzki EM y cols., 2002) que es inferior a la inducida por la inyección plantar de formalina, que induce un comportamiento nociceptivo espontáneo caracterizado por *licking*, *biting* y *flinching* (McCall WD y cols., 1996). Tras la incisión, una técnica propuesta para cuantificar el dolor espontáneo sería registrando el peso que aplica el animal al apoyarse sobre cada una de las patas (*weight bearing*) después de la cirugía; ya que, debido a la cirugía, el animal aplica menos peso sobre la extremidad operada durante los primeros días del postoperatorio, permitiendo cuantificar el dolor.

Es posible que el dolor inducido por una inflamación, una lesión nerviosa o otros tipo de lesión tisular se produzca por distintos mecanismos (Pogatzki EM y cols., 2002; Honore P y cols., 2000; Obata H y cols., 2004). Después de una incisión (lesión tisular) las fibras A $\delta$  y C se sensibilizan (nociceptores periféricos) y una cierta población de mecano-nociceptores silentes se convierte en fibras activas, que podría participar en el mantenimiento de la hiperalgesia postincisional (Pogatzki EM y cols., 2002). El registro de los potenciales de acción del ADME muestra que las neuronas de WDR se sensibilizaban tras la incisión y participan también en la disminución de los umbrales nociceptivos observados en los estudios de comportamiento. A diferencia del dolor inducido por lesión nerviosa, la sensibilización inicial de las neuronas del asta dorsal se mantiene por excitación de las fibras aferentes primarias (sensibilización periférica) (Pogatzki EM y cols., 2002). Este hecho se corroboró mediante la infiltración de la incisión con un anestésico local (AL) que bloqueó la hiperalgesia secundaria (sensibilización central) y la activación de las neuronas del ADME. Tras la desaparición del efecto del AL, en el modelo de dolor postincisional se iniciaban de nuevo las señales aferentes que mantenían la hipersensibilidad (Pogatzki EM y



## I. Introducción

cols., 2002), mientras que en otros tipos de dolor (neuropático, inflamatorio) se prevenía o atenuaba (Coderre TJ y cols., 1990) la hipersensibilidad gracias al bloqueo temprano de la sensibilización central. El estudio muestra por tanto que tras la incisión, la duración y la amplitud de la activación de las neuronas del ADME eran dependientes de la actividad de las fibras periféricas, mientras que en otros modelos esta activación de la excitabilidad espinal es menos dependiente de las señales aferentes en curso (Pogatzki EM y cols., 2002).

También se han investigado los fármacos analgésicos / antihiperalgésicos que son más eficaces en el dolor postoperatorio, comparado su eficacia con la observada en el tratamiento de otros tipos de dolor. Esta hipótesis se basa en las diferencias en la expresión de receptores y enzimas en el dolor postincisional, que podrían ser la base para establecer dianas farmacológicas específicas para el DAP. Un ejemplo es la expresión de las COX en la ME; en el dolor inflamatorio inducido por la administración intraplantar de adyuvante de Freund (CFA, *Complete Freund's Adjuvant*) aparece hiperalgesia térmica y mecánica con un aumento del RNAm de la COX-2 (Hay CH y cols., 1997) y de la proteína (Samad TA y cols., 2001). En cambio, la incisión plantar induce un gran incremento en la expresión de COX-1 en el ADME; además, la administración (intratecal) preoperatoria de un inhibidor específico de COX-1, pero no de la COX-2, disminuye significativamente la hiperalgesia postoperatoria (Zhu X y cols., 2005). Otros estudios muestran también diferencias relevantes entre el dolor postoperatorio y el neuropático. En el modelo de la ligadura del ciático en la rata, la administración de un modulador alostérico (T62) del receptor de la adenosina que favorece la unión de la adenosina al receptor A1, reduce la hipersensibilidad mecánica y este efecto se bloquea totalmente mediante la administración de antagonistas de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos. Por el contrario, después de una incisión plantar la administración de T62, disminuyó la hipersensibilidad mecánica pero el efecto no se modificó por la administración de un antagonista adrenérgico  $\alpha_2$ , sugiriendo que en este modelo participaban mecanismos no adrenérgicos (Obata H y cols., 2004).

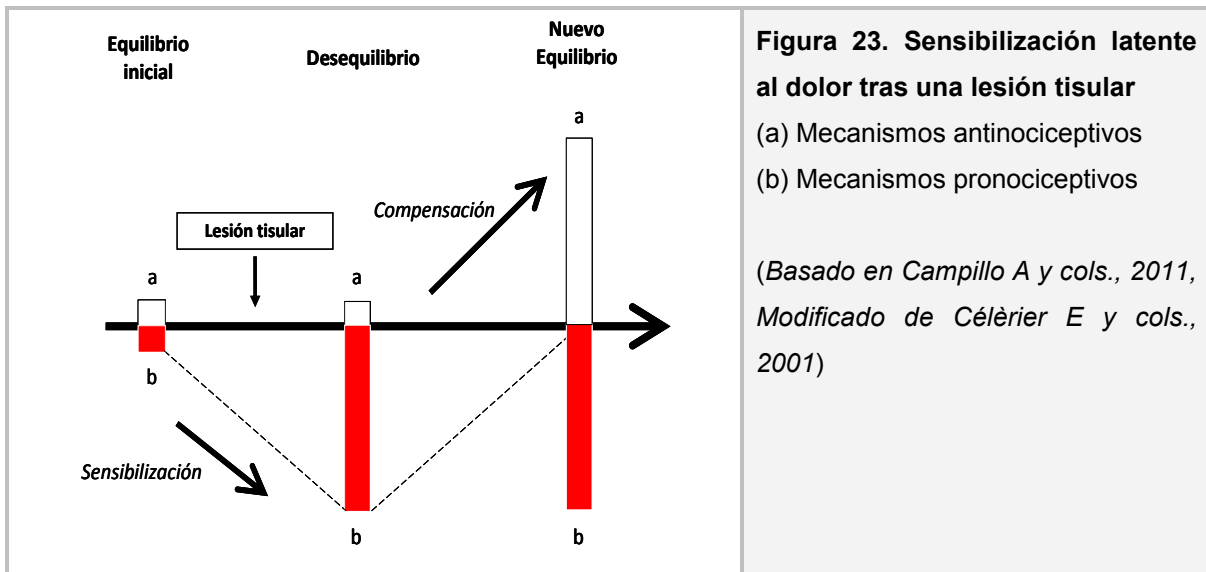
Tal como hemos mencionado anteriormente, en el presente proyecto, hemos utilizado el modelo de dolor postquirúrgico descrito en la rata (Brennan TJ y cols., 1996), y adaptado al ratón en nuestro laboratorio (Célérier E y cols., 2006), para investigar la prevención farmacológica de la sensibilización nociceptiva postoperatoria (HPO inducida durante el período de DAP), la SLD y su posible relación con la activación de la glía espinal.

En el ratón, la lesión quirúrgica induce una reacción inflamatoria local acompañada de dolor y sensibilización nociceptiva manifestada por hiperalgesia (térmica, mecánica) y alodinia (mecánica) con una duración aproximada de 4-7 días (Campillo A y cols., 2010). Además,

nuestro grupo ha caracterizado la SLD o vulnerabilidad al dolor tras la cirugía (Campillo A y cols., 2011). Hemos podido demostrar que una vez cicatrizada la herida quirúrgica y la sensibilidad nociceptiva ha recuperado los umbrales basales, la aplicación de un segundo estímulo sobre la misma pata induce de nuevo hiperalgesia; este fenómeno pone en evidencia cambios plásticos *latentes* a nivel del SNC y SNP que podrían constituir la base para el desarrollo de DCPQ en individuos predispuestos. Así, pudimos comprobar que una segunda cirugía (en la misma pata y condiciones experimentales) induce una hiperalgesia postoperatoria de mayor magnitud y duración que la primera intervención (Cabañero D y cols., 2009). Respuestas similares se obtienen tras la aplicación de estímulos no nociceptivos como son el estrés por inmovilización, la aplicación de luz intensa o la administración de antagonistas opioides (naloxona, nor-BNI), que inducen la reaparición de la hipersensibilidad al dolor (Campillo A y cols., 2011; Romero A y cols., 2011). Estos hallazgos fueron corroborados mediante estudios de imagen utilizando mPET (*positron emission tomography*) en ratas con una incisión plantar a las que se administró naloxona 21 días después de la intervención. Mediante cambios en el metabolismo cerebral de la glucosa ( $^{18}\text{F}$ -FDG), pudimos demostrar que la hiperalgesia inducida por la naloxona iba acompañada de cambios significativos en la captación de glucosa en las áreas del cerebro relacionadas con el procesamiento de la información nociceptiva (*pain matrix*) (Romero A y cols., 2011). Algunos de los cambios observados en las diferentes áreas cerebrales, son similares a los descritos en humanos en etapas tempranas del postoperatorio (Pogatzki-Zhan EM y cols., 2010), hecho que ratifica la buena translación de nuestro modelo animal a los humanos.

Aunque los mecanismos implicados en la SLD son múltiples y complejos, el fenómeno podría ser explicado de forma simple de acuerdo al esquema que se muestra en la **figura 23** postulado tras la administración de opioides (HIO, Célèrier E y cols, 2001) y adoptado como hipótesis en nuestro modelo de dolor postoperatorio por las similitudes entre la hiperalgesia inducida por opioides y la incisión (Campillo A y cols., 2011). En ausencia de lesión existe un equilibrio estable de los sistemas antinociceptivos (a) y pronociceptivos (b). La lesión tisular inducida por la incisión altera el equilibrio de tal forma que se sensibilizan los sistemas pronociceptivos, apareciendo hipersensibilidad a estímulos térmicos y mecánicos. El organismo inicia entonces procesos de compensación de los sistemas antinociceptivos hasta que se alcanza un nuevo equilibrio a un nivel más elevado (SLD). Este hecho explicaría al menos en parte, la aparición de hiperalgesia después de la administración de antagonistas opioides, que bloquean los sistemas antinociceptivos endógenos, favoreciendo la aparición de hiperalgesia.

## I. Introducción



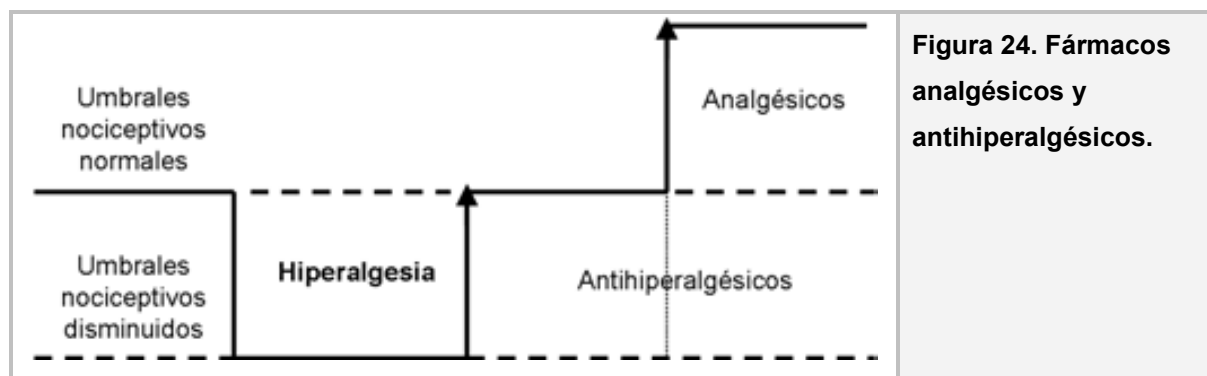
La hiperalgesia postoperatoria, además, está acompañada de la activación glial tanto en el ganglio de la raíz dorsal (macrófagos y células satélite) como en médula espinal (microglía y astrocitos) (Romero A y cols., 2013). La inmunoreactividad de estas células se corresponde aproximadamente al período de HPO hecho que sugiere la posible asociación entre ambos fenómenos e implicación de estas células en la sensibilidad observada. Tras la completa recuperación la administración de naloxona indujo reactivación de las células satélite y su homólogo en médula espinal, astrocitos, pero no macrófagos ni microglía; estos estudios sugirieron una posible implicación de células satélite y astrocitos en los cambios que conducen a la SLD (Romero A y cols., 2013). Sobre esta base, en el presente estudio queda justificada la evaluación del efecto de los diferentes tratamientos sobre estas células por la posible relevancia de los cambios que se producen en ellas y que contribuirían al desarrollo de HPO y SLD.

## 5. FARMACOLOGÍA DEL DOLOR POSTOPERATORIO

En este apartado describiremos las principales características de los fármacos utilizados en el tratamiento del dolor postoperatorio en humanos, prestando especial atención a los fármacos que han sido objeto de estudio en el presente trabajo. Tal como hemos descrito, la lesión quirúrgica, induce dolor espontáneo acompañado de hiperalgesia y alodinia. Los cambios plásticos que aparecen durante los procesos de sensibilización se reflejan en la SLD, que constituye la base para la aparición de DCPQ; el papel de la glía en los cambios plásticos y su prevención mediante la administración de fármacos analgésicos / antihiperalgésicos son los principales objetivos del presente trabajo.

En la clínica humana, se utilizan fármacos analgésicos y/o antihiperalgésicos para tratar el dolor postoperatorio y/o prevenir la aparición de DCPQ. En la actualidad, existen diversas familias de fármacos utilizados en terapéutica bien individualmente o asociados en la denominada analgesia multimodal (Kehlet H y Wilmore DW, 2002). No se dispone de una clasificación sencilla para estos fármacos y en el presente trabajo la hemos abordado desde un punto vista predominantemente práctico, es decir, sobre la base del efecto principal que producen tras su administración clínica. De esta forma, disponemos de fármacos predominantemente analgésicos (opioides), fármacos antihiperalgésicos (corticosteroides) y aquellos de acción mixta analgésica/antihiperalgésica como es el caso de los AINEs. Los *analgésicos* se caracterizan por aumentar los umbrales de nocicepción en condiciones fisiológicas y un ejemplo de este grupo sería los opioides que, paradójicamente, inducen también hiperalgesia tras su administración aguda (Célérier E y cols., 2006; Cabañero D y cols., 2009) y crónica (Angst MS y Clark D, 2006; Chu LF y cols., 2008). Los fármacos *antihiperalgésicos* únicamente son eficaces en presencia de hiperalgesia ya que retornan los umbrales nociceptivos a los valores basales (**figura 24**). Por último, muchos fármacos eficaces en el tratamiento del dolor poseen efectos analgésicos/antihiperalgésicos y se utilizan cuando existe sensibilización nociceptiva, como en el dolor postoperatorio, el dolor neuropático o en presencia de inflamación. Los antihiperalgésicos se denominan en algunos casos adyuvantes, puesto que con frecuencia se asocian a otros fármacos analgésicos y/o antihiperalgésicos.

## I. Introducción



A continuación revisaremos brevemente las principales características de los fármacos utilizados en el presente proyecto y sus posibles acciones sobre la glía.

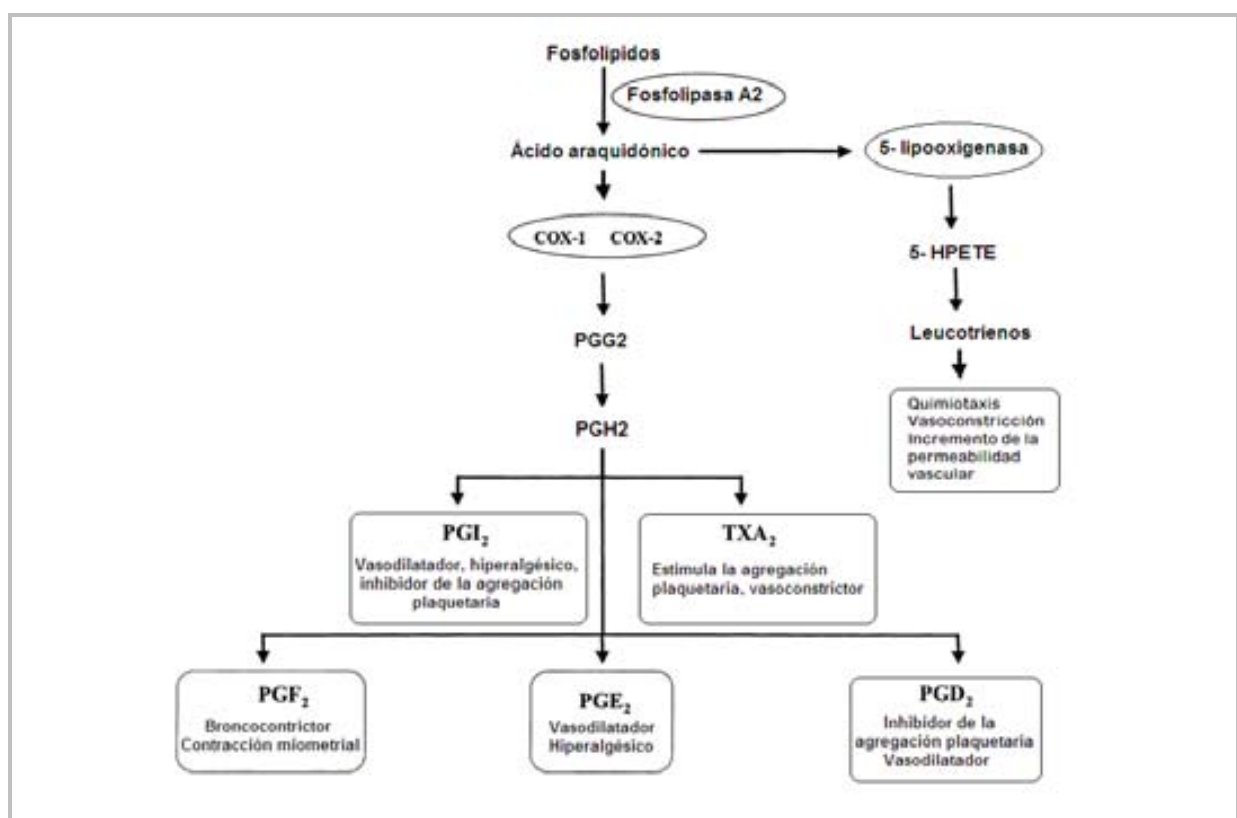
### 5.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Dexketoprofeno

Los antiinflamatorios no esteroideos son un grupo heterogéneo de fármacos que poseen efectos analgésicos / antihiperalgésicos, antitérmicos y antiinflamatorios; los diferentes compuestos comparten acciones beneficiosas e indeseadas asociadas a su consumo. El compuesto de referencia es el ácido acetilsalicílico (AAS, aspirina) extraído inicialmente de la corteza del sauce. A mitad del siglo XVIII se describió el efecto antipirético de esta corteza, y posteriormente, se aisló el principio activo que fue llamado *salicina*; a finales del siglo XIX, un químico alemán llamado Felix Hoffman, obtuvo el AAS a partir de la salicina, mejorando la eficacia del compuesto. El resto de AINEs aparecen en la segunda mitad del siglo XX.

En cuanto a su *mecanismo de acción*, los AINEs, producen sus efectos farmacológicos (beneficiosos e indeseables) inhibiendo la síntesis de PGs; sin embargo, no inhiben otros mediadores inflamatorios como los leucotrienos. En presencia de estrés o lesión celular, la PLA<sub>2</sub> citosólica, libera AA de la membrana celular que es metabolizado por las COXs para sintetizar PGs. Existen dos isoformas de la COXs: la COX-1 es constitutiva y está presente en la gran mayoría de células y tejidos, mientras que la COX-2 se induce durante la lesión tisular en presencia de mediadores inflamatorios tales como las citoquinas (Sawdy R y cols., 1997). La COX-2 también se expresa constitutivamente en algunos tejidos como el riñón o el cerebro (Breder CD y cols., 1995). Además de estas dos COXs, se han descrito otras como la 'COX-3', que es un producto de una variante en la traducción de la proteína del gen de la COX-1, y podría participar en los efectos analgésicos de los AINEs y el paracetamol (analgésico/antipirético) (Chandrasekharn NV y cols., 2002). Sin embargo, el papel de esta ciclooxigenasa es controvertido, e incluso algunos autores postulan, que la 'COX 3' no se puede considerar una tercera isoforma de la COX, puesto que la COX-1 y 2 son diferentes

tanto en el gen que las codifica como su función, y este no sería el caso para la 'COX-3' (derivado de mismo gen que la COX-1) (Davies NM y cols., 2004); además, en humanos, no está claro como afecta esta variante a la síntesis de PGs y los efectos de los AINEs.

La COX-1 y 2 son isoenzimas bifuncionales, ya que cada una de ellas tiene actividad *ciclooxigenasa* y *peroxidasa*. Mediante su acción ciclooxigenasa oxidan el AA a PGG<sub>2</sub>, que es un hidroperóxido; éste a su vez se metaboliza por la actividad peroxidasa dando lugar a las PGs PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> y el tromboxano (TXA<sub>2</sub>). Estas PGs y el TXA<sub>2</sub>, en particular las PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> actúan como reguladores homeostáticos e inducen además la liberación de mediadores de la inflamación, fiebre y dolor (**figura 25**).



**Figura 25. Metabolismo del ácido araquidónico.** COX: ciclooxigenasa; PG: Prostaglandina; TXA<sub>2</sub>: Tromboxano; 5-HPETE: Ácido 5-hidroxiperoxiicosatetraenoico.

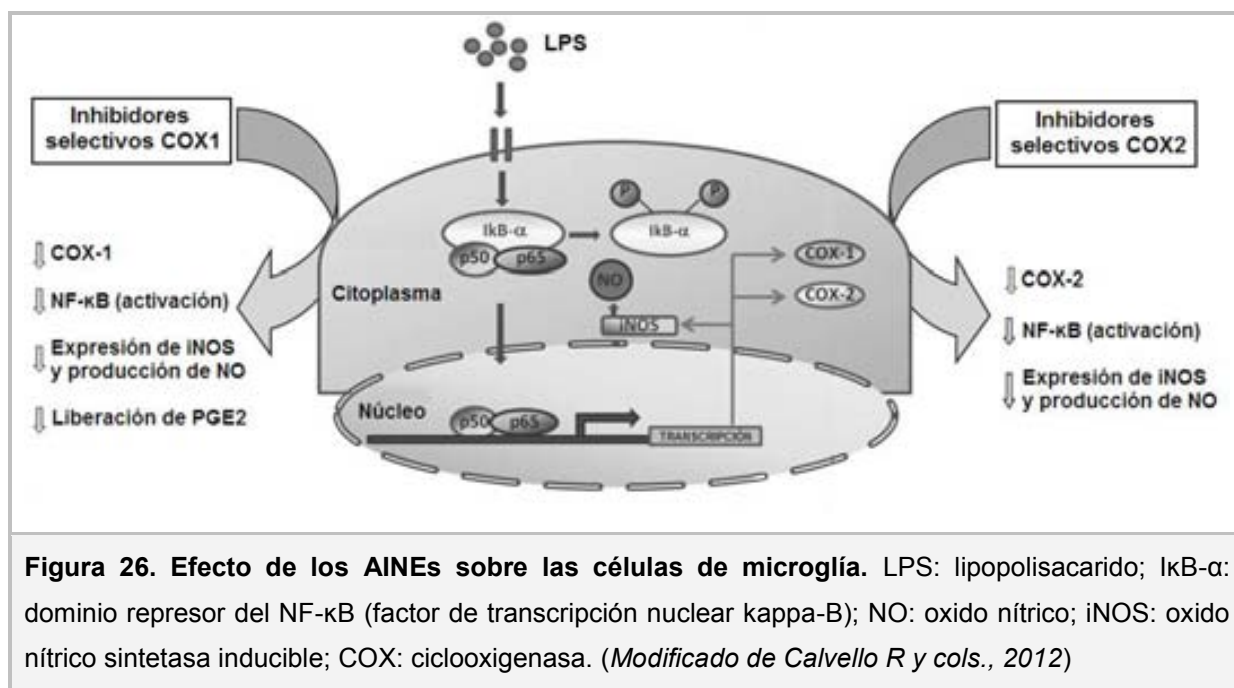
(Modificado de Parente L y Perretti M, 2003)

La administración de AINEs inhibe las COXs y como consecuencia, la síntesis de PGs; estas enzimas tienen una configuración específica mediante la cual el sustrato (AA) puede acceder al lugar de acción por un canal hidrófobo. El AAS es el único AINE que se une de forma irreversible a las COXs (unión covalente), acetilando las serinas 530 (COX-1) y 516 (COX-2) localizadas justo encima del canal; de esta forma se impide la entrada del sustrato y la formación de PGs. Esta característica implica que la duración del efecto del AAS estará

## I. Introducción

relacionado con la velocidad de síntesis de las COXs en el tejido diana. Por el contrario, la inmensa mayoría de AINEs actúan inhibiendo las COX de manera reversible y competitiva.

En la ME y en el cerebro, las COX-1 y 2 se expresan también en las **células de glía** (principalmente microglía) que se activan / sobreexpresan durante procesos inflamatorios. Por tanto, entre los mecanismos de acción de los AINEs, la inhibición de la activación de la glía espinal podría tener un papel relevante. Un estudio reciente (Calvello R y cols, 2012) muestra que la activación de células de microglía en cultivo por LPS induce un aumento en la expresión de ambas COX, que se reduce en presencia de AINEs (**figura 26**). En la misma preparación, el LPS (lipopolisacárido) induce un aumento del dominio represor fosforilado (pI $\kappa$ B- $\alpha$ ) del NF- $\kappa$ B de manera que el NF- $\kappa$ B libre se podrá translocar al núcleo induciendo la transcripción de algunos mediadores incluyendo las COXs. Los AINEs reducen significativamente el aumento del NF- $\kappa$ B libre, disminuyendo por tanto la síntesis de COXs.



**Figura 26. Efecto de los AINEs sobre las células de microglía.** LPS: lipopolisacárido; I $\kappa$ B- $\alpha$ : dominio represor del NF- $\kappa$ B (factor de transcripción nuclear kappa-B); NO: óxido nítrico; iNOS: óxido nítrico sintetasa inducible; COX: ciclooxigenasa. (Modificado de Calvello R y cols., 2012)

La activación de la microglía por LPS induce también la síntesis de PGE<sub>2</sub> (proinflamatoria), que disminuye en presencia de inhibidores de las COX, especialmente de la COX-1. De hecho, la COX-1 es capaz de liberar PGE<sub>2</sub> en respuesta a la activación microglial incluso antes de la inducción de la COX-2; este hecho indica que los AINEs con mayor selectividad para la COX-1, serían más eficaces para disminuir la inflamación. Por último, la *sintasa inducible del óxido nítrico* (iNOS) y su producto (NO), también incrementan su expresión tras la estimulación de la microglía en cultivo con LPS. A diferencia de otras enzimas que sintetizan NO, la iNOS es insensible al Ca<sup>2+</sup> y su activación es dependiente de la activación del NF- $\kappa$ B. Así, la administración de inhibidores COX-1 y/o 2 bloquean la expresión de iNOS,

reduciendo los niveles NO probablemente como resultado de la inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B que producen los AINEs (Calvello R y cols., 2012) (**figura 26**).

Otros estudios sugieren que, además del efecto sobre la microglía, el efecto analgésico de los AINEs también podría estar relacionado con la inhibición de la activación astrocitaria. Así, en un modelo animal (rata) de dolor neuropático por lesión de los discos intervertebrales, la administración de ketorolaco (AINE *no selectivo*) produce antihiperalgesia asociada a una reducción de la activación astrocitaria (Dong L y cols., 2013).

Existe un gran número de AINEs disponibles en la práctica clínica, que por lo general se clasifican en función de su estructura química (la gran mayoría son ácidos orgánicos) y la inhibición preferente de una de las COX (**tabla 2**) en lo que ha denominado inhibición *no-selectiva* / *selectiva* de las COXs.

<u>Inhibidores No-Selectivos para la COX</u>
<input type="checkbox"/> <b>Salicilatos</b> Á. acetilsalicílico, á. salicílico, salsalato, diflunisal, salicilamida, olsalacina
<input type="checkbox"/> <b>Derivados indol-acéticos</b> Indometacina, sulindac
<input type="checkbox"/> <b>Derivados arilo-acéticos</b> Tolmetin, diclofenaco, ketorolaco
<input type="checkbox"/> <b>Derivados arilpropiónicos</b> Ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, oxaprozina, dexketoprofeno
<input type="checkbox"/> <b>Fenematos</b> Á. meclofenámico, á. mefenámico
<input type="checkbox"/> <b>Ácidos enólicos</b> Oxicams (piroxicam, meloxicam)
<input type="checkbox"/> <b>Alcanones</b> Nabumetona
<u>Inhibidores Selectivos de la COX-2</u>
<input type="checkbox"/> <b>Coxibs</b> Rofecoxib, celecoxib
<input type="checkbox"/> <b>Á. Indole acéticos</b> Etodolac
<input type="checkbox"/> <b>Sulfonanilidas</b> Nimesulida

**Tabla 2. Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs): estructura química e inhibición selectiva/no-selectiva de las ciclooxigenasas.**  
 (Modificado de Harirforoosh S y cols., 2013)



## I. Introducción

La gran mayoría de los AINEs se absorben rápidamente y por completo en el tracto gastrointestinal, con un pico plasmático entre 1-4 horas. La presencia de alimentos tiende a retrasar la absorción sin afectar al pico máximo de concentración. Por lo general, los AINEs se unen ampliamente a proteínas plasmáticas (95-99%) y sufren metabolismo hepático seguido de excreción renal. Su vida media de eliminación varía desde pocas horas hasta días, distinguiendo varios grupos o clases de AINEs (J Edmond Charlton, 2005):

- Vida media corta (**1- 6h**): pertenecen a este grupo el AAS, diclofenaco, flurbiprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno e indometacina
- Vida media intermedia (**12-24h**): como ejemplos tenemos el naproxeno, diflunisal, etodolaco y nabumentona, además de algunos inhibidores selectivos COX-2 como el celecoxib o el rofecoxib.
- Vida media larga: puede llegar a días. Encontramos el piroxicam, fenilbutazona, tenoxicam y oxaprocina, entre otros.

En cuanto a los *efectos farmacológicos* de los AINEs, la inhibición de la síntesis de PGs induce *analgesia* y *antihiperalgnesia*, disminuyendo además la *inflamación*. Los AINEs, son también *antipiréticos*, efecto que se produce principalmente por la inhibición de la síntesis de PGE<sub>2</sub>. En la práctica clínica, los AINEs se utilizan como *analgésicos*, en el tratamiento del dolor de intensidad leve-moderada. Son muy efectivos asociados a otros fármacos en el tratamiento del DAP en la denominada *analgesia multimodal* (Derry CJ Y cols., 2013). También son eficaces en procesos inflamatorios agudos y crónicos que cursan con dolor tales como artritis reumatoride, osteoartritis y espondilitis anquilosante (Crofford LJ, 2013); sin embargo, son menos efectivos en el tratamiento del dolor visceral (Sikandar S y Dickenson AH, 2012) y por si solos, carecen de efecto demostrado en pacientes con dolor neuropático (Cohen SP y Mao J, 2014). Como *antipiréticos*, los AINEs reducen la temperatura corporal en estados febriles. Inducen por tanto alivio sintomático del dolor, la inflamación y la fiebre derivados de una determinada patología, sin modificar sustancialmente la progresión de la misma.

Por otra parte, y dada la amplia distribución de las COX 1 y 2 en el organismo de los mamíferos, la inhibición de la síntesis de PGs induce un gran numero de *EA*, entre los que destacan: la *toxicidad gastrointestinal*, *nefrotoxicidad* y el *riesgo cardiovascular*; a continuación revisaremos brevemente los mecanismos implicados en la aparición dichos EA. La COX-1 (pero no la COX-2), está constitutivamente expresada en el estómago, donde sintetiza PGs (PGI<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub>) citoprotectoras de la mucosa gastrointestinal; en el estómago, estas PGs reducen la secreción ácida, incrementan el riego sanguíneo a la mucosa y estimulan la liberación de moco viscoso protector (Vane JR y cols., 2001). Es por ello que

por lo general se acepta que la **toxicidad gastrointestinal** de los AINEs clásicos se debe a la inhibición de la COX-1, explicando así la marcada reducción de la toxicidad gástrica que presentan los inhibidores preferentes (*selectivos*) de la COX-2 (Silverstein FE y cols., 2000). En cuanto a la **nefrotoxicidad**, las PGs participan en la regulación del tono vascular y el flujo glomerular, que son dependientes principalmente de la PGE<sub>2</sub>, sintetizada tanto por la COX-1 como la COX-2. La participación de ambas isoenzimas en la función renal se confirmó tras observar que la administración de AINEs produce una retención aguda de Na<sup>+</sup> en pacientes ancianos mediada por la inhibición de la COX-2, además de una disminución del filtrado glomerular asociada a la inhibición de la COX-1 (Catella-Lawson F y cols., 1999). Por otra parte, tanto las PGs sintetizadas por la COX-1 como por la COX-2 participan en la regulación de la homeostasis vascular; de hecho, el uso profiláctico de AAS es beneficioso para prevenir patologías tromboembólicas (Wolff T y cols., 2009). En las plaquetas, la única isoforma presente es la COX-1, responsable de la síntesis del factor pro-agregante/coagulante TXA<sub>2</sub>; por otra parte, la síntesis del factor anti-agregante/coagulante PGI<sub>2</sub> en las células endoteliales, se produce por la acción de la COX-2 (McAdam BF y cols., 1999). La administración de dosis bajas de AAS, acetila la COX-1 de las plaquetas de manera irreversible, bloqueando la síntesis de TXA<sub>2</sub>; este efecto se prolonga hasta que se sintetizan de nuevo más plaquetas puesto que estas células, al ser anucleadas, no tienen la capacidad de síntesis de proteínas, por lo que no pueden sintetizar las COX. A su vez, el efecto del AAS sobre la síntesis de PGI<sub>2</sub> es muy bajo; de esta manera dosis bajas de AAS reducen el riesgo de trombosis.

La inhibición de la COX-2 mediante fármacos selectivos (también denominados COXIBS), reduce la síntesis de PGI<sub>2</sub> (Catella-Lawson F y cols., 1999), que junto a otras PGs producidas por la COX-2, contribuyen a la protección miocárdica. Por este motivo, la administración de inhibidores específicos COX-2 está asociada a un aumento en el **riesgo cardiovascular** (Roubille C y cols., 2013).

En el presente trabajo, hemos utilizado el **dexketoprofeno**, un AINE *no selectivo*, aunque con mayor afinidad por la COX-1 (Warner TD y cols., 1999). El DEX es la sal de trometamina del ácido S-(+)-2-(3-benzoilfenil) propiónico (familia del ácido propiónico) sintetizado a partir del ketoprofeno, que tiene dos enantiómeros (*R* y *S*). Los efectos analgésicos, aunque también algunos indeseables, están asociados al S(+)-enantiómero, mientras que el R(-)-enantiómero carece de efecto analgésico y es responsable de la mayor parte de los EA. En el laboratorio, se aisló el S(+)-enantiómero, llamado dexketoprofeno (DEX), consiguiendo así una mayor eficacia analgésica y menor toxicidad. También su formulación en forma de sal trometamol le confiere una mayor solubilidad y una rápida absorción gástrica, produciendo menos irritabilidad y alcanzando rápidamente ( $\leq 30$

## I. Introducción

minutos) niveles plasmáticos elevados (Barbanj MJ y cols., 1998) con una unión a proteínas plasmáticas del 99%. Tiene una semivida de eliminación de 1,65 horas y su principal vía de eliminación es la glucoronconjugación (vía hepática), seguida de excreción renal.

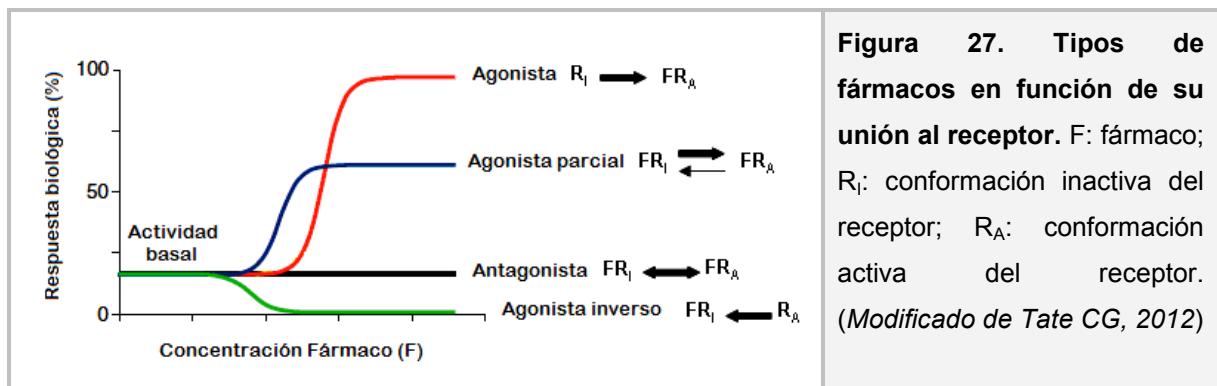
En clínica, el DEX tiene indicaciones similares a los demás AINEs. Debido a la presentación en forma inyectable, el dexketoprofeno se utiliza ampliamente como analgésico / antihiperálgicos postoperatorio, aunque su posible efecto sobre la prevención del DCPQ no ha podido ser establecido de momento en humanos (Deumens R y cols., 2013).

### 5.2 Opioides. Tramadol.

La terminología de esta familia de fármacos a menudo resulta confusa y controvertida, por ello revisaremos brevemente el significado actual de los términos *opio*, *opiáceo*, *opioide*, *endorfina* y *narcótico*. El término *opioide*, se refiere a todos los compuestos relacionados con el *opio*, el cual, se extrae de la planta *Papaver somniferum*. Los fármacos derivados del opio son denominados *opiáceos*, e incluyen productos naturales como la morfina, codeína y derivados semisintéticos. Los *péptidos opioides endógenos* son los ligandos naturales de los RO; el término *endorfina* se utiliza como sinónimo de éstos, aunque también se refiere a un opioide endógeno específico, la  $\beta$ -endorfina. Los *opioides* son las sustancias capaces de unirse al RO. Por último, el término *narcótico* indica opioides que inducen sueño, y ocasionalmente también se utiliza para referirse a sustancias de abuso o potencialmente adictivas (Goodman & Gilman's, 2006)

En el presente texto, utilizaremos el término *opioide* para designar todos los compuestos que se unen a los RO y actúan como *agonistas*, *antagonistas*, *agonistas parciales*, *agonistas inversos* y *agonista-antagonistas* (**figura 27**). Para la mejor comprensión del efecto de los opioides, revisaremos brevemente estos conceptos; los receptores pueden existir al menos en dos estados conformacionales: activo ( $R_A$ ) e inactivo ( $R_I$ ). La magnitud con la que se desplace el equilibrio entre ambas formas o estados viene determinada por la afinidad relativa del fármaco (F) para cada una de las conformaciones. Así, los *agonistas* son aquellos fármacos que tienen mayor afinidad por la conformación activa ( $R_A$ ) y desplazan el equilibrio hacia el estado activo del receptor, mimetizando así la señal de los compuestos endógenos. Los fármacos que poseen una eficacia intermedia son los *agonistas parciales*, que no pueden inducir una respuesta biológica completa a ninguna concentración. Un fármaco que se une con la misma afinidad a las dos conformaciones no alterará el equilibrio y actuará como un *antagonista* competitivo de cualquier compuesto, bien sea agonista o antagonista; estos compuestos bloquean la unión a, por ejemplo, los agonistas endógenos, evitando la activación del receptor. Por último, los *agonistas inversos* son fármacos con gran

afinidad por la conformación inactiva ( $R_i$ ) que producirán un efecto opuesto a los agonistas; su unión inhibirá la señal endógena basal. El *agonismo inverso*, sólo se podrá medir en un sistema en el cual, en ausencia de fármaco, existe un equilibrio entre  $R_A$  y  $R_i$  de manera que se puede ver una disminución en la respuesta fisiológica o bioquímica en respuesta al fármaco (**figura 27**). Por último, los compuestos mixtos *agonistas-antagonistas* se desarrollaron para disminuir los posibles efectos adictivos y la depresión respiratoria, dos EA, comunes a estos fármacos.



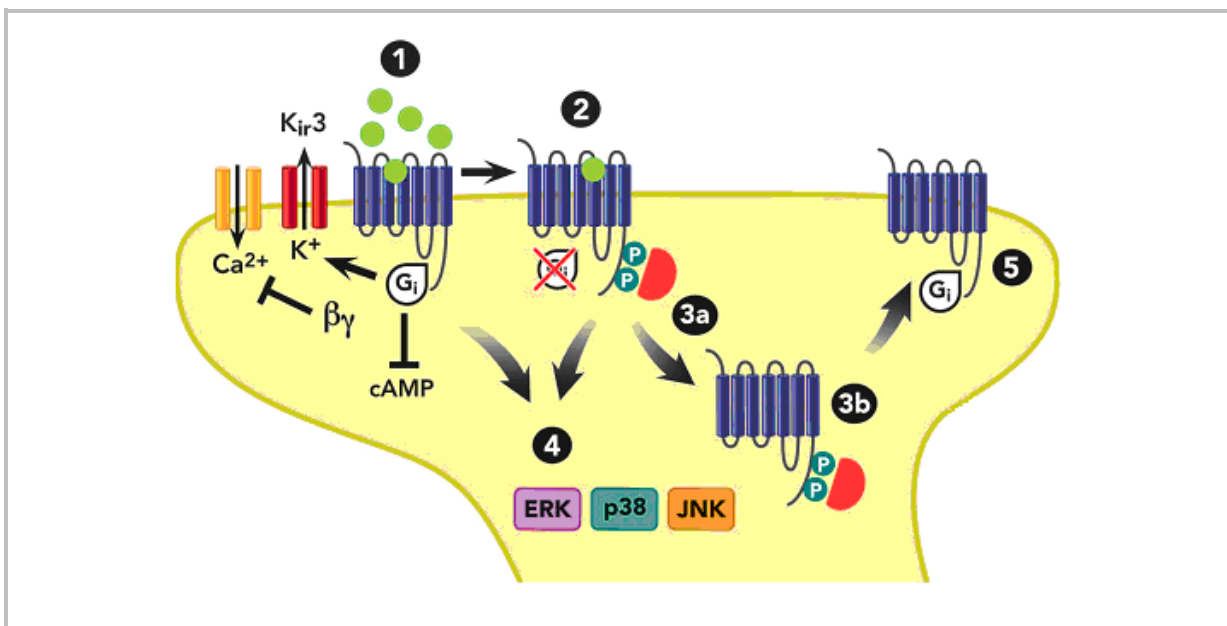
Los opioides ejercen sus efectos farmacológicos (beneficiosos e indeseables) uniéndose a receptores específicos de membrana (RO). Hasta el momento se han caracterizado y clonado cuatro tipos de RO denominados ROM, ROD, ROK y ORL-1 o N/OFQ (Al-Hasani R y Bruchas MR, 2011); estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos pre- y postsinápticamente en el organismo de los mamíferos, en particular en el SNC y periférico donde participan en la modulación inhibitoria del dolor. Desde un punto de vista terapéutico, el más relevante es el receptor ROM puesto que, de momento, todos los opioides de uso clínico (agonistas, agonista-antagonistas y antagonistas) se unen a este receptor. Los RO son proteínas que contienen 7 dominios transmembrana y están acoplados a proteína  $G_{i/o}$ . Las proteínas G son trímeros (subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) que tras la unión de un agonista, se disocian en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ . A pesar de que la función precisa de cada una de las subunidades no está completamente establecida, en la actualidad se acepta que como consecuencia de la disociación, se produce la inhibición de la AC y cambios en la permeabilidad de la membrana; estos incluyen un aumento de la conductancia al  $K^+$  y una disminución de la conductancia al  $Ca^{2+}$ , que tienen como consecuencia la hiperpolarización de la membrana y la disminución de la liberación de neurotransmisores (**figura 28**). Ambas subunidades ( $G\alpha_i$  y  $\beta\gamma$ ) participan en la inhibición de la AC y la disminución del  $AMP_C$ . Por otro lado, la subunidad  $G\alpha$  interacciona directamente con la subunidad kir3 del canal de  $K^+$  GIRK (*G protein-activated inwardly rectifying conductance*, GIRK), induciendo su activación permaniendo activado hasta que se elimine la subunidad  $\beta\gamma$ ; como resultado se produce

## I. Introducción

hiperpolarización (Torrecilla M y cols., 2002). La subunidad  $\beta\gamma$ , se une al canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , inhibiendo su conductancia, disminuyendo la liberación de transmisores excitatorios (**figura 28**). Como consecuencia de las acciones de los agonistas opioides sobre la membrana neuronal, se inhibe la transmisión de la señal nociceptiva y se produce analgesia.

Además de estas acciones, a nivel intracelular también se han descrito otros sistemas efectores como las MAPK (ERK/p38/JNK), la activación de la PKC, el aumento de la IP3 o del DAG (vía PLC) (Lefkowitz RJ y Shenoy SK, 2005).

Si la activación del RO tras la unión del agonista se mantiene de forma prolongada (exposición crónica a opioides), se desencadenan una serie de mecanismos de regulación que conducen a la *desensibilización* e *internalización* del receptor. Este mecanismo se inicia mediante la fosforilación de los RO en el dominio C-terminal por las quinasas de los receptores acoplados a proteína (*G-protein-coupled receptor kinases*, GRK2 y GRK3); quedando así los receptores *desensibilizados* en la membrana plasmática. Tras esta fosforilación, se reclutan las  $\beta$ -arrestinas 1/2 que se unirán al receptor el cual será *internalizado* vía endocitosis dependiente de clatrina y posteriormente podrá ser reciclado (retorno defosforilado y funcional a membrana), o eliminado por los lisosomas (**figura 28**).



**Figura 28. Mecanismo de acción de los opioides.** (1) Unión agonista opioide al receptor. Activación de la proteína G (2) Fosforilación del receptor (3a) Reclutamiento de  $\beta$ -arrestinas (3b) Internalización (4) Señalización vía MAPK (5) Reciclaje y expresión en la membrana neuronal.

(Modificado de Al-Hasani R y Bruchas MR, 2011)

Los fármacos opioides utilizados en el tratamiento del dolor en humanos actúan uniéndose competitivamente a los RO y por tanto se pueden clasificar según su afinidad y eficacia por los distintos tipos de RO. Según su selectividad por los ROM, ROD, ROK, diferenciamos

entre opioides *selectivos* para un receptor, o *no-selectivos* si se unen a diferentes tipos de RO (**tabla 3**).

Receptor	Ligandos Selectivos		Ligandos No-selectivos	
	Agonista	Antagonista	Agonista	Antagonista
ROM	DAMGO Morfina Metadona Fentanilo Dermorfina	CTOP	Levorfanol Etorfina	Naloxona Naltrexona $\beta$ -funaltrexamina
ROK	Espiradolina U50,488 Dinorfina A	Nor-BNI	Levorfanol Etorfina EKC	Naloxona Naltrexona
ROD	DPDPE Deltorfina DSLET	Naltrindole NTB BNTX	Levorfanol Etorfina	Naloxona Naltrexona

**Tabla 3. Clasificación fármacos opioides en función de la selectividad y acción sobre los diferentes receptores opioides.** BNTX: 7-benzylspiroindanyl naltrexone; EKC: etilketociclazocina; NTB: benzofuran; nor-BNI: nor-binaltorfimina; DAMGO, CTOR, DPDPE, DSLET: péptidos opioides sintéticos. (Adaptado de *Goodman & Gilman's 'The pharmacological basis of therapeutics'*, 2006)

En función del efecto analgésico que producen, los opioides también se pueden clasificar en opioides *menores*, como el TRM y la codeína, o *mayores* entre los que encontramos la morfina, la oxycodona, el remifentanilo y el fentanilo, entre otros. Se denominan así, puesto que los primeros son efectivos en dolor leve-moderado y los mayores en dolor moderado-intenso.

En cuanto a su farmacocinética, los opioides se absorben bien por todas las vías y tras su administración oral se metabolizan en el hígado por glucuroconjugación; su biodisponibilidad varía según el opioide (35-80%). Presentan un inicio de acción de aproximadamente 30 minutos y una duración de 4-6 horas.

Debido a la amplia distribución de RO en el organismo (neuronales y extra neuronales), los opioides afectan a un amplio rango de órganos y sistemas fisiológicos. La administración de agonistas induce analgesia y estos fármacos son los analgésicos más eficaces disponibles en la actualidad. Se utilizan también como antitusígenos (deprimen el reflejo de la tos a nivel del SNC) y antidiarreicos. Su principal uso clínico es el tratamiento del dolor nociceptivo

## I. Introducción

moderado-intenso bien sea agudo, crónico u oncológico; también son ampliamente utilizados como anestésicos endovenosos (fentanilo, remifentanilo, alfentanilo). Su eficacia en el dolor neuropático es menor y se consideran fármacos de segunda línea, administrándose en combinación con adyuvantes. En el tratamiento del dolor nociceptivo (por ejemplo el DAP), con frecuencia se administran asociados a AINEs o paracetamol durante la analgesia multimodal; de esta manera, se minimizan los EA incrementando el la acción analgésica, debido a que los efectos de la combinación son aditivos/sinérgicos (Maund E y cols., 2011).

Los EA de los opioides son múltiples y, hasta el momento, ha sido imposible disociarlos de la analgesia; entre ellos destacan el efecto euforizante/reforzante, la sedación/sueño, la depresión respiratoria, los efectos gastrointestinales (náuseas/ vómitos, disminuyen la motilidad y la secreción de moco e incrementan la absorción de fluidos), la retención urinaria, el prurito, la rigidez muscular y los efectos hormonales, entre otros. También inducen tolerancia, dependencia e hiperalgesia (HIO) que pueden aparecer tras su administración aguda o crónica (Angst MS y Clark JD, 2006; Fetcher D y Martinez V, 2014; Célérier E y cols., 2006; Cabañero D y cols., 2009a,b). Los efectos sobre la respiración son particularmente importantes ya que la depresión respiratoria severa puede producir la muerte; sin embargo, en presencia de dolor intenso la depresión respiratoria es infrecuente. Los efectos pronociceptivos de los opioides han sido demostrados después de su administración aguda y crónica, tanto en modelos animales como en los humanos (Angst MS y Clark JD, 2006, Célérier E y cols., 2006; Cabañero D y cols., 2009a,b; Campillo A y cols., 2011), sin que los posibles mecanismos implicados hayan podido ser establecidos de forma definitiva. Diversos estudios indican que la glía podría desempeñar un papel importante en la HIO (Hutchinson MR y cols., 2007), sugiriendo que el bloqueo de la activación glial podría prevenir la hiperalgesia opioide. De esta forma Song P y Zhao ZQ (2001), después de la administración crónica de morfina, observaron que aparecía tolerancia al efecto antinociceptivo y a la vez activación de la glía espinal y supraespinal; sin embargo cuando la morfina se administraba simultáneamente con un inhibidor de la glía, se mantenía la eficacia analgésica de la morfina reduciéndose a la vez la activación glial.

En el presente trabajo, hemos investigado los efectos del **tramadol** (TRM) para prevenir la hiperalgesia postoperatoria y la SLD en el modelo de dolor postincisional en el ratón.

El TRM [(1RS,2RS)-2-[(dimetilamino)metil]-1-(3-metoxifenil)-ciclohexanol HCl)] es un opioide sintético análogo de la codeína. Tanto la molécula original (TRM) como su metabolito activo M1(O-desmetiltramadol) se unen a los ROM para producir analgesia; además el TRM inhibe la recaptación de 5-HT y NA en el SNC (Raffa RB y cols., 1992), por lo que se considera al

TRM un analgésico con un mecanismo de acción dual (opioide y no-opioide). Se metaboliza en el hígado dando lugar a distintos metabolitos, destacando entre ellos el M1, que es analgésico.

El TRM es un profármaco, que se presenta como una mezcla racémica donde el enantiómero (+) se une a los ROM e inhibe la recaptación y aumenta la liberación de 5-HT, mientras que el enantiómero (-) inhibe la recaptación y aumenta la NA (Lewis KS y Han NH, 1997). El TRM es un agonista débil ya que su afinidad para el ROM es 6000, 60 y 10 veces inferior a la de la morfina, dextropropoxifeno y codeína, respectivamente (Codd EE y cols., 1995). Aunque el TRM incrementa los niveles de 5-HT en el SNC, se desconocen los subtipos de receptores serotoninérgicos que podrían participar en la analgesia inducida por el TRM. Estudios recientes sugieren sin embargo que la activación de las vías descendentes serotoninérgicas y la activación del receptor 5-HT<sub>7</sub> a nivel espinal podrían jugar un papel relevante en el efecto antinociceptivo y antihiperálgico del TRM y su metabolito M1 (Yanarates O y cols., 2010).

Algunos autores han investigado la posible implicación de la glía espinal en el mecanismo de acción del TRM. Así, la administración intratecal de TRM inhibe *ligeramente* la activación de la *microglía* espinal en un modelo de dolor neuropático inducido por ligadura del ciático en el ratón (Mei XP y cols., 2013a). Los mismos autores observaron además que la inhibición de la microglía va acompañada de una disminución de la fosforilación de p38 y de la liberación IL-1 $\beta$  en la misma microglía (Mei XP y cols., 2013b). En cuanto a los astrocitos, un estudio reciente muestra (Sakakiyama M y cols, 2014) que la administración repetida de TRM inhibe la activación astrocitaria, hecho que correlaciona con la atenuación de la hiperálgia mecánica en un modelo de dolor neuropático en rata. Por tanto, además de sus acciones sobre el ROM y la recaptación de aminas endógenas, la inhibición de la activación glial podría también participar en los mecanismos mediante los cuales el TRM induce antinocicepción en distintos modelos de dolor.

En cuanto a su cinética, la analgesia en humanos se inicia a los 60 minutos tras la administración oral, alcanzando el pico máximo a las 2-3h. Se une a las proteínas plasmáticas en un 20% y la biodisponibilidad es aproximadamente del 75%. El TRM se metaboliza extensamente en el hígado donde se forma múltiples metabolitos (el M1 entre otros); de hecho, únicamente el 30% se excreta por la orina sin modificar, mientras que el resto son metabolitos. Las vidas medias de los productos activos son aproximadamente 6 y 7 horas para el TRM y el M1, respectivamente.

En la clínica humana, el TRM se utiliza en el tratamiento del dolor nociceptivo-inflamatorio y mixto (nociceptivo-neuropático), agudo y crónico, de intensidad leve-moderada; resulta



## I. Introducción

especialmente útil cuando están contraindicados los AINEs o el paracetamol. Además, el TRM se utiliza ampliamente en el tratamiento del DAP durante la analgesia multimodal (Edwards JE y cols., 2002). Posee EAs similares al resto de opioides, tales como náuseas, vómitos, mareo, boca seca, sedación y dolor de cabeza. La depresión respiratoria es menor a la inducida por dosis equianalgésicas de morfina, y el grado de estreñimiento también es menor al que se observa con dosis equivalentes de codeína (Duthie DJ, 1998); además, no existe evidencia de que produzca HIO. Es importante tener en cuenta que, debido a su doble mecanismo de acción, la analgesia inducida por el TRM no se revierte totalmente por naloxona, mientras que la depresión respiratoria es totalmente reversible. Dado que el TRM inhibe la recaptación de 5-HT no es aconsejable utilizarlo en pacientes que reciben inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT (SSRIs como fluoxetina o paroxetina).

### 5.3 Adyuvantes

A continuación se describen las principales características de los fármacos adyuvantes que han sido objeto de estudio en el presente proyecto. Estos fármacos se utilizan en clínica humana en el tratamiento de dolor neuropático y mixto, solos o asociados a analgésicos convencionales. Debido a las características del DCPQ, que en muchos casos tiene un componente neuropático, se utilizan también en la prevención del DCPQ en los humanos (Chaparro LE y cols., 2013). Sobre la base de su (relativa) eficacia en los humanos y su mecanismo de acción, en el presente trabajo hemos investigado si la administración perioperatoria de distintos adyuvantes previene (total o parcialmente), la aparición de HPO y SLD en el ratón; también hemos estudiado el efecto de estos fármacos sobre la activación de la glía espinal y su correlación con el comportamiento nociceptivo postoperatorio.

#### **Anticonvulsivantes. Gabapentina**

Fueron introducidos en terapéutica para el tratamiento de las convulsiones, en particular la epilepsia, aunque en la actualidad se utilizan en el tratamiento del dolor neuropático de distinta etiología. Los mecanismos implicados en las convulsiones no están totalmente establecidos, aunque se ha postulado que podrían estar en relación a una reducción de la actividad inhibitoria sináptica (por ejemplo GABA) y/o un aumento de la actividad excitatoria (glutamato) (Bradford HF, 1995). De esta forma, los fármacos que incrementan la actividad de GABA y los antagonistas del glutamato inhiben las convulsiones en varios modelos animales y en los humanos.

En cuanto a su mecanismo de acción, muchos anticonvulsivantes (por ejemplo la carbamacepina) tienen como diana *canales de Na<sup>+</sup>* voltaje dependientes. Estos fármacos

mantiene este canal en su forma *inactiva* (tal y como se encuentra en el período refractario tras una despolarización), de manera que no dejan pasar  $\text{Na}^+$ , necesario para generar un potencial de acción; así, el mecanismo principal mediante el cual inhiben las convulsiones consiste en evitar la recuperación del canal de  $\text{Na}^+$  de su forma inactiva, evitando la transmisión del impulso nervioso (Macdonald RL y Greenfield LJ, 1997). Otra diana de algunos anticonvulsivantes son los *canales de  $\text{Ca}^{2+}$*  voltaje dependientes, concretamente la subunidad  $\alpha 2\delta$  (gabapentinoides). La unión del anticonvulsivante a esta subunidad podría disminuir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inhibiendo la liberación de transmisores excitatorio; sin embargo el mecanismo no está establecido de forma definitiva (Hendrich J y cols., 2008);

Los *canales de  $\text{K}^+$*  son también la diana de algunos anticonvulsivante como por ejemplo la retigabina. Estos fármacos potencian las corrientes M neuronales uniéndose a los canales de  $\text{K}^+$   $\text{K}_v7.2$ ; al reducir estas corrientes neuronales excitatorias se disminuye el umbral de las convulsiones, mientras que aumentarlas se protege frente a ellas (Rogawski MA & Bazil CW, 2008). Por último, la *modulación de los receptores  $\text{GABA}_A$*  es otro de los mecanismos propuestos para explicar el efecto de los fármacos anticonvulsivantes. En presencia de GABA, el receptor  $\text{GABA}_A$  se abre dejando pasar iones  $\text{Cl}^-$  que polarizan la membrana; algunos fármacos anticonvulsivantes reducen el metabolismo del GABA y otros incrementan la entrada de iones en respuesta a la activación del canal por el agonista (Greenfield Jr LJ, 2013). A modo de resumen podríamos decir que los fármacos anticonvulsivante evitan la transmisión de la señal eléctrica en ciertas áreas de la corteza cerebral mediante la inhibición tanto de la despolarización neuronal como de la liberación de neurotransmisores excitatorios.

Los anticonvulsivantes se han utilizado en el tratamiento del dolor neuropático desde los años 60, poco después de que fueran introducidos en terapéutica como antiepilépticos. Múltiples estudios clínicos muestran la eficacia de algunos antiepilépticos como la carbamazepina, PGB, fenitoína, GBP y valproato en el dolor neuropático; sin embargo, revisiones sistemáticas recientes indican que los gabapentinoides (GBP y PGB) tienen un efecto analgésico clínicamente relevante (Wiffen PJ y cols., 2013). También se ha demostrado que la administración perioperatoria de gabapentinoides disminuye la intensidad del DAP y los requerimientos de opioides (Hurley RW y cols., 2006); pero la magnitud de su efecto sobre la prevención del DCPQ no ha podido ser establecida de forma definitiva (Clarke H y cols, 2012).

En el presente estudio, hemos evaluado la eficacia de la **gabapentina** sobre la hiperalgesia postoperatoria y la SLD, así como sus posibles efectos sobre la activación de la glía espinal;

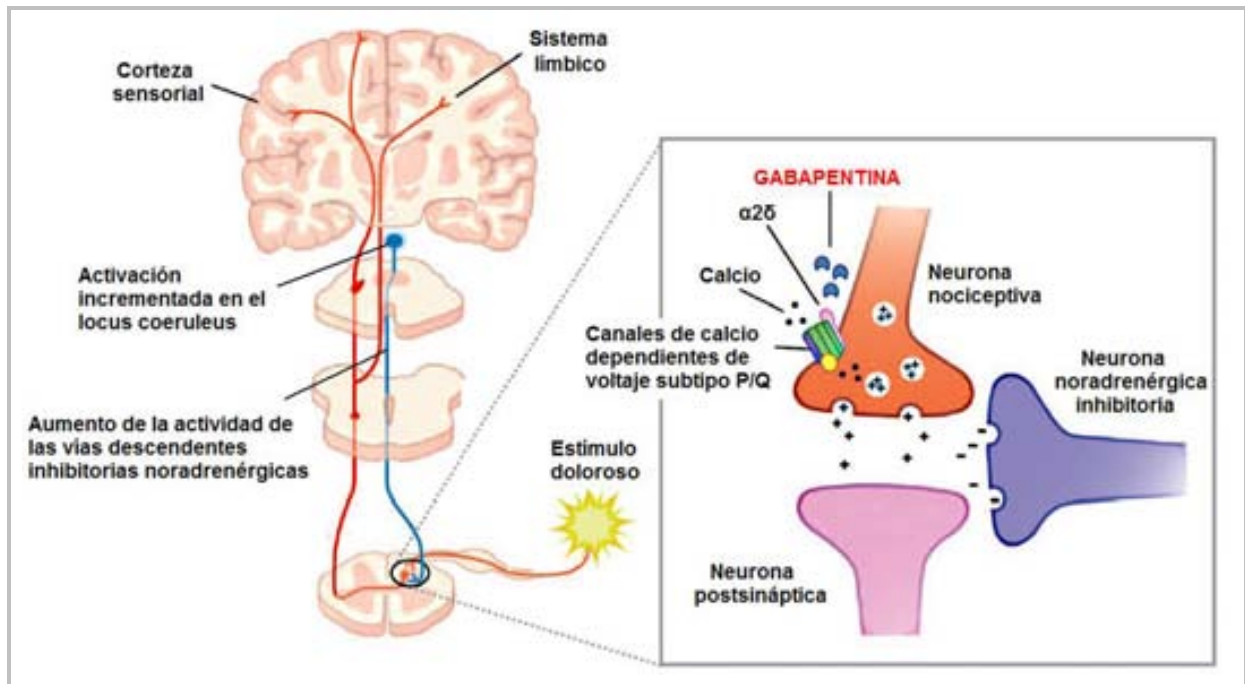
## I. Introducción

hemos utilizado GBP y no PGB, debido a existe una mayor evidencia científica que apoya el uso de GBP para prevenir la aparición de DCPQ en los humanos (Clarke H y cols, 2012).

La GBP fue aprobada para su uso como antiepiléptico en 1993, aunque rápidamente se descubrió su efecto beneficioso en pacientes con dolor neuropático. La GBP es un análogo estructural del ácido  $\gamma$ -aminobutírico, y contiene una molécula GABA unida covalentemente a un anillo hexagonal lipofílico, gracias al cual se facilita el paso a través de la barrera hematoencefálica. A pesar de su estructura, no actúa sobre los receptores GABA sino que se une a las subunidades  $\alpha 2\delta$  presinápticas de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje subtipo P/Q; como consecuencia, se reduce la excitabilidad neuronal mediante la reducción de la liberación de neurotransmisores, bien directamente vía reducción de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  o indirectamente vía inhibición del tráfico de estos receptores a la membrana celular (Hendrich J y cols., 2008). Estas subunidades ( $\alpha 2\delta$ ) están sobreexpresadas en modelos de dolor neuropático, y explicarían, al menos en parte, el efecto analgésico de estos fármacos (Valder CR y cols., 2003). También se ha propuesto que los gabapentinoides podrían activar los sistemas inhibitorios descendentes noradrenérgicos por activación de ciertos grupos neuronales situados en el locus coeruleus (LC); el aumento de NA en la ME junto con la reducción de la hipersensibilidad tras la cirugía ha sido demostrado tanto en humanos como en roedores (Hayashida K y cols., 2007; 2008), sugiriendo a su vez que la acción supraespinal de la GBP tiene un papel importante para producir analgesia (**figura 29**).

Recientemente se ha propuesto que en el mecanismo de acción analgésica-antihiperalgésica de la GBP podrían participar las células de glía del SNC. En un modelo de monoartritis por CFA en la rata, la administración de dosis repetidas de GBP, redujo la liberación neuronal de quimioquina fractalina y la de su receptor CX3CR1, expresado en la microglía, que aumentan durante la inflamación. En este modelo, la GBP disminuyó paralelamente la activación de la microglía y la hiperalgésia térmica; los autores atribuyen la acción sobre la microglía a un efecto indirecto, puesto que la subunidad  $\alpha 2\delta$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se expresa únicamente en las neuronas. De esta forma, la GBP bloquearía la subunidad  $\alpha 2\delta$  disminuyendo la liberación de neurotransmisores excitatorios de la neurona, que al actuar sobre la glía inducen su activación (Yang JL y cols., 2012). La correlación entre la disminución de la activación microglial y el efecto antihiperalgésico de la GBP también puede ser demostrada en ratas con neuropatía diabética (Wodarski R y cols., 2009). Además se ha sugerido que los astrocitos podrían participar en el efecto de la GBP en modelos de dolor neuropático, ya que la GBP incrementa la actividad glutamatérgica en el LC de manera independiente a su acción sobre las subunidades  $\alpha 2\delta$  de los canales de calcio voltaje-dependientes; este aumento sería uno de los mecanismos por los cuales se

activarían los sistemas inhibitorios descendentes noradrenérgicos para reducir el dolor (Suto T y cols., 2014).



**Figura 29. Mecanismo de acción de la gabapentina.** La gabapentina incrementa la activación de los sistemas inhibitorios descendentes noradrenérgicos además de bloquear la entrada de calcio a través de los canales de calcio  $\alpha_2\delta$ , disminuyendo así la liberación de neurotransmisores excitatorios. (Modificado de Schmidt PC y cols., 2013)

En humanos, la GBP se administra por vía oral y se absorbe en su mayor parte en el intestino delgado; tiene una vida media que entre 4-8 horas y no se metaboliza, eliminándose sin ser modificada por el riñón (Blum RA y cols., 1994). Aunque es un buen anticonvulsivante y antihiperálgico, induce EA que con frecuencia hacen interrumpir el tratamiento (sedación, mareo, náuseas y vómitos, prurito). En clínica humana se utiliza como antiepiléptico y como antihiperálgico en el tratamiento del dolor neuropático (Guy y cols., 2014) y del DAP (Seib RK y Paul JE, 2006).

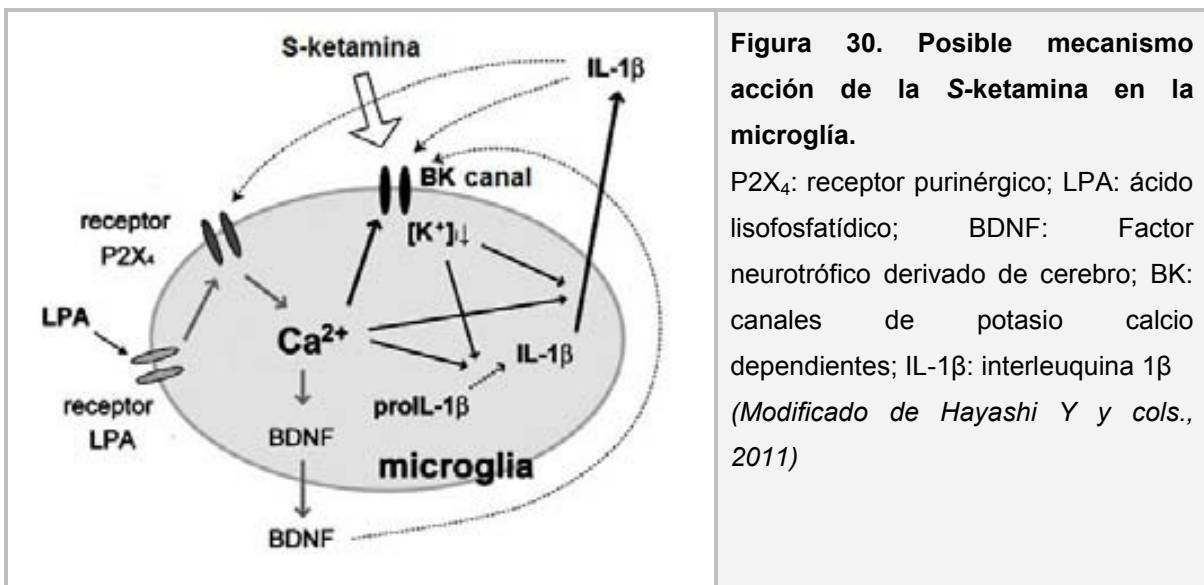
En resumen, *los gabapentínoles*, como la gabapentina y la pregabalina, actúan bloqueando la subunidad  $\alpha_2\delta$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes, modulando el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  y la liberación de diversos transmisores como el glutamato, NA, 5-HT, dopamina y SP, entre otros. Estos fármacos tienen efecto antihiperálgico en distintos modelos animales (Hayashida K y cols., 2007) y son eficaces en el tratamiento del dolor neuropático en humanos. En la clínica disminuyen la incidencia del DCPQ, aunque su eficacia no ha podido ser establecido de forma definitiva (Clarke H y cols., 2012).

## Antagonistas del receptor NMDA. Ketamina

La **ketamina** es un antagonista no competitivo del receptor NMDA utilizado como anestésico/analgésico tanto en clínica veterinaria como humana (Parson CG y cols., 1993; Eichenberger U y cols., 2008). Es una arilciclohexilamina derivada de la fenciclidina que se presenta como mezcla racémica de dos estereoisómeros (*S*- y *R*-). El *S*- tiene entre tres y cuatro veces más potencia analgésica que el *R*-, que a dosis equianalgésicas, está asociado a una mayor incidencia de EA (Marietta MP y cols., 1977).

La mayor afinidad (x 2) de la *S*-ketamina por su lugar de unión al receptor NMDA (Hustveit O y cols., 1995), no explica satisfactoriamente la mayor potencia (x 3-4) del enantiómero *S*- (Mathisen LC y cols., 1995), y diversos estudios han postulado otras dianas que podría participar en su mecanismo de acción. Entre ellas los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  (BK) (Denson DD y Eaton DC, 1994), los canales  $K^+$  voltaje dependientes (Schnoebel R y cols., 2005) y los canales HCN1 (Chen X y cols., 2009) podrían tener un papel relevante.

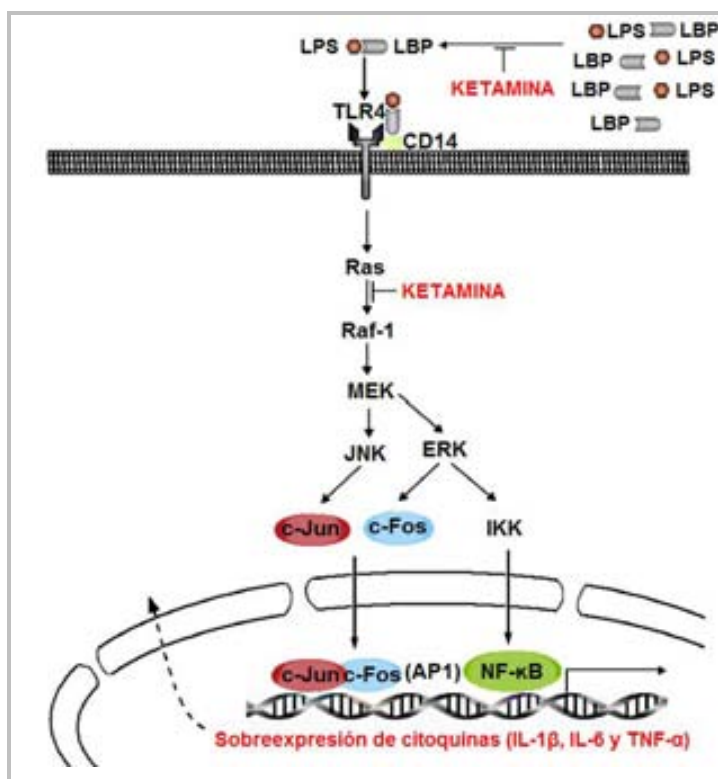
Estudios recientes sugieren también que la glía podría desempeñar un papel relevante en el mecanismo de acción analgésica de la KET. Así, Hayashi Y y colaboradores (2011) proponen que la *S*-ketamina podría bloquear los canales BK situados en la microglía inhibiendo su activación (**figura 30**).



En células de microglía en cultivo expuestas a ácido lisofosfatídico (LPA), la unión de LPA a sus receptores induce la síntesis de BDNF a través de la activación de los receptores purinérgicos P2X<sub>4</sub> y el aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular (Ma L y cols., 2010). Este aumento abre los canales BK, induciendo la síntesis y liberación de IL-1β. Tanto el BDNF como la IL-1β liberados, contribuyen a incrementar la actividad de los canales BK de la propia célula

microglial (Gao Y y cols., 2010) creando un *feedback* positivo. La S- ketamina inhibe las corrientes de los canales BK y también el incremento de la expresión de los receptores P2X<sub>4</sub> y la síntesis de BDNF (Hayashi Y y cols., 2011), reduciendo en último término la activación microglial y disminuyendo la sensibilización (**figura 30**).

En modelos de activación glial en cultivo, el LPS induce activación astrocitaria y aumento en la expresión de TLR4 (Wu Y y cols., 2012). Como consecuencia, aumenta la síntesis de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ . La KET inhibe el aumento de expresión del receptor TLR4, la fosforilación del NF- $\kappa$ B y la síntesis de diversas citoquinas, lo que explicaría su efecto antiinflamatorio demostrado tanto in vitro (Shimaoka M y cols., 1996) como in vivo (Takenaka I y cols., 1994; Kawasaki T y cols., 1999). La **figura 31**, muestra un esquema de los mecanismos implicados en la acción antiinflamatoria de la KET, que por una parte inhibiría la cascada de señalización intracelular Ras/raf/MEK/ERK/IKK y por otra la unión del agonista LPS al LBP (proteína de unión del lipopolisacárido) impidiendo la activación del TLR4 (Chen TL y cols., 2009) (**figura 31**). En un modelo de dolor neuropático in vivo, Mei XP y cols (2011) observaron un aumento de la fosforilación de JNK en los astrocitos pero no en la microglía o las neuronas, que se redujo tras la administración de KET, coincidiendo con el efecto antihiperálgico.



**Figura 31. Mecanismos moleculares implicados en el efecto antiinflamatorio de la ketamina.** LPS: lipopolisacárido; LBP: proteína de unión del lipopolisacárido; TLR4: *Toll-like receptor 4*; CD14: glicoproteína; Ras/ Raf-1/ MEK/ JNK/ ERK: cascada quinasas. c-Jun, c-Fos, NF- $\kappa$ B: factores de transcripción.

(Modificado de Liu FL y cols., 2012)

La KET se administra por vía endovenosa aunque se puede utilizar por vía intramuscular, oral o rectal. El efecto en humanos se inicia 10-15 minutos tras la administración

## I. Introducción

endovenosa, teniendo una vida media de 3 horas. Se metaboliza en el hígado originando diversos metabolitos, entre ellos, norketamina, hidroxinorketamina e hidroxiketamina (Yanagihara Y y cols., 2000). Todos ellos se someten a glucuronización y son eliminados por vía hepática o renal, mientras que un 10-20% del fármaco se elimina inalterado (Hijazi Y y cols., 2002). En humanos los metabolitos de la KET contribuyen poco al efecto analgésico de la KET (Noppers I y cols., 2011); sin embargo en ratas, la norketamina, es un antagonista no selectivo del receptor NMDA y tiene propiedades antinociceptivas tanto en dolor agudo como dolor crónico (Holtman JR Jr y cols., 2008).

La KET se utiliza como anestésico/sedante, y también como analgésico/antihiperálgico. Los EAs incluyen mareo, visión borrosa, hipertensión, taquicardia, hipersalivación, náuseas, vómitos y todo un conjunto de alteraciones del SNC (pesadillas, delirio, euforia, alucinaciones) que aparece predominantemente en pacientes en los extremos de la edad (pediatría, geriatría). En clínica humana, la KET se emplea poco como anestésico, aunque como analgésico/antihiperálgico se utiliza en el tratamiento del dolor neuropático (oncológico y no oncológico), en el DAP (disminuye los requerimientos de opioides) y en la prevención del DCPQ (Tawfic QA, 2013). El reducido índice terapéutico de la KET, la vía de administración, los EA y la falta de especificidad del fármaco por el receptor NMDA, limitan su utilización clínica (D'Mello R y Dickenson AH, 2008).

En el presente proyecto, hemos investigado los efectos de la KET en nuestro modelo, puesto que se utiliza en la práctica clínica para el tratamiento del DAP (Laskowski K y cols., 2011) y en la prevención del DCPQ (Chaparro LE y cols., 2013). Sin embargo, en el periodo perioperatorio, las dosis, duración del tratamiento y el momento de administración de la KET en relación al proceso quirúrgico, no han sido establecidos de forma definitiva.

### **5.4 Inhibidores de la activación de la glía**

Las células gliales, microglía y astrocitos, contribuyen al inicio y mantenimiento del dolor patológico. Por ello, pensamos que la administración de inhibidores de la activación glial podría ser útil en el tratamiento del DAP y en la prevención de la SLD en nuestro modelo. A continuación se describen las características de dos inhibidores de la actividad de la microglía y los astrocitos, la minociclina y el fluorocitrato, respectivamente. Sin embargo, en el presente proyecto, no se ha estudiado el fluorocitrato dado que no ha sido utilizado en la clínica humana y además existen discrepancias sobre su efecto sobre los astrocitos y su efectividad cuando se utilizan distintas vías de administración.

## Minociclina

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro naturales y semisintéticos, utilizados desde 1940 en el tratamiento de infecciones inducidas por bacterias *gram*-positivas/negativas y organismos atípicos como *chlamydia*, *mycoplasmas*, *rickettsia* y parásitos. Actúan inhibiendo la síntesis proteica mediante su unión a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Penetran en las bacterias por difusión a través de los canales hidrofílicos formados por las proteínas *porinas* de la membrana externa, y por transporte activo mediante un sistema energía-dependiente que bombea las tetraciclinas a través de la membrana citoplasmática. Además de la actividad antibacteriana, las tetraciclinas poseen efectos antiinflamatorios, antinociceptivos y neuroprotectores, que se están investigando desde los años 90.

La **minociclina** es una tetraciclina semisintética de segunda generación, capaz de inhibir la excitabilidad neuronal y la activación de la microglía y los macrófagos. Es muy liposoluble por lo que cruza con facilidad la barrera hematoencefálica e induce efectos antinociceptivos en modelos animales de dolor inflamatorio y neuropático (Bastos LFS y cols., 2012). Los mecanismos implicados en el efecto analgésico-antihiperálgico no están bien establecidos, aunque se ha descrito que podría actuar tanto sobre las neuronas como las células de glía. La **figura 32** muestra algunos de estos mecanismos, los cuales se describen brevemente a continuación.

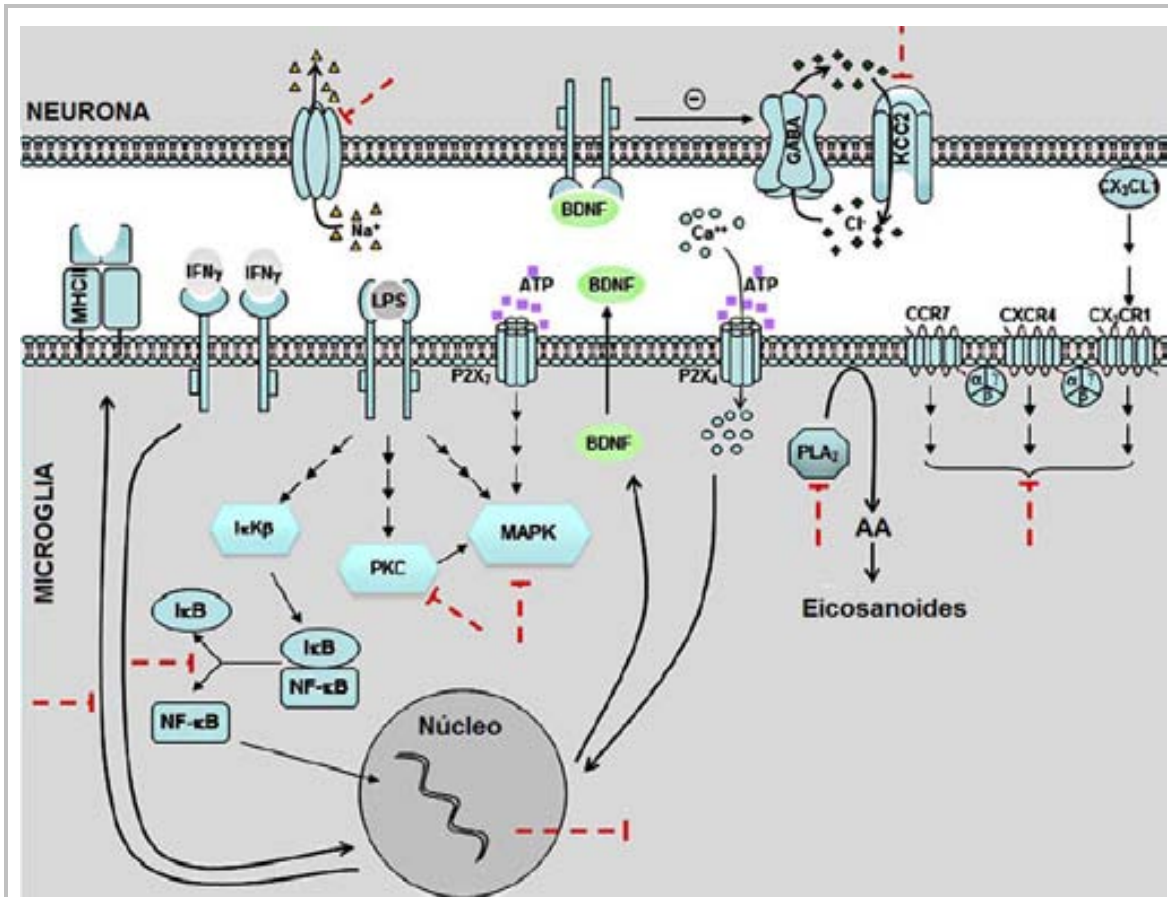
Uno de los principales mecanismos implicados en los efectos antinociceptivos de la minociclina es la inhibición de la síntesis de PGE<sub>2</sub>; esta inhibición estaría mediada por el bloqueo de la actividad o expresión de la PLA<sub>2</sub> (Ma L y cols., 2010) COX-1/2 y PGE-sintetasa (Bastos LFS y cols., 2012). También disminuye la síntesis y liberación de citoquinas pronociceptivas, mediante la inhibición de la señalización intracelular vía NF-κB y MAPK, en modelos animales de dolor nociceptivo (Saito O y cols., 2010) y neuropático (Raghavendra V y cols., 2003), existiendo una buena correlación entre los efectos antinociceptivos y la disminución de los niveles de citoquinas.

La lesión tisular provoca también un incremento de la liberación de ATP a partir de la glía (Tsuda M y cols., 2003), que conduce a la liberación de BDNF vía activación de los receptores purinérgicos P2X<sub>4</sub>, un fenómeno dependiente del Ca<sup>2+</sup> extracelular y la activación de la MAPK p38 (Trang T y cols., 2009). El BDNF liberado interacciona con su receptor neuronal, donde modifica las corrientes del receptor GABA que pasan de inhibitorias a excitatorias, (Coull JAM y cols., 2005), a través de la modulación del cotransportador 2 de K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> (KCC2) (Rivera C y cols., 2004); todo ello conduciendo a un aumento de la



## I. Introducción

excitabilidad neuronal. Se ha propuesto que la administración intratecal de minociclina, además de reducir la activación de la microglía, bloquea los cambios inducidos por el BDNF (Zhou LJ y cols., 2011); por otro lado, los efectos antialodínicos de la minociclina también se han asociado con la disminución de la expresión canales KCC2 neuronales, sin alterar la concentración de BDNF (Morgado C y cols., 2011) (**figura 32**).



**Figura 32. Mecanismos de acción de la minociclina sobre la microglía y la neurona.** KCC2: Cotransportador 2 de K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>; GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico; CX $_3$ CL1: fractalina (quimioquina); MHCII: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II; IFN $\gamma$ : interferón  $\gamma$  ; CCR7, CXCR4, CX $_3$ CR1: receptores quimioquinas; LPS: Lipopolisacárido; ATP: adenosina trifosfato; P2X $_4$ : receptor purinérgico; BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro; PLA $_2$ : fosfolipasa A tipo 2; AA: ácido araquidónico; NF- $\kappa$ B: factor de transcripción nuclear; I $\kappa$ B: molécula represora del NF- $\kappa$ B; I $\kappa$ K $\beta$ : quinasa que fosforila I $\kappa$ B ; PKC: proteína quinasa C; MAPK: proteína quinasas activadas por mitógeno. Las líneas rojas discontinuas (----|) indican los lugares de acción inhibitoria/bloqueante de la minociclina. (Modificado de Bastos LFS y cols., 2012)

Otros mecanismos que también podrían estar implicados en los efectos antinociceptivos de la minociclina incluyen la inhibición de la hemoquinina-1 (familia de las taquininas) y la

disminución del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHCII) (Nikodemonva M y cols., 2007) así como el bloqueo de la señalización intracelular tras la activación de los receptores de quimioquinas de origen neuronal (**figura 32**).

A nivel neuronal, se ha propuesto que la minociclina proporciona neuroprotección por medio de sus efectos antiinflamatorios. Este fármaco inhibe la enzima PARP-1 (poli (ADP-ribosa) polimerasa-1)) que mediante la interacción con factores de transcripción (NF-κB) induce la síntesis y expresión de citoquinas, COX-2 o iNOS (Cuzzocrea S y cols., 2002). Otros estudios sugieren que el fármaco podría modificar directamente la excitabilidad neuronal (Cho IH y cols., 2006), bloqueando los canales de Na<sup>+</sup> (Kim TH y cols., 2011), o deprimiendo la transmisión glutamatérgica en neuronas del hipocampo (Gonzalez JC y cols., 2007).

La minociclina tiene efecto antibacteriano y antihiperalgésico y se utiliza en el tratamiento de patologías infecciosas. Posee un efecto antihiperalgésico en modelos animales de dolor neuropático (Zychowska M y cols., 2013) e inflamatorio (Ledebøer A y cols., 2005). En humanos su uso como antihiperalgésico no ha sido evidenciado para el DAP y en la prevención del DCPQ no existen resultados concluyentes (Martinez V y cols., 2013).

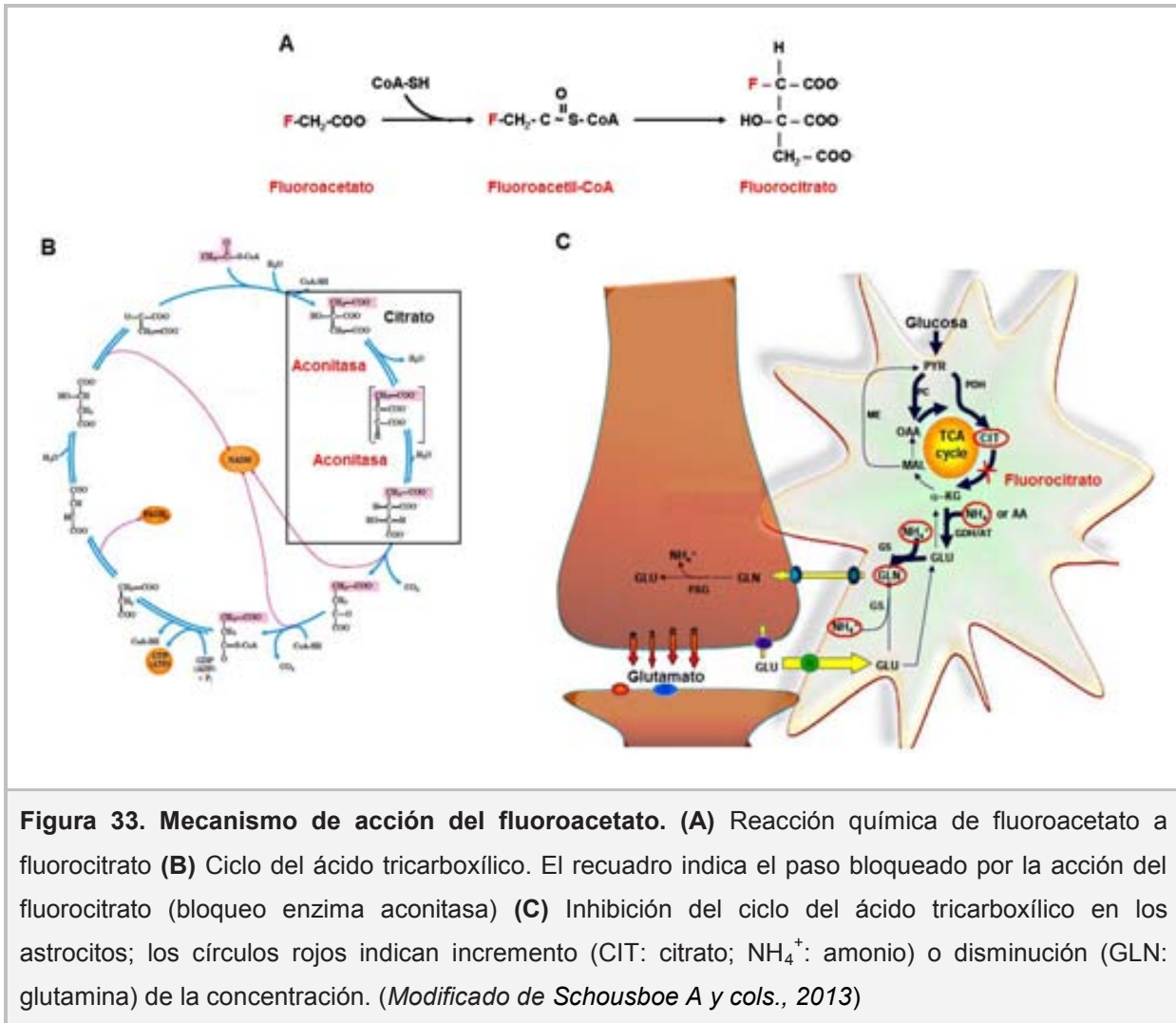
La minociclina se absorbe completamente en el tracto gastrointestinal y se elimina por vía renal tras metabolismo hepático. Alcanza su concentración máxima a las 2,5 horas y la vida media de eliminación es 6 horas. Los EA de las tetraciclinas son predominantemente gastrointestinales (irritación, náuseas, vómitos, diarrea), hepáticos y renales.

## **Fluorocitrato**

El fluoroacetato y su derivado fluorocitrato se aislaron inicialmente de plantas de la familia *Dichapetalum*, aunque posteriormente se han identificado en más de 40 especies diferentes. En 1942 se describió su eficacia como rodenticida y posteriormente como veneno (Proudfoot AT y cols., 2006). El fluoroacetato es un inhibidor específico de la actividad de los astrocitos (Cheng SC y cols., 1972) que actúa inhibiendo el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA).

Concretamente, tras la formación de fluorocitrato (**figura 33A**), este compuesto inhibe la enzima aconitasa impidiendo la continuidad del TCA (**figura 33B**). Como consecuencia de ello, se produce una disminución de la síntesis de glutamina, un aumento del citrato y una disminución de la fijación del amonio (**figura 33C**).

## I. Introducción



Puesto que la activación de los astrocitos está implicada en el inicio y mantenimiento del dolor crónico (Romero-Sandoval A y cols., 2008, **apartado 3** del presente texto), su inhibición mediante la administración de inhibidores específicos ha despertado cierto interés. Algunos estudios en animales a los cuales se ha administrado fluoroacetato/fluorocitrato por vía intracerebroventricular (icv) muestran una inhibición selectiva del TCA en los astrocitos; sin embargo este efecto no se observa tras su administración sistémica (Fonnum F y cols., 1997), puesto que implica la administración de una dosis letal del compuesto. Otros estudios muestran que el efecto antihiperálgico del fluorocitrato correlaciona con una disminución de la activación de los astrocitos (Sung CS y cols., 2012).

El fluorocitrato es un compuesto altamente tóxico que induce arritmias cardíacas, somnolencia, letargo y convulsiones (que reflejan un aumento de la excitabilidad neuronal), produciendo finalmente la muerte (Bosakowski T y Levin AA, 1986). No existe aplicación clínica para este compuesto por su elevada toxicidad. Tras la administración icv el fármaco

alcanza su máximo efecto a las 4 horas y tiene un tiempo de eliminación de 12-24 horas (Paulsen RE y cols., 1987).

### 5.5 A-836339, Agonista del receptor cannabinoide tipo II

En modelos animales de dolor inflamatorio y neuropático, distintos compuestos *cannabinoides* selectivos para el receptor CB2 (AM1241, GW405833 o A836339, entre otros) han demostrado tener un efecto analgésico/antihiperalgésico relevante (LaBuda CJ y cols., 2005; Hsieh GC y cols., 2011). Sin embargo sus efectos en humanos son controvertidos (Blake DR y cols., 2006; Ashton JC y Milligan ED, 2008; Langford RM y cols., 2013) y en el DAP, carecen de efecto tras la extracción del tercer molar (Ostenfeld T y cols., 2011). A pesar de ello, pensamos que sobre la base de su mecanismo de acción y su efecto antihiperalgésico en modelos animales y en los humanos, estos fármacos podrían prevenir (al menos en parte) la SLD en nuestro modelo.

El cannabis, derivado de la planta *Cannabis sativa*, se ha utilizado durante siglos en el ámbito medicinal y como sustancia de abuso, sin embargo la estructura química de los compuestos activos, los cannabinoides (CBs), no fue descubierta hasta los años 60. Los CBs son compuestos hidrófobos que actúan uniéndose a receptores específicos de membrana, de los que se han clonado dos tipos CB1 y CB2; sus principales ligandos endógenos (endocannabinoides, ECs) son la AEA y el 2-AG. La activación de los receptores por agonistas endógenos y exógenos induce antihiperalgesia demostrada en distintos modelos animales de dolor (LaBuda CJ y cols., 2005; Hsieh GC y cols., 2011).

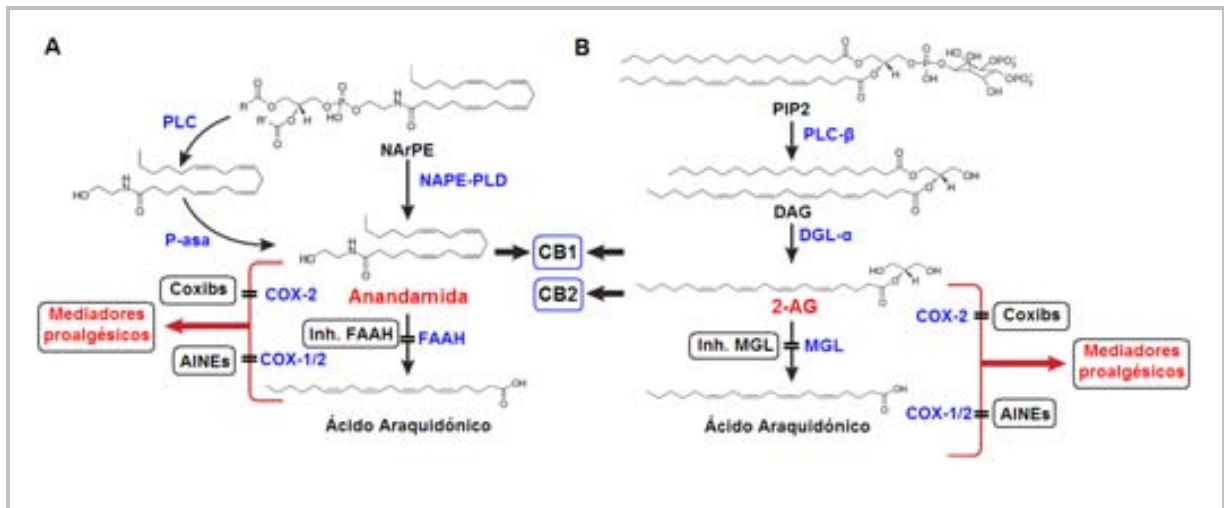
Los receptores **CB1** están abundantemente expresados en el SNC en áreas cerebrales implicadas en la transmisión de la nocicepción, incluyendo la SGPA, el córtex cingulado anterior y el tálamo, además de el ADME y el GRD (Farquhar-Smith WP y cols., 2000). Principalmente, están localizados en las terminaciones de las neuronas, aunque también en los axones y los cuerpos celulares tanto en el SNC como en periferia, ejerciendo una inhibición de la liberación de neurotransmisores (Matyas F y cols., 2006). Además, los receptores CB1, también están presentes en células no nerviosas como macrófagos/microglía, mastocitos y queratinocitos (Ständer S y cols., 2005; Sugawara K y cols., 2013).

Los receptores **CB2** están expresados principalmente en células de origen hematopoyético como, los macrófagos y los mastocitos (Ständer S y cols., 2005); en el SNC, se expresan en la microglía (Gong JP y cols., 2006) y en los astrocitos (Onaivi ES y cols., 2006) donde modulan las respuestas inmunes. Además, también están expresados en células endoteliales y en neuronas tanto a nivel central (tronco del encéfalo) como periférico.

## I. Introducción

Los principales **ECs**, **AEA** y **2-AG**, se sintetizan utilizando rutas bioquímicas distintas, aunque en ambos casos el paso inicial es la hidrólisis enzimática a partir de un precursor que es un fosfolípido de membrana (Piomelli D y cols., 2007) (**figura 34**).

La **AEA**, agonista parcial del receptor CB1 y débil del receptor CB2 (Sugiura T y cols., 2000), se forma a partir de la fosfatidiletanolamina (PE) que se une de forma covalente al AA. Una vez sintetizada, la **AEA** actúa, principalmente, sobre los receptores CB1 cercanos al lugar de síntesis como un mensajero autocrino (propia célula) o paracrino (célula colindante), ejerciendo una acción antinociceptiva, y se elimina rápidamente mediante recaptación al interior de la célula vía un transportador; seguidamente la molécula se degrada a través de la catálisis que facilita la hidrolasa de amidas y ácidos grasos (FAAH, *fatty acid amide hydrolase*) liberando AA y etinolamina (Piomelli D, 2014). El AA liberado puede ser utilizado por ambas COXs para sintetizar PGs pro-nociceptiva/algésica; además, la **AEA**, paralelamente, también puede ser transformada directamente por la COX-2 (pero no la COX-1) en prostamidas, que presentan acción pro-nociceptiva/algésica (Gatta L y cols., 2012) (**figura 34A**). Por estos motivos, tanto la inhibición de la FAAH como los inhibidores de ambas COXs (AINEs) actúan de manera sinérgica, atenuando, el dolor inflamatorio, neuropático en el ratón (Sasso O y cols., 2012; Naidu PS y cols., 2009). Estos hechos ponen de manifiesto la estrecha relación entre los sistemas endocannabinoide y prostanoide, así como el interés en desarrollo de inhibidores duales de FAAH y COX (Piomelli D y Sasso O, 2014). El **2-AG**, derivado de la hidrólisis del fosfoinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>), es el EC más abundante en el SNC y actúa como agonista de ambos receptores con mayor eficacia relativa como antinociceptivo que la **AEA** (Janero DR y cols., 2009). La metabolización (degradación) la produce la enzima monoacilglicerol lipasa (MGL), la cual hidroliza el éster de glicerol y libera el AA. Como en el caso anterior, el AA libre puede ser utilizado por las COXs para sintetizar PGs pronociceptivas/algésicas; además el **2-AG** también se puede metabolizar por la COX-2 para producir derivados proalgésicos como la PGE<sub>2</sub> (Hu SS-J y cols., 2008) (**figura 34B**).



**Figura 34. Síntesis y degradación de endocannabinoides: Anandamida (A) y 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (B). Interacción con la vía del ácido araquidónico.** PLC: fosfolipasa C; P-asa: fosfatasa; NArPE: N-araquidonoil-PE; PLD: fosfolipasa D; COX1/2: ciclooxigenasa 1/2; inh. FAAH: inhibidores de la hidrolasa de amidas y ácidos grasos (*fatty acid amide hydrolase*); CB<sub>1/2</sub>: receptor cannabinoide 1/2; PIP<sub>2</sub>: fosfoinositol bifosfato; PLC-β: fosfolipasa C- β; DAG: diacilglicerol; DGL-α: enzima hidrolítica; Coxibs: inhibidores de la COX-2; AINEs: antiinflamatorios no esteroideos; inh. MGL: inhibidores de monoacilglicerol lipasa.

(Modificado de *Piomelli D y Sasso O, 2014*)

En situaciones de dolor crónico donde existe hiperalgesia persistente, aumenta la expresión de CB1 (Palazzo E y cols., 2012) y CB2 (Guindon J y Hohmann AG, 2008), así como, de ECs y las enzimas que los metabolizan (Petrosino S y cols., 2007). Puesto que la activación de estos receptores cannabinoide proporciona un efecto protector (analgésico/antihiperálgico) mediado por los endocannabinoides, esto pone de manifiesto que durante el proceso patológico se activan y sobreexpresan sistemas antinociceptivos. Además, este hecho remarca la importancia y el potencial de administrar agonistas de los receptores cannabinoide fomentando la respuesta protectora; asimismo, inhibidores de las enzimas que metabolizan a los agonistas endógenos podrían también aumentar la analgesia/antihiperálgica.

Concretamente, la activación por agonistas de los receptores CBs, expresados en glía y neuronas, inhibe la liberación de citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL-6, IL-1β) e incrementa la liberación de citoquinas antiinflamatorias (IL-4 y la IL-6; Sheng WS y cols., 2005; Shohami E y cols., 1997). Estos receptores, están acoplados a proteína G<sub>i/o</sub> y su activación inicia cascadas de señalización que tienen como consecuencia la inhibición de la AC, y el bloqueo / apertura de los canales de calcio y potasio, respectivamente; como

## I. Introducción

consecuencia, se reduce la excitabilidad neuronal y liberación de neurotransmisores excitatorios, disminuyendo así la hipersensibilidad al dolor.

Particularmente, los receptores CB2 median las acciones antiinflamatorias de los agonistas CBs en los astrocitos y la microglía, disminuyendo su actividad como células presentadoras de antígeno, y productoras de citoquinas (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) durante la respuesta inflamatoria (Lombard C y cols., 2007). En los efectos antiinflamatorios de los agonistas CBs sobre las células de glía, se produce una disminución de la transcripción de quimioquinas y citoquinas a través de la inhibición del NF- $\kappa$ B (Panikashvili D y cols., 2005).

En el presente proyecto, hemos evaluado el efecto de un agonista CB2 (A-836339) en el DAP y en la prevención de la SLD. Uno de los principales motivos por los que el CB2 tiene un gran potencial como diana terapéutica respecto al CB1, es el hecho que los efectos psicotrópicos de los CBs están asociados al receptor CB1 y no al CB2 (Miller AM y Stella N, 2008), mientras que los efectos analgésicos/antihiperalgésicos, atribuidos a ambos receptores, se han podido demostrar con agonistas del receptor CB2 en modelos animales de dolor postincisional (LaBuda CJ y cols., 2005), inflamatorio o neuropático (Hsieh GC y cols., 2011). Además, el hecho de que los receptores CBs, particularmente CB2, estén expresados en la glía y que su activación contribuya al efecto antiinflamatorio/antinociceptivo de estas células, despierta gran interés por su posible utilización en terapéutica en humanos. Clínicamente, y a pesar de los efectos observados en modelos animales, hasta el momento, no existe ningún agonista selectivo para el receptor CB2 de uso en humanos dado que los datos de los ensayos clínicos no son concluyentes o bien los compuestos carecen de eficacia clínica.

### 5.6 Benzodiacepinas: Midazolam

Puesto que la ansiedad y el catastrofismo (pesimismo, desaliento) son factores predictivos para el DAP intenso y también para la aparición de DCPQ (Peters ML y cols., 2007) hemos investigado el efecto de las benzodiacepinas sobre la HPO y la SLD. Pensamos que las benzodiacepinas administradas en el periodo perioperatorio podrían ejercer una doble acción: por una parte disminuir la ansiedad y por otra producir analgesia/antihiperalgésia postoperatoria. En el presente proyecto hemos evaluado el efecto del *midazolam* (MDZ) en el DAP, en la prevención de la SLD y la activación glial

En el estudio hemos utilizado MDZ, ya que distintos trabajos preclínicos (Chiba S y cols., 2009) y clínicos (Gupta R y cols., 2012) sugieren que podría favorecer o incrementar el efecto de los fármacos analgésicos / antihiperalgésicos. En modelos animales, los efectos antihiperalgésicos del MDZ han sido observados en el dolor neuropático (Shih A y cols.,

2008; Lim J y cols., 2006). También en el modelo de la formalina (fase 1), se pudo demostrar sinergia para el efecto antinociceptivo cuando se administró simultáneamente MDZ y un agonista 5-HT (Nishiyama T, 2009). Por otra parte, el MDZ inhibe la liberación glial de IL-6 en células de glía previamente activadas por la administración de IL-1 $\beta$  (Tanabe K y cols., 2011).

En los humanos, se ha postulado que las benzodiazepinas (MDZ, otros), podrían inducir analgesia tanto cuando se administran individualmente como asociadas a otros fármacos como la KET, en la prevención del dolor postoperatorio tras la extracción del tercer molar (Gupta R y cols., 2012); sin embargo existe una cierta controversia al respecto, puesto que un trabajo reciente sugiere que los hipnótico-sedantes como el MDZ, podrían incrementar la percepción del dolor (Frölich MA y cols., 2013). Su efecto preventivo del DCPQ no ha podido ser demostrado de forma definitiva (Frölich MA y cols., 2013).

En cuanto a los efectos antinociceptivos del MDZ, existe una cierta correlación con los efectos observados en células de glía en cultivo. Así, la presencia de MDZ en el medio, disminuye la liberación de IL-6 inducida por estimulación con IL-1 $\beta$  (Tanabe K y cols., 2011).

Las benzodiazepinas (5-aril-1,4-benzodiazepinas) son fármacos ansiolíticos / sedantes con una estructura química formada por un anillo de benceno unido a un anillo diazepina; contienen además un anillo 5-aril y un 1,4-diazepina. Actúan uniéndose de forma alostérica a los receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub>, que contienen cinco subunidades (2 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 1 $\gamma$ ) que forman un canal selectivo para el ión Cl<sup>-</sup>. Estos receptores se expresan en neuronas y en astrocitos (Kang J y cols., 1998). La unión del GABA (principal neurotransmisor inhibitorio) a la subunidad  $\beta$  del receptor GABA<sub>A</sub> induce la apertura del canal y la entrada de iones Cl<sup>-</sup>, provocando la hiperpolarización de la membrana; como consecuencia, se inhibe la transmisión excitatoria de señales. Las benzodiazepinas se unen a la subunidad  $\alpha$  del receptor GABA<sub>A</sub> aumentando la frecuencia de apertura de los canales de Cl<sup>-</sup> incrementando la inhibición inducida por el GABA.

Las benzodiazepinas se absorben por completo por vía oral, y se metabolizan en el hígado por los citocromos P450 (CYP3A4 y CYP2C19) y se eliminan por vía renal. Se unen a proteínas plasmáticas en un 70-99%. Según su vida media de eliminación se clasifican en de duración ultracorta (< 4 horas), corta, intermedia y larga (> 24 horas) (Greenblatt DJ y cols., 1981).

En la clínica humana, se utilizan como anticonvulsivantes, ansiolíticos, sedantes e hipnóticos, aunque tras su uso crónico puede aparecer tolerancia y dependencia. Clínicamente, la vida media del fármaco establece su uso terapéutico, así las



## I. Introducción

benzodiazepinas de larga duración son útiles como anticonvulsivantes y ansiolíticos; las de duración intermedia-corta como hipnóticos y las de duración ultra-corta como sedantes y para inducir amnesia en la premedicación anestésica ay y durante la cirugía. Los EA de las benzodiazepinas incluyen lasitud, disminución de los reflejos, descoordinación motora, confusión y amnesia. Otros efectos indeseados menos comunes son cefaleas, visión borrosa, vértigo, náuseas y vómitos, diarrea.

### **5.7 Analgesia Multimodal. Asociaciones o combinaciones de analgésicos**

En la clínica humana es difícil controlar el dolor nociceptivo agudo de intensidad moderada-severa con un solo fármaco o procedimiento analgésico, por lo que se utilizan asociaciones o combinaciones de analgésicos en lo que se ha denominado *analgesia multimodal* o *balanceada*. Dado que la transmisión del dolor y los procesos de sensibilización nociceptiva están mediados por múltiples vías y mecanismos, es poco probable que la inhibición de un único mediador o vía de señalización pueda prevenir/controlar el dolor y la hiperalgesia. Por tanto durante la analgesia multimodal, se utiliza la administración simultánea de dos o más fármacos o procedimientos que producen analgesia por distintos mecanismos (Rawlinson A y cols., 2012); en la actualidad, la analgesia multimodal constituye la base de tratamiento del DAP. Cuando dos o mas fármacos se administran simultáneamente cada uno puede actuar de forma independiente, en cuyo caso los efectos serán aditivos; sin embargo algunos fármacos pueden interactuar entre si, de tal forma que los efectos observados se desvíen de la aditividad pudiendo ser mayores o menores que la suma de ambos, en cuyo caso existe sinergia o antagonismo, respectivamente (Raffa RB y cols., 2003). El tipo de interacción puede ser determinado experimentalmente utilizando protocolos concretos y análisis estadísticos adecuados (por ejemplo isobogramas), que permiten establecer la presencia y el tipo de interacción, así como la óptima relación de dosis para obtener la mejor analgesia (Tallarida RJ, 2012).

Así, estudios realizados en nuestro laboratorio en modelos animales de nocicepción muestran que las asociaciones de analgésicos combinados en una proporción 1:1 (en base a su potencia), son por lo general sinérgicas o aditivas para la analgesia (Romero A y cols., 2010; Miranda HF y cols., 2009; 2012). Concretamente, la combinación de DEX (AINE *no selectivo*) y TRM (opioide menor) es sinérgica en ratones sanos o *naïve* (Miranda HF y cols., 2009) y en animales con inflamación aguda y crónica inducida por CFA (Miranda HF y cols., 2012). Dado que la combinación es sinérgica para la analgesia en distintos modelos animales de nocicepción, en el presente proyecto hemos investigado su eficacia antihiperalgésica en el modelo de dolor incisional y en la prevención de la SLD; también hemos estudiado su eficacia sobre la inhibición de la activación glial (microglía y astrocitos)

en la ME. La combinación de DEX y TRM se utiliza empíricamente en el tratamiento del dolor postoperatorio en humanos, pero se desconoce el tipo de interacción entre ambos fármacos.

Entre los fármacos que se asocian más frecuentemente en el tratamiento del DAP en humanos, se encuentran los AINEs y el paracetamol. Estudios preclínicos muestran que esta combinación tiene efectos sinérgicos para la analgesia (Miranda HF y cols., 2005); en humanos también se ha observado que la combinación posee una mayor eficacia analgésica que cuando los fármacos se administran individualmente (Ong CKS y cols., 2010). En cirugías muy dolorosas, la combinación de AINEs y paracetamol disminuye las dosis de morfina requeridas para obtener analgesia efectiva, y como consecuencia se reducen los EA (Maund E y cols., 2011). Además de fármacos analgésicos, actualmente se incluye en la analgesia multimodal la administración de adyuvantes tales como anticonvulsivantes o KET, puesto que favorecen la analgesia postoperatoria y previenen la aparición de DCPQ (Deumens R y cols., 2013).

Como hemos descrito a lo largo de la introducción, existe una gran variedad de fármacos disponibles para el tratamiento del dolor; sin embargo, el tratamiento subóptimo del DAP continúa siendo un problema relevante en pacientes quirúrgicos que pueden desarrollar más adelante DCPQ. La falta de conocimientos sobre los mecanismos implicados en el desarrollo de DCPQ e incluso la falta de conocimientos del efecto de los fármacos en algunos sistemas (como por ejemplo sobre las células de la glía) hacen difícil establecer pautas farmacológicas efectivas (combinaciones adecuadas, tiempos de administración, dosis...). Por este motivo, en el presente trabajo hemos analizado el efecto que ejercen diferentes fármacos sobre la HPO y la SLD (relacionada con el DCPQ), y su efecto sobre la activación de la glía en la médula espinal. Este campo está poco explorado y es de especial relevancia puesto que está bien establecida la implicación que de la glía en el dolor patológico, en particular neuropático.

## II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El presente proyecto está justificado sobre la base del problema que representa en la práctica clínica el *dolor agudo postoperatorio* (DAP) moderado-severo, que está presente en un 60% de pacientes quirúrgicos aun a pesar del tratamiento analgésico administrado (Wu CL y Raja SN, 2011). El dolor agudo puede convertirse en *dolor crónico postquirúrgico* (DCPQ) en un elevado porcentaje de pacientes (15-60%) (Lavand'homme P, 2011), siendo un factor de riesgo importante la intensidad del dolor agudo después de la cirugía; por lo general, el dolor crónico es neuropático-mixto y puede llegar a ser incapacitante, mermando la calidad de vida del paciente e incrementando los gastos sociales y sanitarios.

El dolor postincisional agudo y crónico presenta características y mecanismos propios que podrían explicar, al menos en parte, la escasa respuesta al tratamiento. Entre ellos, la activación de la glía espinal podría ser un factor relevante en su etiología ya que las células de glía (microglía y astrocitos), participan en los procesos de inicio y mantenimiento del dolor patológico (Romero-Sandoval A y cols., 2008). En nuestro estudio hemos evaluado el efecto de diversos tratamientos farmacológicos sobre el comportamiento nociceptivo con el fin de establecer su posible asociación con la activación glial.

En la actualidad, el tratamiento farmacológico del dolor postoperatorio tiene una doble finalidad: controlar la intensidad del dolor agudo y prevenir la aparición de dolor crónico. En el tratamiento del dolor agudo se utilizan AINEs, AA y opioides, solos o asociados, en la denominada analgesia multimodal o balanceada; para la prevención del dolor crónico utilizamos antagonistas del receptor NMDA y anticonvulsivantes, pero de momento, su eficacia no ha sido establecida de forma definitiva. Cada familia de fármacos analgésicos / antihiperálgicos, actúa por mecanismos distintos, aunque se ha descrito que todos ellos pueden modificar en mayor o menor proporción la activación de la glía después de una lesión tisular.

Hemos investigado si los fármacos utilizados habitualmente en el tratamiento del DAP en el hombre (solos o asociados) producen antinocicepción en el ratón, y si a la vez son capaces de modificar la activación de la glía. El posible paralelismo de los resultados de comportamiento con la activación glial, nos dará una nueva visión sobre la participación de la glía en los mecanismos de acción de los analgésicos utilizados en tratamiento del dolor postoperatorio, consolidando (o no), el papel de la glía en la etiología del dolor postincisional agudo y crónico.

El estudio ha sido realizado en un modelo de dolor postquirúrgico en el ratón, que mimetiza las características del dolor agudo postoperatorio en humanos (Célérier E y cols., 2006); el modelo no permite cuantificar dolor espontáneo, por lo que hemos evaluado la hiperálgia

mecánica (HPO) que acompaña invariablemente el DAP. En este modelo, la aplicación de un nuevo estímulo una vez que ha cicatrizado la herida quirúrgica y se han recuperado los umbrales nociceptivos, induce de nuevo hiperalgesia. La respuesta pone en evidencia cambios plásticos en el SNC compatibles con una *sensibilización latente al dolor (SLD)*, que sería la base para desarrollar dolor crónico postquirúrgico (Cabañero D y cols., 2009; Campillo A y cols., 2011; Romero A y cols., 2011;). En el estudio, hemos evaluado la *hiperalgesia postoperatoria* como manifestación del DAP y la *sensibilización latente al dolor* que refleja la aparición de DCPQ; como estímulo para poner en evidencia la presencia de SLD, hemos utilizado (-)naloxona, un antagonista no selectivo de los RO.

El estudio da una visión global sobre las familias de fármacos que podrían ser efectivos no sólo en el tratamiento del DAP sino también en la prevención del DCPQ en humanos. Además, los efectos sobre las células de la glía ampliarán nuestros conocimientos sobre los mecanismos de acción de estos fármacos, así como la implicación de la activación de la glía espinal en el DAP y la aparición de DCPQ.

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra **hipótesis de trabajo** propone que la administración intraoperatoria de fármacos analgésicos o *adyuvantes* utilizados en clínica humana en el tratamiento del dolor postoperatorio, podrían prevenir cambios plásticos espinales que conducen al desarrollo de *sensibilización latente al dolor* y dolor crónico postquirúrgico. Puesto que los cambios plásticos afectarían a células nerviosas y gliales, postulamos también que los distintos tratamientos podrían prevenir la sensibilización nociceptiva mediante mecanismos neuronales y/o gliales, estos últimos poco caracterizados todavía.

Utilizando un modelo de dolor postquirúrgico en el ratón que reproduce (aproximadamente) los eventos que ocurren en el período perioperatorio en humanos, nos planteamos como **objetivo general** investigar el efecto de la administración intraoperatoria de analgésicos y *adyuvantes* sobre la hiperalgesia postoperatoria, la sensibilización latente al dolor, y la activación glial (microglía y astrocitos) inducidos por la cirugía.

Los **objetivos concretos** del estudio han sido:

1. Evaluar el efecto de la administración intraoperatoria de una única dosis de dexketoprofeno y/o tramadol, individualmente o combinados, sobre la hiperalgesia postoperatoria (4h-2d) y la prevención de la sensibilización latente al dolor (que se evidencia mediante la administración de naloxona, el día 21 del postoperatorio)
2. Evaluar el efecto de la administración intraoperatoria de una única dosis de dexketoprofeno y/o tramadol, individualmente o combinados, sobre i) el aumento de la inmunoreactividad glial espinal inducida por la cirugía el día 1 del postoperatorio y ii) la reactivación glial tras la administración de naloxona el día 21 del postoperatorio.
3. Establecer si existe paralelismo entre el comportamiento nociceptivo (hiperalgesia postoperatoria y SLD) y la inmunoreactividad glial espinal
4. Analizar el efecto del dexketoprofeno y el tramadol sobre la activación glial, en condiciones control (animales *sham*-operados)
5. Evaluar el efecto de la combinación de dexketoprofeno y el tramadol sobre la hiperalgesia postquirúrgica y la activación glial. Determinar si existe interacción entre ambos fármacos cuando se administran el día 1 del postoperatorio en una proporción 1:1. Establecer el tipo de interacción para el efecto antihiperálgico utilizando isoblogramas e índices de interacción.

6. Evaluar el efecto de la administración intraoperatoria de una única dosis de distintos fármacos analgésicos y adyuvantes utilizados en la clínica humana, sobre la hiperalgesia postquirúrgica y la activación glial
7. Determinar el efecto de la ketamina y la gabapentina (fármacos que previenen parcialmente el DCPQ en humanos), sobre la hiperalgesia postoperatoria, la sensibilización latente al dolor y la activación glial en los distintos tiempos. En ambos períodos, establecer un paralelismo entre la antihiperalgesia y la inhibición de la activación glial en la médula espinal
8. Evaluar el efecto de la inhibición de la activación microglial inducida por la administración de minociclina, sobre la hiperalgesia postoperatoria, la sensibilización latente al dolor y la activación glial espinal
9. Investigar si la activación de los receptores cannabinoides CB2 mediante el agonista A-836339, podría bloquear la HPO y SLD y la activación glial después de la cirugía.
10. Establecer el efecto del midazolam, una benzodiazepina utilizada como ansiolítico en el perioperatorio en humanos sobre la hiperalgesia postoperatoria, la sensibilización latente al dolor y la activación glial espinal.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Animales y estabulación

Para la realización de todos los experimentos se han utilizado ratones macho Swiss CD1 obtenidos de Charles-River (CRIFFA, Francia) con un peso comprendido entre los 25-30 gramos. Los animales fueron estabulados en grupos de 4 en cajas con un lecho de viruta de madera de álamo autoclavada (Souralit S.L, Barcelona, Spain), mantenidos en una habitación con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (ciclo luz 8.00h-20.00h) y temperatura y humedad controlada ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $55 \pm 10\%$ , respectivamente). Los animales disponían de agua y comida *ad libitum* exceptuando en los períodos de evaluación del comportamiento o manipulación de los animales.

Todos los procedimientos han sido aprobados siguiendo las directrices de la normativa de la Comunidad Europea 86/609/EEC referente a la manipulación de animales de experimentación y por el Comité Ético para la Experimentación Animal- Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (CEEA-PRBB). Las instalaciones donde se han llevado a cabo los procedimientos cuentan con la acreditación de la *International Association for Accreditation of Laboratory and Assessment Animal Care*.

### 2. Cirugía

Utilizamos el modelo incisional de dolor postoperatorio descrito previamente en rata (Brennan TJ y cols., 1996) y validado en el ratón en nuestro laboratorio (Célérier E y cols., 1996). Los animales de todos los grupos experimentales fueron anestesiados con sevoflurano durante 30 minutos en un quirófano en condiciones de esterilidad. El sevoflurano fue administrado vaporizado en oxígeno a una concentración de 3,5% v/v para la inducción de la anestesia y 3,0% v/v durante la cirugía. Para la inducción de la anestesia se empleó una cámara de metacrilato, mientras que para el mantenimiento, y con el fin de facilitar la cirugía, se utilizó una máscara facial. En el caso de los animales control ésta fue la única manipulación que se les practicó (anestesia, 30 minutos); en cambio, a los animales que fueron sometidos a cirugía, se les realizó una incisión plantar durante los 30 minutos que duró la anestesia (ver apartado 5 material y métodos). La cirugía consistió en una incisión longitudinal de 0,7 cm realizada con un bisturí número 20 en la piel y la fascia en la superficie plantar de la pata derecha trasera, empezando a 0,3 cm del límite proximal del talón y extendiéndose hacia los dedos. El músculo plantar se expone y se realizan incisiones longitudinalmente, manteniendo la inserción intacta. Tras la hemostasis mediante ligera

presión, se procede al cierre de la herida quirúrgica realizando dos puntos de sutura con hilo de seda del número 6/0; posteriormente, se cubre con una sustancia antiséptica de povidona yodada. Una vez finalizado el proceso quirúrgico, los animales se recuperan en cajas con el lecho estéril y con una fuente de calor (manta térmica).

Durante la cirugía, además, los animales recibieron una administración sistémica de uno de los fármacos de estudio o bien suero salino (SS, NaCl 0,9%) en el caso de los animales control (ver apartado 5 material y métodos).

### 3. Evaluación del comportamiento nociceptivo: Test de Von Frey

Los umbrales nociceptivos se evaluaron en todos los experimentos de comportamiento mediante el *test de Von Frey*. Este test mide la hiperalgesia mecánica ante un estímulo mecánico mediante los filamentos Semmes-Weinstein (San José, California, EE.UU).

Inicialmente, se habitúa a los animales al entorno y condiciones de la sala durante 2-3 días. Para ello, cada día y a la misma hora, se colocan los animales individualmente en un cilindro de metacrilato, de 30 cm de alto y 9 de diámetro, sobre una superficie de malla metálica; permaneciendo en ellos 2 horas. Tras el período de habituación, se realiza la evaluación de los umbrales nociceptivos basales mediante los filamentos de Von Frey 2-3 días consecutivos previos a cualquier manipulación; este test se realizará tras la habituación también de 2 horas cada día (de tal manera que los animales estén tranquilos y quietos durante el período de evaluación). El valor medio de las tres evaluaciones se considerará el valor basal de los umbrales nociceptivos cada animal. De igual forma, tras la manipulación, cada día que se evalúen los umbrales nociceptivos, los animales se habituaran durante las 2 horas previas al inicio del test.

Para la valoración de los umbrales nociceptivos (test de Von Frey), se aplican filamentos de distinto grosor (correspondientes a presiones comprendidas entre los 0,008 y 2 gramos, en el espacio delimitado por las almohadillas (no sobre ellas ni fuera de este espacio) del animal. Los filamentos se aplican siempre empezando por una presión de 0,4 gramos, que se irá aumentando o disminuyendo siguiendo el método de '*up&down*' (Chaplan SR y cols., 1994); así, si el animal responde ante el estímulo (retira la pata) se aplicará un filamento de calibre inferior, mientras que, si no responde se aumentará el calibre. Este proceso se realizará sucesivamente hasta haber realizado 4 aplicaciones tras el primer cambio de respuesta, entendiendo este cambio como pasar de retirar la pata a no retirarla, o viceversa. El filamento equivalente a 2g se utiliza como *cut-off*. Las respuestas se anotan como 'O' cuando no hay respuesta y como 'X' cuando hay respuesta. Para el cálculo del umbral nociceptivo la secuencia de las 6 últimas respuestas se introduce en una hoja de cálculo



#### IV. Material y métodos

proporcionada por el laboratorio del Dr. A. Basbaum (San Francisco, EE.UU) que calcula el valor en gramos utilizando el método up&down descrito por W.J, Dixon, 1980.

### 4. Evaluación de la inmunoreactividad glial en médula espinal

#### 4.1 Perfusión, inclusión y preparación de las muestras

Para cada tiempo y grupo experimental evaluado, 4-5 animales son anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p) y perfundidos por vía intracardiaca con suero salino tamponado (PBS, phosphate-buffered saline; 0,1M, pH 7,4) seguido de una sustancia fijadora al 10% de formalina. Tras la perfusión se procede a la extracción del segmento comprendido entre la L4-L6 de la médula espinal. Estos segmentos se depositan individualmente en *ependorfs* con la misma solución fijadora de la perfusión (formalina 10%) donde permanecen durante 2 horas a 4°C. Tras este período, se elimina esta solución y se cubren los tejidos con una solución crioprotectora (20% sacarosa en PBS 0.1M) durante 24 horas a 4°C. Esta solución, por osmosis, permitirá la liberación de agua del tejido, preservando así el tejido de la formación de cristales de gran tamaño durante la congelación, que podrían deteriorar la muestra.

Posteriormente, los tejidos se incluyen individualmente en moldes de congelación de una dimensión de 10x10x5mm (Tissue-Tek Sakura Finetek, USA) con el compuesto OCT (compuesto de alcoholes hidrosolubles y resina) (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Holanda), que se lleva a cabo en el interior del criostato (Leica, Madrid, España) con el que posteriormente realizamos los cortes histológicos de 25 µm de grosor a una temperatura de  $-21\pm 1^{\circ}\text{C}$ . De cada médula espinal se realizan 6-7 cortes de manera seriada los cuales se colocan en portaobjetos silanizados (Thermo Scientific, Alemania). Para cada muestra analizada, se emplean como mínimo 4 portaobjetos (6-7 cortes histológicos/portaobjeto).

#### 4.2 Inmunohistoquímica

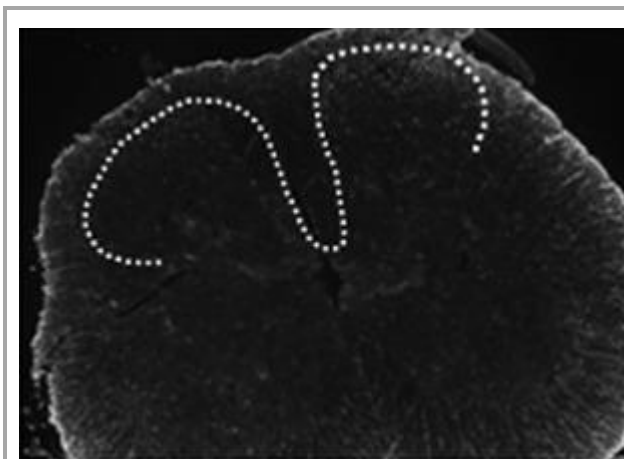
Inicialmente los portaobjetos que contienen los cortes histológicos de las muestras se dejan a temperatura ambiente durante unos 30 minutos para que se descongelen. Posteriormente, se colocan en un recipiente con PBS con el objetivo de eliminar el OCT de las muestras. Para ello, se realizan 3 lavados consecutivos con PBS+ Tritón al 0,2% (PBS-T 0,2%, Triton-X-100, Sigma) de 10 minutos cada uno, cambiando el líquido entre lavado y lavado y manteniendo el recipiente en agitación. Tras la eliminación completa del OCT, para evitar uniones inespecíficas posteriores, se procede a bloquearlas con suero de cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA) al 5% en PBS-T 0,2%; las muestras permanecen con esta

*solución de bloqueo* durante 1 hora a temperatura ambiente. Trascorrido este período, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario de conejo anti-Iba-1 (*Ionized calcium Binding Adaptator molecule 1*) o anti-GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) para la detección de la inmunoreactividad de microglía y astrocitos, respectivamente; las diluciones utilizadas fueron 1:2000 para Iba-1 (Wako Chemical, Richmond, VA) y 1:500 para GFAP (Dako Cytomation, Denmark), ambas preparadas en PBS-T 0,2%. Finalizada esta incubación, se procedió a eliminar la solución mediante tres ciclos de 10 minutos de lavado con PBS-T 0,2%. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente y en total oscuridad para evitar la pérdida de fluorescencia; en ambos casos el anticuerpo secundario fue el Cy3 (1:2000, Chemicon International, Temecula, CA) de bovino anti-conejo IgG preparado en PBS-T 0,2%. Finalmente, se procedió a montar las muestras para la posterior visualización en el microscopio. Para ello se utilizó como medio de montaje *Vectashields+Dapi* (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se cubrió con un cubreobjetos.

#### 4.3 Visualización de las muestras, captación de imágenes y cuantificación

Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas con un microscopio (Leica DMR, Madrid) provisto de un filtro para la detección de fluorescencia de Cy3 y equipado con una cámara digital (Leica DFC 300 FX, Madrid).

Las imágenes fueron captadas con el objetivo 20x en la región del asta dorsal de la médula espinal, que comprende las láminas I-III; concretamente, la zona ipsilateral a la cirugía (**figura 35**).



**Figura 35. Microfotografía de médula espinal.** El área punteada engloba la región del asta dorsal de la médula espinal que comprende las láminas I-III. (Modificada de Romero A y cols., 2013)

Para el análisis cuantitativo, para cada tiempo y grupo experimental fueron utilizadas las muestras de al menos 4 portaobjetos por cada animal, obteniendo así un valor promedio de todas las secciones tisulares analizadas. La cuantificación de Iba-1 y GFAP se realizó

#### IV. Material y métodos

determinando la intensidad de fluorescencia en un área fija de las células (ADME, lamina I-III), mediante el programa ImageJ (versión 1.44, NIH, Bethesda, MD); así, el número de células activadas para el Iba-1 o el porcentaje de área marcada para el GFAP en estas áreas específicas de interés fue evaluado.

#### 5. Experimentos

Todos los animales fueron anestesiados recibiendo la misma concentración de sevoflurano (3,5-3,0% v/v). Utilizando una N de 10-12 ratones para los estudios de comportamiento y 4-5 ratones para los estudios de inmunoreactividad glial, los animales recibieron uno de los siguientes tratamientos:

- **Grupo Control (CTL):** Los animales son anestesiados con sevoflurano (3,5-3,0 v/v) durante 30 minutos.
- **Grupo Incisión (INC):** Los animales son intervenidos quirúrgicamente (incisión plantar) bajo anestesia con sevoflurano (3,5-3,0 v/v) durante 30 minutos.
- **Grupo Incisión + Salino o fármaco de estudio (INC+SS o Fármaco de estudio):** Los animales son intervenidos quirúrgicamente (incisión plantar) bajo anestesia con sevoflurano (3,5-3,0 v/v) durante 30 minutos. Además, durante la cirugía se les administra por vía sistémica suero salino (SS) o el fármaco de estudio (nomenclatura que se muestra a continuación):
  - **INC+SS:** administración s.c de suero salino
  - **INC+DEX:** administración s.c de dexketoprofeno
  - **INC+TRM:** administración s.c de tramadol
  - **INC+DEX+TRM:** administración s.c de dexketoprofeno y tramadol
  - **INC+KET:** administración s.c de ketamina
  - **INC+GBP:** administración i.p de gabapentina (\*)
  - **INC+MINO:** administración i.p de minociclina
  - **INC+A-836339:** administración i.p de A-836339
  - **INC+MDZ:** administración s.c de midazolam

(\*) La gabapentina se administró *excepcionalmente* 30 minutos antes de la cirugía con el objetivo de mimetizar los estudios clínicos (Schmidt PC y cols., 2013)

- **Grupo sham operado + fármaco de estudio (abreviatura fármaco):** Animales *naïve* son anestesiados con sevoflurano (3,5-3,0 v/v) durante 30 minutos. Durante la anestesia reciben una administración sistémica del fármaco a analizar. Este grupo

únicamente fue empleado para los estudios de inmunoreactividad glial, puesto que se han descrito fármacos (opioides) que *per se* activan la glía (Hutchinson MR y cols., 2008). En este grupo, no se evaluó el comportamiento nociceptivo puesto que el principal objetivo fue estudiar el efecto antihiperalgésico en una situación clínica (INC). A continuación se detalla la nomenclatura de cada subgrupo según el fármaco de estudio:

- **DEX:** dexketoprofeno
- **TRM:** tramadol
- **DEX+TRM:** dexketoprofeno+tramadol
- **KET:** Ketamina
- **GBP:** Gabapentina
- **MINO:** Minociclina

Concretamente, en el presente proyecto, se llevaron a cabo los siguientes grupos de experimentos:

##### **Experimento 1:** *Efecto de la cirugía sobre los umbrales nociceptivos*

Tras el período de habituación, se evaluaron los umbrales nociceptivos mecánicos (Von Frey) de todos los animales durante 2-3 días consecutivos (basal). Posteriormente los animales fueron asignados al grupo control (CTL, N=10) o incisión (INC, N=12) determinando en todos ellos los umbrales nociceptivos mecánicos (von Frey) a las 4 horas, y a los días 1, 2, 4, 7 del postoperatorio. Los umbrales nociceptivos no fueron evaluados antes de las 4 horas para evitar posibles efectos residuales de la anestesia.

##### **Experimento 2:** *Efecto de la administración de salino y naloxona tras la completa recuperación de los umbrales nociceptivos. Evaluación de la sensibilización latente al dolor*

Tras la completa recuperación de los umbrales nociceptivos, el día 21 todos los animales (grupo CTL e INC) recibieron una dosis de naloxona (1mg/kg) por vía subcutánea (s.c) 20 minutos antes de la evaluación de los umbrales nociceptivos mecánicos. El día anterior (día 20), se había realizado, como control de la naloxona, el mismo experimento, administrando salino a todos los animales antes de la evaluación conductual.

#### IV. Material y métodos

##### **Experimento 3:** *Efecto de la cirugía sobre la inmunoreactividad glial en médula espinal*

Los animales del grupo incisión (INC) fueron eutanasiados a los 30 minutos, 4 horas y los días 1, 2 y 4 tras la cirugía (grupo INC, N= 4-5 por tiempo evaluado). También se eutanasió un grupo de animales control (grupo CTL, N=5). Sobre las médulas espinales de todos estos animales (previamente procesadas) se determinó la inmunoreactividad a Iba-1 (microglía) y a GFAP (astrocitos); concretamente a nivel del asta dorsal de la médula espinal ipsilateral a la zona de la cirugía.

##### **Experimento 4:** *Efecto la administración de salino o naloxona sobre la inmunoreactividad glial el día 21 del postoperatorio*

Los animales de los grupos control e incisión (CTL, INC; N=4-5 por grupo) recibieron salino o naloxona el día 21 del postoperatorio, 20 minutos antes de su eutanasia. Las médulas espinales fueron procesadas evaluando la inmunoreactividad a Iba-1 y GFAP en el asta dorsal de la médula espinal ipsilateral a la zona de la cirugía.

##### **Experimento 5:** *Efecto de la administración intraoperatoria de dexketoprofeno o tramadol sobre la hiperalgesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor*

Tras el período de habituación, se evaluaron los umbrales nociceptivos mecánicos (Von Frey) de todos los animales durante 2-3 días consecutivos (basal). Posteriormente los animales fueron asignados al grupo incisión+salino (INC+SS, N=10), incisión+dexketoprofeno (INC+DEX, N=12) o incisión+tramadol (INC+TRM, N=12) determinando en todos ellos los umbrales nociceptivos mecánicos a las 4 horas, y a los días 1 y 2 del postoperatorio. Los días 20 y 21 los animales de todos los grupos recibieron una inyección de salino y naloxona, respectivamente, 20 minutos antes de la evaluación del comportamiento nociceptivo.

##### **Experimento 6:** *Efecto de la administración intraoperatoria de dexketoprofeno o tramadol sobre la inmunoreactividad glial inducida por la cirugía*

Los animales del grupo incisión+salino (INC+SS), dexketoprofeno (DEX), incisión+dexketoprofeno (INC+DEX), tramadol (TRM) e incisión+ tramadol (INC+TRM) fueron eutanasiados los días 1 y 21 del postoperatorio. Concretamente, el día 21 los animales recibieron una administración de salino (21d+SS) o naloxona (21d+Nx) 20 minutos antes de la eutanasia. Como control del experimento se empleó un grupo de animales únicamente anestesiado (grupo CTL). Las médulas espinales de todos los grupos y

condiciones experimentales fueron procesadas y evaluadas con el fin de determinar la inmunoreactividad a Iba-1 (microglía) y a GFAP (astrocitos) en el asta dorsal de la médula espinal ipsilateral a la zona de la cirugía. Se empleó una N=4-5 animales para todos los grupos y tiempos.

**Experimento 7:** *Efecto de la combinación dexketoprofeno:tramadol sobre la hiperalgesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor*

Animales tratados durante la cirugía con diferentes dosis de dexketoprofeno (INC+DEX; 50, 70, 100 mg/kg) o tramadol (INC+TRM; 25, 50, 100 mg/kg) fueron evaluados el día 1 del postoperatorio con el fin de realizar una curva dosis-respuesta de ambos fármacos administrados individualmente. Estas curvas nos permitieron determinar la dosis eficaz 50 (DE<sub>50</sub>) además de establecer el efecto máximo de cada fármaco (E<sub>max</sub>). Posteriormente se realizaron los mismos experimentos (curvas dosis respuesta) para evaluar el efecto antihiperalgésico de la combinación 1:1 en base a su potencia; además se determinó el tipo de interacción entre los fármacos mediante el análisis con isobogramas (ver **7.1 cálculos y estadísticas** presente apartado).

La combinación (grupo INC+DEX+TRM) de las DE<sub>50</sub> para la antihiperalgnesia el día 1 del postoperatorio de los fármacos (dexketoprofeno, tramadol) administrados individualmente, fue valorada junto con el grupo incisión+salino (INC+SS) no solo el día 1 del postoperatorio sino también el día 20 y 21 tras la administración de salino y naloxona, respectivamente. Una N=10-12 animales fue utilizada para cada tiempo y grupo evaluado.

**Experimento 8:** *Efecto de la combinación dexketoprofeno:tramadol sobre la inmunoreactividad glial inducida por la cirugía*

Los animales del grupo incisión+salino (INC+SS), dexketoprofeno:tramadol (DEX+TRM) y incisión+dexketoprofeno+tramadol (INC+DEX+TRM) fueron eutanasiados el día 1 y 21 del postoperatorio. Concretamente, el día 21 los animales recibieron una administración de salino (21d+SS) o naloxona (21d+Nx) 20 minutos antes de la eutanasia. Las dosis utilizadas de la combinación para los grupos DEX+TRM e INC+DEX+TRM fueron la DE<sub>50</sub> para la antihiperalgnesia el día 1 de los fármacos administrados de forma individual (experimento 7). Como control del experimento un grupo de animales únicamente anestesiado (grupo CTL) fue utilizado. Las médulas espinales de todos los grupos y condiciones experimentales fueron procesadas y evaluadas con el fin de determinar la inmunoreactividad a Iba-1

#### IV. Material y métodos

(microglía) y a GFAP (astrocitos) en el asta dorsal de la médula espinal ipsilateral a la zona de la cirugía. Se empleó una N=4-5 animales para todos los grupos y tiempos.

**Experimento 9:** *Efecto de la administración intraoperatoria de ketamina o gabapentina sobre la hiperalgesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor*

Tras el período de habituación, se evaluaron los umbrales nociceptivos mecánicos (Von Frey) de todos los animales durante 2-3 días consecutivos (basal). Posteriormente los animales fueron asignados al grupo incisión+salino (INC+SS, N=10), incisión+ ketamina (INC+KET, N=12) o incisión+gabapentina (INC+GBP) determinando en todos ellos los umbrales nociceptivos mecánicos a las 4 horas y un 1 día del postoperatorio. El día 20 y 21 los animales de todos los grupos recibieron una administración de salino y naloxona, respectivamente, 20 minutos antes de la evaluación del comportamiento nociceptivo.

**Experimento 10:** *Efecto de la administración intraoperatoria de ketamina o gabapentina sobre la inmunoreactividad glial inducida por la cirugía.*

Los animales del grupo incisión+salino (INC+SS), ketamina (KET), incisión+ketamina (INC+KET), gabapentina (GBP) e incisión+ gabapentina (INC+GBP) fueron eutanasiados el día 1 y 21 del postoperatorio. Concretamente, el día 21 los animales recibieron una administración de salino (21d+SS) o naloxona (21d+Nx) 20 minutos antes de la eutanasia. Como control del experimento un grupo de animales únicamente anestesiado (grupo CTL) fue utilizado. Las médulas espinales de todos los grupos y condiciones experimentales fueron procesadas y evaluadas con el fin de determinar la inmunoreactividad a Iba-1 (microglía) y a GFAP (astrocitos) en el asta dorsal de la médula espinal ipsilateral a la zona de la cirugía. Se empleó una N=4-5 animales para todos los grupos y tiempos.

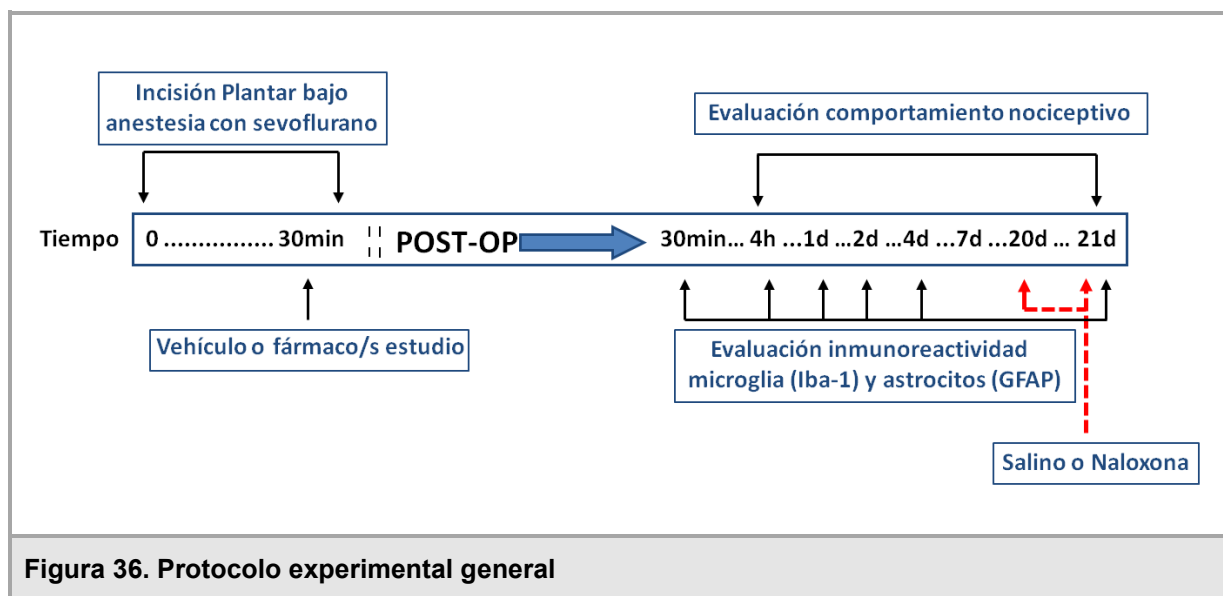
**Experimento 11:** *Efecto de la administración intraoperatoria de minociclina, A-836339 o midazolam sobre la hiperalgesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor*

Tras el período de habituación, se evaluaron los umbrales nociceptivos mecánicos (Von Frey) de todos los animales durante 2-3 días consecutivos (basal). Posteriormente los animales fueron asignados al grupo incisión+salino (INC+SS, N=10), incisión+ minociclina (INC+MINO, N=12), incisión+A-836339 (INC+A-836339) o incisión+midazolam (INC+MDZ) determinando en todos ellos los umbrales nociceptivos mecánicos a las 4 horas y un 1 día del postoperatorio. El día 20 y 21 los animales de todos los grupos recibieron una administración de salino y naloxona, respectivamente, 20 minutos antes de la evaluación del comportamiento nociceptivo.

**Experimento 12:** Efecto de la administración intraoperatoria de minociclina sobre la inmunoreactividad glial inducida por la cirugía.

Los animales del grupo incisión+salino (INC+SS), minociclina (MINO) e incisión+minociclina (INC+MINO), fueron eutanasiados el día 1 y 21 del postoperatorio. Concretamente, el día 21 los animales recibieron una administración de salino (21d+SS) o naloxona (21d+Nx) 20 minutos antes de la eutanasia. Como control del experimento un grupo de animales únicamente anestesiado (grupo CTL) fue utilizado. Las médulas espinales de todos los grupos y condiciones experimentales fueron procesadas y evaluadas con el fin de determinar la inmunoreactividad a Iba-1 (microglía) y a GFAP (astrocitos) en el asta dorsal de la médula espinal ipsilateral a la zona de la cirugía. Se empleó una N=4-5 animales para todos los grupos y tiempos.

A modo de resumen general, la **figura 36** muestra el protocolo experimental realizado:



**Figura 36. Protocolo experimental general**

## 6. Fármacos y vías de administración

Los animales de los diferentes grupos experimentales (**ver apartado 5, material y métodos**) utilizados en el presente estudio, fueron anestesiados con el anestésico sevoflurano (Sevorane<sup>®</sup>, Laboratorios Abbott S.A. Madrid, España) proporcionado por el Servicio de Anestesiología del Hospital del Mar, Barcelona. Durante la cirugía, los animales recibieron una administración de vehículo (solvente) o los diferentes fármacos de estudio detallados en la **tabla 4**:



IV. Material y métodos

<b>Fármaco</b>	<b>Solvente</b>	<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>Vía administración</b>	<b>Referencia</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>Dexketoprofeno trometamol</b>	NaCl 0,9%	50	s.c	Miranda HF y cols., 2012	Enantyum <sup>®</sup> . Laboratorios Menarini, S.A. Badalona (Barcelona), España
		70			
		100			
<b>Tramadol</b>	NaCl 0,9%	25	s.c.	Miranda HF y cols., 2012	Normon S.A, Tres Cantos (Madrid)
		50			
		100			
<b>Ketamina</b>	NaCl 0,9%	50	s.c	Minville V y cols., 2010	Ketolar <sup>®</sup> , Parke-Davis, S.L Grupo Pfizer, Alcobendas (Madrid)
<b>Gabapentina</b>	NaCl 0,9%	100	i.p	Tanabe M y cols., 2009	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
<b>Minociclina</b>	NaCl 0,9%	50	i.p	Ito N y cols., 2009	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
<b>A-836339</b>	5% DMSO/ 95% PEG-400 v/v	30	i.p	Hsieh GC y cols., 2011	Desarrollado por <i>Abbott Laboratories</i> . Sintetizado y cedido con fines de investigación por Laboratorios Esteve S.A, Barcelona
<b>Midazolam</b>	NaCl 0,9%	4	s.c	Chiba S y cols., 2009	B.Braun, Melsungen, Alemania

**Tabla 4. Fármacos evaluados en el estudio.** s.c: subcutánea; i.p: intraperitoneal.

Además de estos fármacos, también se utilizó para evidenciar la SLD (21d+Nx) el antagonista opioide naloxona (1mg/kg, sc) (B.Braun, Melsungen, Alemania) disuelto en NaCl 0,9%.

## 7. Cálculos y análisis estadístico

### 7.1 Estudios de comportamiento

#### ***Estudios de una única administración***

Para cada tiempo y grupo experimental evaluado los resultados se expresaron como la media de las respuestas nociceptivas en gramos (von Frey) así como el porcentaje de cambio respecto a su valor basal (**ecuación (1)**)  $\pm$  error estándar medio (E.E.M). Los valores negativos de porcentaje de cambio indicaron efectos pronociceptivos. Además, para los grupos tratados con los fármacos de estudio (INC+Fármaco), también se mostró el porcentaje de efecto antihiperalgésico del fármaco respecto a los grupos tratados con salino (INC+SS) (**ecuación (2)**)  $\pm$  E.E.M.

$$\% \text{ Cambio} = \left[ \frac{\text{Umbral nociceptivo animal } X \cdot 100}{\text{Basal animal } X} \right] - 100$$

**Ecuación 1. Cálculo porcentaje de cambio respecto al valor basal**

$$\% \text{ Efecto antihiperalgésico} = \left[ \left( \frac{\% \text{ Cambio animal } X \times 100}{\text{Valor medio } \% \text{ Cambio grupo INC + SS}} \right) - 100 \right] \times (-1)$$

**Ecuación 2. Cálculo del efecto antihiperalgésico de los fármacos**

Para analizar los cambios en los diferentes tiempos evaluados y grupos de tratamiento, se realizó, para cada caso, una ANOVA de dos vías de medidas repetidas (tiempo y tratamiento), seguida por el *post-hoc* Tukey. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa *GraphPad Prism* (versión 4.03) y un p valor < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

#### IV. Material y métodos

##### **Combinación de fármacos. Análisis mediante el uso de isobogramas**

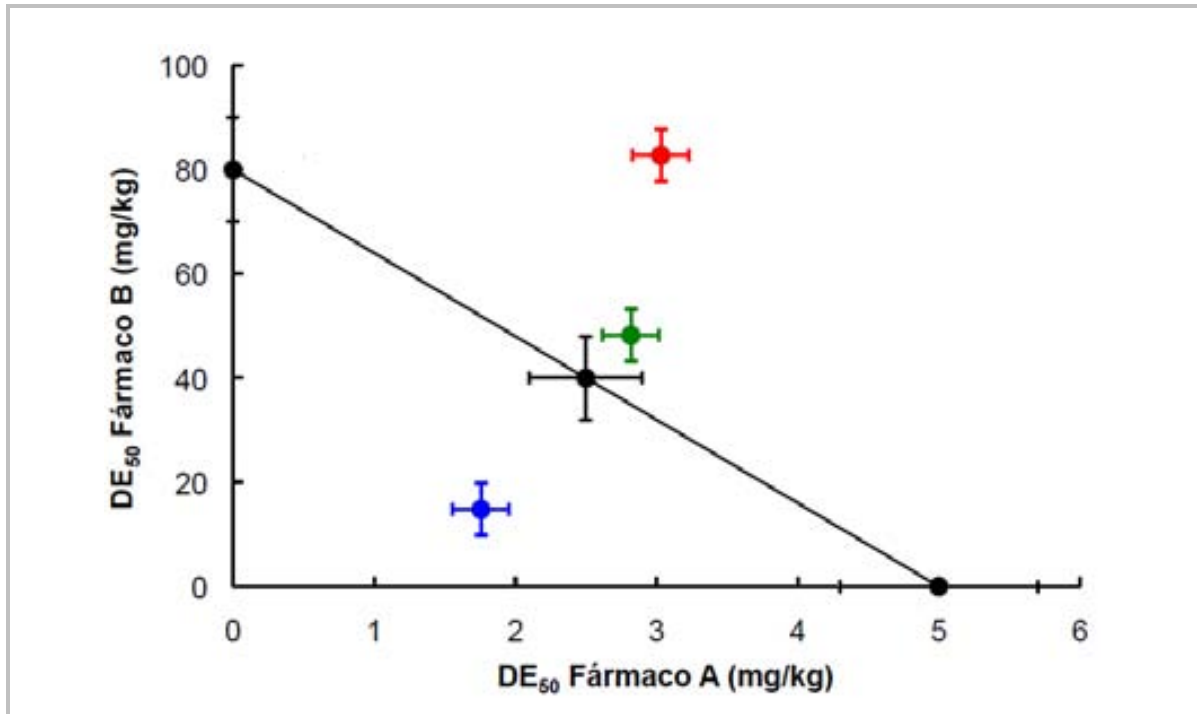
Para la combinación de fármacos, inicialmente se realizaron las curvas dosis respuesta de cada fármaco individualmente (tramadol, dexketoprofeno). El análisis de la regresión lineal por mínimos cuadrados permitió la determinación de las dosis eficaces (DE) como medida de potencia antihiperalgésica, en base al método Tallarida RJ (2000). En el presente estudio, la  $DE_{50}$  corresponde a la dosis del fármaco que produce el 50% del efecto máximo antihiperalgésico el día 1 del postoperatorio. De forma similar, la  $DE_{20}$  y la  $DE_{80}$  corresponden a las dosis que producen el 20 y 80%, respectivamente. El término  $E_{max}$  lo usamos para designar el efecto inhibitorio máximo observado tras la administración de los fármacos individualmente y combinados; este valor fue calculado en base a los puntos experimentales que forman el segmento lineal de las curvas.

Posteriormente se realizó la curva dosis respuesta de la combinación dexketoprofeno y tramadol (DEX+TRM). Las dosis utilizadas fueron fracciones de sus respectivos valores de  $DE_{50}$ :  $1 DE_{50} + 1 DE_{50}$ ,  $\frac{1}{2} DE_{50} + \frac{1}{2} DE_{50}$  y  $\frac{1}{4} DE_{50} + \frac{1}{4} DE_{50}$ .

Para generar las curvas dosis respuesta, utilizamos 3 dosis de cada fármaco o combinación, con una N de 10-12 ratones por dosis.

El análisis mediante isobogramas fue empleado para establecer el tipo de interacción que se establecía entre los fármacos A y B (en nuestro caso dexketoprofeno y tramadol).

Los *isobogramas* son representaciones gráficas del efecto de dos fármacos administrados individualmente y combinados, para un determinado nivel de efecto ( $DE_{20}$ ,  $DE_{50}$ ,  $DE_{80}$ ). En ellos se representa la DE (del nivel que corresponda) del fármaco A en el eje de ordenadas (Y) y la del fármaco B en el de abscisas (X). En la **figura 37**, se muestra un ejemplo al nivel de efecto del 50% ( $DE_{50}$ ). Como vemos, la  $DE_{50}$  del fármaco A administrado individualmente está representada en el eje de ordenadas y la del B en el eje de abscisas. Entre estas DEs de los fármacos administrados individualmente se representa una línea de unión la cual se denomina línea de *aditividad* o *sumación*. El punto representado sobre esta línea corresponde a la  $DE_{50}$  teórica ( $Z_{add}$ ) de la combinación de los fármacos A y B sino existe interacción entre ellos, es decir, el efecto es aditivo, se suman los efectos. Así, si la  $DE_{50}$  experimental ( $Z_{mix}$ ) de la combinación es mayor o menor a la teórica, indicará antagonismo o sinergia, respectivamente; por el contrario sino es diferente a la teórica indicará aditividad.



**Figura 37. Ejemplo de los diferentes efectos posibles tras la combinación de 2 fármacos. Isoblograma.** Las dosis eficaces al nivel de efecto del 50% ( $DE_{50}$ ) de los fármacos A y B administrados de forma individual se muestran en los ejes X e Y, respectivamente. Además se muestra la  $DE_{50}$  teórica de esta combinación (efecto aditivo, no interacción; negro) y un ejemplo de aditividad (verde), sinergia (azul) y antagonismo (rojo).

A continuación se muestra, de manera teórica, los cálculos que se realizaron para la determinación del tipo de interacción:

Un parámetro indica el tipo de interacción entre los fármacos es el **índice de interacción (II)**:

$$\frac{da}{dA} + \frac{db}{dB} = 1$$

**Ecuación 3. Índice de interacción (II)**

Donde,

**da, db:** dosis de los fármacos A y B en la combinación para un determinado nivel de efecto.

**dA, dB:** dosis de los fármacos A y B administrados individualmente para un determinado nivel de efecto.

El resultado de esta **ecuación (3)**, nos indicará el tipo de interacción entre los fármacos. Así,

#### IV. Material y métodos

**II = 1 Aditividad**  
**II < 1 Sinergia**  
**II > 1 Antagonismo**

El I.I ya nos indica el tipo de interacción; a pesar de ello para la determinación de la *significancia estadística*, posteriormente se realiza un test basado en la distribución de *t* de *Student*. Para ello, utilizaremos la  $Z_{add}$  (DE<sub>50</sub> teórica), calculada mediante la **ecuación (4)**, la cual compararemos con la  $Z_{mix}$  (DE<sub>50</sub> experimental).

$$Z_{add} = ED_{50 \text{ FÁRMACO A}} * f + ED_{50 \text{ FÁRMACO B}} * (1-f) \quad \text{Ecuación 4. Cálculo } Z_{add} \text{ (DE teórica)}$$

donde,

*f* corresponde a la proporción que en el caso de una combinación 1:1 es 0,5.

**Existirán diferencias significativas** entre el valor experimental (**ecuación 5**) y el teórico (**ecuación 6**) si se cumple:

$$|t'| > T$$

Donde,

*t'* corresponde a la observada o experimental

T corresponde a la teórica.

Ambos valores se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

$$t' = \frac{(x - y)}{[(SE_x)^2 + (SE_y)^2]^{1/2}} \quad \text{Ecuación 5. Cálculo } t' \text{ experimental}$$

donde,

X corresponde al log (Zadd)

Y corresponde al log (Zmix)

SE corresponde al error estándar (*Standard error*)

$$T = \frac{[t_{add} \cdot (SE_X)^2 + t_{mix} \cdot (SE_Y)^2]}{[(SE_X)^2 + (SE_Y)^2]}$$

**Ecuación 6. Cálculo T teórica**

donde,

$t_{add} = N-2$ ; N corresponde a la suma de todas las dosis que se han dado de cada fármaco;  
 $N = n^{\circ}$  dosis fármaco A +  $n^{\circ}$  dosis fármaco B

$t_{mix} = N-2$ ; N es el número de dosis que se han dado de la combinación

Con los números resultantes de la  $t_{add}$  y la  $t_{mix}$ , se buscará la correspondencia en las tablas de distribución de la  $t$  (95%); los valores correspondientes serán los utilizados en la ecuación 6.

**SE** corresponde al error estándar

En nuestro estudio, todos estos análisis se llevaron a cabo con los programas *Pharm Tools Pro* (versión 1.1.27), basado en Tallarida (2000) y *GraphPad Prism* (versión 4.03).

## 7.2 Inmunohistoquímica

Para cada grupo experimental y tiempo evaluado se mostró el número medio de células inmunoreactivas Iba-1 y el porcentaje medio de área marcada para GFAP ( $\pm$  E.E.M). Para el análisis estadístico se realizó una ANOVA de dos vías (tiempo y tratamiento) seguida del post-hoc Tukey. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa *GraphPad Prism* (versión 4.03) y un p valor de 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

El porcentaje de incremento de la inmunoreactividad glial respecto a los animales control (grupo CTL) y el porcentaje de efecto de los fármacos sobre la inmunoreactividad inducida por la cirugía (grupo INC+SS) fueron calculadas según las **ecuaciones (7) y (8)**, respectivamente.

#### IV. Material y métodos

$\% \text{ incremento inmunoreactividad} = \left( \frac{b \cdot 100}{a} \right) - 100$	<b>Ecuación 7. Porcentaje de incremento de inmunoreactividad glial respecto al valor control</b>
--	--

$\% \text{ Efecto sobre inmunoreactividad glial} = 100 - \left( \frac{(b - a) \cdot 100}{c - a} \right)$	<b>Ecuación 8. Porcentaje de efecto del tratamiento sobre la inmunoreactividad glial inducida por la cirugía (INC+SS).</b>
--	--

Donde,

**a:** valor medio de células Iba-1 positivas (microglía) o % área de astrocitos marcada en el grupo control

**b:** número de células Iba-1 positivas (microglía) o % área de astrocitos marcada del animal de estudio

**c:** valor medio de células Iba-1 positivas (microglía) o % área de astrocitos marcada en el grupo no tratado con el fármaco de estudio (grupo INC+SS)

## V. RESULTADOS

Los resultados del estudio se exponen de acuerdo a los grupos de experimentos enumerados en el apartado de Métodos. En primer lugar presentaremos el efecto de la cirugía realizada bajo anestesia con sevoflurano sobre los umbrales nociceptivos y la activación glial en la médula espinal (microglía y astrocitos) en el ratón (**apartado 1**). Expondremos después los efectos de una única administración intraoperatoria de dexketoprofeno (AINE), tramadol (opioide menor) y de su combinación 1:1 sobre la prevención de la hiperalgesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor; mostraremos también el efecto de estos fármacos solos o asociados sobre la activación glial (**apartado 2**). El mismo protocolo de estudio se ha utilizado para investigar el efecto de la ketamina y la gabapentina, dos fármacos que han demostrado ser útiles en la prevención del DCPQ en el hombre (**apartado 3**). A continuación mostraremos los efectos de la minociclina (inhibidor de la activación de la glía), el A836339 (agonista cannabinoide CB2) y el midazolam (benzodiazepina), fármacos que por su mecanismo podrían prevenir la hiperalgesia postquirúrgica y/o el desarrollo de SLD (**apartado 4**). En último lugar, presentaremos una valoración comparativa global de los fármacos evaluados en el estudio, que nos permita seleccionar los tratamientos farmacológicos más efectivos en la prevención de la HPO y la SLD, y su correlación con la inhibición de la activación glial (**apartado 5**).

### 1. EFECTO DE LA CIRUGÍA SOBRE LOS UMBRALES NOCICEPTIVOS Y LA ACTIVACIÓN GLIAL

Con el fin de determinar la intensidad y la duración de la hiperalgesia inducida por la incisión plantar (HPO), se determinaron los umbrales nociceptivos frente a la estimulación mecánica, (filamentos Von Frey) a las 4 horas después de la cirugía y a los 1, 2, 4 y 7 días del postoperatorio; para poner en evidencia los cambios latentes (SLD) producidos por la lesión quirúrgica se evaluaron de nuevo los umbrales nociceptivos 21 días después de la incisión, tras la administración de naloxona (Nx). En los mismos tiempos de evaluación (y además a los 30 minutos postincisión) se investigó la activación glial basándonos en los cambios fenotípicos de las células de glía en médula espinal (microglía y astrocitos) utilizando técnicas de inmunohistoquímica.

#### 1.1 Hiperalgesia postoperatoria (HPO) y sensibilización latente al dolor (SLD)

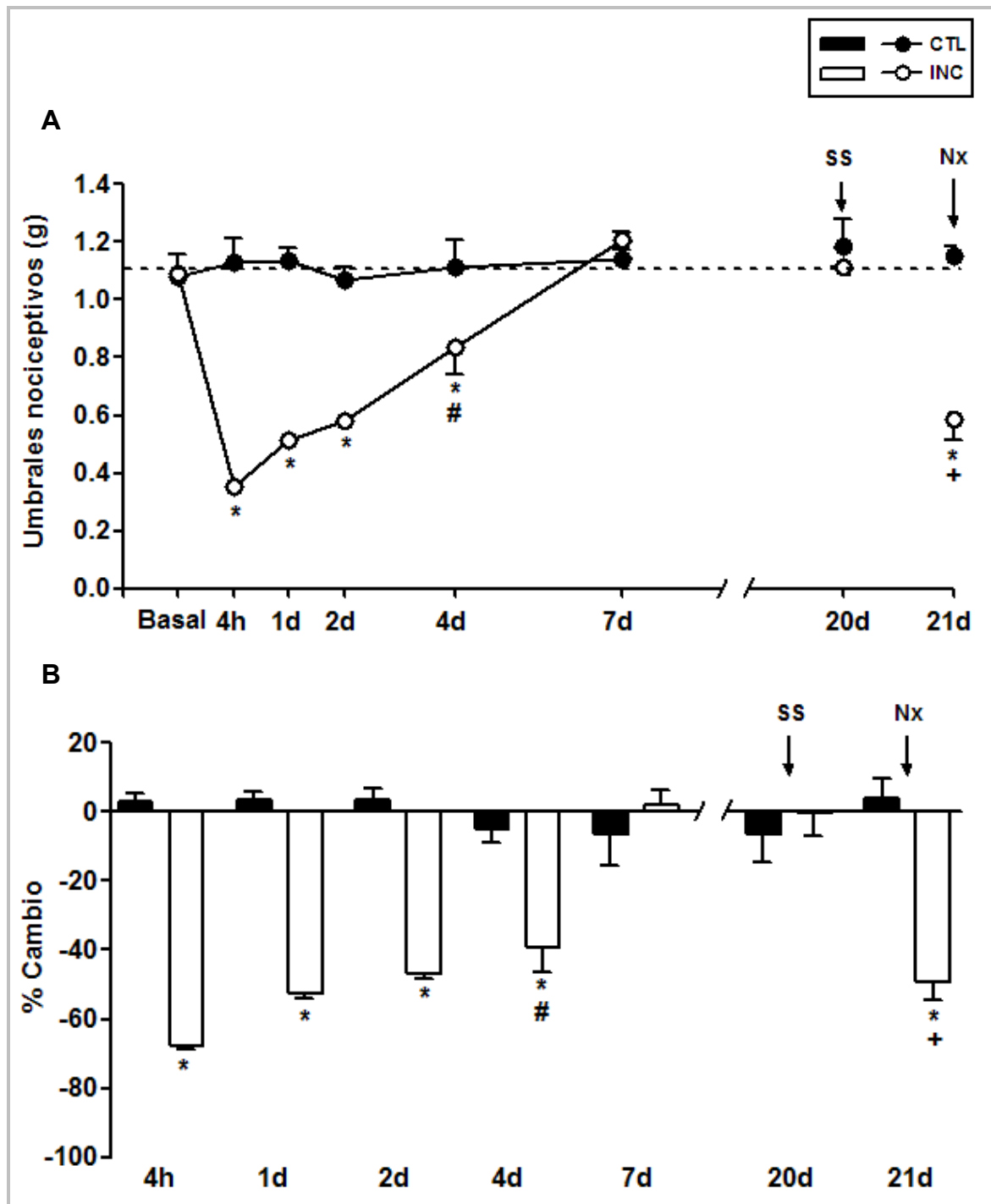
Inicialmente, evaluamos los umbrales nociceptivos mecánicos en animales sometidos a cirugía (INC) bajo anestesia con sevoflurano comparando los resultados con animales *sham* operados, que únicamente recibieron anestesia, pero sin realizar la cirugía (CTL). La **figura 38A** y la **tabla 5** muestran, que los animales de ambos grupos (CTL y INC) presentaron valores basales (B) similares previos a la manipulación ( $1,07 \pm 0,07g$  y  $1,08 \pm 0,01g$ ,



## V. Resultados

respectivamente). Durante el período inicial evaluado comprendido entre las 4h y los 7 días, los valores basales en el grupo CTL se mantuvieron inalterados, oscilando en el rango de  $1,06 \pm 0,04g$  a  $1,13 \pm 0,09g$ . La cirugía (grupo INC) provocó una disminución significativa ( $p < 0,001$  respecto basal) de los umbrales nociceptivos desde las 4 horas ( $0,35 \pm 0,01g$ ) hasta los 4 días ( $0,83 \pm 0,09g$ ) del postoperatorio. La hiperalgesia observada a los 4 días fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que a las 4 h y 1d, mostrando su evolución / desaparición en el tiempo. Sobre la base de estos resultados, en experimentos posteriores se optó por evaluar la HPO el día 1 del postoperatorio. El día 7 tras la cirugía, la herida quirúrgica había cicatrizado y los animales habían recuperado totalmente los umbrales nociceptivos, mostrando valores similares a los basales ( $1,20 \pm 0,03g$ ). La SLD se puso de manifiesto en animales que recibieron naloxona ( $1 \text{ mg/kg}$ , sc) 21 días después de la intervención quirúrgica. El día 20 ambos grupos recibieron salino que no provocó respuesta alguna, mientras que la administración de naloxona al día siguiente (21d) indujo una HPO de una magnitud similar a la observada en el postoperatorio inmediato. Así, la administración de salino el día 20 del postoperatorio no indujo ningún cambio de los umbrales nociceptivos ni en el grupo CTL ni en el grupo INC ( $1,18 \pm 0,09g$  y  $1,11 \pm 0,01g$ , respectivamente) siendo estos valores similares a los basales. Sin embargo, la administración de Nx el día 21, provocó una disminución significativa de los umbrales nociceptivos en el grupo INC ( $0,58 \pm 0,07g$ ;  $p < 0,001$  respecto al basal), mientras que el grado de hiperalgesia se mantuvo inalterado en el grupo CTL ( $1,15 \pm 0,03g$ ). Cabe destacar que la disminución de los umbrales nociceptivos inducida tras la administración de Nx en el grupo INC es similar a la que experimentan los animales los días 1, 2 y 4 del postoperatorio, siendo significativamente menor ( $p < 0,05$ ) a la que experimentan 4 horas tras la cirugía.

La magnitud de la respuesta pronociceptiva se muestra en la **figura 38B**, donde se presentan los porcentajes de cambio respecto a los valores basales (los valores negativos indican hiperalgesia). En el grupo CTL no hay alteraciones significativas entre las 4h y los 7d y los porcentajes de cambio permanecen en el rango de  $3,35 \pm 2,54 \%$  a  $-6,45 \pm 9,08\%$ . En el grupo INC la hiperalgesia que muestran los animales desde las 4 horas hasta los 4 días tiene una magnitud de  $-67,66 \pm 0,92\%$  y  $-39,31 \pm 6,92\%$ , respectivamente; desapareciendo a los 7 días ( $2,26 \pm 4,33\%$ ). En la evaluación del período tardío (20 y, 21 días), vemos que la administración de SS no produce alteración en ninguno de los grupos, siendo la magnitud de cambio de  $-6,46 \pm 8,00\%$  y  $-0,13 \pm 7,03\%$ , para los grupos CTL e INC, respectivamente; sin embargo la administración de Nx induce hiperalgesia de  $-49,13 \pm 5,39\%$  en el grupo INC, manteniendo prácticamente nulo el cambio en el grupo CTL ( $4,10 \pm 5,79\%$ ).



**Figura 38. Hiperalgnesia postoperatoria en animales sometidos a una incisión plantar (INC) y en animales control (CTL). Efecto de la naloxona. (A)** Umbral nociceptivos (g)  $\pm$  E.E.M basales (B) y a las 4 horas, 1, 2, 4, 7 días. Los días 20 y 21 se les administró salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la evaluación. Línea discontinua indica los valores basales. **(B)** Porcentaje de cambio (%) respecto a los valores basales  $\pm$  E.E.M en los mismos grupos; valores negativos indican pronocicepción. \* $p < 0,001$  vs B; # $p < 0,05$  vs 4h,1d INC; +  $p < 0,05$  vs 4h INC

En la **tabla 5**, se muestran los valores numéricos de hiperalgnesia mecánica obtenidos entre las primeras 4h - 4d del postoperatorio, que desaparece por completo el día 7; la

## V. Resultados

administración de naloxona el día 21, induce de nuevo un grado de hiperalgesia similar a la del postoperatorio temprano. Los umbrales nociceptivos permanecen inalterados en el grupo CTL. Así, en el periodo postoperatorio del grupo INC, la tabla muestra dos periodos claramente diferenciados, el primero (4h-7d) corresponde al postoperatorio temprano o inmediato, donde aparece la que en el presente trabajo denominaremos *hiperalgesia postoperatoria (HPO)*; el segundo corresponde al postoperatorio tardío (20,21 días) el cual denominaremos, siguiendo la nomenclatura de estudios previos del laboratorio, periodo de *sensibilidad latente al dolor (SLD)*.

Tiempo	CONTROL		INCISIÓN	
	Umbrales nociceptivos (g)	% Cambio	Umbrales nociceptivos (g)	% Cambio
<b>Basal</b>	1,07 ± 0,07	-	1,08 ± 0,01	-
<b>4h</b>	1,12 ± 0,08	3,01 ± 2,17	0,35 ± 0,01 <sup>*</sup>	-67,03 ± 0,92 <sup>*</sup>
<b>1d</b>	1,13 ± 0,04	3,35 ± 2,54	0,51 ± 0,01 <sup>*</sup>	-52,53 ± 1,62 <sup>*</sup>
<b>2d</b>	1,06 ± 0,04	3,27 ± 3,34	0,58 ± 0,02 <sup>*</sup>	-46,71 ± 1,83 <sup>*</sup>
<b>4d</b>	1,11 ± 0,09	-4,96 ± 3,83	0,83 ± 0,09 <sup>*#</sup>	-39,31 ± 6,92 <sup>*#</sup>
<b>7d</b>	1,13 ± 0,09	-6,45 ± 9,08	1,20 ± 0,03	2,26 ± 4,33
<b>20d+SS</b>	1,18 ± 0,09	-6,46 ± 8,00	1,11 ± 0,01	-0,13 ± 7,03
<b>21d+Nx</b>	1,15 ± 0,03	4,10 ± 5,79	0,58 ± 0,07 <sup>*+</sup>	-49,13 ± 5,39 <sup>*+</sup>

**Tabla 5. Hiperalgesia postoperatoria en animales sometidos a cirugía bajo anestesia con sevoflurano (INCISIÓN) y animales control (CTL).** Se muestran los valores medios de umbrales nociceptivos (g) y porcentaje (%) de cambio respecto a los niveles basales ± E.E.M, para los animales control e Incisión.

\*p<0,001 vs B; # p<0,05 vs 4h, 1d INC; + p<0,05 vs 4h INC

### 1.2 Activación de la glía espinal inducido por la lesión quirúrgica

En las mismas condiciones experimentales (grupos CTL e INC) hemos determinado el grado de activación (descrito en términos de incremento de inmunoreactividad) de las células de microglía y astrocitos.

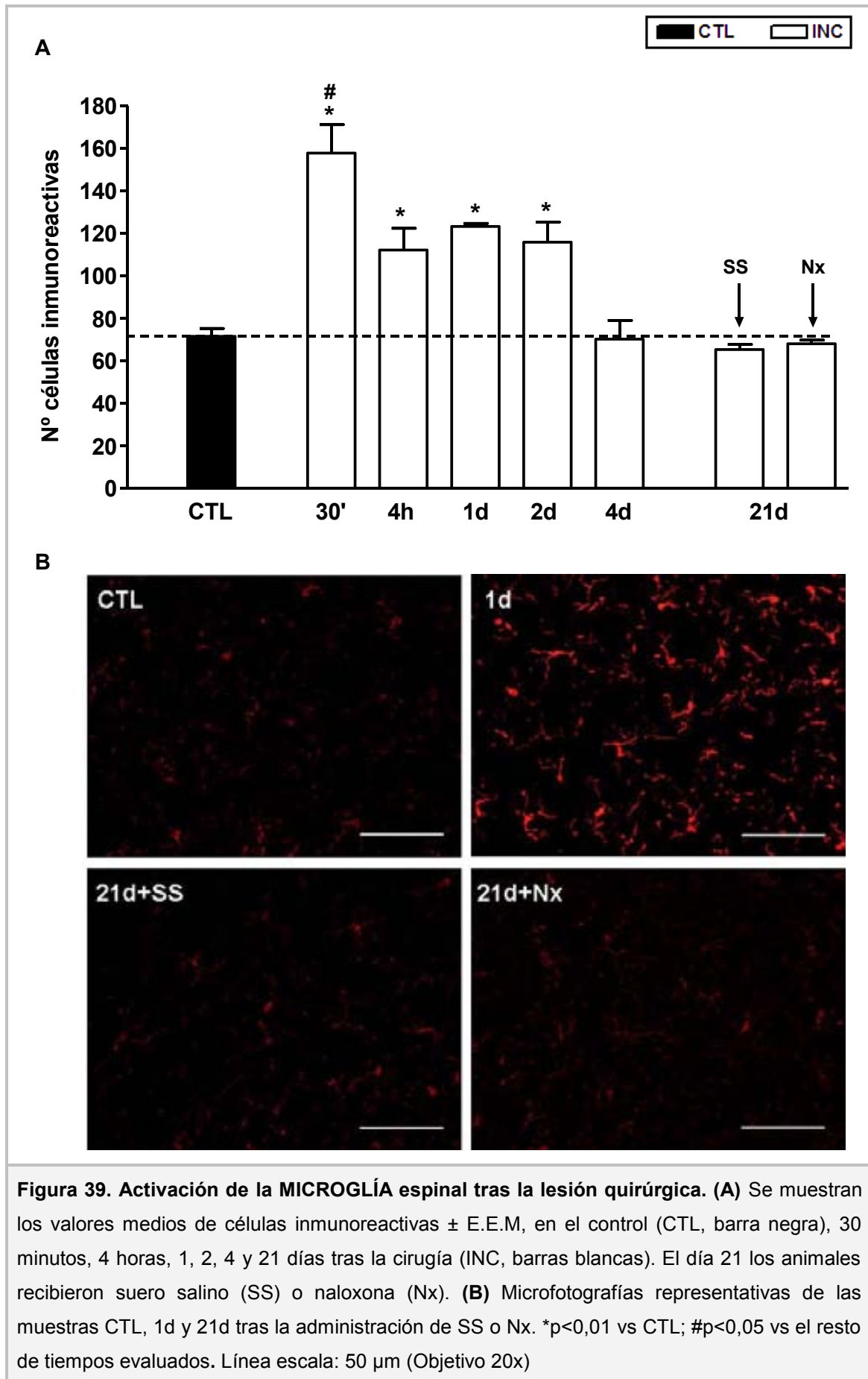
Para las células de *microglía*, se determinó primero el número de células inmunoreactivas en animales CTL siendo el valor medio de 71,60 ± 3,73 (**tabla 6 y figura 39**). La cirugía

(INC) provocó un aumento significativo ( $p < 0,001$  respecto al CTL) del número de células inmunoreactivas a los 30 minutos ( $157,80 \pm 13,45$ ), 4 horas ( $112,22 \pm 10,27$ ), 1 ( $123,37 \pm 1,38$ ) y 2 ( $115,90 \pm 9,46$ ) días del postoperatorio, retornando a los valores basales el día 4 ( $70,30 \pm 8,82$ ). Así, la incisión plantar produce un incremento de inmunoreactividad que alcanza el  $120,39 \pm 18,79\%$  a los 30 minutos, y posteriormente se mantiene en un  $56,73 \pm 14,34\%$ ,  $72,31 \pm 1,93\%$  y  $61,87 \pm 13,21\%$ , a las 4 horas, 1 y 2 días tras la intervención quirúrgica, respectivamente. Como se puede observar en la **figura 39A**, el número de células inmunoreactivas es significativamente superior ( $p < 0,05$ ) 30 minutos tras la intervención respecto a la magnitud de la activación observada 4 hora, 1 y 2 días del postoperatorio. Puesto que en el presente estudio el objetivo es establecer un paralelismo entre la hiperalgesia postoperatoria y la activación glial, en experimentos posteriores el análisis de la activación glial se ha llevado a cabo el día 1 tras la incisión plantar, ya que, no existen diferencias relevantes entre las 4 horas y el día 2; los tiempos 30 minutos (punto máximo de inmunoreactividad) y 4h no fueron utilizados debido a la imposibilidad de evaluar de forma precisa el comportamiento nociceptivo después de la anestesia.

Con el objetivo de evaluar la posible participación de la microglía en la SLD, se evaluó el número de células inmunoreactivas el día 21 tras la administración de SS o Nx. La administración de SS no alteró el número de células inmunoreactivas ( $65,41 \pm 2,38$ ) así como tampoco lo hizo la administración de Nx ( $68,07 \pm 1,81$ ), mostrando en ambos casos valores similares al grupo CTL (**figura 39A**).

En la **figura 39B** se muestran microfotografías representativas de los tiempos más relevantes para el estudio. Observamos cambios morfológicos caracterizados por hipertrofia de las células de microglía, que pasan de un estado en reposo (CTL) y 21d+SS a un estado activo o reactivo 1d después de la cirugía.

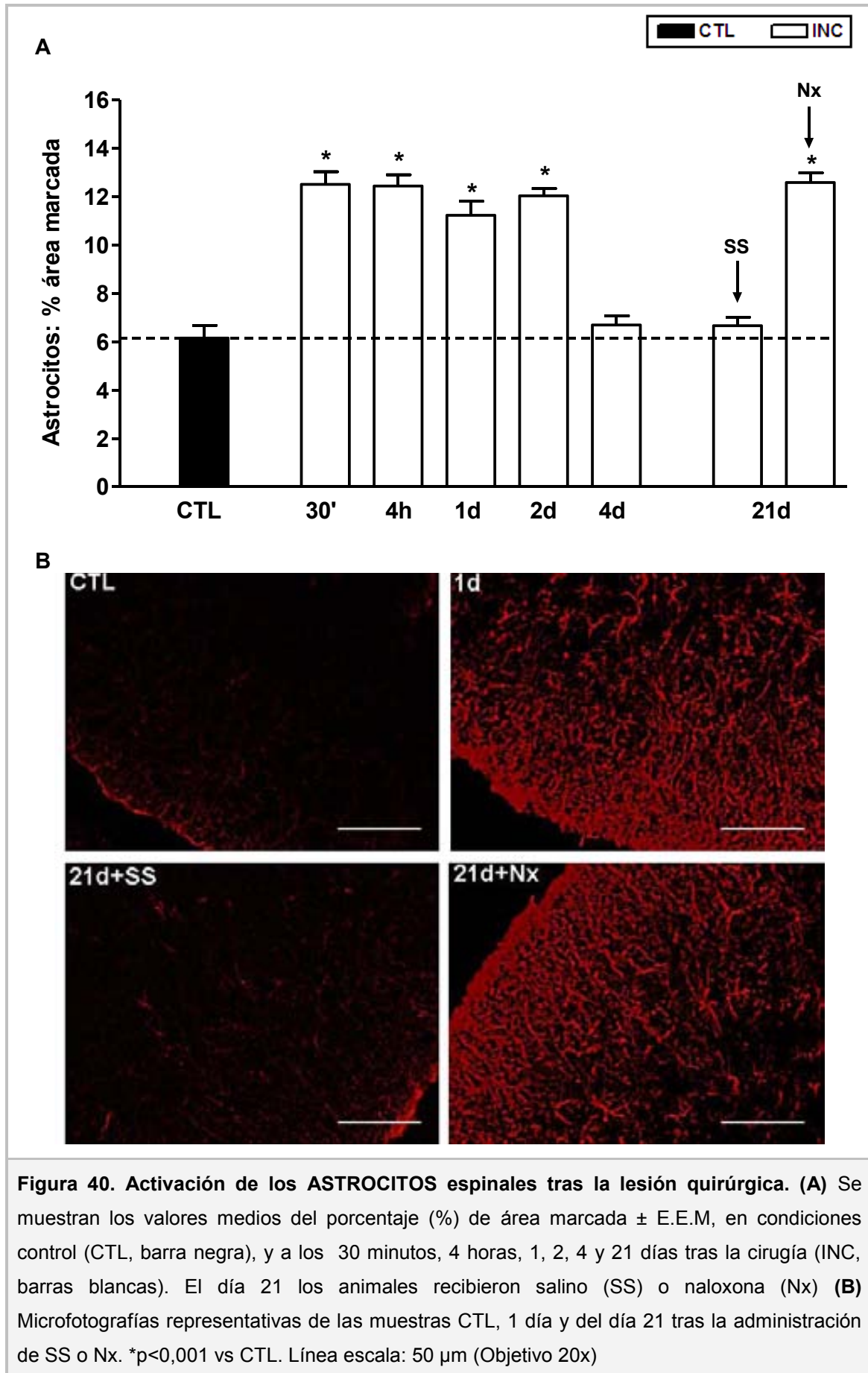
Los resultados muestran que existe un paralelismo entre la HPO y la activación de la microglía durante el periodo postoperatorio temprano, aunque la duración de la hiperalgesia (4 días) es superior a la duración de la activación de la microglía (2 días; inmunoreactividad). Sin embargo, la administración de naloxona induce hiperalgesia pero no reactivación glial, sugiriendo que la microglía no participa en los fenómenos de SLD en nuestro modelo.



Para los *astrocitos*, el porcentaje de área marcada (inmunoreactividad) en los animales CTL fue  $6,15 \pm 0,51\%$ . La cirugía (INC), provocó un incremento significativo ( $p < 0,001$  frente al CTL) del porcentaje de área marcada a los 30 minutos ( $12,51 \pm 0,51\%$ ), 4 horas ( $12,43 \pm 0,47\%$ ) y los días 1 ( $11,22 \pm 0,58\%$ ) y 2 ( $12,04 \pm 0,29\%$ ) del postoperatorio, volviendo a los valores control el día 4 ( $6,68 \pm 0,37\%$ ) (**figura 40 y tabla 6**). Observamos un incremento en la inmunoreactividad superior al 100 % en los tiempos 30 minutos y 4 horas ( $103,34 \pm 8,44\%$  y  $102,18 \pm 7,65$ , respectivamente), que fue ligeramente inferior los días 1 y 2 ( $82,52 \pm 9,50\%$  y  $95,72 \pm 4,84\%$ , respectivamente). Por tanto, la duración de la activación de los *astrocitos* fue similar a la de la *microglía* (2 días), aunque para este tipo celular, los incrementos en inmunoreactividad observados en los distintos tiempos de evaluación fueron similares (**figura 40A**).

La administración de SS el día 21 (21d+SS) no produjo ninguna alteración en la activación de los *astrocitos* ( $6,66 \pm 0,34\%$ ) manteniéndose valores similares al grupo control; sin embargo, la administración de naloxona produjo una *reactivación* de los *astrocitos*, demostrada por un incremento en el % del área marcada, que alcanzó valores similares a los del postoperatorio temprano ( $12,58 \pm 0,39\%$ ,  $p < 0,001$  frente al control), alcanzando nuevamente un porcentaje de incremento de inmunoreactividad de aproximadamente el 100% ( $104,58 \pm 6,47\%$ ) (**figura 40A**).

En la **figura 40B** se muestran microfotografías representativas de los cambios morfológicos inducidos por la incisión en los *astrocitos*, mostrando dichas células en estado de reposo (CTL, 21d+SS) y en estado activo o reactivo (células inmunoreactivas) (1d, y 21+Nx).



A manera de resumen, la **tabla 6** muestra la activación glial (microglía y astrocitos) tras la cirugía. Podemos observar activación de ambos tipos celulares durante los primeros 2 días del postoperatorio, coincidiendo con el periodo de HPO, aunque en ambos casos, la duración de la inmunoreactividad es inferior (2 días) a la de la hiperalgesia mecánica (4 días). Estos resultados sugieren por tanto, la participación tanto de la microglía como de los astrocitos en la HPO. Sin embargo, la magnitud del efecto (% incremento de la inmunoreactividad, **tabla 6**), podría considerarse superior en los astrocitos, a excepción del tiempo 30 min, donde la activación de la microglía aumenta un 120% respecto al CTL.

A los 21 días del postoperatorio, la naloxona no provocó cambios en la microglía, mientras que se observó una reactivación de los astrocitos con un porcentaje de incremento de inmunoreactividad similar al del período postoperatorio inmediato (1d). Los resultados sugieren que los astrocitos, pero no la microglía podrían participar en la SLD en nuestro modelo.

Tiempo	MICROGLÍA		ASTROCITOS	
	Nº células inmunoreactivas	% Incremento inmunoreactividad	% Área marcada	% Incremento inmunoreactividad
<b>Control</b>	71,60 ± 3,73	-	6,15 ± 0,51	-
<b>30'</b>	157,80 ± 13,45 <sup>*#</sup>	120,39 ± 18,79 <sup>*#</sup>	12,51 ± 0,51 <sup>*</sup>	103,34 ± 8,44 <sup>*</sup>
<b>4h</b>	112,22 ± 10,27 <sup>*</sup>	56,73 ± 14,34 <sup>*</sup>	12,43 ± 0,47 <sup>*</sup>	102,18 ± 7,65 <sup>*</sup>
<b>1d</b>	123,37 ± 1,38 <sup>*</sup>	72,31 ± 1,93 <sup>*</sup>	11,22 ± 0,58 <sup>*</sup>	82,52 ± 9,50 <sup>*</sup>
<b>2d</b>	115,90 ± 9,46 <sup>*</sup>	61,87 ± 13,21 <sup>*</sup>	12,04 ± 0,29 <sup>*</sup>	95,72 ± 4,84 <sup>*</sup>
<b>4d</b>	70,30 ± 8,82	-3,75 ± 14,34	6,68 ± 0,37	8,73 ± 6,13
<b>21d+SS</b>	65,41 ± 2,38	-8,63 ± 3,33	6,66 ± 0,34	8,33 ± 5,63
<b>21d+Nx</b>	68,07 ± 1,81	-4,92 ± 2,53	12,58 ± 0,39 <sup>*</sup>	104,58 ± 6,47 <sup>*</sup>

**Tabla 6. Activación de la glía espinal inducida por la incisión quirúrgica.** Se muestran el número de células inmunoreactivas y el porcentaje (%) de área marcada ± E.E.M para la microglía y los astrocitos, respectivamente. Presentamos también el porcentaje (%) de incremento de activación (inmunoreactividad) respecto al control (CTL) para cada tipo de célula y tiempo de evaluación (30 minutos, 4 horas, 1, 2, 4 y 21 días tras la cirugía). El día 21, los animales recibieron salino (21d+SS) o naloxona (21d+Nx) antes de la eutanasia.

\*p<0,001 vs CTL; # p<0,05 vs el resto de tiempos evaluados



## **2. PREVENCIÓN DE LA HIPERALGESIA POSTOPERATORIA Y LA SENSIBILIZACIÓN LATENTE AL DOLOR MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE DEXKETOPROFENO Y TRAMADOL INDIVIDUALMENTE O COMBINADOS. EFECTOS SOBRE LA ACTIVACIÓN GLIAL.**

El dexketoprofeno y el tramadol, son dos fármacos analgésicos de uso común en el tratamiento del dolor agudo postoperatorio en el hombre. En el presente apartado, mostramos los resultados de la evaluación de la hiperalgesia mecánica (HPO y SLD) en ratones sometidos a cirugía y que han recibido *una única dosis* de cada uno de los fármacos, individualmente o combinados en una proporción 1:1 en base a su potencia. Nuestro objetivo ha sido doble: por una parte investigar el tipo de interacción entre los fármacos con el fin de establecer los posibles beneficios de la asociación sobre la hiperalgesia inducida por la cirugía (HPO y SLD); además hemos evaluado la implicación de la activación de la glía espinal (microglía y astrocitos) en el efecto anti-hiperalgésico de los tratamientos utilizados.

Los tratamientos fueron administrados por vía subcutánea antes de finalizar la cirugía. El comportamiento nociceptivo se evaluó a las 4 horas, y a los días 1 y 2 del postoperatorio para establecer el efecto de los tratamientos sobre la HPO. El efecto sobre la prevención de la SLD, se evaluó los días 20 y 21 del postoperatorio, tras la administración de SS o Nx (ver Métodos).

Presentamos a continuación el efecto de cada uno de los fármacos individualmente y asociados, sobre el comportamiento nociceptivo y la activación glial.

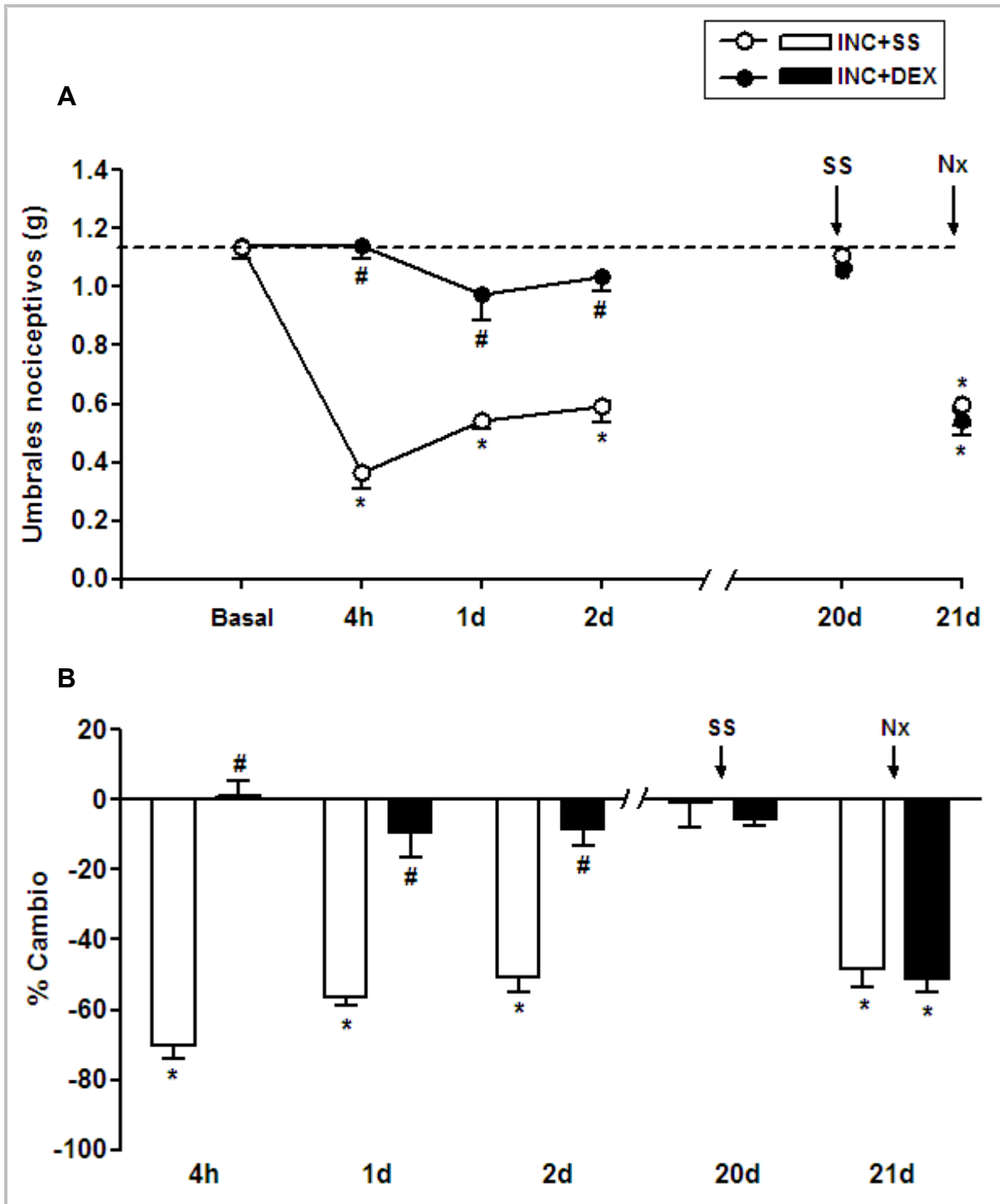
### **2.1 Efecto del dexketoprofeno**

Para estudiar el efecto del dexketoprofeno los ratones recibieron una única dosis de 100 mg/kg antes de finalizar la cirugía (grupo INC+DEX), mientras que el grupo control recibió salino (INC+SS). Los umbrales nociceptivos basales antes de la cirugía fueron  $1,13 \pm 0,04g$  y  $1,14 \pm 0,04g$  para los grupos INC+SS e INC+DEX, respectivamente. Tras la intervención quirúrgica, el grupo INC+SS mostró una disminución significativa ( $p < 0,001$  frente al basal) de los umbrales nociceptivos a las 4 horas, y a los días 1 y 2 del postoperatorio ( $0,36 \pm 0,05g$ ,  $0,54 \pm 0,02g$  y  $0,59 \pm 0,59g$ , respectivamente). El grupo INC+DEX no presentó hiperalgesia ( $1,14 \pm 0,04g$ ,  $0,97 \pm 0,09g$  y  $1,03 \pm 0,05g$  - a las 4 horas, 1 y 2 días), demostrando que el dexketoprofeno previene totalmente la HPO en nuestro modelo (**figura 41 y tabla 7**).

La administración de salino el día 20 en los grupos INC+SS e INC+DEX no tuvo efecto alguno, presentando umbrales nociceptivos similares a los valores basales ( $1,10 \pm 0,01\text{g}$  y  $1,05 \pm 0,02\text{g}$ , respectivamente). Sin embargo, la administración de Nx el día 21 provocó una disminución de los umbrales nociceptivos similar a la observada el día 1 en el grupo INC+SS ( $0,54 \pm 0,02$ ), y que fue de la misma magnitud en ambos grupos ( $0,59 \pm 0,06\text{g}$ , y  $0,54 \pm 0,05\text{g}$  en los grupos INC+SS y INC+DEX) ( $p < 0,001$ ).

En la **figura 41B** se muestra la magnitud de la respuesta: el grupo INC+SS presentó hiperalgesia durante todo el período de evaluación inicial (4h, 1 y 2 días), con valores de porcentaje de cambio de  $-70,03 \pm 4,18\%$ ,  $-56,38 \pm 2,42\%$  y  $-50,90 \pm 3,96\%$ , respectivamente. Sin embargo, los animales que recibieron dexketoprofeno (INC+DEX) mostraron porcentajes de cambio de  $1,10 \pm 4,07\%$ ,  $-9,15 \pm 7,16\%$  y  $-8,53 \pm 4,83\%$ , que no fueron estadísticamente significativos respecto al valor basal. Así durante este período, el dexketoprofeno mostró un efecto antihiperalgésico de  $101,58 \pm 5,81\%$ ,  $83,76 \pm 12,70\%$  y  $83,23 \pm 9,49\%$ , a las 4h, 1 y 2 días del postoperatorio (**tabla 7**).

El día 20 tras la administración de salino, el porcentaje de cambio fue prácticamente nulo en ambos grupos (INC+SS e INC+DEX), siendo  $-0,85 \pm 6,97\%$  y  $-5,54 \pm 1,66\%$ , respectivamente. La administración de naloxona el día 21, provocó porcentajes de cambio similares a los observados en el día 1 del postoperatorio ( $-48,26 \pm 5,44\%$  para el grupo INC+SS y  $-51,19 \pm 3,81\%$  para el grupo INC+DEX).



**Figura 41. Efecto del DEXKETOPROFENO sobre la hiperalgesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor.** Para cada tiempo de evaluación mostramos los umbrales nociceptivos en gramos (A) y los porcentajes (%) de cambio respecto al valor basal (B)  $\pm$  E.E.M. Los animales recibieron salino (grupo INC+SS, círculos/barras blancas) ó 100 mg/Kg dexketoprofeno (INC+DEX, círculos/barras negras) antes de finalizar la cirugía. A los días 20 y 21 del postoperatorio, los ratones recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la evaluación. La línea discontinua (A) indica el valor basal medio. ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs B; # $p < 0,001$  vs INC+SS.

La **tabla 7**, muestran los valores numéricos obtenidos tras la administración de dexketoprofeno (grupo INC+DEX) o salino (INC+SS), en los diferentes tiempos de evaluación.

Tiempo	INC+SS	INC + DEX	
	Umbrales nociceptivos (g)	Umbrales nociceptivos (g)	Efecto antihiperalgésico (%)
<b>Basal</b>	1,13 ± 0,04	1,14 ± 0,02	-
<b>4h</b>	0,36 ± 0,05 *	1,14 ± 0,04 #	101,58 ± 5,81 #
<b>1d</b>	0,54 ± 0,02 *	0,97 ± 0,09 #	83,76 ± 12,70 #
<b>2d</b>	0,59 ± 0,05 *	1,03 ± 0,05 #	83,23 ± 9,49 #
<b>20d+SS</b>	1,10 ± 0,01	1,05 ± 0,02	-
<b>21d+Nx</b>	0,59 ± 0,06 *	0,54 ± 0,05 *	6,07 ± 7,9

**Tabla 7. Efecto del DEXKETOPROFENO sobre la hiperalgnesia inducida por la incisión quirúrgica.** Se muestran los umbrales nociceptivos (g) y el porcentaje (%) de efecto antihiperalgésico del dexketoprofeno (INC+DEX) respecto al grupo control (INC+SS) ± E.E.M. Los días 20 y 21 del postoperatorio, los animales recibieron salino (SS) y naloxona (Nx), respectivamente, antes de la evaluación.

ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey).

\*p<0,001 vs B; #p<0,001 vs INC+SS

Este grupo de experimentos muestra que el dexketoprofeno impide la aparición de hiperalgnesia en el postoperatorio inmediato (HPO), mientras que no previene la aparición de hiperalgnesia tras la administración de naloxona 21 días después de la intervención (SLD).

En los mismos grupos de animales investigamos la activación de la microglía y astrocitos en la médula espinal el día 1 del postoperatorio y también el día 21 después de la administración de SS o Nx. Se estimó también el efecto del dexketoprofeno en animales que no habían sido sometidos a cirugía.

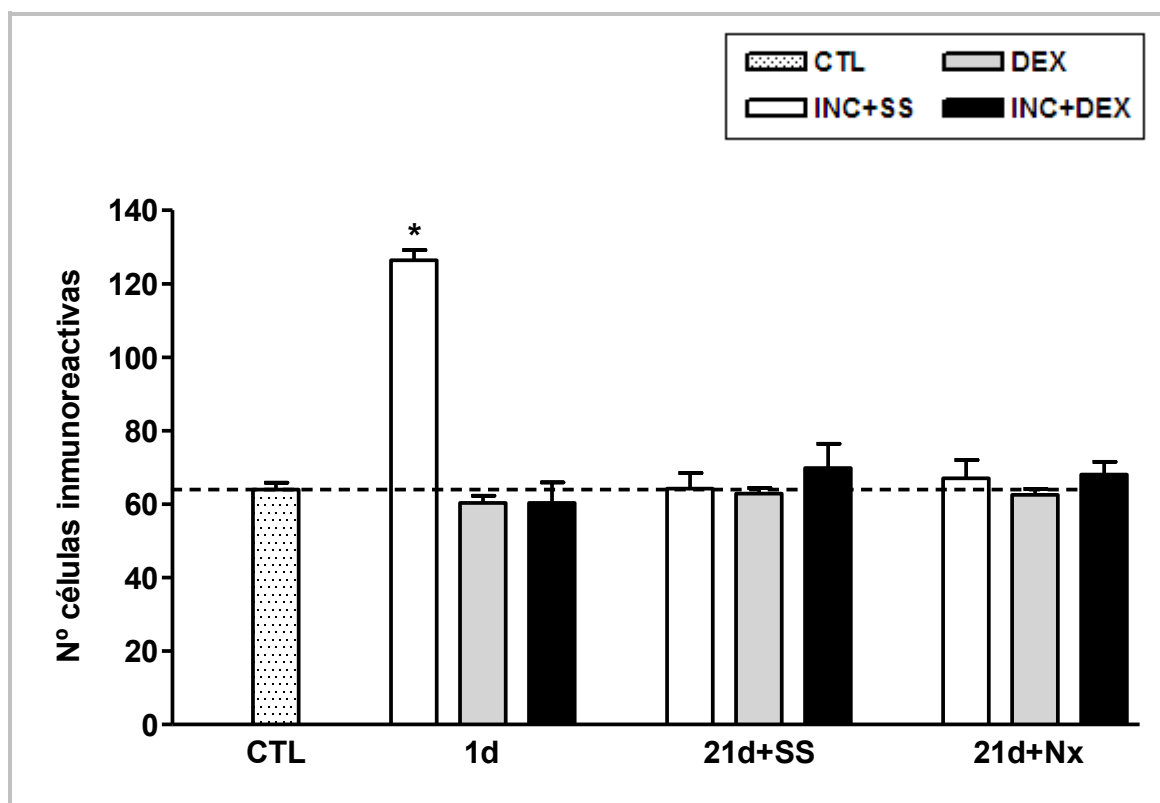
## V. Resultados

### Inmunoreactividad de la microglía en la medula espinal

El número de células inmunoreactivas de *microglía* antes de la manipulación (control, CTL) fue de  $64,00 \pm 1,84$ ; este valor es la media de los controles de cada uno de los grupos, siendo  $63,60 \pm 3,27$ ,  $65,00 \pm 2,34$  y  $63,50 \pm 4,5$  para los grupos INC+SS, DEX e INC+DEX.

El día 1 tras la manipulación, la cirugía (INC+SS) provocó un incremento significativo del número de células inmunoreactivas ( $126,37 \pm 2,79$ ;  $p < 0,001$  versus al CTL); hecho que no se observó en el grupo INC+DEX, que mostró un número de células inmunoreactivas similar al control ( $62,83 \pm 2,65$ ;  $p < 0,001$  frente INC+SS). La inhibición de la activación de la microglía inducida por el dexketoprofeno fue del  $105,03 \pm 8,96\%$  ( $p < 0,001$  comparado con INC+SS). La administración de dexketoprofeno en ausencia de cirugía no modificó el número de células de microglía activadas ( $60,33 \pm 1,98$ ) (**figura 42, tabla 8**).

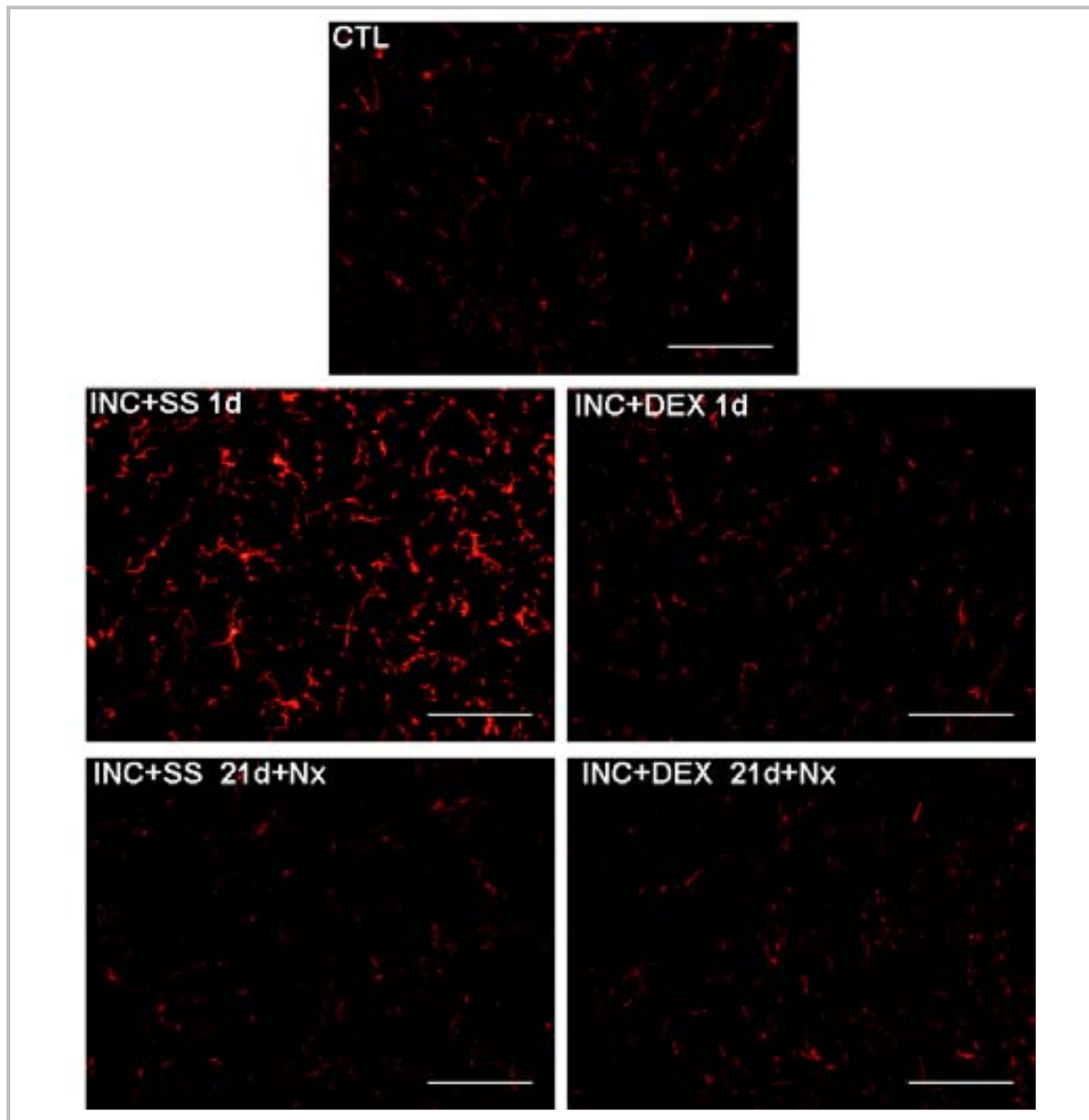
A los 21 días postincisión, el número de células de microglía inmunoreactivas tras la administración de salino, fue similar al CTL en los tres grupos de estudio (INC+SS, DEX, INC+DEX:  $64,21 \pm 4,24$ ;  $62,84 \pm 1,58$  y  $69,83 \pm 6,58$ , respectivamente), mostrando la recuperación de los valores iniciales. La administración de naloxona no provocó la reactivación de la microglía en el ninguno de los grupos de estudio (INC+SS,  $67,07 \pm 4,92$ ; DEX  $62,54 \pm 1,58$ ; INC+DEX  $68,09 \pm 3,40$ ).



**Figura 42. Efecto del DEXKETOPROFENO sobre la activación de la MICROGLÍA espinal inducida por la incisión.** Se muestra el número de células inmunoreactivas de microglía  $\pm$  E.E.M en animales control (CTL, barra punteada), y en animales que recibieron 100 mg/kg dexketoprofeno (INC+DEX, barras negras) o salino (INC+SS, barras blancas) antes de finalizar la cirugía. Las muestras de médula espinal se obtuvieron los días 1 y 21 postcirugía. El día 21 los ratones recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la eutanasia. El efecto del dexketoprofeno (DEX, barras grises) se evaluó a los mismos tiempos en animales sin cirugía. La línea discontinua indica el valor medio de los controles.

ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs CTL.

En la **figura 43** se incluyen microfotografías representativas que muestran la hipertrofia de las células de microglía el día 1 tras la cirugía y el efecto del dexketoprofeno (INC+DEX) que previene el aumento de inmunoreactividad. Mostramos también como la administración de naloxona el día 21 no induce reactivación de la microglía en ninguno de los grupos, de manera que la respuesta observada en ambos casos es muy similar a la del control.



**Figura 43.** Microfotografías representativas que muestran el efecto del **DEXKETOPROFENO** sobre la activación de la **MICROGLÍA** espinal (inmunoreactividad). Se muestran ejemplos en condiciones control (CTL), y a los 1 y 21 días después de la incisión, en los grupos que recibieron salino (INC+SS) o dexketoprofeno (INC+DEX). La administración de naloxona (Nx) el día 21 no tuvo efecto sobre la activación de la microglía. Línea blanca, escala: 50µm (objetivo 20x).

En la **tabla 8**, se muestran los datos numéricos obtenidos en los animales control y también en los días 1 y 21 del postoperatorio, tras la administración de SS o Nx en los tres grupos de estudio. De especial relevancia es la prevención de la activación de la microglía por la administración de dexketoprofeno (INC+DEX), el día 1 del postoperatorio.

Por último mencionar que el fármaco *per se* no modifica la inmunoreactividad de la microglía en los distintos tiempos evaluados.

Los resultados muestran que en el periodo postoperatorio inmediato (día 1), el dexketoprofeno inhibe la aparición de hiperalgnesia mecánica (HPO) y a la vez la activación de la microglía espinal, demostrando una correspondencia entre estos dos parámetros.

Tiempo	MICROGLÍA			
	INC+SS	DEX	INC+DEX	
	Nº células inmunoreactivas	Nº células inmunoreactivas	Nº células inmunoreactivas	Inhibición de la activación (%)
Control	63,60 ± 3,27	65,00 ± 2,34	63,50 ± 4,5	-
1d	126,37 ± 2,79 *	60,33 ± 1,98	62,83 ± 2,65	105,03 ± 8,96 #
21d+SS	64,21 ± 4,24	62,84 ± 1,58	69,83 ± 6,58	-
21d+Nx	67,07 ± 4,92	62,54 ± 1,58	68,09 ± 3,40	-

**Tabla 8. Efecto del DEXKETOPROFENO sobre la activación de la MICROGLÍA.** Para los tres grupos evaluados, se muestra el número de células inmunoreactivas ± E.E.M en condiciones control y a los 1 y 21 días del postoperatorio. Los ratones recibieron salino (grupo INC+SS) o dexketoprofeno (INC+DEX) durante la cirugía; el día 21 recibieron además una inyección de salino (SS) o naloxona (Nx). El grupo dexketoprofeno (DEX) no fue intervenido quirúrgicamente (operado *sham*). Para el grupo INC+DEX se muestra también el porcentaje (%) de inhibición de la activación glial.

ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs control; # $p < 0,001$  vs INC+SS.

### Inmunoreactividad de los astrocitos en la médula espinal

En las mismas condiciones experimentales se estimaron los cambios morfológicos de los *astrocitos* en la médula espinal. La evaluación del porcentaje del área marcada de astrocitos previa a la manipulación (control), mostró un valor del  $6,15 \pm 0,52\%$ , que es la media aritmética de los valores obtenidos en los tres grupos de estudio evaluados individualmente: INC+SS, DEX e INC+DEX ( $6,10 \pm 1,15\%$ ;  $6,21 \pm 0,9\%$ ;  $6,14 \pm 0,81\%$ , respectivamente) (**figura 44 y tabla 9**).

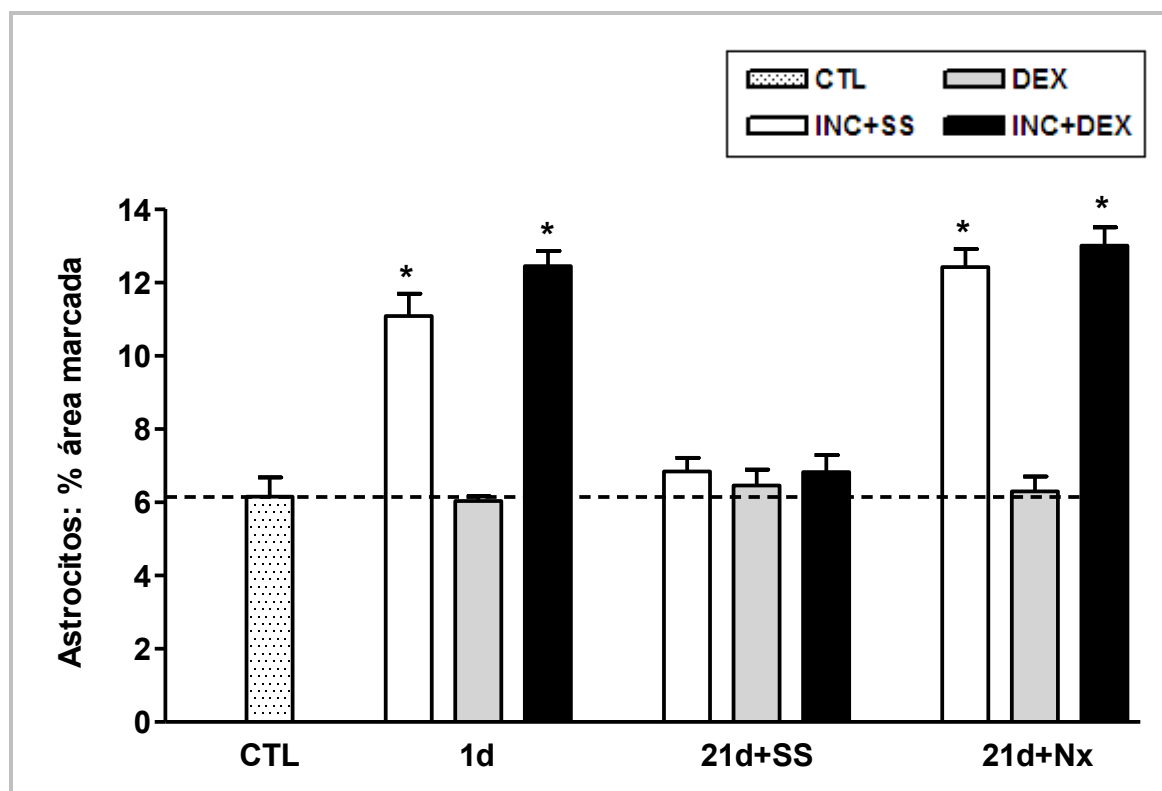
El día 1 del postoperatorio, la cirugía (INC+SS) provocó una hipertrofia / activación astrocitaria ( $11,08 \pm 0,60\%$ ,  $p < 0,001$  frente al control), que no fue modificada por la administración de dexketoprofeno (INC+DEX,  $12,44 \pm 0,41\%$ ,  $p < 0,001$ ). Los animales operados *sham* que recibieron dexketoprofeno, mostraron un porcentaje de activación astrocitaria similar al control ( $6,03 \pm 0,11\%$ ).



## V. Resultados

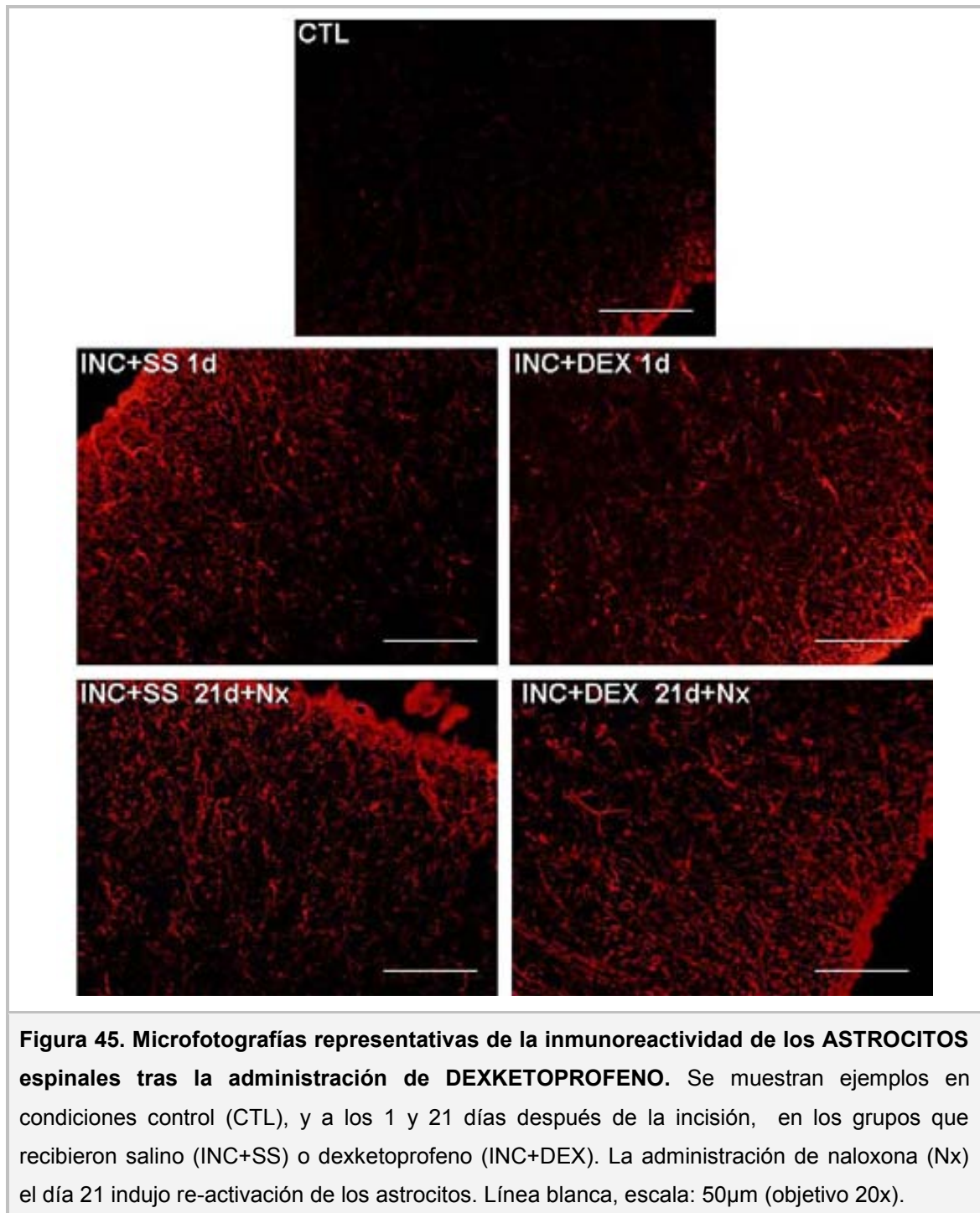
El día 21, la activación astrocitaria había retronado a los valores CTL (**figura 44**), y la administración de salino no provocó ningún cambio, siendo los valores observados en los tres grupos similares al control ( $6,84 \pm 0,37\%$ ,  $6,82 \pm 0,46\%$  y  $6,46 \pm 0,42\%$ , respectivamente).

La administración de naloxona provocó una reactivación astrocitaria (incremento de la inmunoreactividad) similar en el grupo INC+SS ( $12,42 \pm 0,49\%$ ,  $p < 0,001$  frente al CTL) y el grupo INC+DEX ( $13,00 \pm 0,49\%$ ,  $p < 0,001$ ), mientras que el grupo DEX permaneció inalterado ( $6,29 \pm 0,40\%$ ). Estos resultados demuestran por tanto, que el dexketoprofeno no modifica la activación astrocitaria el día 1 del postoperatorio ni tampoco su reactivación inducida por la administración de naloxona el día 21.



**Figura 44. Efecto del DEXKETOPROFENO sobre la activación de los ASTROCITOS espinales inducida por la incisión.** Se muestran el porcentaje (%) de área marcada de astrocitos  $\pm$  E.E.M en animales control (CTL, barra punteada), y en animales que recibieron 100 mg/kg dexketoprofeno (INC+DEX, barras negras) o salino (INC+SS, barras blancas) antes de finalizar la cirugía. Las muestras de medula espinal se obtuvieron los días 1 y 21 postcirugía. El día 21 los ratones recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la eutanasia. El efecto del dexketoprofeno (DEX, barras grises) se evaluó a los mismos tiempos en animales sin cirugía (*sham* operados). La línea discontinua indica el valor medio de los controles. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs CTL.

En la **figura 45** se muestran microfotografías representativas de muestras de médula espinal obtenidas en condiciones control y de animales de los grupos INC+SS e INC+DEX; en ambos grupos podemos observar una activación astrocitaria similar los días 1 y 21, éste último tras la administración de naloxona.



En la **tabla 9** se resumen los resultados numéricos; observamos que tanto el día 1 como el 21, el dexketoprofeno (INC+DEX) no modificó la activación astrocitaria inducida por la

## V. Resultados

cirugía o la Nx, sugiriendo que en el efecto antihiperálgico del fármaco no está relacionado con la activación astrocitaria.

Por último el dexketoprofeno *per se*, no indujo ninguna alteración en la activación de los astrocitos, en ninguno de los tiempos evaluados.

ASTROCITOS				
Tiempo	INC+SS	DEX	INC+DEX	
	% Área marcada	% Área marcada	% Área marcada	Inhibición de la activación (%)
Control	6,10 ± 1,15	6,21 ± 0,90	6,14 ± 0,81	-
1d	11,08 ± 0,60 *	6,03 ± 0,11	12,44 ± 0,41 *	-27,56 ± 8,46
21d+SS	6,84 ± 0,37	6,46 ± 0,42	6,82 ± 0,46	-
21d+Nx	12,42 ± 0,49 *	6,29 ± 0,40	13,00 ± 0,49 *	-9,36 ± 7,74

**Tabla 9. Efecto del DEXKETOPROFENO sobre la activación de los ASTROCITOS.** Para los tres grupos evaluados, se muestra el porcentaje (%) de inmunoreactividad de área marcada ± E.E.M en condiciones control y en los días 1 y 21 del postoperatorio. Los ratones recibieron salino (grupo INC+SS) o dexketoprofeno (INC+DEX) durante la cirugía; el día 21 recibieron además una inyección de salino (SS) o naloxona (Nx). El grupo dexketoprofeno (DEX) no fue intervenido quirúrgicamente (operado *sham*). Para el grupo INC+DEX se muestra también el porcentaje (%) de inhibición de la activación glial. Los valores negativos indican que la inmunoreactividad fue ligeramente superior, pero no significativa ( $p > 0,05$ ), respecto al grupo INC+SS. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs control

Estos resultados demuestran que el dexketoprofeno previene la hiperálgia postoperatoria (HPO) y la activación de la microglía en el postoperatorio inmediato; sin embargo, no modifica la hiperálgia inducida por Nx, ni la activación y reactivación astrocitaria tras la administración de naloxona (día 21).

### 2.2 Efecto del tramadol

El efecto antihiperálgico del tramadol (TRM, 100 mg, s.c.) y su posible inhibición de la activación de la glía espinal fueron investigados en ratones que recibieron salino (INC+SS) o tramadol (INC+TRM) antes de finalizar la intervención. La hiperálgia mecánica se evaluó a las 4 horas, y los días 1 y 2 del postoperatorio (HPO), y también a los 20 y 21 días, después

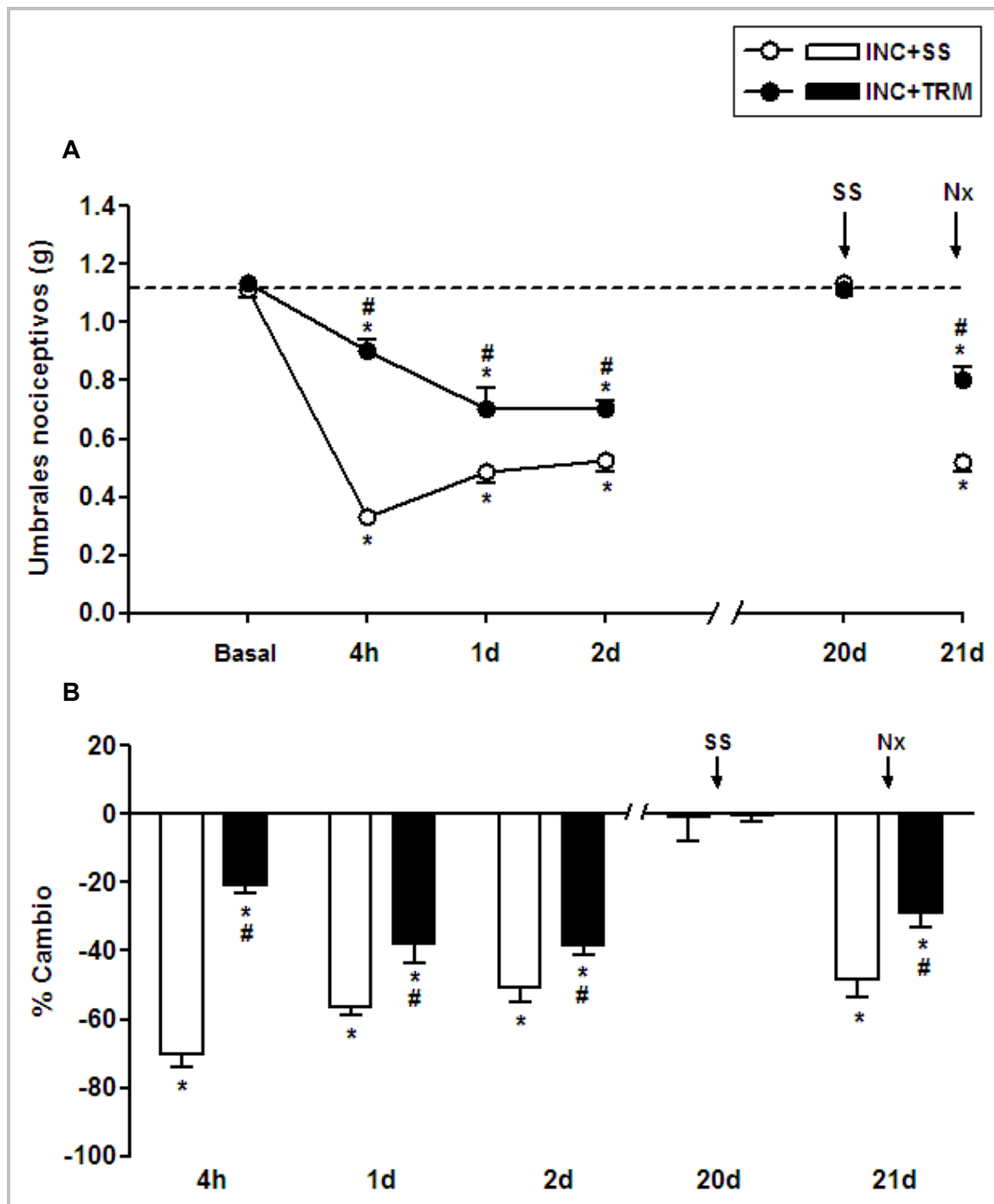
de la administración de salino o naloxona (SLD). El efecto del tramadol sobre la glía se valoró los días 1 y 21 post-manipulación en los grupos INC+SS e INC+TRM y también en ratones *sham*-operados (grupo TRM) (**ver Métodos**).

Los umbrales mecánicos basales, fueron  $1,11 \pm 0,03\text{g}$  y  $1,13 \pm 0,01\text{g}$  para los grupos INC+SS e INC+TRM, respectivamente. Tras la cirugía, el grupo INC+SS mostró una disminución significativa de los umbrales nociceptivos a las 4h, 1 y 2 días del postoperatorio ( $p < 0,001$  respecto al basal). La administración intraoperatoria de tramadol fue capaz de prevenir parcialmente la HPO, de tal forma que a los mismos tiempo de evaluación, los animales del grupo INC+TRM presentaron un menor grado de hiperalgesia que los del grupo INC+SS ( $p < 0,001$ ). Estos resultados muestran que en nuestro modelo experimental, el tramadol posee un efecto antihiperalgésico significativo que se prolonga durante al menos dos días ( $0,90 \pm 0,03\text{g}$ ,  $0,70 \pm 0,06\text{g}$  y  $0,70 \pm 0,03\text{g}$ ;  $p < 0,001$  respecto INC+SS) (**figura 46 y tabla 10**).

Todos los ratones habían recuperado los umbrales nociceptivos basales el día 20 postincisión ( $1,13 \pm 0,01\text{g}$  y  $1,11 \pm 0,00\text{g}$ , para los grupos INC+SS e INC+TRM, respectivamente). La administración de naloxona el día 21 provocó de nuevo una disminución de los umbrales nociceptivos en el grupo INC+SS ( $0,51 \pm 0,03\text{g}$ ,  $p < 0,001$  frente a la basal), que fue similar a la de los días 1 y 2. Sin embargo, la hiperalgesia inducida por naloxona ( $p < 0,001$  versus basal) fue significativamente menor en los animales que recibieron tramadol ( $0,80 \pm 0,04\text{g}$ ;  $p < 0,001$  frente a INC+SS), revelando que el TRM previene parcialmente la aparición de la SLD.

En el grupo INC+SS, los porcentajes de cambio respecto al basal fueron  $-70,03 \pm 4,18\%$ ,  $-56,38 \pm 2,42\%$  y  $-50,90 \pm 3,96\%$  para las 4h, 1 y 2 días postcirugía, respectivamente; a los mismos tiempos de evaluación el grupo INC+TRM mostró porcentajes de cambio significativamente menores con valores de  $-20,63 \pm 2,59\%$ ,  $-38,01 \pm 5,38\%$  y  $-38,20 \pm 2,99\%$ . Por tanto el TRM provocó un efecto antihiperalgésico parcial del  $70,76 \pm 3,66\%$ ,  $32,10 \pm 9,61\%$  y  $26,83 \pm 6,77\%$ , para las 4h, 1 y 2 días del postoperatorio, respectivamente (**figura 46B y tabla 10**).

No se observaron cambios significativos respecto al valor basal el día 20, siendo  $-0,85 \pm 6,97\%$  para el grupo INC+SS y  $-0,14 \pm 2,12\%$  para el grupo INC+TRM. En cambio, el día 21 tras la naloxona, el porcentaje de cambio fue  $-48,26 \pm 5,44\%$  para el grupo INC+SS y  $-28,76 \pm 4,35\%$  para el grupo INC+TRM. Esta inhibición parcial del tramadol corresponde a un efecto antihiperalgésico de aproximadamente un  $46,53 \pm 8,10\%$ .



**Figura 46. Efecto del TRAMADOL sobre la hiperalgesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor.** Para cada tiempo de evaluación mostramos los umbrales nociceptivos en gramos (A) y el porcentaje (%) de cambio respecto al valor basal (B) ± E.E.M. Los animales recibieron salino (grupo INC+SS, círculos/barras blancas) ó 100 mg/Kg tramadol (INC+TRM, círculos/barras negras) antes de finalizar la cirugía. Los días 20 y 21, recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la evaluación. En el panel A, la línea discontinua indica el valor basal medio (señalado por la letra B). ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs B; # $p < 0,001$  vs INC+SS.

En la **tabla 10**, se muestra el efecto del tramadol sobre los umbrales nociceptivos, en los distintos tiempos de evaluación. El fármaco previene parcialmente la HPO y la aparición de SLD, aunque los experimentos no permiten establecer si la magnitud del efecto antihiperalgésico en los dos tiempos de evaluación (1d y 21d+Nx), es similar.

Tiempo	INC+SS	INC + TRAMADOL	
	Umbrales nociceptivos (g)	Umbrales nociceptivos (g)	Efecto antihiperalgésico (%)
<b>Basal</b>	1,11 ± 0,03	1,13 ± 0,01	-
<b>4h</b>	0,33 ± 0,02 *	0,90 ± 0,03 * #	70,76 ± 3,66 #
<b>1d</b>	0,48 ± 0,03 *	0,70 ± 0,06 * #	32,10 ± 9,61 #
<b>2d</b>	0,52 ± 0,03 *	0,70 ± 0,03 * #	26,83 ± 6,77 #
<b>20d+SS</b>	1,13 ± 0,01	1,11 ± 0,00	-
<b>21d+Nx</b>	0,51 ± 0,03 *	0,80 ± 0,04 * #	46,53 ± 8,10 * #

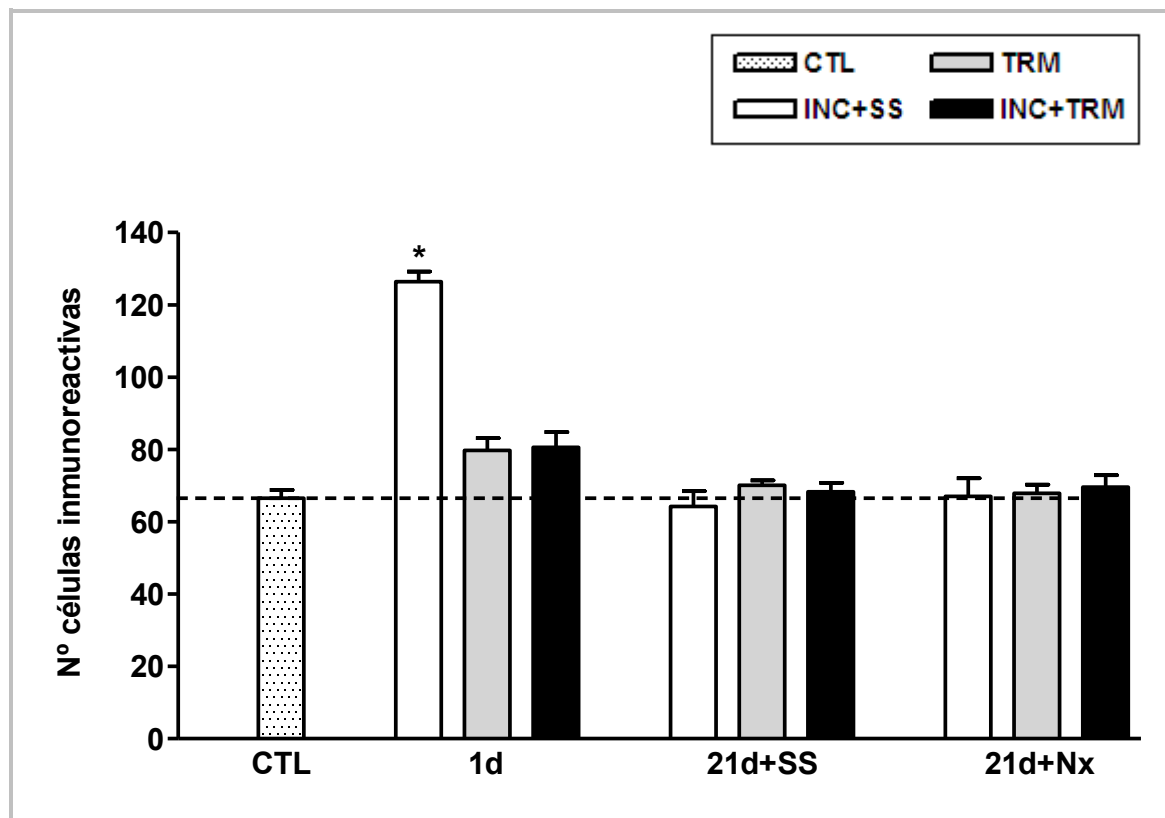
**Tabla 10. Efecto del TRAMADOL sobre la hiperalgnesia inducida por la incisión quirúrgica.** Se muestran los umbrales nociceptivos (g) y el porcentaje (%) de efecto antihiperalgésico del tramadol (INC+TRM) respecto al grupo control (INC+SS) ± E.E.M. El día 20 y 21 del postoperatorio, los animales recibieron salino (SS) y naloxona (Nx), respectivamente, antes de la evaluación. ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs B; # $p < 0,001$  vs INC+SS

### Inmunoreactividad de la microglía en la médula espinal

El efecto del TRM sobre la activación glial fue evaluado 1 y 21 días después la manipulación. El valor medio del número de células de *microglía* inmunoreactivas en animales control fue  $66,5 \pm 2,33$ ; este promedio se obtuvo a partir de determinaciones independientes en los grupos INC+SS, TRM e INC+TRM ( $66,66 \pm 3,80$ ,  $67,00 \pm 6,49$  y  $65,83 \pm 1,78$ , respectivamente). La cirugía (INC+SS) provocó un aumento del número de células de microglía activadas ( $126,37 \pm 2,79$ ;  $p < 0,001$  frente al control) y el tramadol (INC+TRM) fue capaz de prevenir en un  $75,69 \pm 7,08\%$  la activación de la microglía el día 1 (número de células inmunoreactivas:  $80,54 \pm 4,28$ ). En animales operados-*sham*, el TRM no alteró la activación de la microglía manteniendo la inmunoreactividad en un valor similar al control ( $79,73 \pm 3,43$ ).

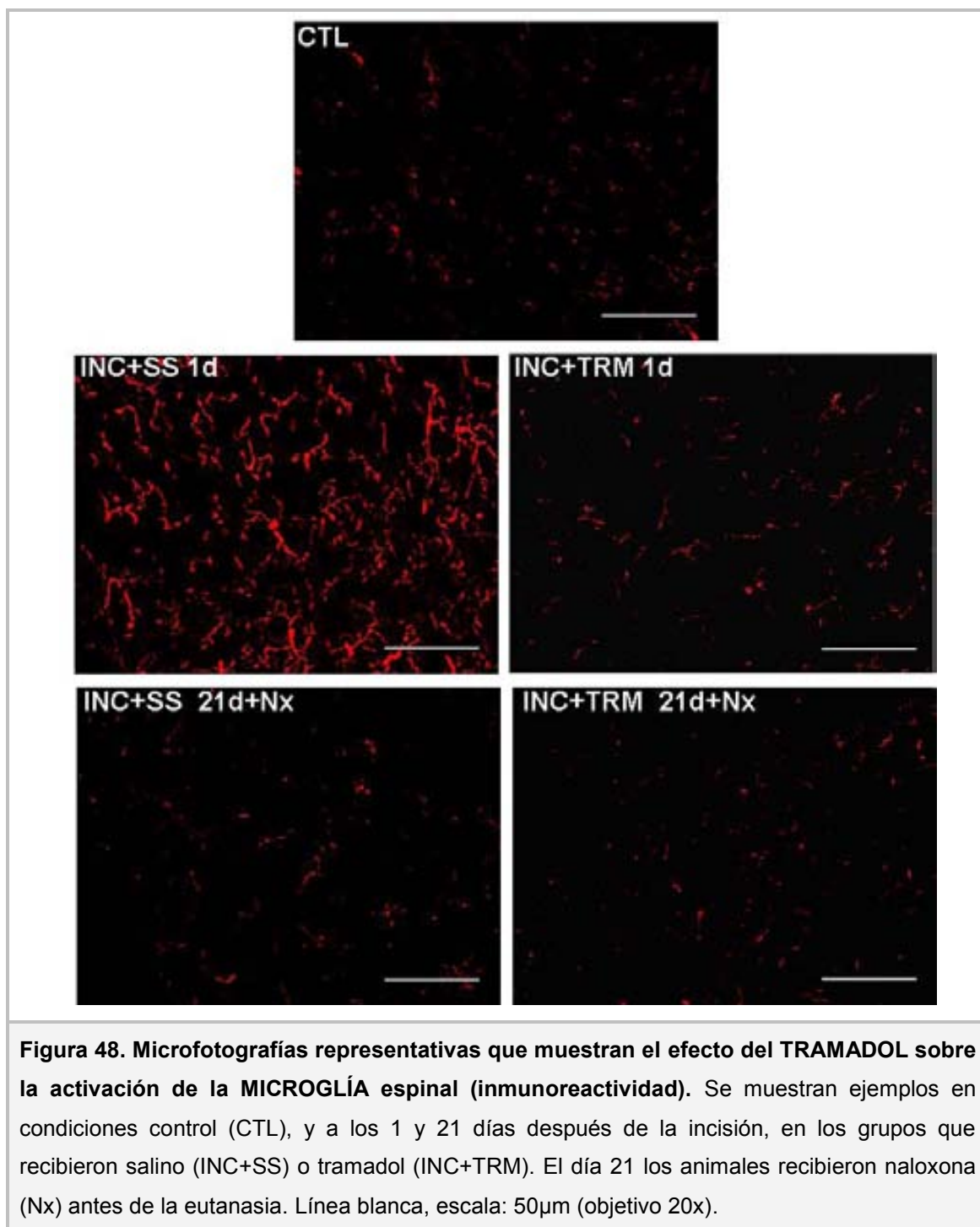
## V. Resultados

El día 21, no apareció activación ni reactivación de la microglía tras la administración de salino o naloxona en ninguno de los grupos evaluados, siendo el número de células activadas tras la administración de salino,  $64,21 \pm 4,24$ ,  $70,05 \pm 1,41$  y  $68,27 \pm 2,47$  para los grupos INC+SS, TRM e INC+TRM y tras la administración de naloxona de  $67,07 \pm 4,92$ ,  $67,85 \pm 2,36$  y  $69,61 \pm 3,27$ , respectivamente; estos valores son similares a los controles para los tres grupos de estudio (**figura 47, tabla 11**).



**Figura 47. Efecto del TRAMADOL sobre la activación de la MICROGLÍA espinal inducida por la incisión.** Se muestra el número de células inmunoreactivas de microglía  $\pm$  E.E.M en animales control (CTL, barra punteada), y que recibieron 100 mg/kg tramadol (INC+TRM, barras negras) o salino (INC+SS, barras blancas) antes de finalizar la cirugía. Las muestras de médula espinal se obtuvieron los días 1 y 21 postcirugía. El día 21 los ratones recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la eutanasia. El efecto del tramadol (TRM, barras grises) se evaluó a los mismos tiempos en animales operados *sham*. La línea discontinua indica el valor medio de los controles. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs CTL.

La **figura 48** muestra microfotografías representativas del efecto del tramadol (INC+TRM) sobre inhibición de la activación microglial inducida por la cirugía (INC+SS); la administración de Nx no indujo activación de la microglía en ninguno de los grupos evaluados.



La **tabla 11** muestra un resumen de los datos de la inmunoreactividad de las células de microglía en los tres grupos de estudio. Se observa que el TRM *per se* carece de efecto, mientras que administrado durante la cirugía, previene la activación la microglía el día 1. No observamos efecto alguno de la naloxona a los 21 días.



## V. Resultados

MICROGLÍA				
Tiempo	INC+SS	TRM	INC+TRM	
	Nº células inmunoreactivas	Nº células inmunoreactivas	Nº células inmunoreactivas	Inhibición de la activación (%)
<b>Control</b>	66,66 ± 3,80	67,00 ± 6,49	65,83 ± 1,78	-
<b>1d</b>	126,37 ± 2,79 *	79,73 ± 3,43	80,54 ± 4,28	75,69 ± 7,08 #
<b>21d+SS</b>	64,21 ± 4,24	70,05 ± 1,41	68,27 ± 2,47	-
<b>21d+Nx</b>	67,07 ± 4,92	67,85 ± 2,36	69,61 ± 3,27	-

**Tabla 11. Efecto del TRAMADOL sobre la activación de la MICROGLÍA.** Para los tres grupos evaluados, se muestra el número de células inmunoreactivas ± E.E.M en condiciones control y en los días 1 y 21 del postoperatorio. Los ratones recibieron salino (grupo INC+SS) o tramadol (INC+TRM) durante la cirugía; el día 21 recibieron además una inyección de salino (SS) o de naloxona (Nx). El grupo tramadol (TRM) no fue intervenido quirúrgicamente (operado *sham*). Para el grupo INC+TRM se muestra también el porcentaje (%) de inhibición de la activación glial.

ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs control; # $p < 0,001$  vs INC+SS.

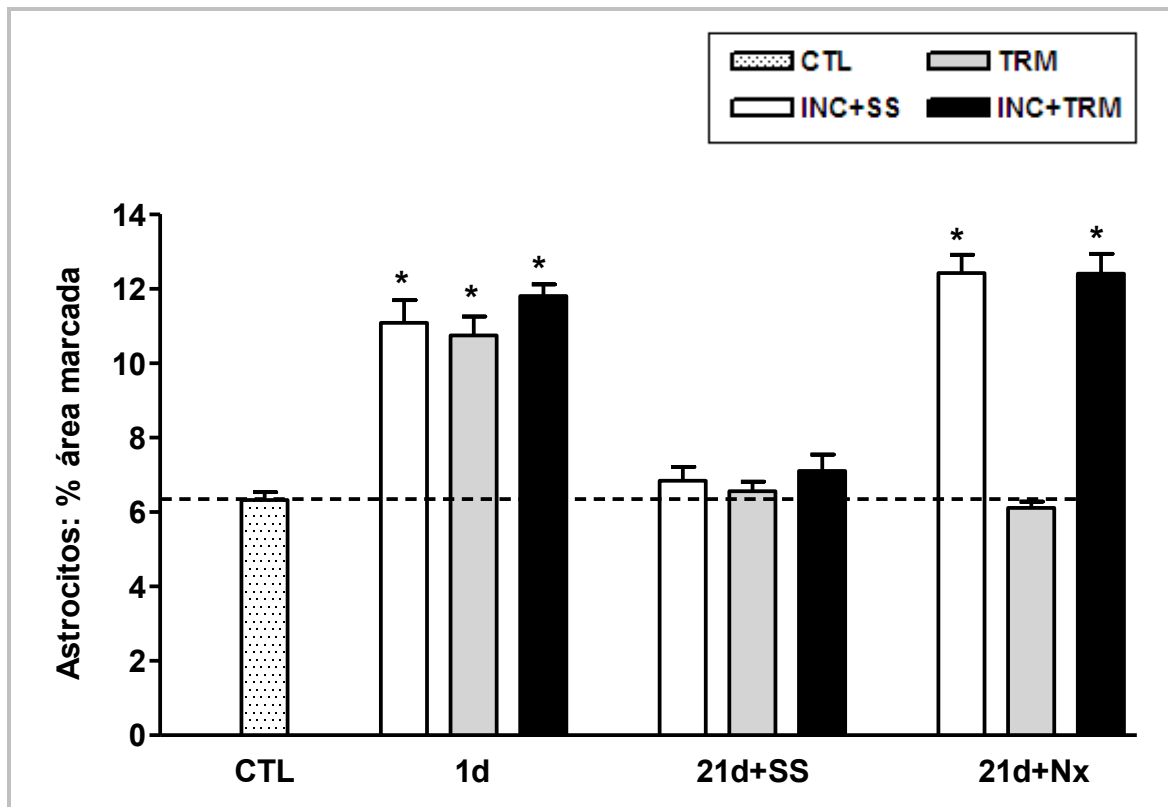
### Inmunoreactividad de los astrocitos en la medula espinal

La evaluación del porcentaje de área marcada de inmunoreactividad para los *astrocitos* en condiciones control fue  $6,32 \pm 0,21\%$ ; este valor es la media de los controles obtenidos para los grupos INC+SS, TRM e INC+TRM ( $6,41 \pm 0,38\%$ ,  $6,35 \pm 0,37\%$  y  $6,20 \pm 0,35\%$ , respectivamente).

El día 1 del postoperatorio, la cirugía provocó una activación de los astrocitos manifestada por un aumento en el % del área marcada de inmunoreactividad ( $11,08 \pm 0,60\%$ ,  $p < 0,001$  respecto al CTL); la activación fue similar en animales que recibieron tramadol durante la cirugía (INC+TRM) siendo el porcentaje de área marcada  $11,80 \pm 0,31\%$  ( $p < 0,001$  frente al CTL). Así mismo, los animales que recibieron tramadol en ausencia de cirugía, (grupo TRM) mostraron una activación astrocitaria similar a los demás grupos ( $10,74 \pm 0,50\%$ ,  $p < 0,001$  frente al CTL) (**figura 49 y tabla 12**).

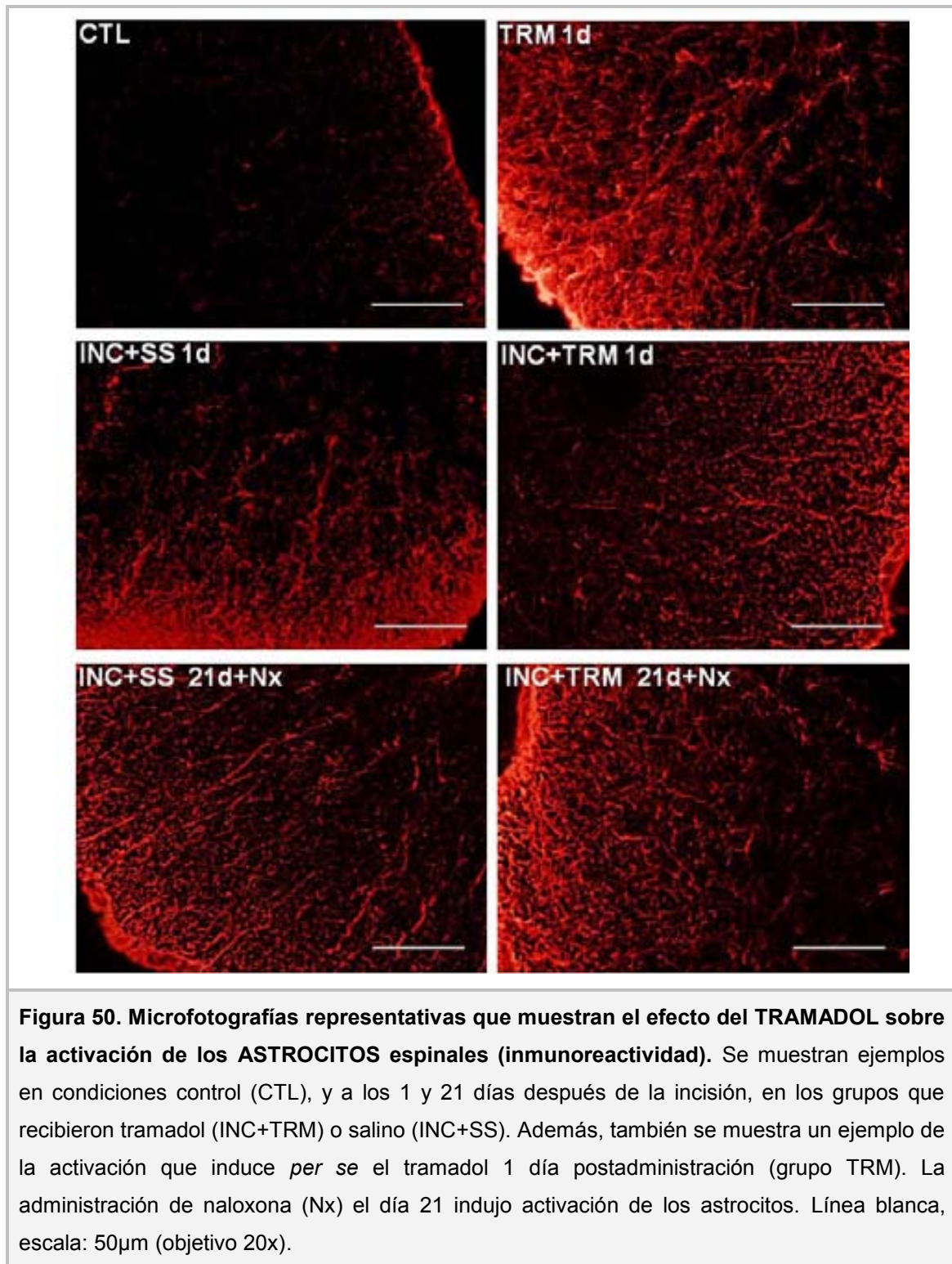
El día 21 (tras la administración de salino), todos los grupos mostraron niveles de inmunoreactividad similares al control, siendo los porcentajes de área marcada  $6,84 \pm 0,37\%$ ,  $6,55 \pm 0,25\%$  y  $7,10 \pm 0,44\%$  para los grupos INC+SS, TRM e INC+TRM,

respectivamente. La administración de naloxona provocó reactivación astrocitaria en los grupos INC+SS e INC+TRM ( $12,42 \pm 0,49\%$  y  $12,40 \pm 0,53$ , respectivamente;  $p < 0,001$  frente al CTL), siendo estos valores similares a los observados el día 1 del postoperatorio. La administración de naloxona no provocó reactivación astrocitaria en el grupo TRM ( $6,10 \pm 0,16\%$ ).



**Figura 49. Efecto del TRAMADOL sobre la activación de los ASTROCITOS en la medula espinal.** Se muestra el porcentaje (%) de área inmunoreactiva marcada para los astrocitos  $\pm$  E.E.M en animales control (CTL, barra punteada), y que recibieron 100 mg/kg tramadol (INC+TRM, barras negras) o salino (INC+SS, barras blancas) antes de finalizar la cirugía. Las muestras de medula espinal se obtuvieron los días 1 y 21 postcirugía. El día 21 los ratones recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la eutanasia. El efecto del tramadol (TRM, barras grises) se evaluó a los mismos tiempos y condiciones experimentales, en animales *sham* operados. La línea discontinua indica el valor medio de los controles. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs CTL.

La **figura 50** muestra el aumento de inmunoreactividad (hipertrófia de los astrocitos) en los tres grupos (TRM, INC+SS e INC+TRM) el día 1 y la reactivación astrocitaria observada el día 21 tras la administración de Nx en los grupos con una incisión quirúrgica.



En la **tabla 12** mostramos un resumen de los datos obtenidos. Estos resultados demuestran que el tramadol es capaz de inducir activación astrocitaria 1 día después de su administración a ratones sham-operados; además administrado antes de finalizar la cirugía, no previene la activación ni reactivación astrocitaria a los tiempos 1d y 21 día +Nx.

ASTROCITOS				
Tiempo	INC+SS	TRM	INC+TRM	Inhibición de la activación (%)
	% Área marcada	% Área marcada	% Área marcada	
Control	6,41 ± 0,38	6,35 ± 0,37	6,20 ± 0,35	-
1d	11,08 ± 0,60 *	10,74 ± 0,50 *	11,80 ± 0,31 *	-14,83 ± 6,37
21d+SS	6,84 ± 0,37	6,55 ± 0,25	7,10 ± 0,44	-
21d+Nx	12,42 ± 0,49 *	6,10 ± 0,16	12,40 ± 0,53 *	0,30 ± 8,61

**Tabla 12. Efecto del TRAMADOL sobre la activación de los ASTROCITOS.** Para los tres grupos evaluados, se muestra el porcentaje (%) de área marcada ± E.E.M en condiciones control y en los días 1 y 21 del postoperatorio. Los ratones recibieron salino (grupo INC+SS) o tramadol (INC+TRM) durante la cirugía; el día 21 recibieron además una inyección de salino (SS) o naloxona (Nx). El grupo tramadol (TRM) no fue intervenido quirúrgicamente (operado *sham*). Para el grupo INC+TRM se muestra también el porcentaje (%) de inhibición de la activación glial; Los valores negativos indican que la inmunoreactividad fue ligeramente superior, pero no significativa ( $p > 0,05$ ), respecto al grupo INC+SS. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs control

Así, a modo de resumen, los resultados muestran que el día 1 del postoperatorio, el tramadol previene parcialmente la hiperalgesia mecánica, a la vez que impide la activación de la microglía, pero no de los astrocitos. El día 21 del postoperatorio, el tramadol también previene parcialmente la hiperalgesia inducida por la naloxona pero no modifica la reactivación astrocitaria, sugiriendo que los astrocitos no participan en el efecto antihiperálgico del tramadol ni en la prevención parcial del desarrollo de la SLD que proporciona este opioide menor en nuestro modelo experimental.

### 2.3 Efecto de la combinación dexketoprofeno y tramadol sobre la hiperalgesia inducida por la cirugía y la activación glial.

Después de establecer el efecto de la administración intraoperatoria de dexketoprofeno y el tramadol, hemos analizado el efecto de la administración de estos fármacos combinados en una proporción 1:1 en base a su potencia antihiperálgica. Esta asociación forma parte de la analgesia multimodal utilizada en el tratamiento del dolor agudo postoperatorio en la práctica clínica habitual, aunque su uso es hasta el momento empírico. En el presente

## V. Resultados

apartado, mostramos el efecto de esta combinación tanto sobre el comportamiento nociceptivo como sobre la activación de la glía espinal. Analizaremos también si existe interacción entre ambos fármacos, utilizando un análisis isoblográfico, que requiere un protocolo específico (ver Métodos).

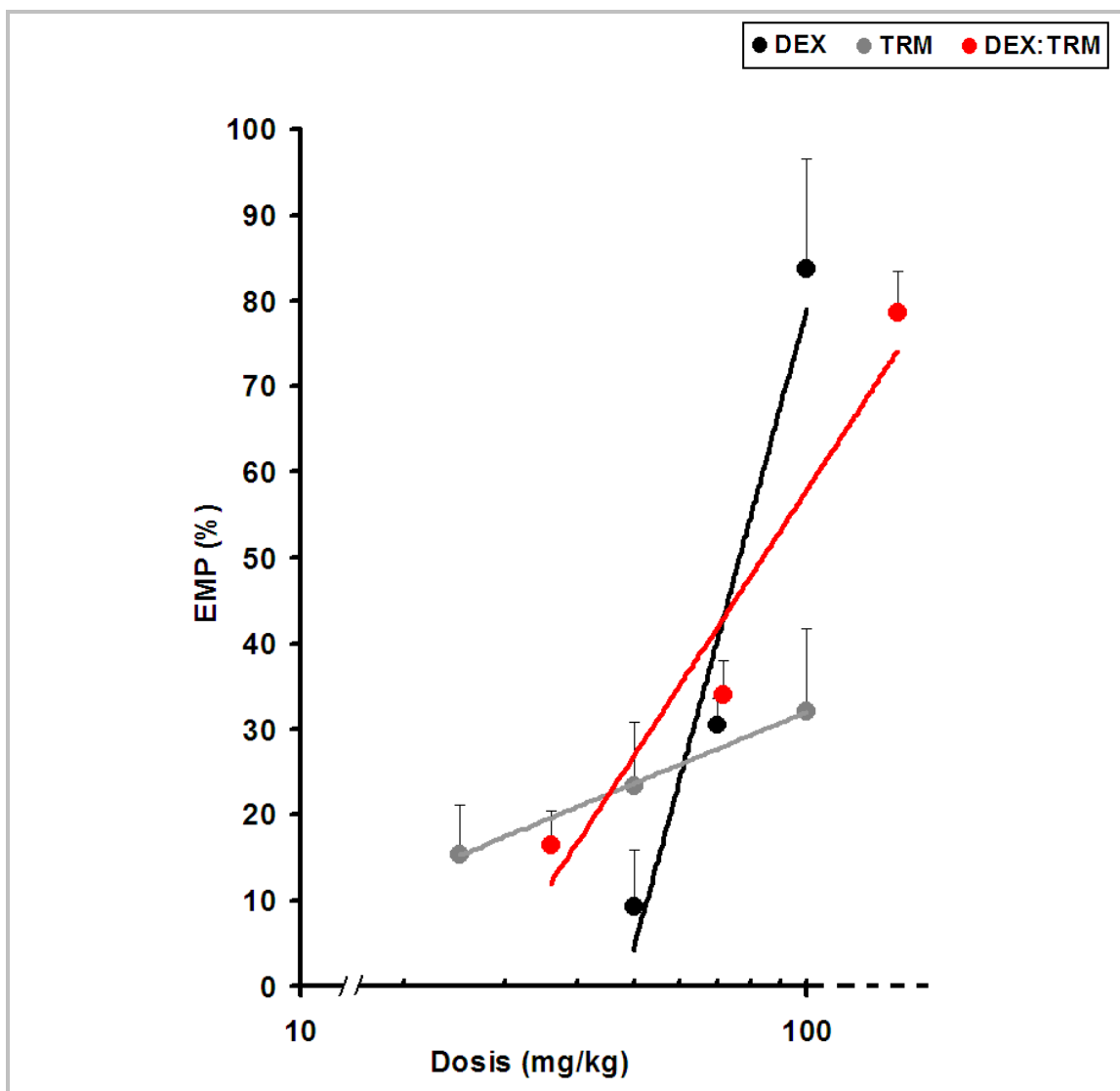
Todos los experimentos se han llevado a cabo en animales a los que se les realizó una incisión plantar. El día 1 del postoperatorio, se obtuvieron curvas dosis-respuesta para establecer el efecto antihiperalgésico de cada fármaco administrado individualmente y de su combinación en una proporción 1:1 en base a su potencia. Estos experimentos se llevaron a cabo el día 1 del postoperatorio, con el fin de evitar el efecto residual del sevoflurano, que podría interferir con la evaluación nociceptiva; además la magnitud de la hiperalgesia postoperatoria inducida por la cirugía es similar a las 4h, 1d y 2d después de la cirugía (**figura 38**).

En primer lugar se llevaron a cabo las curvas dosis-respuesta al dexketoprofeno y el tramadol, administrados a distintas dosis durante la intervención quirúrgica; a partir de éstas, se calcularon las dosis eficaces 20, 50 y 80 ( $DE_{20}$ ,  $DE_{50}$ ,  $DE_{80}$ ) para cada uno de los fármacos.

Para el dexketoprofeno, las dosis utilizadas fueron 50, 70 y 100 mg/kg obteniendo una curva con una pendiente de 1,51 y un efecto máximo ( $E_{max}$ ) de  $118,3 \pm 25,38\%$ . Los valores de las  $DE_{20}$ ,  $DE_{50}$  y  $DE_{80}$  fueron  $59,64 \pm 3,55$  mg/kg,  $82,58 \pm 3,61$  mg/kg y  $105,50 \pm 6,32$  mg/kg, respectivamente (**figura 51, tablas 13 y 14**).

Para el TRM, utilizamos dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, obteniéndose una curva con una pendiente de 0,21 y una  $E_{max}$  de  $42,36 \pm 29,58\%$ . Mediante esta curva se calcularon las DEs siendo éstas de  $40,92 \pm 6,62$  mg/kg,  $60,93 \pm 5,82$  mg/kg y  $80,94 \pm 7,37$  mg/kg para los niveles de efecto 20, 50 y 80 %, respectivamente (**figura 51, tabla 13 y 14**).

A partir de estos resultados se combinaron ambos fármacos en una proporción 1:1 en base a su potencia antihiperalgésica; concretamente se combinaron las  $DE_{50}$  de cada fármaco solo ( $82,58 \pm 3,61$  mg/kg y  $60,93 \pm 5,82$ , para el DEX y el TRM, respectivamente), obteniendo la curva dosis-respuesta de la combinación; la pendiente de esta curva fue 0,58 y el  $E_{max}$  de  $99,43 \pm 11,44\%$ . Calculamos a continuación las  $DE_{20}$ ,  $DE_{50}$  y  $DE_{80}$  obteniéndose valores de  $37,56 \pm 4,36$  mg/kg,  $77,62 \pm 3,03$  mg/kg y  $117,68 \pm 3,71$  mg/kg, respectivamente (**tabla 14**).



**Figura 51. Curvas dosis-respuesta para el efecto antihiperalgésico del dexketoprofeno, el tramadol y su combinación 1:1, el día 1 día del postoperatorio.** Se muestran los porcentajes (%) de efecto máximo posible (EMP)  $\pm$  E.E.M para el dexketoprofeno (DEX, círculos negros), tramadol (TRM, círculos grises) y la combinación dexketoprofeno:tramadol (1:1) (DEX:TRM, círculos rojos). Cada punto es la media de 10-12 ratones.

Cálculos realizados con los programas *Pharm Tools Pro* y *GraphPad Prim*.

En la **tabla 13** se presentan los datos obtenidos tras la administración de los distintos fármacos. Los resultados muestran que el día 1 del postoperatorio, el dexketoprofeno tiene un efecto antihiperalgésico mayor que el tramadol, alcanzando un efecto del 80%, mientras que el tramadol consigue un 32%. La combinación induce un efecto antihiperalgésico similar al del dexketoprofeno, mostrando que en la combinación, predomina el efecto antihiperalgésico de este fármaco.

## V. Resultados

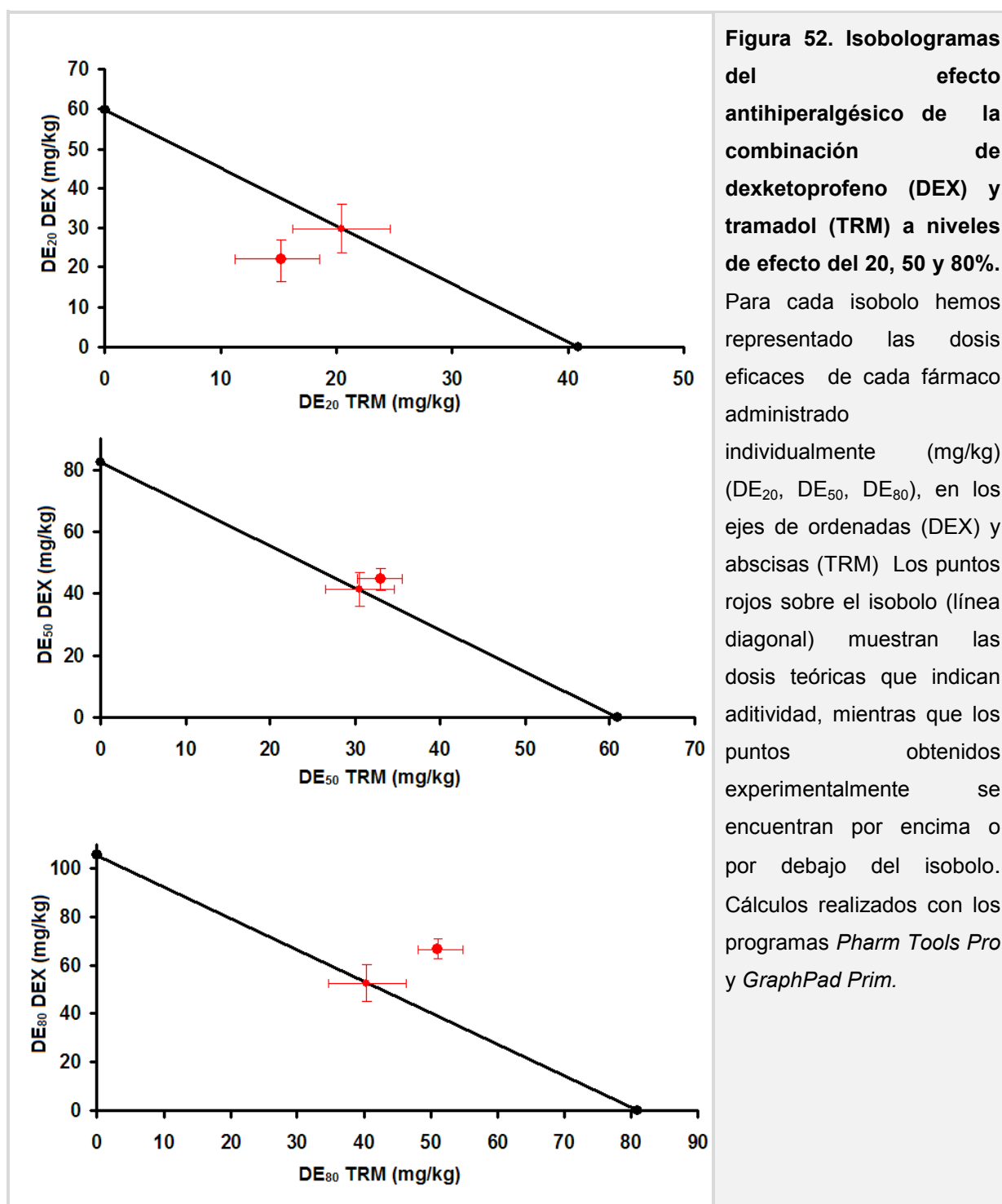
Fármaco	Dosis (mg/kg)	Umbrales nociceptivos (g)	Efecto antihiperalgésico (%)	E <sub>max</sub>	Pendiente
DEX	50	0,53±0,03	9,24±6,59		
	70	0,67±0,01	30,55±3,03	118,3 ±25,38	1,51
	100	0,97±0,09	83,76±12,70		
TRM	25	0,41±0,03	15,37±5,71		
	50	0,60±0,03	23,42±7,34	42,36±29,58	0,21
	100	0,70±0,06	32,10±9,61		
DEX:TRM	20,64+15,23	0,49±0,02	16,47±3,94		
	41,29+30,46	0,62±0,03	33,87±4,02	99,43±11,44	0,58
	82,58+60,93	0,96±0,03	78,64±4,67		

**Tabla 13. Dosis- respuestas al dexketoprofeno (DEX), tramadol (TRM) y su combinación 1:1 (DEX:TRM), el día 1 del postoperatorio.** Se muestran los umbrales nociceptivos frente a la estimulación mecánica en gramos (g) y los porcentajes de efecto antihiperalgésico ± E.E.M de las diferentes dosis utilizadas. Se incluye también la pendiente de la recta de cada dosis-respuesta y la eficacia máxima (E<sub>max</sub>).

Cálculos realizados con los programas *Pharm Tools Pro* y *GraphPad Prim*.

Con los datos obtenidos, se calcularon los índices de interacción (I.I., descritos en el apartado de material y métodos) y se representaron los isobogramas para cada nivel de efecto (**figura 52 y tabla 14**). Los resultados muestran que no hay interacción entre el efecto antihiperalgésico del dexketoprofeno y el tramadol, existiendo *aditividad* entre los mismos. Dibujado sobre cada isobolo (línea diagonal) de la **figura 52** mostramos las dosis teóricas que indican aditividad o suma de efectos; los puntos obtenidos experimentalmente se muestran en torno al isobolo. Para cada nivel de efecto, se calcularon I.I.; este parámetro, indica el tipo de interacción entre los fármacos (dexketoprofeno-tramadol). Así, un valor de 1 indica aditividad, mientras que un valor superior o inferior a 1 indica antagonismo o sinergia, respectivamente. En nuestro caso los valores de I.I. fueron 0,747, 1,082 y 1,282, para los

niveles de efecto 20, 50 y 80%, respectivamente (**tabla 14**). Aunque el cálculo de este parámetro pudo sugerir que se produce sinergia y antagonismo a los niveles 20 y 80%, respectivamente, el análisis estadístico (*t de student*) (**ver métodos**) indicó que la comparación de los valores teóricos (T) y experimentales (t') no mostraban diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ), demostrando que existe aditividad o suma de efectos en ambos casos.





## V. Resultados

La **tabla 14** muestra las dosis eficaces 20, 50 y 80, con los intervalos de confianza para el dexketoprofeno, tramadol y su combinación 1:1 en base a su potencia antihiperalgésica. Además también se muestran los I.I para cada nivel de efecto. Estos datos resumen el efecto aditivo de esta combinación para el 20, 50 y 80% de efecto antihiperalgésico.

Dosis eficaz (DE, mg/kg)	Tratamiento			Índice interacción (II)
	DEX	TRM	DEX:TRM	
DE <sub>20</sub> [Inter. Conf.]	59,64±3,55 [50,72-66,08]	40,92±6,62 [21,96-53,20]	37,56±4,36 [27,70-45,63]	0,747
DE <sub>50</sub> [Inter. Conf.]	82,58±3,61 [76,11-91,78]	60,93±5,82 [48,19-75,05]	77,62±3,03 [71,28-83,68]	1,082
DE <sub>80</sub> [Inter. Conf.]	105,50±6,32 [95,41-123,57]	80,94±7,37 [68,04-103,29]	117,68±3,71 [110,68-125,92]	1,282

**Tabla 14. Dosis eficaces del dexketoprofeno (DEX), tramadol (TRM) y su combinación (DEX:TRM) el día 1 del postoperatorio. Índice de interacción (I.I).** Para cada tratamiento y nivel de efecto (20, 50 y 80) se muestran las dosis eficaces así como los intervalos de confianza [Inter. Conf.] (mg/kg) y los índices de interacción (I.I).

Cálculos realizados con los programas *Pharm Tools Pro* y *GraphPad Prim*.

El efecto de la combinación fue evaluado también los días 1 y también los días 20-21, tras la administración de salino o naloxona. Los experimentos fueron realizados en dos grupos de animales que recibieron salino (INC+SS) o una combinación de dexketoprofeno y tramadol en una proporción 1:1 (grupo INC+DEX+TRM) antes de finalizar la cirugía. Las dosis de la combinación utilizadas fueron: 82,58 mg/kg (DE<sub>50</sub> DEX) + 60,93 mg/kg (DE<sub>50</sub> TRM).

En estos ratones, los valores basales fueron  $1,12 \pm 0,03g$  y  $1,12 \pm 0,01g$  para los grupos INC+SS e INC+DEX+TRM, respectivamente. El día 1 del postoperatorio, la cirugía (grupo INC+SS) provocó una disminución significativa de los umbrales nociceptivos ( $p < 0,001$  vs basal), que fue parcialmente prevenida por la combinación (grupo INC+DEX+TRM) ( $p < 0,001$

respecto a INC+SS); con un efecto antihiperalgésico del  $78,64 \pm 4,67$  % (**figura 53A, tabla 15**).

El día 20 del postoperatorio, tras la administración de salino, los umbrales nociceptivos fueron similares a los basales ( $1,09 \pm 0,01$ g y  $1,09 \pm 0,02$ g para los grupos INC+SS e INC+DEX+TRM) mostrando que los animales se habían recuperado por completo de la cirugía. El día 21, la administración de naloxona, provocó nuevamente una reducción de los umbrales nociceptivos en el grupo INC+SS ( $0,49 \pm 0,05$ g,  $p < 0,001$  vs basal) y en el grupo INC+DEX+TRM ( $0,73 \pm 0,60$ g); sin embargo, la hiperalgnesia en el grupo tratado con la combinación, fue significativamente menor ( $p < 0,001$ ) a la que experimentaron los animales que recibieron salino. Así, la administración intraoperatoria de la combinación dexketoprofeno y tramadol (grupo INC+DEX+TRM) proporcionó un efecto antihiperalgésico del  $32,02 \pm 9,80$ % (**figura 53A, tabla 15**).

En la **figura 53B** se muestra la magnitud de cambio de los umbrales nociceptivos; los porcentajes de cambios el día 1 fueron  $-56,38 \pm 2,42$ % y  $-13,99 \pm 3,06$ % para los grupos INC+SS e INC+DEX+TRM. El día 20 del postoperatorio, el salino no provocó cambio alguno (valores de  $-0,85 \pm 6,97$ % y  $-3,07 \pm 1,42$ %), mientras que la naloxona (día 21), indujo un cambio (hiperalgesia) del  $-48,26 \pm 5,44$ % en el grupo INC+SS y un cambio algo menor de  $-30,35 \pm 2,78$ % en el grupo que había recibido la combinación.

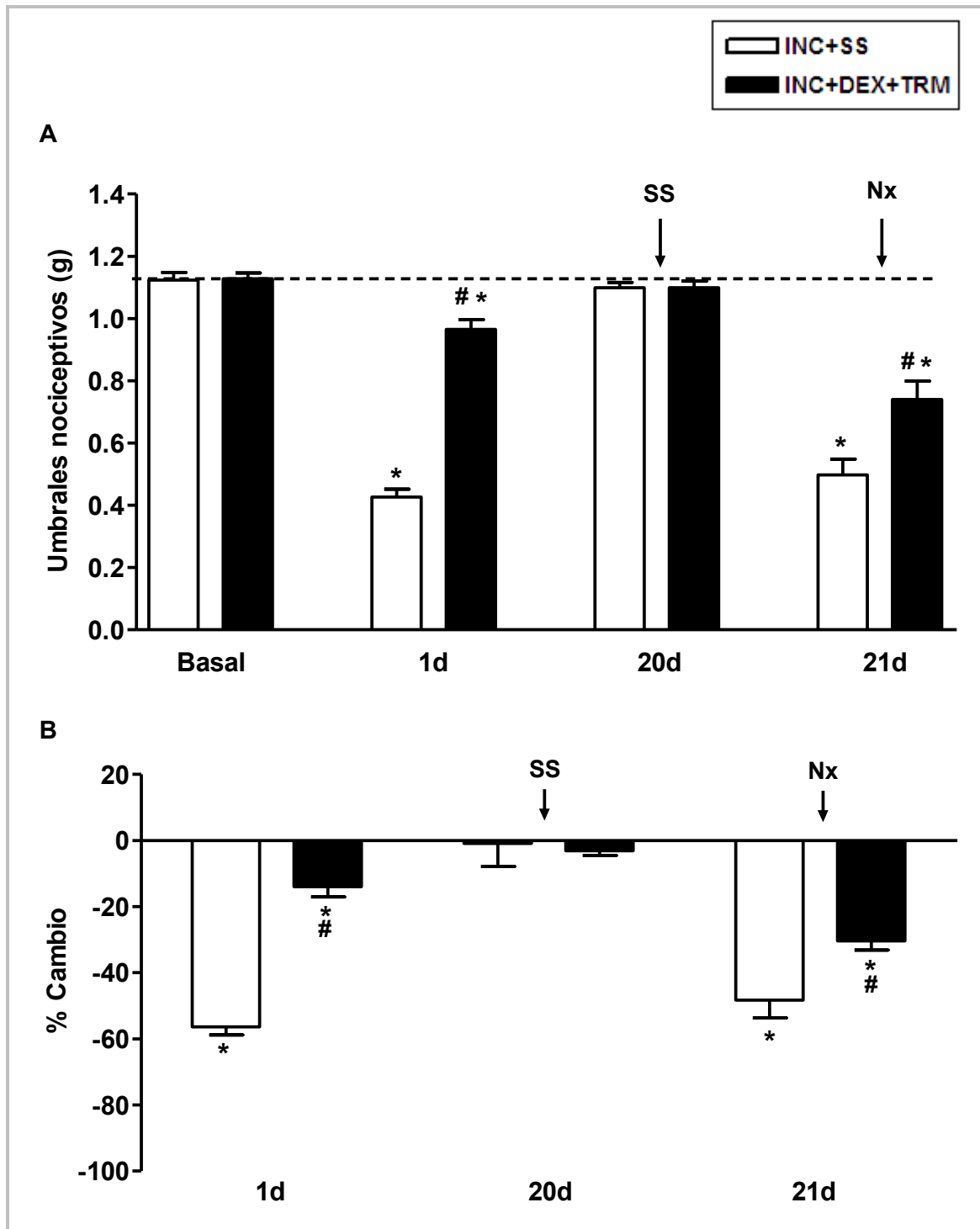


Figura 53. Efecto de la combinación DEXKETOPROFENO:TRAMADOL sobre la hiperalgesia postoperatoria y la sensibilidad latente al dolor. Para cada tiempo de evaluación mostramos los umbrales nociceptivos en gramos (A) y el porcentaje (%) de cambio respecto al valor basal (B)  $\pm$  E.E.M. Los animales recibieron salino (grupo INC+SS, barras blancas) o la combinación dexketoprofeno:tramadol 1:1 (INC+DEX+TRM, barras negras) antes de finalizar la cirugía. Los días 20 y 21, recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la evaluación. La línea discontinua (A) indica el valor basal medio. ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs B; # $p < 0,001$  vs INC+SS.

En la **tabla 15** se muestran los valores de los umbrales nociceptivos obtenidos en los dos grupos en los distintos tiempos de evaluación, y el efecto antihiperalgésico de la combinación dexketoprofeno y tramadol. Los resultados muestran que la combinación (grupo INC+DEX+TRM) es capaz de prevenir parcialmente la hiperalgnesia tanto el día 1 como el día 21 (después de naloxona), aunque el efecto antihiperalgésico es mayor en el período inicial (HPO, 1d) que no en el tardío (SLD, 21d+Nx).

Tiempo	INC+SS	INC + DEX+TRM	
	Umbrales nociceptivos (g)	Umbrales nociceptivos (g)	Efecto antihiperalgésico (%)
Basal	1,12 ± 0,03	1,12 ± 0,01	-
1d	0,42 ± 0,02 *	0,96 ± 0,03 *#	78,64 ± 4,67 #
20d+SS	1,09 ± 0,01	1,09 ± 0,02	-
21d+Nx	0,49 ± 0,05 *	0,73 ± 0,60 *#	32,02 ± 9,80 #

**Tabla 15. Efecto de la combinación DEXKETOPROFENO (DEX) y TRAMADOL (TRM) sobre la hiperalgnesia inducida por la incisión quirúrgica.** Se muestran los umbrales nociceptivos (g) y el porcentaje (%) de efecto antihiperalgésico de la combinación grupo (INC+DEX+TRM) respecto el grupo INC+SS ± E.E.M. El día 20 y 21 del postoperatorio, los animales recibieron salino (SS) y naloxona (Nx), respectivamente, antes de la evaluación. INC, incisión plantar. ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey).

\*p<0,001 vs B; #p<0,001 vs INC+SS

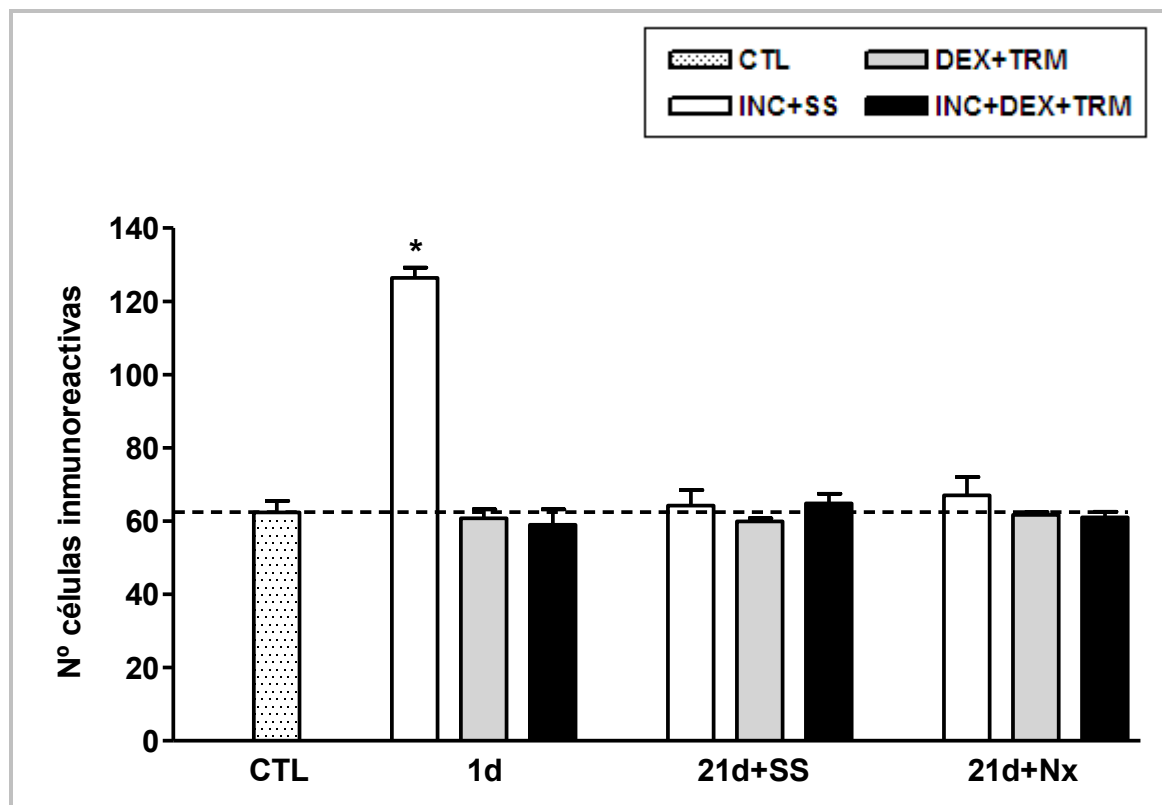
### Inmunoreactividad de la microglía en la médula espinal

En las mismas condiciones experimentales, evaluamos también el efecto de la combinación sobre la activación de las células de glía en la médula espinal. El valor medio del número de células de *microglía* en condiciones basales (CTL) fue  $62,38 \pm 3,14$ , siendo este el promedio de los valores obtenidos en los diferentes grupos de estudio: DEX+TRM, INC+SS, e INC+DEX+TRM ( $63,50 \pm 7,98$ ,  $62,00 \pm 5,49$ , y  $61,80 \pm 4,54$ , respectivamente). La cirugía (INC+SS) indujo un aumento significativo ( $p<0,001$  frente al CTL) de las células de microglía inmunoreactivas el día 1 del postoperatorio siendo este valor de  $126,37 \pm 2,79$ . La administración de la combinación (grupo INC+DEX+TRM) impidió este incremento de inmunoreactividad, siendo el número de células activadas similar al control ( $59,00 \pm 4,24$ ).

## V. Resultados

Así, la combinación provocó una inhibición de la activación de la microglía del  $104,33 \pm 6,57\%$ . La combinación no tuvo efecto alguno en animales *sham*-operados (grupo DEX+TRM), donde el número de células inmunoreactivas de microglía fue  $60,70 \pm 2,46$  (figura 54, tabla 16).

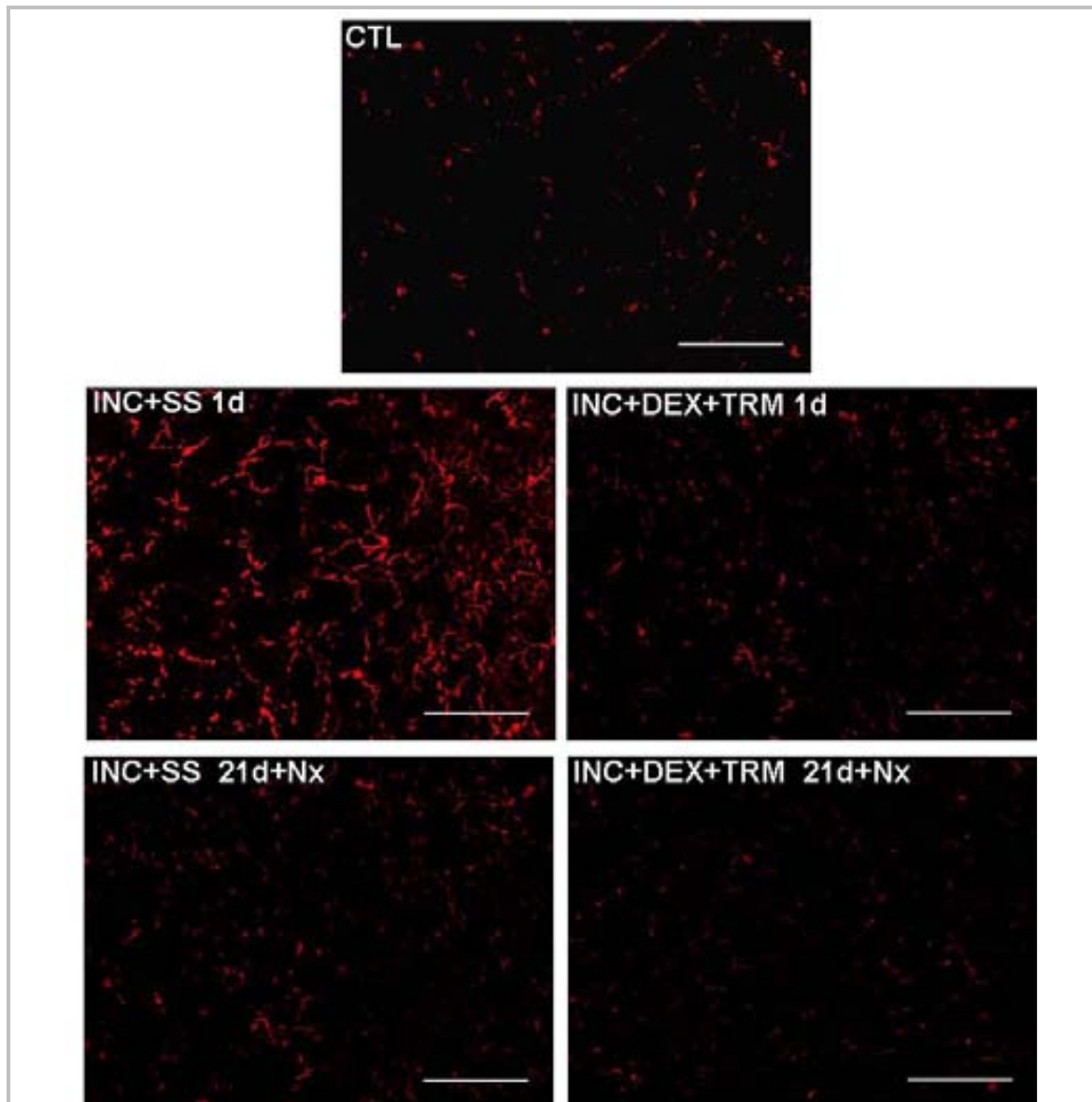
El día 21, tras la administración de salino, los animales de los tres grupos mostraron valores de inmunoreactividad similares a los de los controles, siendo de  $64,21 \pm 4,24$ ,  $59,88 \pm 0,88$  y  $64,85 \pm 2,61$  para los grupos INC+SS, DEX+TRM e INC+DEX+TRM. Asimismo, la administración de naloxona no indujo ningún cambio en el estado de reposo de las células de microglía en ninguno de los grupos ( $67,07 \pm 4,92$ ,  $61,71 \pm 0,77$  y  $61,00$ ).



**Figura 54. Efecto de la combinación DEXKETOPROFENO (DEX) y TRAMADOL (TRM) sobre la activación de la MICROGLÍA espinal inducida por la incisión (INC).** Se muestran el número de células inmunoreactivas de microglía en animales control (CTL, barra punteada), y que recibieron la combinación dexketoprofeno mas tramadol en una proporción 1:1 (INC+DEX+TRM, barras negras) o salino (INC+SS, barras blancas) antes de finalizar la cirugía. El efecto de la combinación de dexketoprofeno y tramadol (DEX+TRM, barras grises) se evaluó a los mismos tiempos en animales *sham*-operados (sin cirugía). La línea discontinua indica el valor medio de los controles. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs CTL.

En la figura 55, se muestran microfotografías representativas de los controles, y de los grupos INC+SS e INC+DEX+TRM los días 1 y 21, tras la administración de Nx. En ellas, se

puede apreciar como el día 1 tras la cirugía, únicamente existe hipertrofia de la microglía (asociada con su activación) en los animales que recibieron salino (INC+SS), mientras que los ratones que recibieron la combinación (INC+DEX+TRM) mostraron niveles de activación de la microglía similares al control. Se observa también que la administración de Nx el día 21 no modificó el número de células inmunoreactivas que fue similar al control.



**Figura 55. Microfotografías representativas que muestran el efecto de la combinación de DEXKETOPROFENO (DEX) y TRAMADOL (TRM) sobre la activación de la MICROGLÍA espinal (inmunoreactividad).** Se muestran ejemplos en condiciones control (CTL), y a los 1 y 21 días después de la incisión (INC), en los grupos que recibieron la combinación (INC+DEX+TRM) o salino (INC+SS). La administración de naloxona (Nx) el día 21 no tuvo efecto sobre la activación de la microglía. Línea blanca, escala: 50 $\mu$ m (objetivo 20x).

## V. Resultados

La **tabla 16** muestra un resumen de los datos obtenidos; se puede apreciar que la combinación dexketoprofeno mas tramadol (INC+DEX+TRM) previene completamente la activación microglial inducida por la cirugía (INC+SS). Este efecto podría reflejar la suma de los efectos observados cuando se administran cada uno de los fármacos individualmente (**figuras 42 y 47; tablas 8 y 11**)

El día 21 tras la administración de Nx, no se observó reactivación de la microglía en ninguno de los grupos de estudio. Por último mencionar que la combinación administrada en ausencia de cirugía (grupo DEX+TRM) no provocó ningún cambio en ninguno de los tiempos evaluados.

Tiempo	MICROGLÍA			
	INC+SS	DEX+TRM	INC+DEX+TRM	
	Nº células inmunoreactivas	Nº células inmunoreactivas	Nº células inmunoreactivas	Inhibición de la activación (%)
<b>Control</b>	62,00 ± 5,49	63,50 ± 7,98	61,80 ± 4,54	-
<b>1d</b>	126,37 ± 2,79 *	60,7 ± 2,46	59,00 ± 4,24 <sup>#</sup>	104,33 ± 6,57 <sup>#</sup>
<b>21d+SS</b>	64,21 ± 4,24	59,88 ± 0,88	64,85 ± 2,61	-
<b>21d+Nx</b>	67,07 ± 4,92	61,71 ± 0,77	61,00 ± 1,55	-

**Tabla 16. Efecto de la combinación DEXKETOPROFENO (DEX) y TRAMADOL (TRM) sobre la activación de la MICROGLÍA.** Para los tres grupos evaluados, se muestra el número de células inmunoreactivas ± E.E.M en condiciones control y en los días 1 y 21 del después de la incisión (INC). Los ratones recibieron salino (grupo INC+SS) o la combinación de dexketoprofeno y tramadol (INC+DEX+TRM) durante la cirugía; el día 21 recibieron además una inyección de naloxona (Nx) o salino (SS). El grupo dexketoprofeno mas tramadol (DEX+TRM) no fue intervenido quirúrgicamente (operado *sham*). Para el grupo INC+DEX+TRM se muestra también el porcentaje (%) de inhibición de la activación glial. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \*p<0,001 vs control; #p<0,001 vs INC+SS.

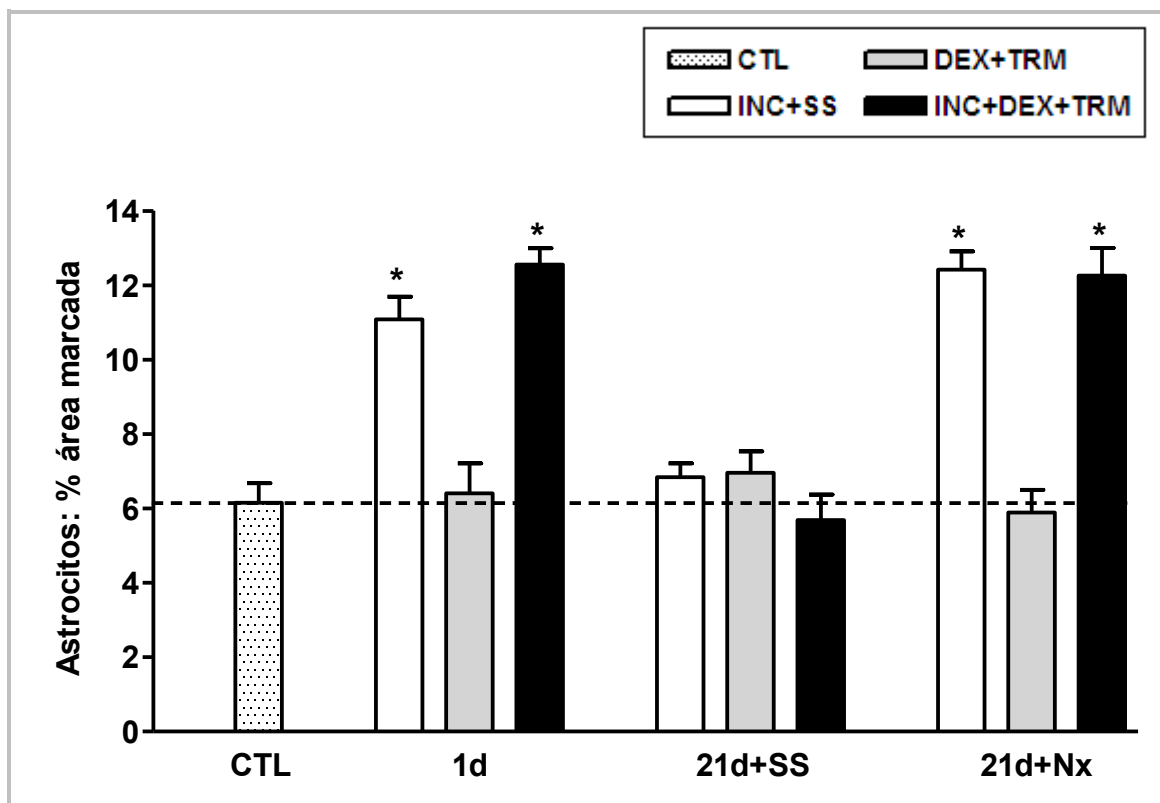
### Inmunoreactividad de los astrocitos en la médula espinal

El valor medio del porcentaje (%) de área marcada inmunoreactiva para los *astrocitos*, fue de un  $6,15 \pm 0,52\%$  siendo este valor obtenido de la evaluación de los controles en los grupos INC+SS, DEX+TRM e INC+DEX+TRM ( $6,10 \pm 1,15\%$ ,  $6,06 \pm 1,29\%$  y  $6,27 \pm 0,39\%$ , respectivamente).

La cirugía (INC+SS) indujo activación astrocitaria el día 1 del postoperatorio con un porcentaje de área inmunoreactiva del  $11,08 \pm 0,60\%$  ( $p < 0,001$  vs CTL). La combinación (grupo INC+DEX+TRM), no modificó el aumento de la inmunoreactividad inducida por la cirugía, siendo el porcentaje de área marcada similar al observado en el grupo INC+SS ( $12,55 \pm 0,44\%$ ,  $p < 0,001$  respecto al CTL). Los animales operados *sham* que únicamente recibieron la combinación (grupo DEX+TRM), no modificaron la inmunoreactividad 1 día post-administración ( $6,41 \pm 0,80\%$ ) (**figura 56, tabla 17**).

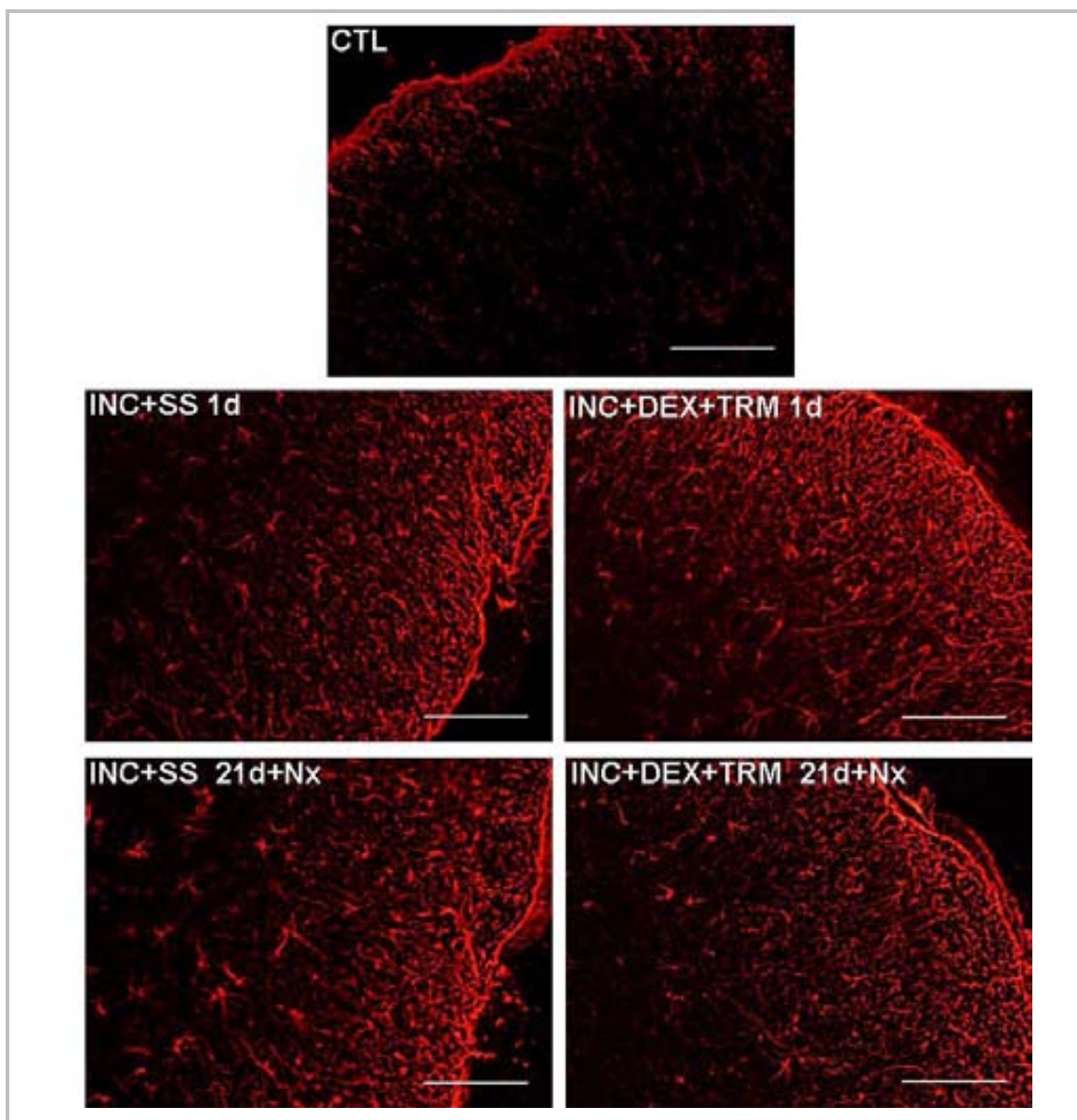
El día 21, tras la administración de salino, todos los grupos mostraron valores de inmunoreactividad similares a los del estado de reposo (CTL), siendo estos porcentajes de  $6,84 \pm 0,37\%$ ,  $6,96 \pm 0,57\%$  y  $5,96 \pm 0,68\%$  para los grupos INC+SS, DEX+TRM e INC+DEX+TRM, respectivamente. La administración de naloxona indujo una reactivación astrocitaria similar a la del día 1, tanto en el grupo INC+SS como en el INC+DEX+TRM ( $12,42 \pm 0,49\%$  y  $12,25 \pm 0,74\%$ , respectivamente,  $p < 0,001$  vs CTL): Estos resultados demuestran que la combinación carece de efecto preventivo sobre la reactivación astrocitaria inducida tras la administración de naloxona. El grupo DEX+TRM no mostró cambios significativos tras la administración de Nx ( $5,88 \pm 0,60\%$ ) (**figura 56, tabla 17**). Por tanto la combinación carece de efecto sobre la activación y reactivación astrocitaria.





**Figura 56. Efecto de la combinación DEXKETOPROFENO (DEX) y TRAMADOL (TRM) sobre la activación de los ASTROCITOS espinales inducida por la incisión (INC).** Se muestra el porcentaje (%) de área marcada de los astrocitos  $\pm$  E.E.M en animales control (CTL, barra punteada), y que recibieron la combinación dexketoprofeno mas tramadol (INC+DEX+TRM, barras negras) o salino (INC+SS, barras blancas) antes de finalizar la cirugía. El efecto de la combinación dexketoprofeno y tramadol (DEX+TRM, barras grises) se evaluó a los mismos tiempos en animales *sham*-operados. La línea horizontal discontinua indica el valor medio de los controles. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs CTL.

La **figura 57** muestra microfotografías representativas de la activación astrocitaria inducida por la cirugía el día 1 del postoperatorio y su reactivación el día 21 tras la administración de naloxona. También muestra como la combinación (INC+DEX+TRM) carece de efecto sobre la activación en ninguno de los tiempos evaluados.



**Figura 57. Microfotografías representativas que muestran el efecto de la combinación de DEXKETOPROFENO (DEX) y TRAMADOL (TRM) sobre la activación de los ASTROCITOS espinales (inmunoreactividad).** Se muestran ejemplos en condiciones control (CTL), y a los 1 y 21 días después de la incisión, en los grupos que recibieron la combinación (INC+DEX+TRM) o salino (INC+SS). La administración de naloxona (Nx) el día 21 provocó una reactivación astrocitaria en ambos grupos. Línea blanca, escala: 50 $\mu$ m (objetivo 20x).

La **tabla 17** muestra un resumen de los datos obtenidos al estudiar el efecto de la combinación sobre la activación astrocitaria en la médula espinal. La combinación no fue capaz de prevenir el aumento de inmunoreactividad inducida por la cirugía en ninguno de los dos períodos; estos resultados son similares a los obtenidos al evaluar el efecto de los fármacos administrados individualmente (**tabla 9 y 12**). Por tanto, el efecto antihiperálgico

## V. Resultados

parcial de la combinación observado al evaluar el comportamiento nociceptivo (**figura 53**) parece ser independiente de la inhibición de astrocitaria.

Cabe destacar que en animales *sham*-operados la combinación no provocó activación astrocitaria, a diferencia de cuando se administra tramadol individualmente (**figura 49**).

Tiempo	ASTROCITOS			
	INC+SS	DEX+TRM	INC+DEX+TRM	Inhibición de la activación (%)
	% Área marcada	% Área marcada	% Área marcada	
<b>Control</b>	6,10 ± 1,15	6,06 ± 1,29	6,27 ± 0,39	-
<b>1d</b>	11,08 ± 0,60 *	6,41 ± 0,80	12,55 ± 0,44 *	-30,60 ± 9,16
<b>21d+SS</b>	6,84 ± 0,37	6,96 ± 0,57	5,69 ± 0,68	-
<b>21d+Nx</b>	12,42 ± 0,49 *	5,88 ± 0,60	12,25 ± 0,74 *	2,66 ± 12,16

**Tabla 17. Efecto de la combinación DEXKETOPROFENO (DEX) y TRAMADOL (TRM) sobre la activación de los ASTROCITOS.** Para los tres grupos evaluados, se muestra el porcentaje (%) de área marcada ± E.E.M en condiciones control y en los días 1 y 21 del postoperatorio. Los ratones recibieron salino (grupo INC+SS) o la combinación dexketoprofeno y tramadol (INC+DEX+TRM) durante la cirugía (INC); el día 21 recibieron además una inyección de salino (SS) o naloxona (Nx). El grupo DEX+TRM no fue intervenido quirúrgicamente (operado *sham*). Para el grupo INC+DEX+TRM se muestra también el porcentaje (%) de inhibición de la activación glial. Los valores negativos indican que la inmunoreactividad fue ligeramente superior, pero no significativa ( $p > 0,05$ ), respecto al grupo INC+SS. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs control.

La **tabla 18**, resume los resultados obtenidos en los estudios de comportamiento e inmunohistoquímica. Se muestra el efecto del dexketoprofeno, el tramadol y su combinación sobre la inhibición de la hiperalgia mecánica postoperatoria y la actividad glial en la médula espinal

El día 1 postcirugía, el efecto antihiperalgésico de la combinación fue similar al del dexketoprofeno, mientras que el del tramadol fue significativamente ( $p < 0,05$ ) menor. Sin embargo, el día 21 tras la administración de naloxona, la combinación proporcionó un efecto antihiperalgésico similar al del tramadol administrado individualmente. El efecto doble de la

combinación sobre la HPO y la SLD, podría justificar su utilización en la práctica clínica como analgésicos / antihiperalgésico (**tabla 18**).

El día 1 del postoperatorio, todos los tratamientos fueron capaces de inhibir la activación de la microglía de forma similar; sin embargo no modificaron la activación de los astrocitos. El día 21 del postoperatorio la administración de naloxona induce una reactivación astrocitaria que podría estar relacionada con la presencia de hiperalgnesia, en este tiempo de evaluación. La inhibición parcial de la aparición de SLD inducida por el tramadol, solo o combinado con dexketoprofeno, no parece estar relacionado con la reactivación astrocitaria. De esta forma este opioide menor ejerce un efecto protector del desarrollo de SLD sin alterar la activación astrocitaria (**tabla 18**).

V. Resultados

Tratamiento	DÍA 1 DEL POSTOPERATORIO			DÍA 21 DEL POSTOPERATORIO + NALOXONA	
	Efecto antihiperalgésico (%)	Inhibición de la activación (%) MICROGLÍA	Inhibición de la activación (%) ASTROCITOS	Efecto antihiperalgésico (%)	Inhibición de la activación (%) ASTROCITOS
DEX (100 mg/kg)	83,76 ± 12,70 <sup>* #</sup>	105,03 ± 8,96 <sup>*</sup>	-27,56 ± 8,46	6,07±7,9	-9,36 ± 7,74
TRM (100 mg/kg)	32,10 ± 9,61 <sup>*</sup>	76,69 ± 7,08 <sup>*</sup>	-14,83 ± 6,87	46,53±8,10 <sup>* +</sup>	0,30 ± 8,61
DEX: TRM (82,58:60,93 mg/kg)	78,64 ± 4,67 <sup>* #</sup>	104,33 ± 6,57 <sup>*</sup>	-30,60 ± 9,16	32,02±9,8 <sup>* +</sup>	2,66 ± 12,16

**Tabla 18. Resumen del efecto antihiperalgésico e inhibidor de la glía del dexketoprofeno (DEX), tramadol (TRM) y su combinación en una proporción 1:1 (DEX:TRM) los días 1 y 21 del postoperatorio.** Se muestra el porcentaje de efecto antihiperalgésico y la inhibición de la activación (disminución inmunoreactividad) de la microglía y los astrocitos ± E.E.M. Los numero negativos indican que la inmunoreactividad fue ligeramente superior, pero no significativa (p>0,05), al grupo INC+SS. En ninguno de los experimentos realizados se observo reactivación de la microglía tras la administración de naloxona.

\* p<0,001 vs INC+SS; # p<0,001 vs TRM; + p<0,001 vs DEX

### 3. PREVENCIÓN DE LA HIPERALGESIA POSTOPERATORIA Y LA SENSIBILIZACIÓN LATENTE AL DOLOR MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE KETAMINA O GABAPENTINA. EFECTO SOBRE LA ACTIVACIÓN GLIAL.

En este apartado se evaluó el efecto de la *ketamina* (antagonista NMDA) y la *gabapentina* (anticonvulsivante) en la prevención de la hiperalgesia postoperatoria (HPO) así como la aparición de sensibilización latente al dolor (SLD), fenómeno que constituye la base para el desarrollo de dolor crónico post quirúrgico (DCPQ). Asimismo, se estudió el efecto de ambos fármacos sobre la activación de la glía espinal (microglía y astrocitos). Estos fármacos, son de especial interés dado que son los únicos que han demostrado, hasta el momento, una acción preventiva sobre la aparición de DCPQ en humanos (Chaparro LE y cols., 2013, Clarke H y cols, 2012). Nuestro objetivo era establecer si la activación de la glía participaba en la prevención del DCPQ que producen estos fármacos.

#### 3.1 Efectos de la ketamina

##### Comportamiento nociceptivo

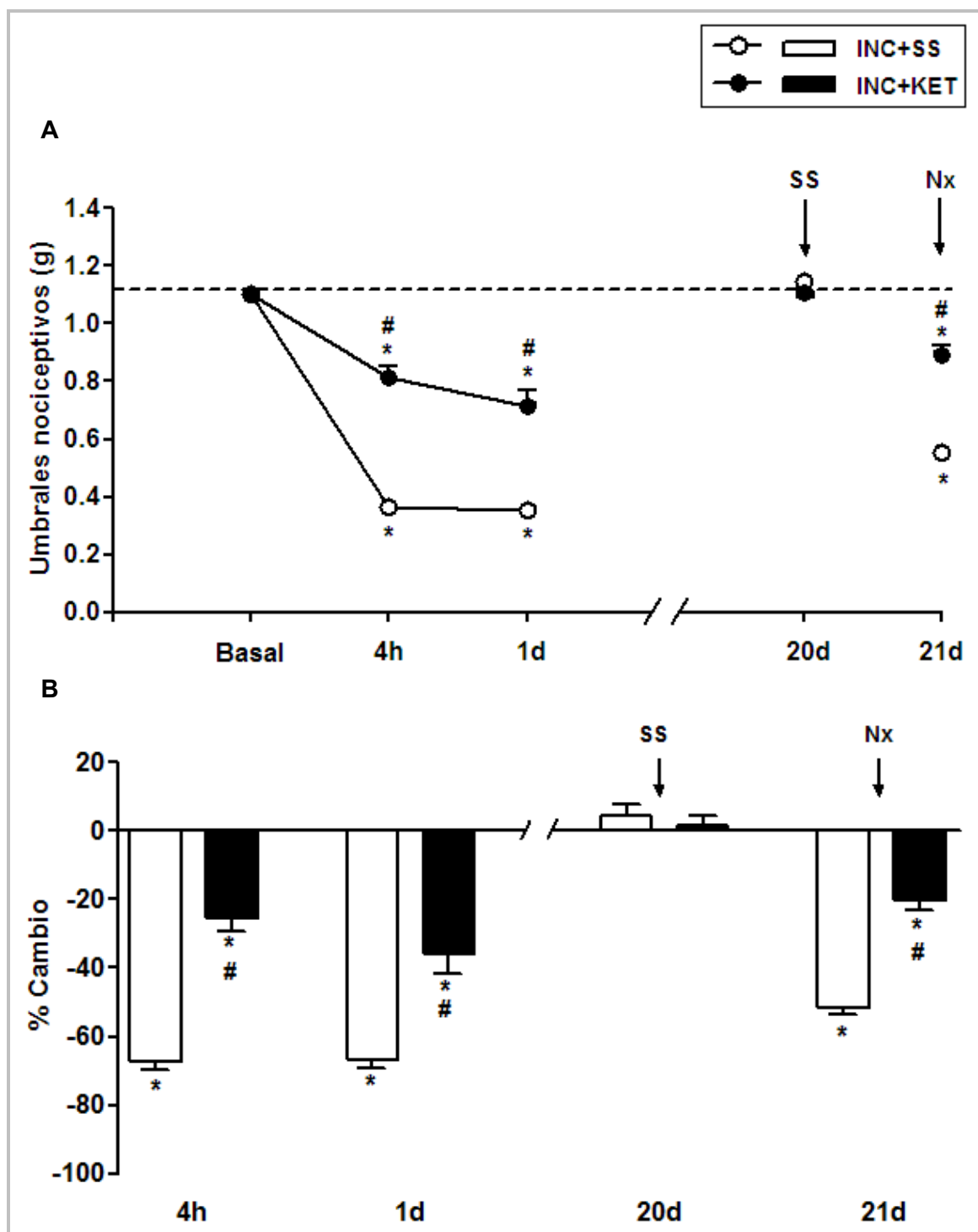
Para estudiar el efecto de la ketamina (KET) sobre la HPO, la SLD y la activación glial, utilizamos dos grupos de animales a los que antes de finalizar la cirugía (INC), se les administró una dosis única de salino (grupo INC+SS) o 50 mg/kg ketamina sc (INC+KET). Los umbrales nociceptivos a la estimulación mecánica fueron evaluados a distintos tiempos (ver Métodos). Antes de la incisión plantar los umbrales basales (B) fueron  $1,10 \pm 0,02$ g y  $1,09 \pm 0,02$ g, para los grupos INC+SS y INC+KET. En el grupo INC+SS, la incisión provocó una disminución de los umbrales nociceptivos tras la intervención ( $0,36 \pm 0,02$ g,  $0,35 \pm 0,11$ g, respectivamente;  $p < 0,001$  vs B). La hiperalgesia fue significativamente menor en el grupo INC+KET ( $0,81 \pm 0,03$ g,  $0,71 \pm 0,05$ g,  $p < 0,001$ ), que mostró un efecto antihiperalgésico del  $61,87 \pm 5,18\%$  y del  $46,44 \pm 8,50\%$  a los tiempos 4 horas y 1 día del postoperatorio (**figura 58A, tabla 19**).

El día 20, tras la administración de salino, los umbrales nociceptivos en ambos grupos habían vuelto a los basales ( $1,14 \pm 0,02$ g,  $1,11 \pm 0,01$ g); sin embargo, la administración de naloxona el día 21 provocó de nuevo hiperalgesia en los grupos INC+SS ( $0,55 \pm 0,01$ ;  $p < 0,001$  vs B) e INC+KET ( $0,89 \pm 0,03$ g,  $p < 0,001$  vs B), siendo la magnitud de ésta última significativamente menor ( $p < 0,001$  vs INC+SS). De este modo la ketamina demostró un efecto preventivo sobre la aparición de SLD (efecto antihiperalgésico) del  $60,44 \pm 4,96\%$  (**figura 58A, tabla 19**).

## V. Resultados

En la **figura 58B** se muestra el porcentaje de cambio respecto a sus valores basales en ambos grupos de estudio. El grupo INC+SS mostró un cambio de  $-67,41 \pm 2,21\%$  y  $-66,84 \pm 2,25\%$  4 horas y 1 día tras la cirugía, mientras que el % de cambio en el grupo INC+KET fue significativamente menor ( $-25,62 \pm 3,48\%$  y  $-35,80 \pm 5,68\%$ , respectivamente).

El % de cambio en ambos grupos fue prácticamente nulo con valores de  $4,23 \pm 3,58\%$  y  $1,58 \pm 3,04\%$  (INC+SS e INC+KET, respectivamente). En el grupo INC+SS, la administración de naloxona el día 21, indujo un cambio similar al del día 1 ( $-51,52 \pm 2,09\%$ ), cambio que fue menor en el grupo INC+KET ( $-20,38 \pm 2,55\%$ ) (**figura 58B**).



**Figura 58. Efecto de la KETAMINA sobre la hiperalgesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor.** Para cada tiempo de evaluación mostramos los umbrales nociceptivos en gramos (**A**) y el porcentaje (%) de cambio respecto al valor basal (**B**)  $\pm$  E.E.M. Los animales recibieron salino (grupo INC+SS, círculos/barras blancas) ó 50 mg/Kg ketamina (INC+KET, círculos/barras negras) antes de finalizar la cirugía. Los días 20 y 21, recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la evaluación. La línea discontinua (**A**) indica el valor basal medio. ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey).

\* $p < 0,001$  vs B; # $p < 0,001$  vs INC+SS.



## V. Resultados

En la **tabla 19** se muestra un resumen de los datos obtenidos, mostrando el efecto antihiperalgésico de la ketamina que fue significativo en los dos periodos de evaluación (HPO y SLD); la magnitud del efecto fue del 40-60%

Tiempo	INC+SS	INC + KETAMINA	
	Umbrales nociceptivos (g)	Umbrales nociceptivos (g)	Efecto antihiperalgésico (%)
<b>Basal</b>	1,10 ± 0,02	1,09 ± 0,02	-
<b>4h</b>	0,36 ± 0,02 *	0,81 ± 0,03 * #	61,87 ± 5,18
<b>1d</b>	0,35 ± 0,11 *	0,71 ± 0,05 * #	46,44 ± 8,50
<b>20d+SS</b>	1,14 ± 0,02	1,11 ± 0,01	-
<b>21d+Nx</b>	0,55 ± 0,01 *	0,89 ± 0,03 * #	60,44 ± 4,96

**Tabla 19. Efecto de la KETAMINA sobre la hiperalgnesia inducida por la incisión quirúrgica.** Se muestran los umbrales nociceptivos (g) y el porcentaje (%) de efecto antihiperalgésico de la ketamina (INC+KET) respecto al grupo control (INC+SS) ± E.E.M. Los días 20 y 21 del postoperatorio, los animales recibieron salino (SS) y naloxona (Nx), respectivamente, antes de la evaluación. ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs B; # $p < 0,001$  vs INC+SS

### Inmunoreactividad de la microglía en la medula espinal

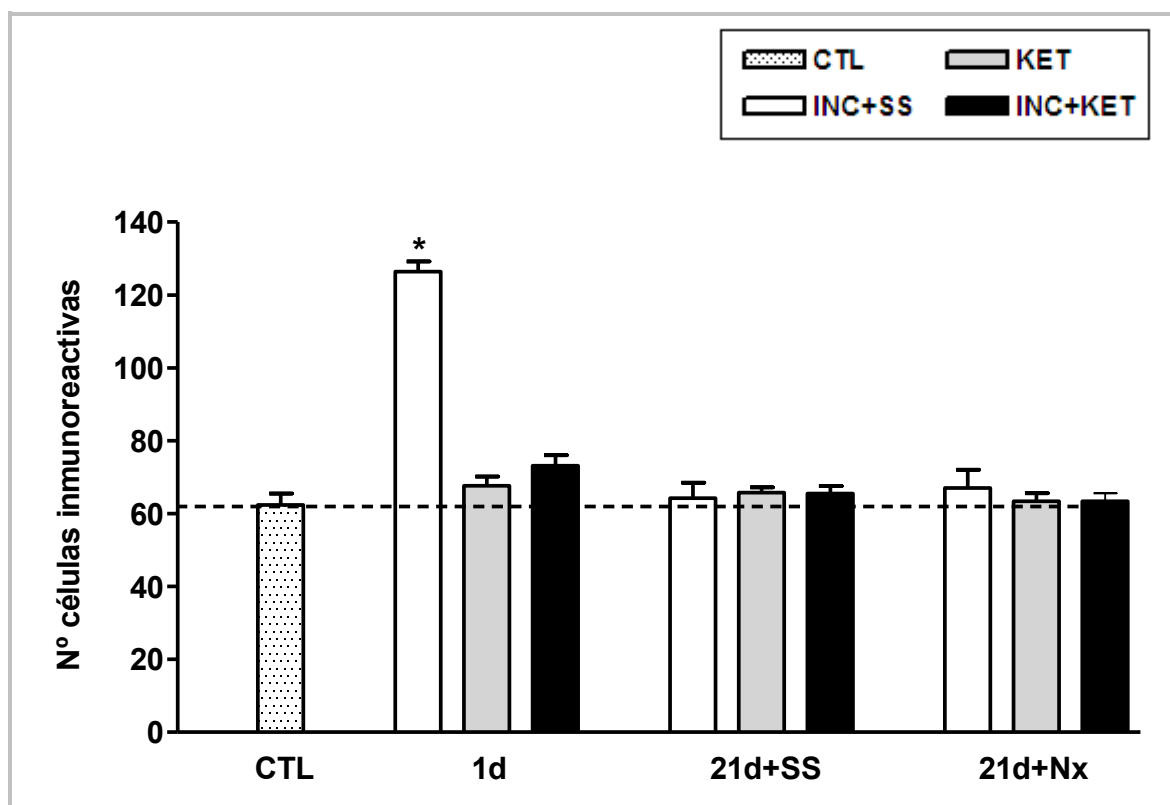
Tras evaluar el efecto de la ketamina sobre el comportamiento nociceptivo se evaluó su efecto sobre la activación de la microglía y los astrocitos a fin de establecer un posible paralelismo entre ambos.

Los experimentos fueron realizados en los mismos grupos experimentales (INC+SS e INC+KET) y además en animales *sham*-operados que recibieron la misma dosis de ketamina (grupo KET). El número de células de *microglía* inmunoreactivas en animales control fue de  $62,38 \pm 3,14$ , siendo éste el valor medio de los controles de los tres grupos estudiados INC+SS, KET e INC+KET ( $63,50 \pm 5,13$ ,  $62,00 \pm 8,21$  y  $61,80 \pm 4,54$ , respectivamente).

El día 1 del postoperatorio, la cirugía (INC+SS) provocó un incremento significativo del número de células inmunoreactivas ( $126,37 \pm 2,79$ ;  $p < 0,001$  vs CTL), que fue completamente bloqueado por la administración de ketamina, siendo el número de células

positivas en este grupo (INC+KET), similar al control ( $73,14 \pm 2,83$ ). Así, la administración de ketamina intraoperatoria provocó una inhibición de la activación microglial del  $82,42 \pm 4,38\%$  el día 1 del postoperatorio. En el mismo tiempo de evaluación, la administración del fármaco a animales *sham*-operados (grupo KET), no produjo ninguna alteración, manteniéndose el número de células activadas similar al control ( $67,61 \pm 2,55$ ) (**figuras 59 y 60, tabla 20**).

El día 21, tras la administración de salino, el número de células inmunoreactivas en todos los grupos evaluados (INC+SS, KET e INC+KET) fue similar al control ( $64,21 \pm 4,24$ ,  $65,76 \pm 1,45$  y  $65,55 \pm 1,99$ , respectivamente) demostrando que habían vuelto al estado de reposo. Del mismo modo, la administración de naloxona tampoco provocó activación de la microglía en ninguno de los grupos estudiados ( $67,07 \pm 4,92$ ,  $63,41 \pm 2,15$ ,  $63,41 \pm 2,15$ , respectivamente) (**figura 59, tabla 20**).

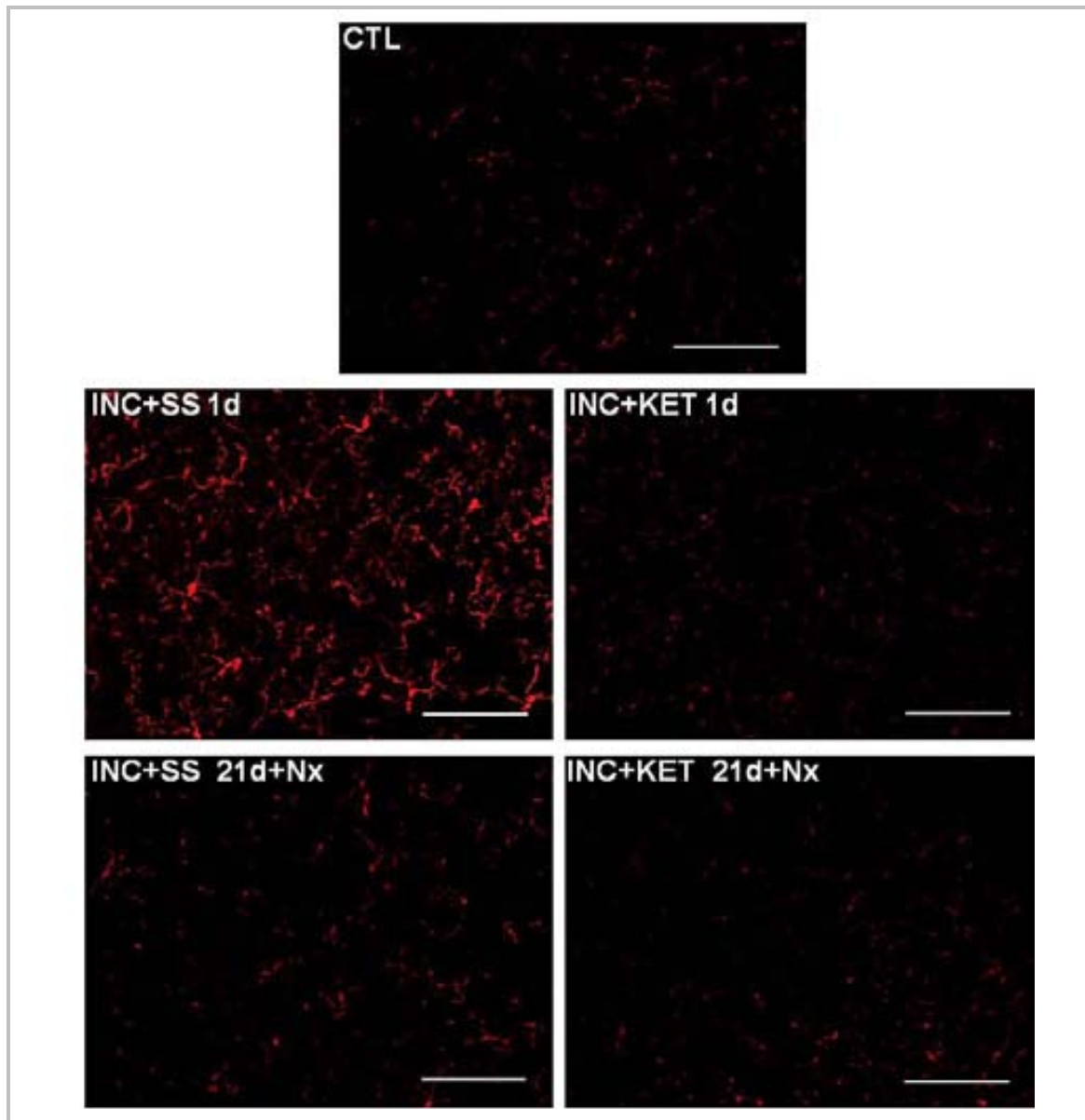


**Figura 59. Efecto de la KETAMINA sobre la activación de la MICROGLÍA espinal inducida por la incisión.** Se muestra el número de células inmunoreactivas de microglía  $\pm$  E.E.M en animales control (CTL, barra punteada), que animales recibieron 50 mg/kg ketamina (INC+KET, barras negras) o salino (INC+SS, barras blancas) y en animales *sham*-operados que recibieron ketamina (KET, barras grises). Las muestras de médula espinal se obtuvieron los días 1 y 21 post-manipulación. El día 21 los ratones recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la eutanasia. La línea discontinua indica el valor medio de los controles.

ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs CTL.

## V. Resultados

La **figura 60** muestra microfotografías representativas de los cambios morfológicos presentados por las células de microglía el día 1 tras la cirugía (grupo INC+SS), así como la prevención del incremento de inmunoreactividad inducida por la ketamina (INC+KET) el día 1 y el día 21 tras la administración de naloxona.



**Figura 60. Microfotografías representativas que muestran el efecto de la KETAMINA sobre la activación de la MICROGLÍA espinal (inmunoreactividad).** Se incluyen microfotografías en condiciones control (CTL), y a los 1 y 21 días después de la incisión, en los grupos que recibieron salino (INC+SS) o ketamina (INC+KET). La administración de naloxona (Nx) el día 21 no tuvo efecto sobre la activación de la microglía. Línea blanca, escala: 50 $\mu$ m (objetivo 20x).

La **tabla 20** muestra un resumen del efecto de la ketamina sobre la inmunoreactividad microglial. La ketamina fue capaz de prevenir por completo la activación de la microglía inducida por la cirugía el día 1 del postoperatorio. Paralelamente, el fármaco también impide parcialmente la hiperalgesia postoperatoria (aproximadamente en un 50%) aunque en la magnitud del efecto es menor. La ketamina en animales *sham*-operados no tuvo efecto alguno sobre la inmunoreactividad microglial.

MICROGLÍA				
Tiempo	INC+SS	KET	INC+KET	
	Nº células inmunoreactivas	Nº células inmunoreactivas	Nº células inmunoreactivas	Inhibición de la activación (%)
<b>Control</b>	63,50 ± 5,13	62,00 ± 8,21	61,80 ± 4,54	-
<b>1d</b>	126,37 ± 2,79 *	67,61 ± 2,55	73,14 ± 2,83 #	82,42 ± 4,38
<b>21d+SS</b>	64,21 ± 4,24	65,76 ± 1,45	65,55 ± 1,99	-
<b>21d+Nx</b>	67,07 ± 4,92	63,41 ± 2,15	63,41 ± 2,15	-

**Tabla 20. Efecto de la KETAMINA sobre la activación de la MICROGLÍA.** Para los tres grupos se muestra el número de células inmunoreactivas ± E.E.M en condiciones control y en los días 1 y 21 del postoperatorio. Los ratones recibieron salino (grupo INC+SS) o ketamina (INC+KET) durante la cirugía; el día 21 recibieron además una inyección de salino (SS) o naloxona (Nx). El grupo ketamina fue *sham*-operado (KET) y fue evaluado a los mismos tiempos. Para el grupo INC+KET se muestra también el porcentaje (%) de inhibición de la activación glial.

ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs control; # $p < 0,001$  vs INC+SS.

### Inmunoreactividad de los astrocitos en la medula espinal

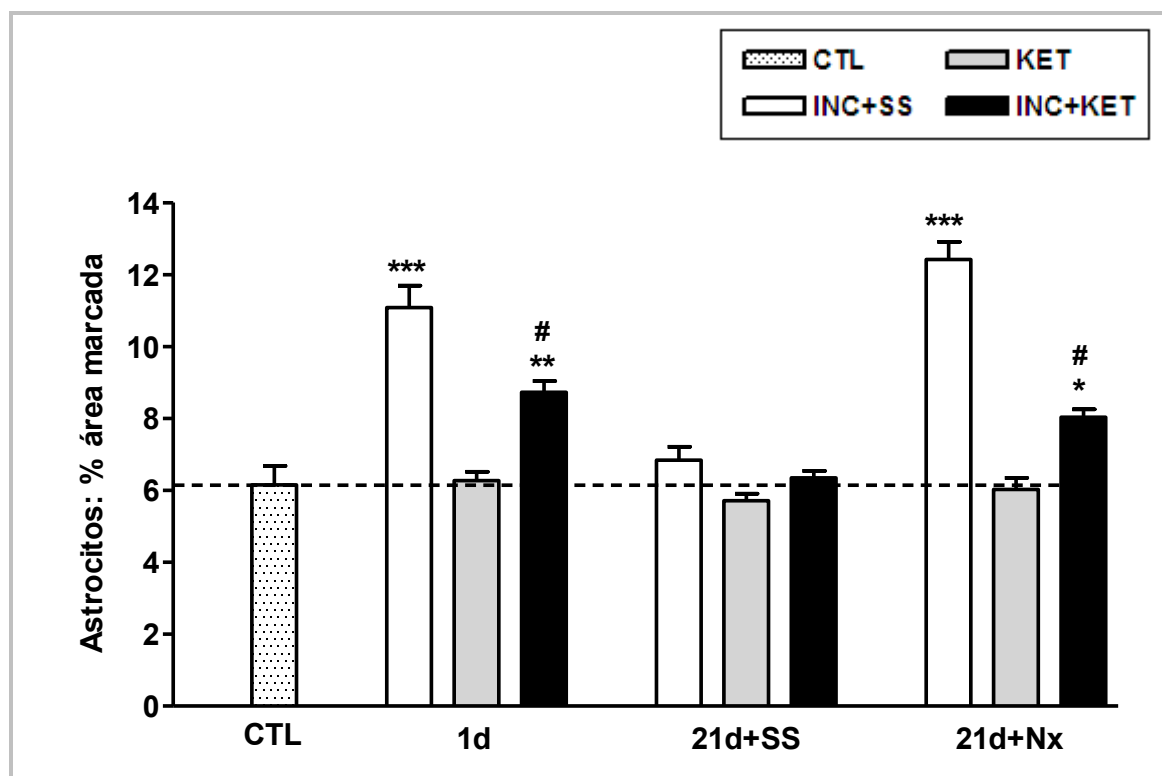
Inicialmente determinamos el porcentaje del área de inmunoreactividad marcada de los controles, siendo el valor medio  $6,15 \pm 0,52\%$ ; este valor, es el promedio de los valores obtenidos de forma independiente para cada uno de los grupos de estudio: INC+SS, KET e INC+KET ( $6,10 \pm 1,15\%$ ,  $6,37 \pm 1,04\%$  y  $6,18 \pm 0,32\%$ , respectivamente).

El día 1 del postoperatorio, la cirugía (INC+SS) indujo un incremento del % del área marcada para los astrocitos ( $11,08 \pm 0,60$ ;  $p < 0,001$  frente al CTL), que fue parcialmente bloqueado por la ketamina ( $8,72 \pm 0,31\%$ ;  $p < 0,001$  frente al CTL y frente a INC+SS); así, la inhibición de la activación astrocitaria inducida por la ketamina fue del  $48,17 \pm 6,48\%$ . El

## V. Resultados

grupo KET no mostro efecto alguno sobre los astrocitos manteniendo inalterado el porcentaje de área de inmunoreactividad marcada ( $6,27 \pm 0,24\%$ ), (figura 61, tabla 21).

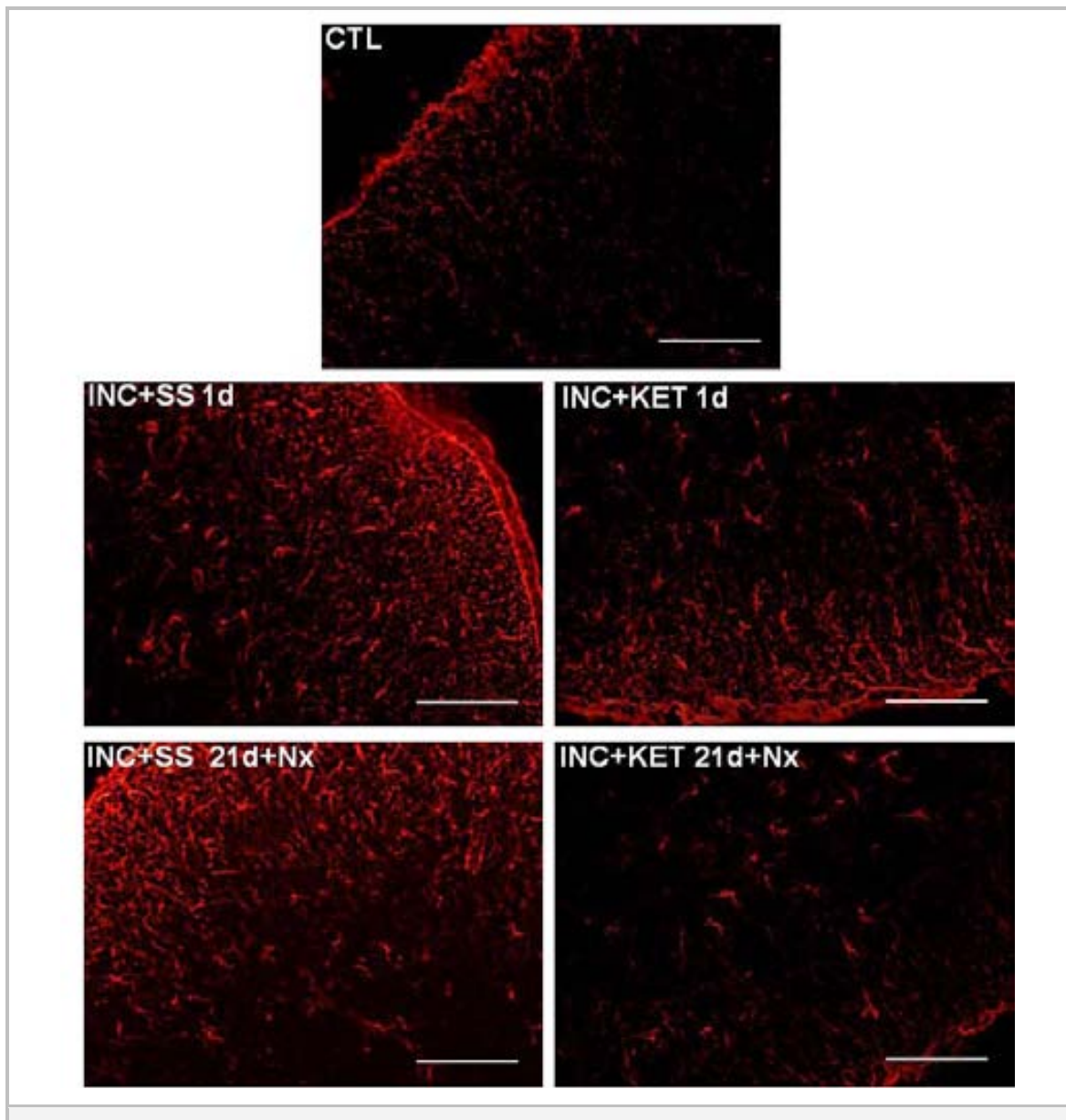
La evaluación de la inmunoreactividad de los astrocitos el día 21 tras la administración de salino, demostró que todos los grupos habían vuelto al estado de reposo (control), con porcentajes de área marcada de  $6,84 \pm 0,37\%$ ,  $5,71 \pm 0,19\%$  y  $6,34 \pm 0,19\%$  para los grupos INC+SS, KET e INC+KET, respectivamente. Sin embargo, la administración de naloxona provocó reactivación astrocitaria ( $p < 0,001$  vs CTL) en los grupos INC+SS ( $12,42 \pm 0,49\%$ ) e INC+KET ( $8,03 \pm 0,22\%$ ), aunque en este último la reactivación fue de menor magnitud ( $p < 0,001$  vs INC+SS); así, la ketamina demostró un efecto inhibitor de la reactivación astrocitaria del  $70,38 \pm 3,53\%$ . Por último, y como en el caso anterior, el grupo KET no modificó la inmunoreactividad astrocitaria respecto a los valores control (del  $6,02 \pm 0,31\%$ ) (figura 61, tabla 21).



**Figura 61. Efecto de la KETAMINA sobre la activación de los ASTROCITOS espinales inducida por la incisión.** Se muestra el porcentaje (%) de área de inmunoreactividad marcada de los astrocitos  $\pm$  E.E.M en animales control (CTL, barra punteada), y animales que recibieron 50 mg/kg ketamina (INC+KET, barras negras) o salino (INC+SS, barras blancas) antes de finalizar la cirugía. Las muestras de médula espinal se obtuvieron los días 1 y 21 postcirugía. El día 21, los ratones recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la eutanasia. El efecto de la ketamina (KET, barras grises) se evaluó a los mismos tiempos en animales *sham*-operados. La línea discontinua indica el valor medio de los controles. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey).

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs CTL; # $p < 0,001$  vs INC+SS

En la **figura 62** se presentamos microfotografías representativas que muestran la hipertrofia astrocitaria inducida por la cirugía (INC+SS) el día 1 del postoperatorio, así como el 21 tras la administración de naloxona. Se muestra también la disminución de la inmunoreactividad inducida por la ketamina (INC+KET) en ambos periodos, siendo el efecto de mayor magnitud el día 21 tras la administración de naloxona.



**Figura 62. Microfotografías representativas que muestran el efecto de la KETAMINA sobre la activación de los ASTROCITOS espinales (inmunoreactividad).** Se muestran ejemplos en condiciones control (CTL), y a los 1 y 21 días después de la incisión, en los grupos que recibieron salino (INC+SS) o ketamina (INC+KET). Nx, naloxona. Línea blanca, escala: 50μm (objetivo 20x).

## V. Resultados

La **tabla 21** resume los datos obtenidos en la evaluación de la inmunoreactividad astrocitaria. Como vemos, la ketamina fue capaz de inhibir parcialmente la activación astrocitaria el día 1 del postoperatorio, coincidiendo también con una inhibición similar de la hiperalgesia (aproximadamente 47%). Además, la ketamina bloqueó parcialmente la reactivación astrocitaria el día 21 tras la administración de naloxona, con una magnitud también similar (60-70%) a la obtenida en la prevención de la hiperalgesia durante la SLD.

ASTROCITOS				
Tiempo	INC+SS	KET	INC+KET	Inhibición de la activación (%)
	% Área marcada	% Área marcada	% Área marcada	
<b>Control</b>	6,10 ± 1,15	6,37 ± 1,04	6,18 ± 0,32	-
<b>1d</b>	11,08 ± 0,60 <sup>***</sup>	6,27 ± 0,24	8,72 ± 0,31 <sup>**#</sup>	48,17 ± 6,48 <sup>#</sup>
<b>21d+SS</b>	6,84 ± 0,37	5,71 ± 0,19	6,34 ± 0,19	-
<b>21d+Nx</b>	12,42 ± 0,49 <sup>***</sup>	6,02 ± 0,31	8,03 ± 0,22 <sup>*#</sup>	70,38 ± 3,53 <sup>#</sup>

**Tabla 21. Efecto de la KETAMINA sobre la activación de los ASTROCITOS.** Para los tres grupos evaluados, se muestra el porcentaje (%) de área inmunoreactividad de marcada ± E.E.M en condiciones control y en los días 1 y 21 del postoperatorio. Los ratones recibieron salino (grupo INC+SS) o ketamina (INC+KET) durante la cirugía; el día 21 recibieron además una inyección de salino (SS) o naloxona (Nx). El grupo ketamina (KET) fue operado *sham*. Para el grupo INC+KET se muestra también el porcentaje (%) de inhibición de la activación glial. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey).

\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs CTL; #p<0,001 vs INC+SS

Así, el día 1 del postoperatorio, la ketamina, indujo un efecto antihiperalgésico de un 46% que fue acompañado de una inhibición de la activación total de la microglía (82%) y parcial de los astrocitos (48%). El día 21, tras la administración de naloxona, se observó que este fármaco había proporcionado una protección parcial frente al desarrollo de SLD con un efecto antihiperalgésico del 60% que iba acompañado de una prevención parcial de la reactivación astrocitaria del 70%. No se produjo reactivación de la microglía.

### 3.2 Efecto de la gabapentina

#### Comportamiento nociceptivo

Con el objetivo de valorar los efectos de la gabapentina sobre la hiperalgesia postoperatoria, la aparición de SLD y la activación de la glía espinal, los animales recibieron una única dosis de 100 mg/kg del fármaco 30 minutos antes de la cirugía (**ver Métodos**). Al igual que con los fármacos utilizados anteriormente, nuestro objetivo era investigar si existe, un paralelismo o relación entre el comportamiento nociceptivo y la activación glial.

Inicialmente, se valoraron los umbrales nociceptivos basales de los grupos de estudio INC+SS e INC+GBP, siendo similares en ambos grupos ( $1,10 \pm 0,02g$  y  $1,14 \pm 0,01g$ , respectivamente) (**figura 63A, tabla 22**).

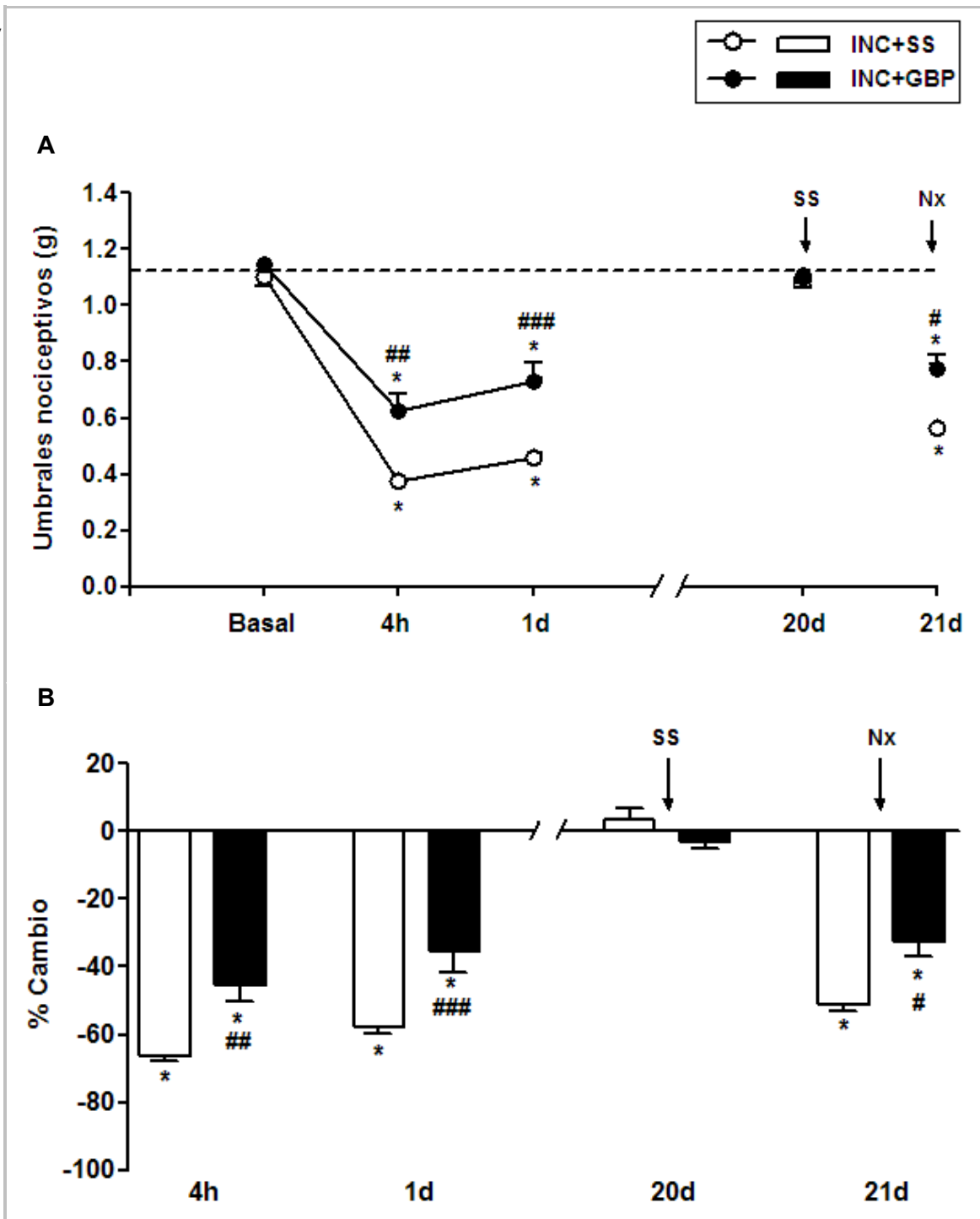
La cirugía (INC+SS) disminuyó los umbrales nociceptivos 4 horas y 1 día tras la intervención ( $0,37 \pm 0,01g$  y  $0,46 \pm 0,01g$ , respectivamente); la hiperalgesia fue significativamente menor ( $p < 0,001$  frente INC+SS) en aquellos animales que habían recibido gabapentina (INC+GBP) ( $0,62 \pm 0,05g$  y  $0,73 \pm 0,06g$ , respectivamente;  $p < 0,001$  vs basal). De esta manera, la gabapentina mostró un efecto anhiperalgésico de un  $31,66 \pm 7,37\%$  y  $38,65 \pm 10,49\%$ , a las 4 horas y 1 día del postoperatorio respectivamente (**figura 63A, tabla 22**).

El día 20, tras la administración de salino, ambos grupo habían retornado a los umbrales nociceptivos basales ( $1,10 \pm 0,03g$  y  $1,10 \pm 0,01g$ , INC+SS e INC+GBP, respectivamente). La administración de naloxona provocó nuevamente hiperalgesia en el grupo INC+SS ( $0,56 \pm 0,01g$ ,  $p < 0,001$  vs B), y también en el grupo INC+GBP ( $0,71 \pm 0,03g$ ,  $p < 0,001$  vs B), aunque en este último fue significativamente menor ( $p < 0,001$  vs INC+SS). El efecto antihiperalgésico de la gabapentina fue del  $30,51 \pm 7,42\%$  (**figura 63A, tabla 22**), similar al observado el día 1 del postoperatorio.

La **figura 63B** muestra la magnitud del cambio (%) respecto a los valores basales. En el grupo INC+SS, el porcentaje de cambio a las 4 horas y 1 día del postoperatorio fue de  $-66,16 \pm 1,66\%$  y  $-57,67 \pm 2,16\%$ , respectivamente; mientras que en el grupo INC+GBP fue de  $-45,41 \pm 4,87\%$  y  $-35,38 \pm 6,05\%$ , respectivamente.

El día 20, tras la administración de salino, no se observaron cambios significativos respecto a los valores basales ( $3,60 \pm 3,20\%$  y  $-2,94 \pm 2,19\%$ , para el grupo INC+SS e INC+GBP, respectivamente). Sin embargo, el día 21, tras la administración de naloxona el grupo INC+SS presentó un de cambio de  $-51,02 \pm 1,94\%$  y el grupo INC+GBP de  $-38,58 \pm 2,39\%$ .





**Figura 63. Efecto de la GABAPENTINA sobre la hiperalgesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor.** Para cada tiempo de evaluación mostramos los umbrales nociceptivos en gramos (A) y el porcentaje (%) de cambio respecto al valor basal (B)  $\pm$  E.E.M. Los animales recibieron salino (grupo INC+SS, círculos/barras blancas) ó 100 mg/Kg gabapentina (INC+GBP, círculos/barras negras) antes de finalizar la cirugía. Los días 20 y 21, recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la evaluación. La línea discontinua (A) indica el valor basal medio. ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey).

\* $p < 0,001$  vs Basal; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  vs INC+SS.

La **tabla 22** muestra un resumen de los datos obtenidos. En ella podemos observar que la gabapentina mostró un efecto antihiperalgésico parcial en el período postoperatorio temprano (4h, 1d), protegiendo parcialmente la aparición de SLD (21d+Nx).

Tiempo	INC+SS	INC + GABAPENTINA	
	Umbrales nociceptivos (g)	Umbrales nociceptivos (g)	Efecto antihiperalgésico (%)
<b>Basal</b>	1,10 ± 0,02	1,14 ± 0,01	-
<b>4h</b>	0,37 ± 0,01 *	0,62 ± 0,05 * ##	31,66 ± 7,37
<b>1d</b>	0,46 ± 0,01 *	0,73 ± 0,06 * ###	38,65 ± 10,49
<b>20d+SS</b>	1,10 ± 0,03	1,10 ± 0,01	-
<b>21d+Nx</b>	0,56 ± 0,01 *	0,71 ± 0,03 * #	30,51 ± 7,42

**Tabla 22. Efecto de la GABAPENTINA sobre la hiperalgnesia inducida por la incisión quirúrgica.** Se muestran los umbrales nociceptivos (g) y el porcentaje (%) de efecto antihiperalgésico de la gabapentina (INC+GBP) respecto al grupo control (INC+SS) ± E.E.M. Los días 20 y 21 del postoperatorio, los animales recibieron salino (SS) y naloxona (Nx), respectivamente, antes de la evaluación. ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey). \*p<0,001 vs B; #p<0,05, ##p<0,01, ### p<0,001 vs INC+SS.

### Inmunoreactividad de la microglía en la medula espinal

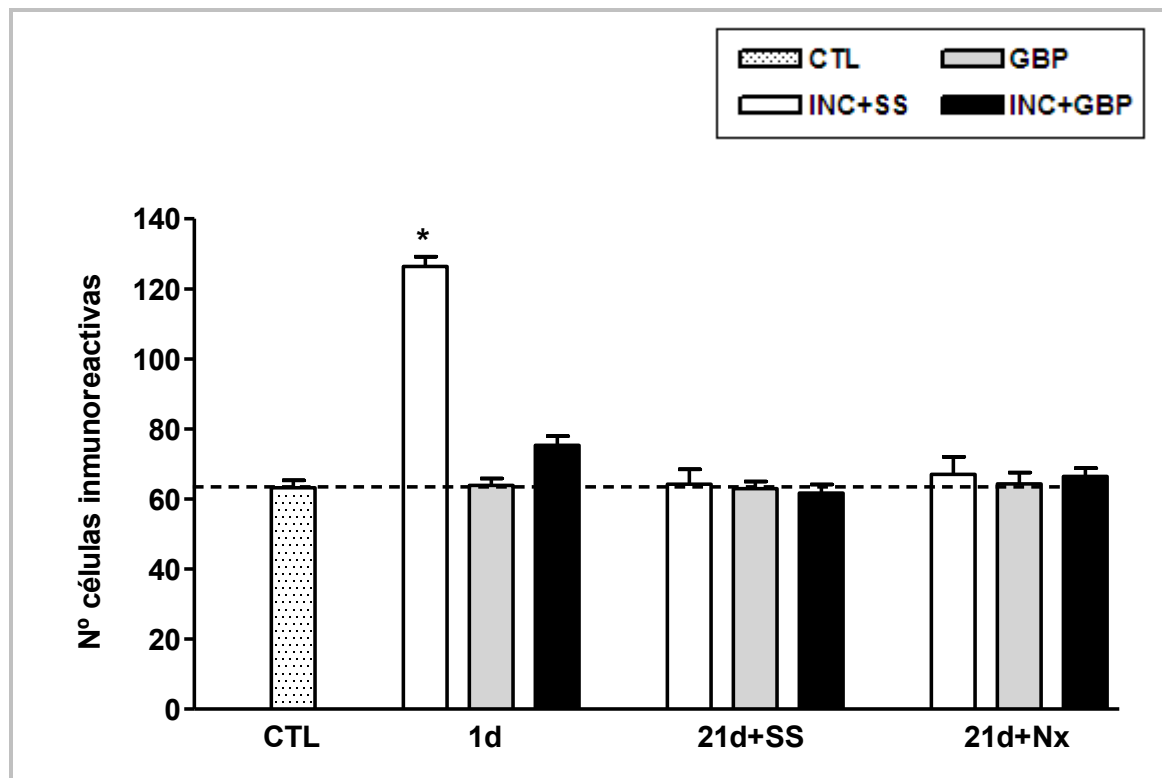
En primer lugar se evaluó el número de células inmunoreactivas de microglía en animales control. El resultado fue de  $63,2 \pm 2,17$  obtenido a partir de la media de los controles de los grupos evaluados independientes INC+SS, GBP e INC+GBP ( $62,71 \pm 2,98$ ,  $62,00 \pm 4,56$  y  $64,71 \pm 4,29$ , respectivamente) (**figura 64, tabla 23**).

La cirugía (INC+SS) provocó un aumento significativo del número de células inmunoreactivas el día 1 del postoperatorio ( $126,37 \pm 2,79$ ,  $p<0,001$  frente al CTL); la gabapentina fue capaz de prevenir este incremento (INC+GBP,  $75,32 \pm 2,65$ ), que presentó un efecto inhibitor de la activación de la microglía del  $82,79 \pm 4,31\%$ . La administración de gabapentina en animales *sham*-operados (grupo GBP) no indujo cambios morfológicos en las células de microglía ( $63,88 \pm 1,97$ ) (**figura 64, tabla 23**).

El día 21 tras la administración de salino, los valores de inmunoreactividad de todos los grupos habían retornado al estado de reposo (control), siendo el número de células

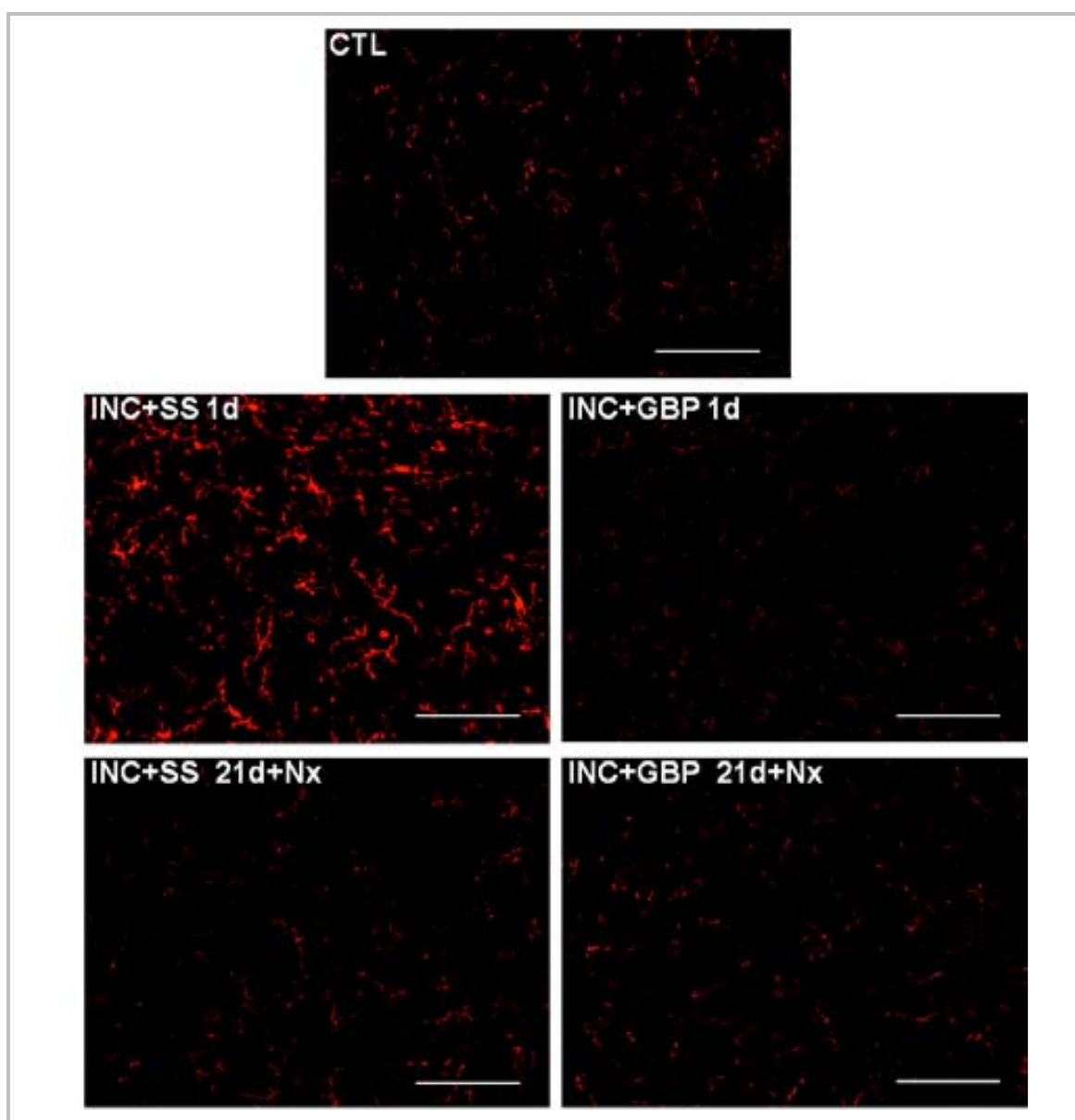
## V. Resultados

inmunoreactivas de  $64,21 \pm 4,24$ ,  $63,00 \pm 2,00$  y  $61,66 \pm 2,46$ , para los grupos INC+SS, GBP e INC+GBP, respectivamente. De igual forma, no se observaron cambios en la inmunoreactividad tras la administración de naloxona ( $67,07 \pm 4,92$ ,  $64,33 \pm 3,18$  y  $66,46$ , respectivamente) (figura 64, tabla 23).



**Figura 64. Efecto de la GABAPENTINA sobre la activación de la MICROGLÍA espinal inducida por la incisión.** Se muestra el número de células inmunoreactivas de microglía  $\pm$  E.E.M en animales control (CTL, barra punteada), y que recibieron 100 mg/kg de gabapentina (INC+GBP, barras negras) o salino (INC+SS, barras blancas) antes de finalizar la cirugía. Las muestras de médula espinal se obtuvieron los días 1 y 21 postcirugía. El día 21 los ratones recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la eutanasia. El efecto de la gabapentina (GBP, barras grises) se evaluó a los mismos tiempos en animales *sham*-operados. La línea discontinua indica el valor medio de los controles. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs CTL.

En la **figura 65** mostramos microfotografías representativas del incremento de inmunoreactividad el día 1 del postoperatorio en el grupo INC+SS, que no fue observado en el grupo que recibió gabapentina (INC+GBP). Mostramos también que la administración de naloxona el día 21 no provocó cambios morfológicos en la células de microglía.



**Figura 65. Microfotografías representativas que muestran el efecto de la GABAPENTINA sobre la activación de la MICROGLÍA espinal (inmunoreactividad).** Se muestran ejemplos en condiciones control (CTL), y a los 1 y 21 días después de la incisión, en los grupos que recibieron salino (INC+SS) o gabapentina (INC+GBP). La administración de naloxona (Nx) el día 21 no tuvo efecto sobre la activación de la microglía. Línea blanca, escala: 50µm (objetivo 20x).

## V. Resultados

La **tabla 23** muestra un resumen de los datos obtenidos en los 3 grupos, evaluados a los distintos tiempos y condiciones experimentales. La gabapentina bloqueó completamente la activación microglial inducida por la lesión quirúrgica 1 día tras la intervención. Todos los grupos retornaron al estado de reposo el día 21, y la naloxona no modificó la inmunoreactividad en el mismo tiempo de evaluación. Asimismo, la administración de gabapentina en animales *sham*-operados (no sometidos a una incisión quirúrgica) no tuvo efecto sobre la activación de la microglía. Los resultados muestran que el día 1 postincisión, la gabapentina tiene un efecto inhibitor de la activación glial de un 83%, mientras que el efecto anihiperalgésico es aproximadamente del 39%.

MICROGLÍA				
Tiempo	INC+SS	GBP	INC+GBP	
	Nº células inmunoreactivas	Nº células inmunoreactivas	Nº células inmunoreactivas	Inhibición de la activación (%)
<b>Control</b>	62,71 ± 2,98	62,00 ± 4,56	64,71 ± 4,29	-
<b>1d</b>	126,37 ± 2,79 *	63,88 ± 1,97	75,32 ± 2,65 #	82,79 ± 4,31
<b>21d+SS</b>	64,21 ± 4,24	63,00 ± 2,00	61,66 ± 2,46	-
<b>21d+Nx</b>	67,07 ± 4,92	64,33 ± 3,18	66,46 ± 2,34	-

**Tabla 23. Efecto de la GABAPENTINA sobre la activación de la MICROGLÍA.** Para los tres grupos evaluados, se muestra el número de células inmunoreactivas ± E.E.M en condiciones control y en los días 1 y 21 del postoperatorio. Los ratones recibieron salino (grupo INC+SS) o gabapentina (INC+GBP) antes de finalizar la cirugía; el día 21 recibieron además una inyección de salino (SS) o naloxona (Nx). El grupo gabapentina (GBP) no fue operado-*sham*. Para el grupo INC+GBP se muestra también el porcentaje (%) de inhibición de la activación glial. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs control; # $p < 0,001$  vs INC+SS.

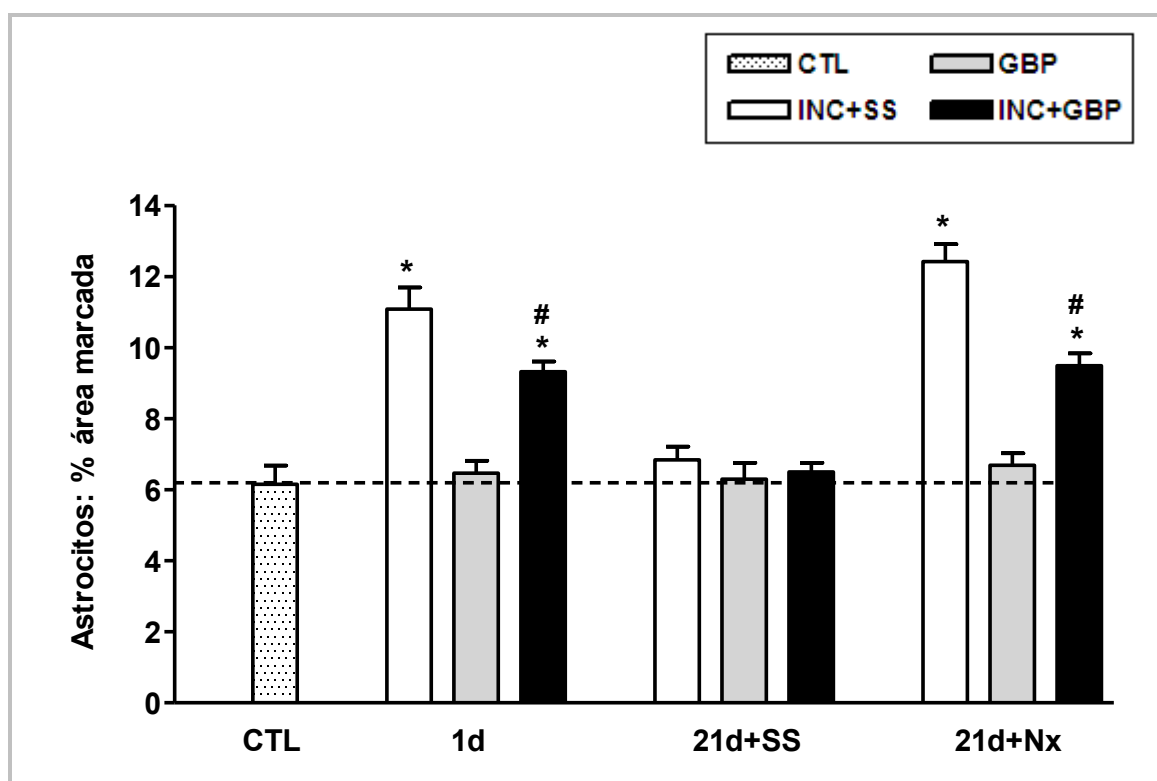
### Inmunoreactividad de los astrocitos en la medula espinal

Determinamos primero el porcentaje de área marcada de los animales control. Para ello, se evaluaron los controles de los tres grupos de forma independiente (INC+SS, GBP e INC+GBP) que mostraron valores de  $6,06 \pm 1,15\%$ ,  $6,14 \pm 1,16\%$  y  $6,25 \pm 0,59\%$ , respectivamente; el valor medio control fue  $6,15 \pm 0,52\%$  (**figura 66, tabla 24**).

El día 1 del postoperatorio, la incisión (INC+SS) provocó un incremento del área marcada de inmunoreactividad de los astrocitos ( $11,08 \pm 0,60\%$ ,  $p < 0,001$  frente al CTL), que fue

significativamente menor (INC+GBP,  $p < 0,001$  vs INC+ en el grupo que recibió gabapentina SS9 ( $9,31 \pm 0,28\%$ ;  $p < 0,001$  vs CTL). El % de inhibición de la activación astrocitaria inducido por la gabapentina fue del  $36,49 \pm 5,97\%$  (figura 66, tabla 24).

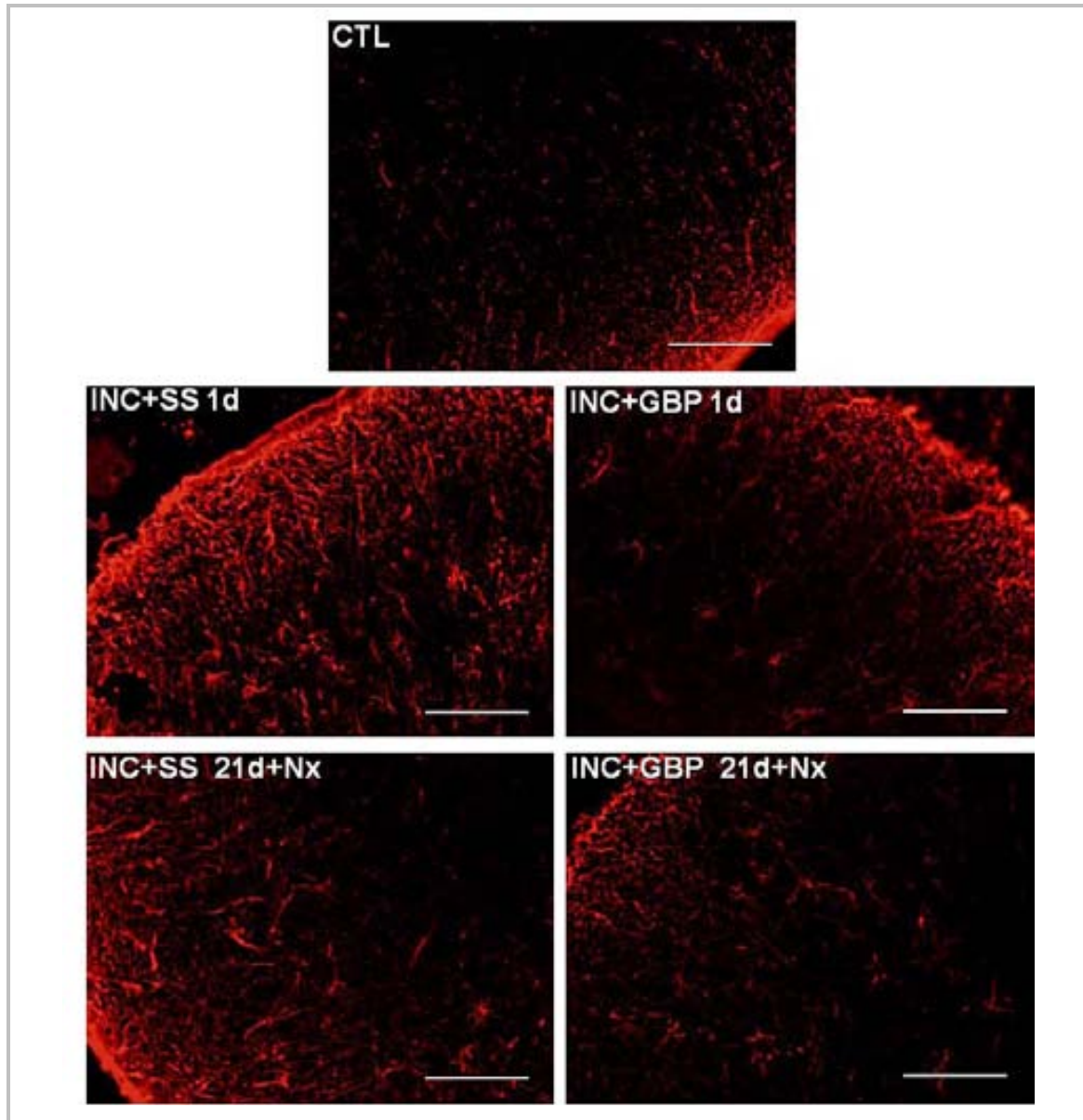
El día 21, tras la administración de salino, todos los grupos mostraron niveles de inmunoreactividad similares al control ( $6,84 \pm 0,37\%$ ,  $6,30 \pm 0,45\%$  y  $6,49 \pm 0,25\%$ , para los grupos INC+SS, GBP e INC+GBP, respectivamente). La administración de naloxona provocó una reactivación astrocitaria en el grupo INC+SS ( $12,42 \pm 0,49\%$ ,  $p < 0,001$  vs CTL), que fue parcialmente inhibida por la gabapentina (INC+GBP;  $9,49 \pm 0,34\%$ ,  $p < 0,001$  frente al CTL, INC+SS), que mostro un efecto inhibitor de la reactivación astrocitaria del  $47,48 \pm 5,57\%$  (figura 66, tabla 24).



**Figura 66. Efecto de la GABAPENTINA sobre la activación de los ASTROCITOS espinales inducida por la incisión.** Se muestran el porcentaje (%) de inmunoreactividad de área marcada de astrocitos  $\pm$  E.E.M en animales control (CTL, barra punteada), y que recibieron 100 mg/kg gabapentina (INC+GBP, barras negras) o salino (INC+SS, barras blancas) 30 minutos antes de la intervención. Las muestras de medula espinal se obtuvieron los días 1 y 21 postcirugía. El día 21 los ratones recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la eutanasia. El efecto de la gabapentina (GBP, barras grises) se evaluó a los mismos tiempos en animales *sham*-operados. La línea discontinua indica el valor medio de los controles. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs CTL; #  $p < 0,001$  vs INC+SS

## V. Resultados

La **figura 67** muestra microfotografías representativas del aumento la inmunoreactividad astrocitaria inducida por la cirugía (INC+SS) los días 1 y 21 (este último tras la administración de naloxona). En los mismos tiempos de evaluación, las microfotografías muestran también el efecto de la gabapentina que inhibió parcialmente la hipertrofia de los astrocitos (INC+GBP).



**Figura 67.** Microfotografías representativas que muestran el efecto de la **GABAPENTINA** sobre la activación de los **ASTROCITOS** espinales (inmunoreactividad). Se incluyen ejemplos en condiciones control (CTL), y a los 1 y 21 días después de la incisión, en los grupos que recibieron salino (INC+SS) o gabapentina (INC+GBP). Línea blanca, escala: 50µm (objetivo 20x).

En la **tabla 24** se resume de los datos de inmunoreactividad astrocitaria en todos los grupos evaluados y el % de inhibición de la activación astrocitaria. Los resultados muestran que la

gabapentina (INC+GBP) inhibió parcialmente tanto la activación astrocitaria como la reactivación tras la administración de naloxona el día 21 postcirugía. El bloqueo parcial de la reactivación astrocitaria coincide con la magnitud del efecto antihiperalgésico y sugiere la participación de los astrocitos espinales en los fenómenos de SLD en nuestro modelo experimental.

Por último, en ninguno de los tiempos de evaluación, la gabapentina provocó cambios sobre la inmunoreactividad astrocitaria en la medula espinal.

Tiempo	ASTROCITOS			
	INC+SS	GBP	INC+GBP	Inhibición de la activación (%)
	% Área marcada	% Área marcada	% Área marcada	
<b>Control</b>	6,06 ± 1,15	6,14 ± 1,16	6,25 ± 0,59	-
<b>1d</b>	11,08 ± 0,60 *	6,46 ± 0,34	9,31 ± 0,28 * #	36,49 ± 5,97
<b>21d+SS</b>	6,84 ± 0,37	6,30 ± 0,45	6,49 ± 0,25	-
<b>21d+Nx</b>	12,42 ± 0,49 *	6,69 ± 0,33	9,49 ± 0,34 * #	47,48 ± 5,57

**Tabla 24. Efecto de la GABAPENTINA sobre la activación de los ASTROCITOS.** Para los tres grupos evaluados, se muestra el porcentaje (%) de área marcada ± E.E.M en condiciones control y en los días 1 y 21 del postoperatorio. Los ratones recibieron salino (grupo INC+SS) o gabapentina (INC+GBP) 30 minutos antes de la cirugía; el día 21 recibieron además una inyección de salino (SS) o naloxona (Nx). El grupo gabapentina (GBP) no fue operado *sham*. Para el grupo INC+GBP se muestra también el porcentaje (%) de inhibición de la activación glial. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \*  $p < 0,001$  vs CTL; #  $p < 0,001$  vs INC+SS.

La gabapentina, indujo un efecto antihiperalgésico el día 1 del postoperatorio del 38% que fue paralelo a un efecto inhibitorio de la inmunoreactividad microglía y astrocitaria del 82% y 36%, respectivamente. El día 21, tras la administración de naloxona, este anticonvulsivante también tuvo un efecto sobre el comportamiento nociceptivo del 30% acompañado de un efecto inhibitorio de la reactivación astrocitaria del 47%.



#### **4. PREVENCIÓN DE LA HIPERALGESIA POSTOPERATORIA Y LA SENSIBILIZACIÓN LATENTE AL DOLOR MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE MINOCICLINA, A-836339 O MIDAZOLAM. EFECTO SOBRE LA ACTIVACIÓN GLIAL.**

En el presente apartado hemos analizado el efecto de la **minociclina**, el **A-836339** y el **midazolam** sobre la hiperalgesia postoperatoria y la aparición de SLD.

Tal como se ha descrito en la **Introducción** del presente trabajo, la minociclina es una tetraciclina que presenta un efecto antihiperalgésico en modelos de dolor inflamatorio y neuropático, que estaría mediado por la inhibición de la activación glial (Bastos LFS y cols., 2012). Debido a su mecanismo de acción, hemos investigado en nuestro modelo su efecto sobre la hiperalgesia inducida por la cirugía (POH y SLD), así como la activación de la glía en la médula espinal (microglía y astrocitos).

También hemos estudiado además el efecto del A-836339 (agonista de los receptores cannabinoides tipo II) y del midazolam, una benzodiazepina ampliamente utilizada como ansiolítico en el periodo perioperatorio; la evaluación de este último fue basada en la importancia clínica de la ansiedad como factor predictivo del DCPQ (Peters ML y cols., 2007).

##### **4.1 Efecto de la minociclina**

###### **Comportamiento nociceptivo**

Con el objetivo de evaluar el efecto de la minociclina en nuestro modelo experimental, los animales recibieron *una única dosis* de minociclina (50 mg/kg, ip) antes de finalizar la cirugía.

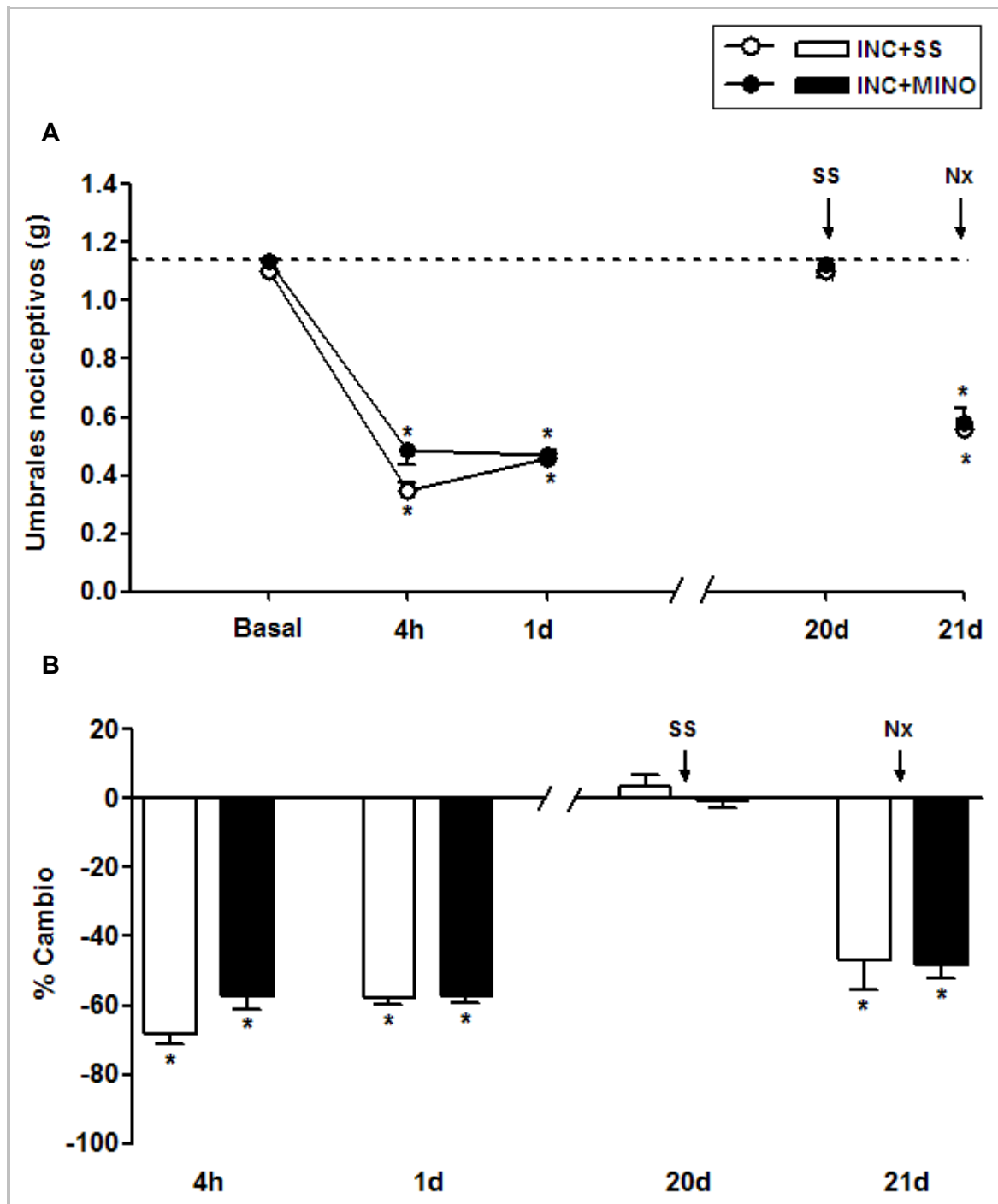
En primer lugar se investigó su efecto sobre la hiperalgesia inducida por la cirugía (HPO y SLD). En estos experimentos los umbrales nociceptivos basales fueron de  $1,10 \pm 0,02g$  y  $1,13 \pm 0,01g$  para los ratones a los que se les practicó una incisión quirúrgica y recibieron además salino (INC+SS) o minociclina (INC+MINO) antes de finalizar la intervención (**figura 68A, tabla 25**).

La cirugía (INC+SS) provocó hiperalgesia 4 horas y día 1 tras la intervención ( $0,34 \pm 0,02g$  y  $0,46 \pm 0,01g$ , respectivamente;  $p < 0,001$  frente al B); los animales que recibieron minociclina (INC+MINO) mostraron una disminución similar de los umbrales nociceptivos en los mismos tiempos ( $0,48 \pm 0,04g$  y  $0,47 \pm 0,01g$ ;  $p < 0,001$  vs B), careciendo de efecto antihiperalgésico ( $15,70 \pm 5,81\%$  y  $0,18 \pm 2,99\%$ , respectivamente) (**figura 68A, tabla 25**).

El día 20, tras la administración de salino, los umbrales nociceptivos en ambos grupos (INC+SS, INC+MINO) se habían recuperado completamente, mostrando valores parecidos a los basales ( $1,10 \pm 0,03\text{g}$  y  $1,12 \pm 0,02\text{g}$ , respectivamente). Asimismo, la administración de naloxona provocó un grado de hiperalgesia similar en el grupo INC+SS ( $0,56 \pm 0,07\text{g}$ ,  $p < 0,001$  frente al B), y en el INC+MINO ( $0,58 \pm 0,02\text{g}$ ,  $p < 0,001$  vs B). Estos experimentos muestran que, en nuestras condiciones experimentales, la minociclina no previene la aparición de SLD (**figura 68A, tabla 25**).

La **figura 68B** muestra la magnitud de cambio de los umbrales nociceptivos respecto al valor basal. En el grupo INC+SS el porcentaje de cambio 4 horas y 1 día postcirugía fue de  $-68,10 \pm 2,9\%$  y  $-57,68 \pm 2,16\%$ , respectivamente; de forma similar, los cambios observados en el grupo INC+MINO fueron  $-57,41 \pm 3,96\%$  y  $-57,57 \pm 1,72\%$ .

El día 20, tras la administración de salino, los porcentajes de cambio eran prácticamente nulos en ambos grupos ( $3,06 \pm 3,2\%$  y  $0,68 \pm 2,20\%$ , para los grupos INC+SS e INC+MINO). El día 21 la naloxona indujo nuevamente cambios similares en ambos grupos con una magnitud de  $-47,00 \pm 8,31\%$  y  $-48,33 \pm 3,58\%$  para INC+SS e INC+MINO, respectivamente (**figura 68B**).



**Figura 68. Efecto de la MINOCICLINA sobre la hiperalgesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor.** Para cada tiempo de evaluación mostramos los umbrales nociceptivos en gramos (A) y el porcentaje (%) de cambio respecto al valor basal (B) ± E.E.M. Los animales recibieron salino (grupo INC+SS, círculos/barras blancas) ó 50 mg/Kg minociclina (INC+MINO, círculos/barras negras) antes de finalizar la cirugía. Los días 20 y 21, recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la evaluación. La línea discontinua (A) indica el valor basal medio. ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs B

La **tabla 25** resume los resultados obtenidos para ambos grupos en la evaluación del comportamiento nociceptivo. Podemos apreciar que la minociclina no tuvo efecto antihiperalgésico ni en el período del postoperatorio temprano (HPO) ni tampoco 21d días después de la cirugía (SLD).

Tiempo	INC+SS	INC + MINOCICLINA	
	Umbrales nociceptivos (g)	Umbrales nociceptivos (g)	Efecto antihiperalgésico (%)
<b>Basal</b>	1,10 ± 0,02	1,13 ± 0,01	-
<b>4h</b>	0,34 ± 0,02 *	0,48 ± 0,04 *	15,70 ± 5,81
<b>1d</b>	0,46 ± 0,01 *	0,47 ± 0,01 *	0,18 ± 2,99
<b>20d+SS</b>	1,10 ± 0,03	1,12 ± 0,02	-
<b>21d+Nx</b>	0,56 ± 0,07 *	0,58 ± 0,02 *	2,83 ± 7,61

**Tabla 25. Efecto de la MINOCICLINA sobre la hiperalgnesia inducida por la incisión quirúrgica.** Se muestran los umbrales nociceptivos (g) y el porcentaje (%) de efecto antihiperalgésico de la minociclina (INC+MINO) respecto al grupo control (INC+SS) ± E.E.M. Los días 20 y 21 del postoperatorio, los animales recibieron salino (SS) y naloxona (Nx), respectivamente, antes de la evaluación.

ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs B

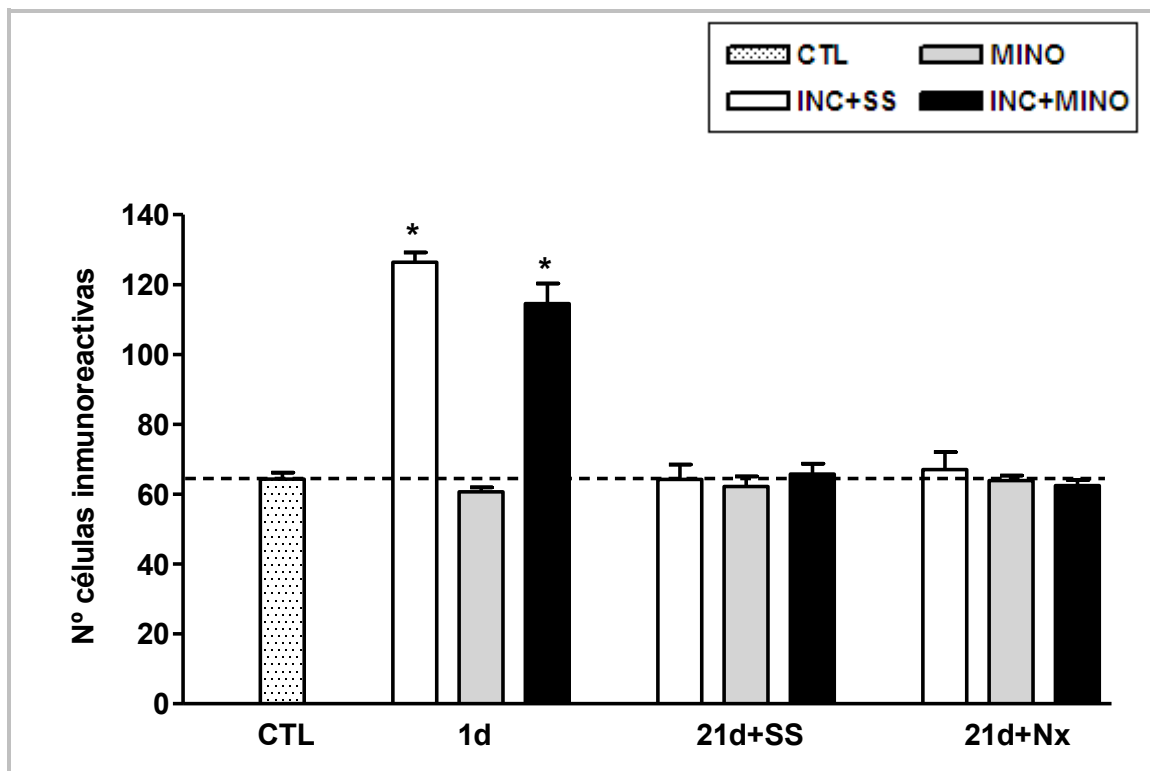
### Inmunoreactividad de la microglía en la medula espinal

Evaluamos en primer lugar el número de células de microglía inmunoreactivas en condiciones control, en cada uno de los grupos de estudio (INC+SS, MINO e INC+MINO); los valores individuales fueron  $63,20 \pm 3,81$ ,  $64,93 \pm 3,16$  y  $64,87 \pm 2,71$ , respectivamente, obteniendo un valor medio de  $64,34 \pm 1,83$  (**figura 69, tabla 26**).

La cirugía (INC+SS), indujo un aumento significativo ( $p < 0,001$  vs CTL) del número de células inmunoreactivas 1 día tras la intervención, aumento que fue similar en los animales que habían recibido minociclina (INC+MINO); el % de células inmunoreactivas en ambos grupos fue  $126,37 \pm 2,79$  y  $114,58 \pm 5,74$  ( $p < 0,001$  frente CTL). En este mismo período, la administración de minociclina en animales sham-operados, tampoco provocó cambios sobre el número de células inmunoreactivas ( $60,64 \pm 1,34$ ) (**figura 69, tabla 26**).

## V. Resultados

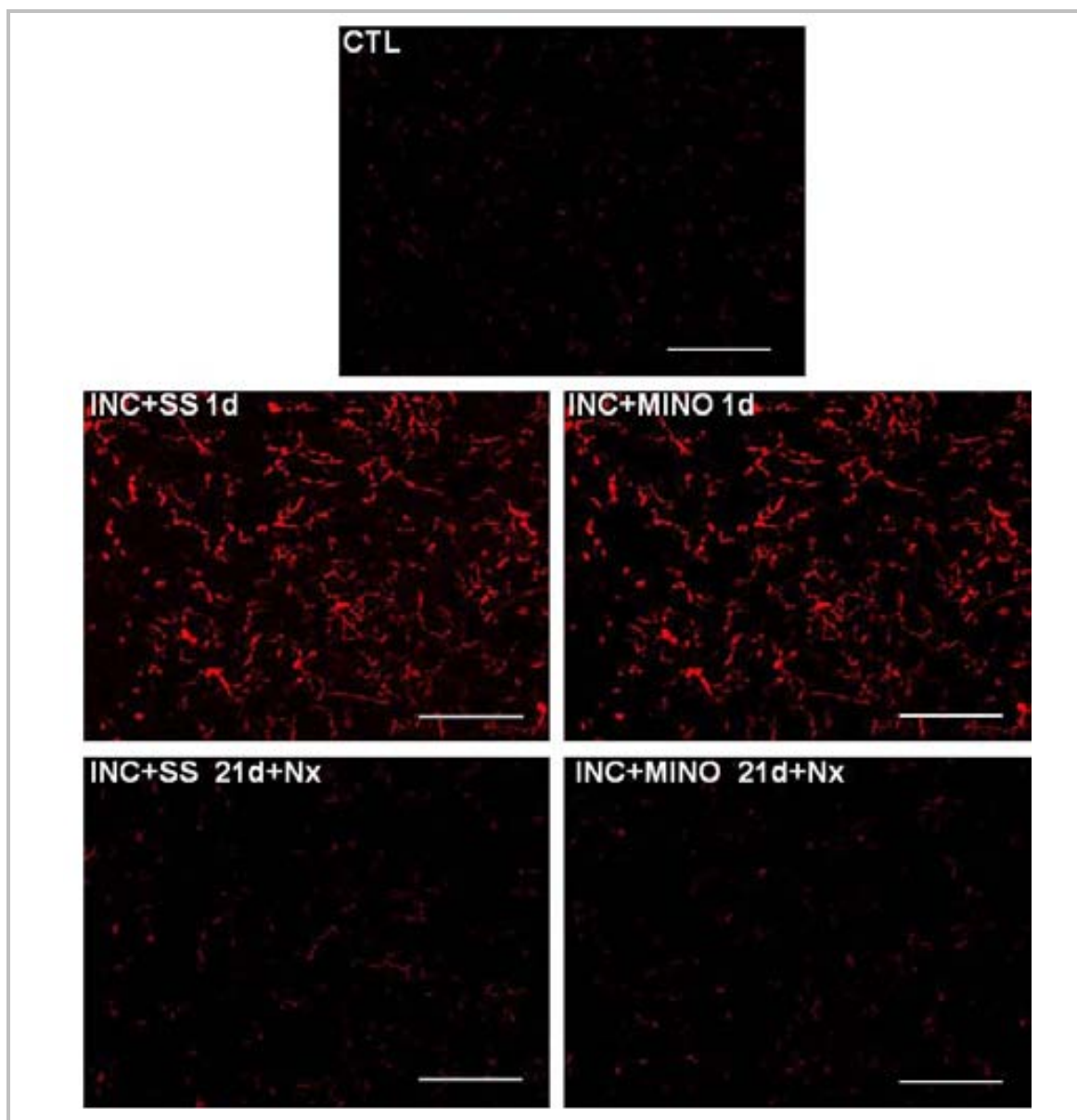
El día 21, tras la administración de salino, todos los grupos habían vuelto al estado de reposo (CTL), siendo los valores  $64,21 \pm 4,24$ ,  $62,16 \pm 2,87$  y  $65,75 \pm 2,97$  para los grupos INC+SS, MINO e INC+MINO, respectivamente. Así mismo, la administración de naloxona no produjo reactivación de la microglía manteniendo inalterados los valores de inmunoreactividad en todos los grupos ( $67,07 \pm 4,92$ ,  $63,94 \pm 1,37$  y  $62,50 \pm 1,58$ , respectivamente) (figura 69, tabla 26).



**Figura 69. Efecto de la MINOCICLINA sobre la activación de la MICROGLÍA espinal inducida por la incisión.** Se muestra el número de células inmunoreactivas de microglía  $\pm$  E.E.M en animales control (CTL, barra punteada), y que recibieron 50 mg/kg minociclina (INC+MINO, barras negras) o salino (INC+SS, barras blancas) antes de finalizar la cirugía. Las muestras de médula espinal se obtuvieron los días 1 y 21 postcirugía. El día 21 los ratones recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la eutanasia. El efecto de la minociclina (MINO, barras grises) se evaluó a los mismos tiempos en animales *sham*-operados. La línea discontinua indica el valor medio de los controles.

ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs CTL.

En la **figura 70** mostramos el efecto de la cirugía (INC+SS) que indujo un incremento de inmunoreactividad (1d) respecto al control (CTL); este efecto no fue modificado por la administración de minociclina (INC+MINO). Así mismo, también se muestra que no hay reactivación microglial tras la administración de naloxona el día 21 (21d+Nx).



**Figura 70. Microfotografías representativas que muestran los resultados sobre la activación de la MICROGLÍA espinal (inmunoreactividad), obtenidos tras la administración de MINOCICLINA.** Se muestran ejemplos en condiciones control (CTL), y a los 1 y 21 días después de la incisión, en los grupos que recibieron salino (INC+SS) o minociclina (INC+MINO). La administración de naloxona (Nx) el día 21 no tuvo efecto sobre la activación de la microglía. Línea blanca, escala: 50 $\mu$ m (objetivo 20x).

En la **tabla 26** se resumen los datos obtenidos. En ningún tiempo de evaluación, la minociclina modificó significativamente la inmunoreactividad de la microglía respecto al grupo INC+SS, efecto similar al obtenido al evaluar el comportamiento nociceptivo.

## V. Resultados

MICROGLÍA				
Tiempo	INC+SS	MINO	INC+MINO	
	Nº células inmunoreactivas	Nº células inmunoreactivas	Nº células inmunoreactivas	Inhibición de la activación (%)
<b>Control</b>	63,20 ± 3,81	64,93 ± 3,16	64,87 ± 2,71	-
<b>1d</b>	126,37 ± 2,79 *	60,64 ± 1,34	114,58 ± 5,74 *	19,17 ± 9,33
<b>21d+SS</b>	64,21 ± 4,24	62,16 ± 2,87	65,75 ± 2,97	-
<b>21d+Nx</b>	67,07 ± 4,92	63,94 ± 1,37	62,50 ± 1,58	-

**Tabla 26. Resumen de los resultados obtenidos sobre la activación de la MICROGLÍA tras la administración de MINOCICLINA.** Para los tres grupos evaluados, se muestra el número de células inmunoreactivas ± E.E.M en condiciones control y en los días 1 y 21 del postoperatorio. Los ratones recibieron salino (grupo INC+SS) o minociclina (INC+MINO) durante la cirugía; el día 21 recibieron además una inyección de salino (SS) o naloxona (Nx). El grupo minociclina (MINO) no fue operado (*sham*). Para el grupo INC+MINO se muestra también el porcentaje (%) de inhibición de la activación glial.

ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs control

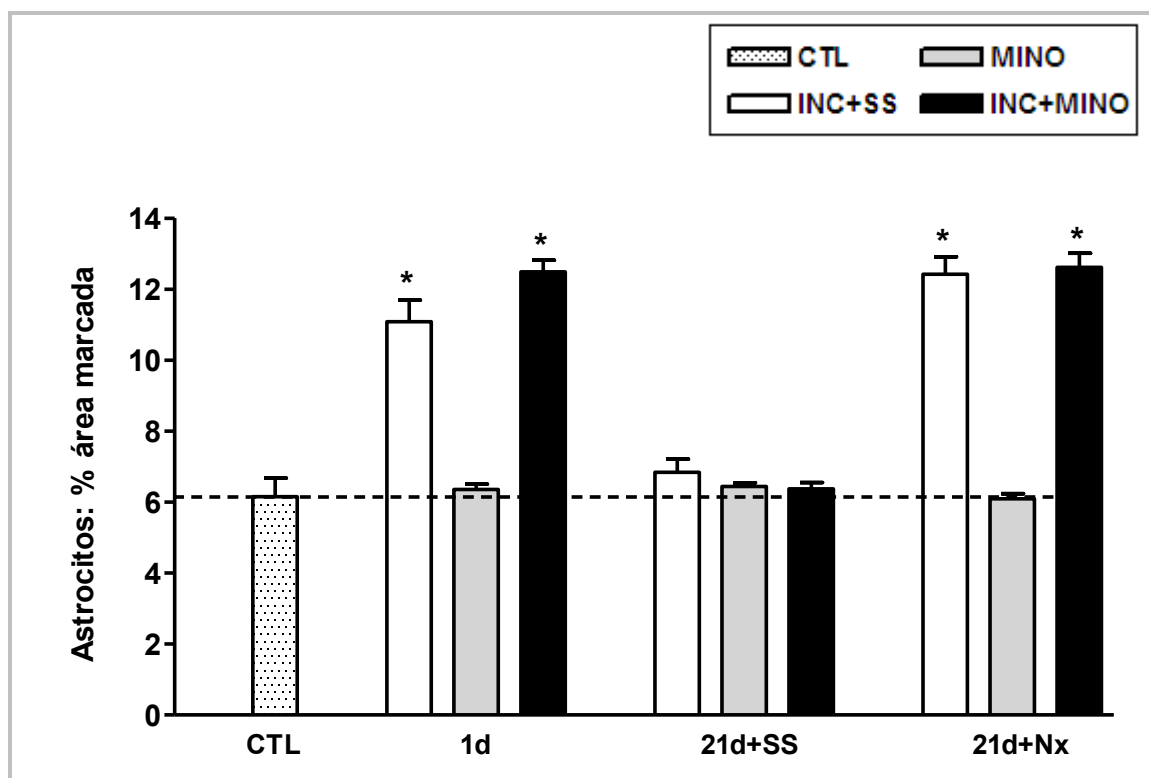
### Inmunoreactividad de los astrocitos en la medula espinal

En las mismas condiciones experimentales, evaluamos seguidamente el efecto de la minociclina sobre la activación astrocitaria. El valor control del área inmunoreactiva marcada para los astrocitos en los tres grupos fue:  $6,10 \pm 1,15\%$ ,  $6,17 \pm 1,32\%$  y  $6,18 \pm 0,32\%$ , para los grupos INC+SS, MINO e INC+MINO, respectivamente siendo el valor medio  $6,15 \pm 0,52\%$  (**figura 71, tabla 27**).

La cirugía (INC+SS), provocó un incremento del área marcada de astrocitos ( $11,08 \pm 0,60\%$ ,  $p < 0,001$  vs CTL) que fue similar en los animales que habían recibido minociclina (INC+MINO,  $12,49 \pm 0,32\%$ ;  $p < 0,001$  vs CTL). El día 1 postadministración, la minociclina en animales *sham*-operados no mostró ningún efecto (grupo MINO;  $6,35 \pm 0,15\%$ ) (**figura 71, tabla 27**).

El día 21, tras la administración de salino, los astrocitos en los grupos INC+SS e INC+MINO, habían vuelto al estado de reposo (CTL), mostrando unos porcentajes de área marcada de  $6,84 \pm 0,37\%$  y  $6,37 \pm 0,17\%$ , respectivamente; la inmunoreactividad en el grupo MINO ( $6,44 \pm 0,10\%$ ) se mantuvo inalterada. La administración de naloxona, provocó una

reactivación astrocitaria similar en los grupos INC+SS e INC+MINO ( $12,42 \pm 0,49\%$  y  $12,61 \pm 0,39 \%$ ), sin producir cambios en el grupo MINO ( $6,09 \pm 0,13\%$ ) (figura 71, tabla 27).

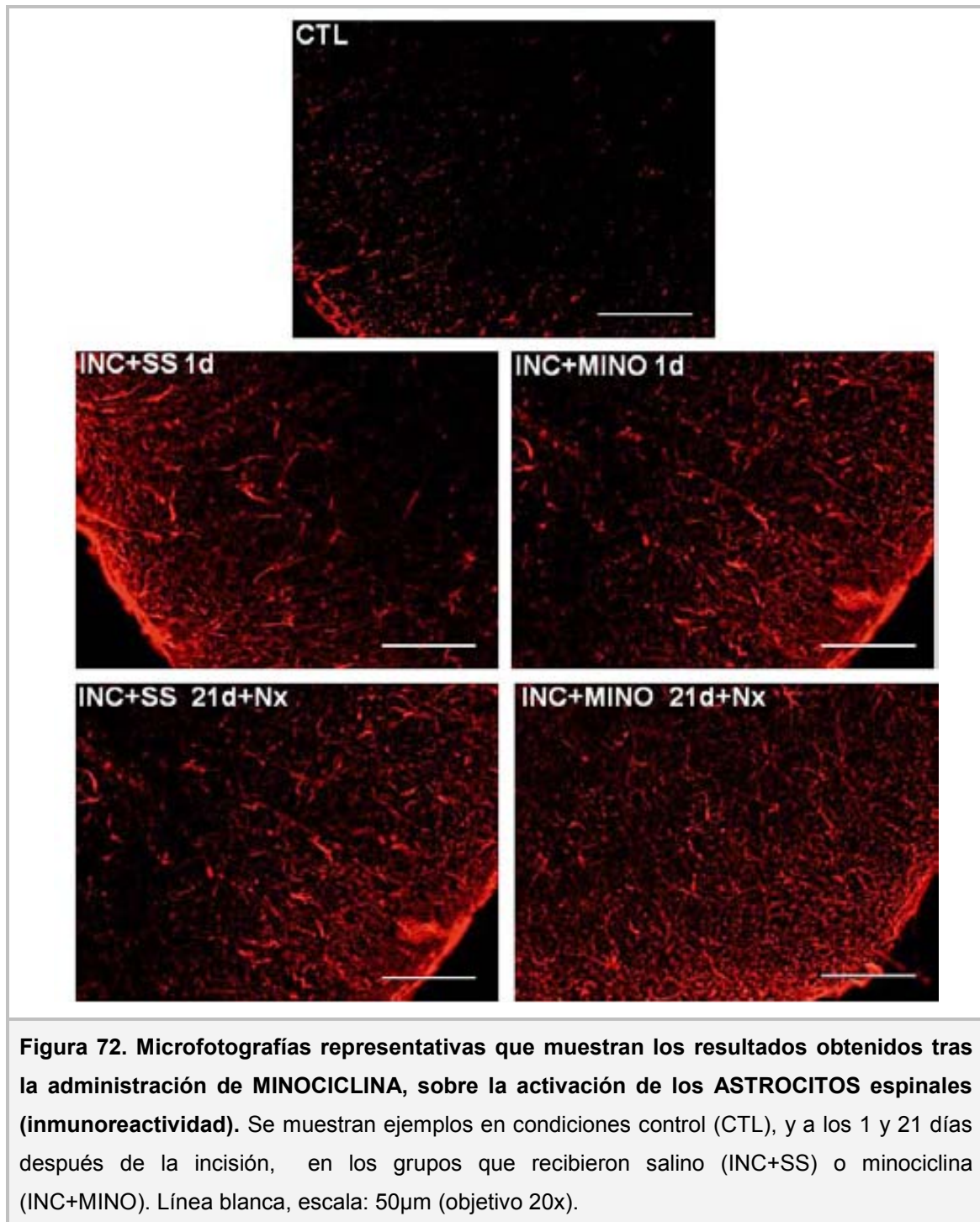


**Figura 71. Efecto de la MINOCICLINA sobre la activación de los ASTROCITOS espinales inducida por la incisión.** Se muestra el porcentaje (%) de área marcada de los astrocitos  $\pm$  E.E.M en animales control (CTL, barra punteada), y que recibieron 50 mg/kg minociclina (INC+MINO, barras negras) o salino (INC+SS, barras blancas) antes de finalizar la cirugía. Las muestras de médula espinal se obtuvieron los días 1 y 21 postcirugía. El día 21, los ratones recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la eutanasia. El efecto de la minociclina (MINO, barras grises) se evaluó a los mismos tiempos en animales sin cirugía. La línea discontinua indica el valor medio de los controles.

ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \*  $p < 0,001$  vs CTL

La **figura 72** muestra como el efecto de la cirugía incrementando la inmunoreactividad en los astrocitos los días 1 y el 21 del postoperatorio, efecto que se modifica de forma significativa en animales tratados con minociclina.





Por último, la **tabla 27** resume los resultados tras evaluar el efecto de la minociclina sobre el patrón de inmunoreactividad de los astrocitos inducida tras la cirugía. La minociclina no pudo inhibir la activación astrocitaria el día 1 del postoperatorio, así como tampoco pudo prevenir la reactivación tras la administración de naloxona el día 21. Este hecho coincide a su vez con la falta de efecto antihiperálgico de este fármaco en la evaluación de los umbrales nociceptivos.

ASTROCITOS				
Tiempo	INC+SS	MINO	INC+MINO	Inhibición de la activación (%)
	% Área marcada	% Área marcada	% Área marcada	
Control	6,10 ± 1,15	6,17 ± 1,32	6,18 ± 0,32	-
1d	11,08 ± 0,60 *	6,35 ± 0,15	12,49 ± 0,32 *	-28,75 ± 6,65
21d+SS	6,84 ± 0,37	6,44 ± 0,10	6,37 ± 0,17	-
21d+Nx	12,42 ± 0,49 *	6,09 ± 0,13	12,61 ± 0,39 *	-3,09 ± 6,35

**Tabla 27. Resultados obtenidos tras la administración de MINOCICLINA sobre la activación de los ASTROCITOS (inmunoreactividad).** Para los tres grupos evaluados, se muestra el porcentaje (%) de área marcada ± E.E.M en condiciones control y en los días 1 y 21 del postoperatorio. Los ratones recibieron salino (grupo INC+SS) o minociclina (INC+MINO) durante la cirugía; el día 21 recibieron además una inyección de salino (SS) o naloxona (Nx). El grupo minociclina (MINO) no fue intervenido quirúrgicamente (operado *sham*). Para el grupo INC+MINO se muestra también el porcentaje (%) de inhibición de la activación glial; los números negativos indican que la inmunoreactividad fue ligeramente superior, pero no significativa ( $p > 0,05$ ), al grupo INC+SS. ANOVA de dos vías (*post hoc* Tukey). \*  $p < 0,001$  vs CTL

#### 4.2 Efecto del A-836339 (agonista CB2)

##### Comportamiento nociceptivo

A fin de establecer el efecto del A-836339 (agonista de los receptores cannabinoides tipo II), los animales recibieron *una única dosis* del fármaco (30 mg/kg ip) antes de finalizar la cirugía.

Se evaluaron primero los umbrales nociceptivos basales en los grupos que recibieron salino (INC+SS) o A-836339 (INC+A-836339), que fueron  $1,10 \pm 0,02$ g en ambos grupos (**figura 73A, tabla 28**).

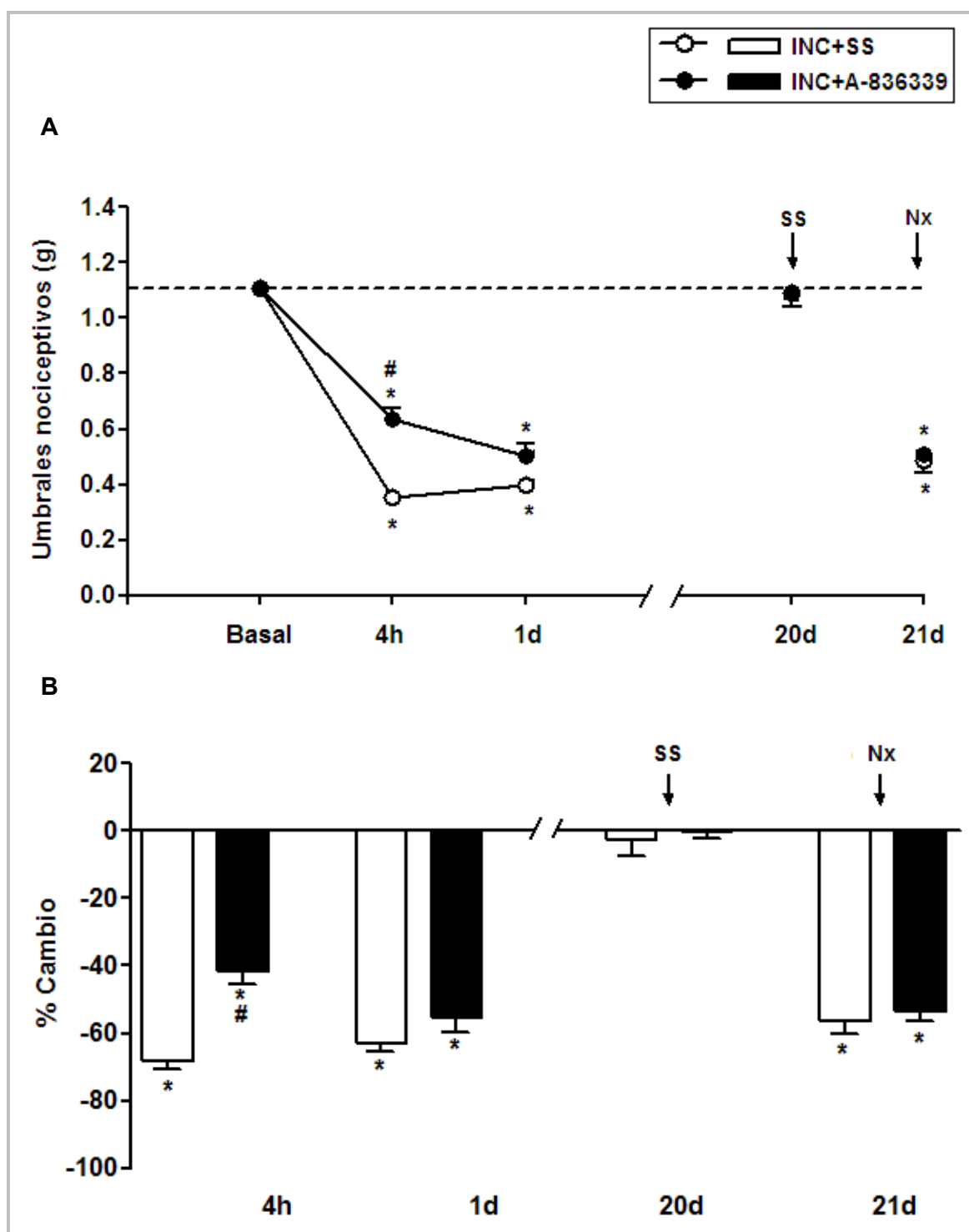
La cirugía (INC+SS) provocó una reducción significativa ( $p < 0,001$  vs basal) de los umbrales nociceptivos a las 4 horas y el día 1 del postoperatorio ( $0,35 \pm 0,02$ g y  $0,39 \pm 0,02$ g, respectivamente). En cambio, los animales que recibieron A-836339, experimentaron una

## V. Resultados

hiperalgesia significativamente menor ( $p < 0,001$  vs INC+SS) a las 4 horas ( $0,63 \pm 0,03g$ ,  $p < 0,001$  frente a la basal), aunque el día 1, las diferencias no fueron estadísticamente significativas respecto al grupo INC+SS ( $0,50 \pm 0,04g$ ,  $p < 0,001$  vs basal). El efecto antihiperalgésico del A-836339 fue por tanto de un  $39,30 \pm 4,91\%$  (4 horas) y un  $12,27 \pm 6,70\%$  (1 día) (**figura 73A, tabla 28**). El efecto antihiperalgésico observado a las 4 horas del postoperatorio lo consideramos *poco fiable* debido a que los efectos residuales de la anestesia inhalatoria con sevoflurano, podría interferir con la evaluación del comportamiento nociceptivo.

El día 20 del postoperatorio, tras la administración de salino, ambos grupos mostraron umbrales nociceptivos similares a los basales ( $1,08 \pm 0,04g$  y  $1,09 \pm 0,02g$ , grupo INC+SS e INC+A-836339, respectivamente). La administración de naloxona el día 21, precipitó una hiperalgesia similar ( $p < 0,001$  frente basal) tanto en el grupo INC+SS ( $0,48 \pm 0,04g$ ) como en el grupo INC+A-836339 ( $0,50 \pm 0,02g$ ) (**figura 73A, tabla 28**).

La **figura 73B** muestra la magnitud del cambio respecto a los umbrales nociceptivos basales. Así, el grupo INC+SS experimentó una variación de  $-68,35 \pm 2,30\%$  y  $-63,03 \pm 2,19\%$  a las 4 horas y 1 día del postoperatorio. Para los mismos tiempos de evaluación, estos cambios fueron de  $-41,88 \pm 3,39\%$  y  $-55,29 \pm 4,29$ , en el grupo tratado con A-836339 (INC+A-836339). Posteriormente, el día 20 tras la administración de salino, la recuperación se hizo evidente siendo prácticamente nulos los cambios en ambos grupos ( $-2,51 \pm 4,86\%$  y  $-0,27 \pm 1,89\%$ , grupo INC+SS e INC+A-836339, respectivamente). Por el contrario, el día 21, tras la administración de naloxona, ambos grupos mostraron una magnitud de cambio parecida siendo  $-56,45 \pm 3,73\%$ , para el grupo INC+SS, y  $-53,59 \pm 2,67\%$ , para el grupo INC+A-836339.



**Figura 73. Efecto del A-836339 sobre la hiperalgesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor.** Para cada tiempo de evaluación mostramos los umbrales nociceptivos en gramos (A) y el porcentaje (%) de cambio respecto al valor basal (B)  $\pm$  E.E.M. Los animales recibieron salino (grupo INC+SS, círculos/barras blancas) ó 30 mg/Kg A-836339 (INC+A-836339, círculos/barras negras) antes de finalizar la cirugía. Los días 20 y 21, recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la evaluación. La línea discontinua (A) indica el valor basal medio. ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey).

\* $p < 0,001$  vs B; # $p < 0,001$  vs INC+SS.

## V. Resultados

La **tabla 28**, muestra un resumen de los resultados obtenidos en estos experimentos. El A-836339, redujo parcialmente la hiperalgesia 4 horas tras la intervención quirúrgica; sin embargo, este efecto no fue sostenido en el tiempo puesto que había desaparecido el día 1 del postoperatorio. Además, el fármaco no fue capaz de prevenir la aparición de SLD, dado que, después de la naloxona, los animales tratados mostraron el mismo nivel de hiperalgesia que los que recibieron salino antes de finalizar la intervención.

Tiempo	INC+SS	INC + A-836339	
	Umbrales nociceptivos (g)	Umbrales nociceptivos (g)	Efecto antihiperalgésico (%)
<b>Basal</b>	1,10 ± 0,02	1,10 ± 0,02	-
<b>4h</b>	0,35 ± 0,02 *	0,63 ± 0,03 * #	39,30 ± 4,91
<b>1d</b>	0,39 ± 0,02 *	0,50 ± 0,04 *	12,27 ± 6,70
<b>20d+SS</b>	1,08 ± 0,04	1,09 ± 0,02	-
<b>21d+Nx</b>	0,48 ± 0,04 *	0,50 ± 0,02 *	5,07 ± 4,74

**Tabla 28. Efecto del A-836339 sobre la hiperalgesia inducida por la incisión quirúrgica.**

Se muestran los umbrales nociceptivos (g) y el porcentaje (%) de efecto antihiperalgésico del A-836339 (INC+A-836339) respecto al grupo control (INC+SS) ± E.E.M. Los días 20 y 21 del postoperatorio, los animales recibieron salino (SS) y naloxona (Nx), respectivamente, antes de la evaluación.

ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey)

\*p<0,001 vs B; #p<0,001 vs INC+SS

Puesto que, el A-836339 no protege ni de la HPO ni de la aparición de SLD, descartamos llevar a cabo los experimentos designados a establecer un posible efecto sobre la activación de la glía.

### 4.3 Efecto del midazolam

#### Comportamiento nociceptivo

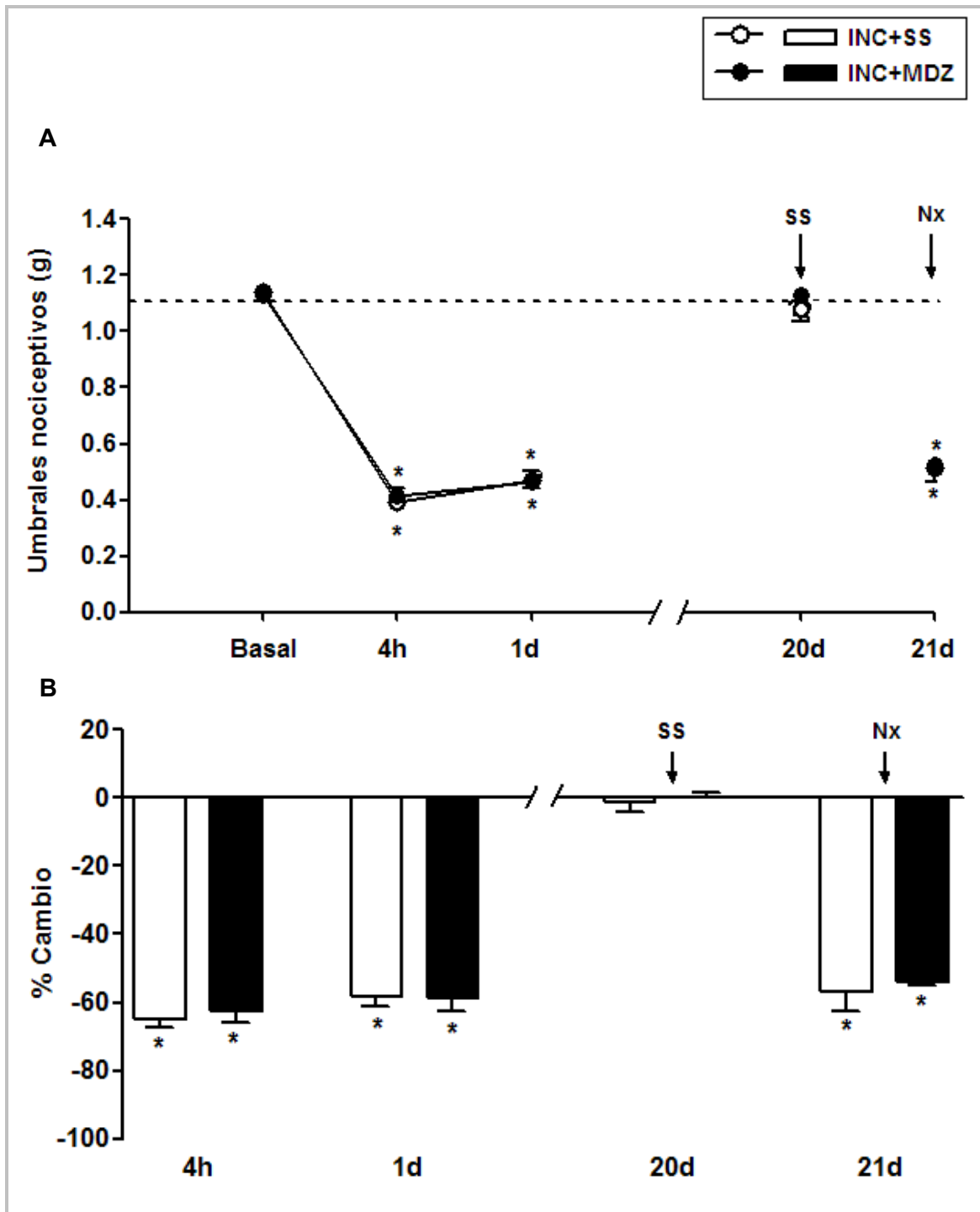
El efecto del midazolam sobre la hiperalgesia inducida por la cirugía (HPO y SLD) se evaluó después de la administración de *una dosis única* de 4 mg/kg ip, administrada antes de finalizar la cirugía.

Se estimaron primero los umbrales nociceptivos basales en los dos grupos de estudio; así, para el grupo que recibió salino (INC+SS), el umbral nociceptivo fue de  $1,14 \pm 0,02\text{g}$ , y para el grupo que recibiría midazolam (INC+MDZ) fue de  $1,12 \pm 0,01\text{g}$  (**figura 74A, tabla 29**).

La cirugía (INC+SS) provocó una hiperalgesia significativa 4 horas y 1 día tras la intervención ( $0,39 \pm 0,01\text{g}$  y  $0,47 \pm 0,03\text{g}$ , respectivamente;  $p < 0,001$  vs basal), que no fue modificada en los animales que recibieron midazolam (INC+MDZ) durante la cirugía ( $0,41 \pm 0,02\text{g}$  y  $0,46 \pm 0,03\text{g}$ ;  $p < 0,001$  frente a la basal). Por tanto el midazolam, administrado individualmente, carece de efecto antihiperalgésico en el período inicial del postoperatorio (4 horas, 1 día) (**figura 74A, tabla 29**).

El día 20, tras la administración de salino, todos los animales habían recuperado los umbrales nociceptivos basales; así para el grupo INC+SS fueron de  $1,08 \pm 0,04\text{g}$  y para el grupo INC+MDZ de  $1,12 \pm 0,01\text{g}$ . El día 21, la administración de naloxona provocó un grado similar de hiperalgesia en el grupo INC+SS ( $0,51 \pm 0,05\text{g}$ ;  $p < 0,001$  vs basal), y en el INC+MDZ ( $0,52 \pm 0,05\text{g}$ ;  $p < 0,001$  vs basal). De este modo, el midazolam tampoco protegió frente a la aparición de SLD (**figura 74A, tabla 29**).

La **figura 74B** muestra los cambios respecto a los valores basales que mostraron los animales de ambos grupos en los distintos tiempos evaluados. En el grupo INC+SS el cambio 4 horas y 1 día postcirugía fue  $-65,07 \pm 2,30\%$  y  $-58,40 \pm 2,57\%$ , respectivamente; de manera similar en el grupo INC+MDZ fue  $-62,53 \pm 3,27\%$  y  $-58,82 \pm 3,73\%$ . El día 20, tras la administración de salino, el porcentaje de cambio era prácticamente nulo para los grupos INC+SS ( $-1,14 \pm 2,92\%$ ) e INC+MDZ ( $0,14 \pm 1,40\%$ ). Por el contrario, tras la administración de naloxona el día 21, estos valores volvieron a incrementarse de forma similar en ambos grupos, siendo  $-56,82 \pm 5,55\%$ , para el grupo INC+SS y  $-53,86 \pm 1,32\%$ , para el (**figura 74B**).



**Figura 74. Resultados obtenidos tras la administración de MIDAZOLAM sobre la hiperalgesia postoperatoria y la sensibilización latente al dolor.** Para cada tiempo de evaluación mostramos los umbrales nociceptivos en gramos (**A**) y el porcentaje (%) de cambio respecto al valor basal (**B**)  $\pm$  E.E.M. Los animales recibieron salino (grupo INC+SS, círculos/barras blancas) ó 4 mg/Kg midazolam (INC+MDZ, círculos/barras negras) antes de finalizar la cirugía. Los días 20 y 21, recibieron salino (SS) o naloxona (Nx) antes de la evaluación. La línea discontinua (**A**) indica el valor basal medio. ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs B

En la **tabla 29** se resumen los resultados obtenidos en los experimentos de comportamiento nociceptivo. Podemos observar que, en nuestras condiciones experimentales, el midazolam no tuvo efecto antihiperalgésico, ni en el período temprano del postoperatorio (4h, 1d), ni en el tardío (21 días).

Tiempo	INC+SS	INC + MIDAZOLAM	
	Umbrales nociceptivos (g)	Umbrales nociceptivos (g)	Efecto antihiperalgésico (%)
<b>Basal</b>	1,14 ± 0,02	1,12 ± 0,01	-
<b>4h</b>	0,39 ± 0,01 *	0,41 ± 0,02 *	3,90 ± 5,02
<b>1d</b>	0,47 ± 0,03 *	0,46 ± 0,03 *	0,71 ± 6,38
<b>20d+SS</b>	1,08 ± 0,04	1,12 ± 0,01	-
<b>21d+Nx</b>	0,51 ± 0,05 *	0,52 ± 0,00 *	5,19 ± 2,33

**Tabla 29. Resultados obtenidos tras la administración de MIDAZOLAM sobre la hiperalgnesia inducida por la incisión quirúrgica.** Se muestran los umbrales nociceptivos (g) y el porcentaje (%) de efecto antihiperalgésico del midazolam (INC+MDZ) respecto al grupo control (INC+SS) ± E.E.M. Los días 20 y 21 del postoperatorio, los animales recibieron salino (SS) y naloxona (Nx), respectivamente, antes de la evaluación.

ANOVA de dos vías de medidas repetidas (*post hoc* Tukey). \* $p < 0,001$  vs B

Como en el caso anterior (A-836339), dada la ausencia de efecto antihiperalgésico del fármaco se descartó evaluar su posible acción sobre la activación de la glía espinal.



## **5. RESUMEN DEL EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO E INHIBIDOR DE LA ACTIVACIÓN DE LA GLÍA ESPINAL DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS EVALUADOS**

En la **tabla 30** mostramos un resumen de los resultados obtenidos los días 1 y 21 del postoperatorio, este último tras la administración de naloxona. Los resultados obtenidos 4 horas después de la cirugía sobre la hiperalgesia no se incluyen debido al posible efecto residual de la anestesia con sevoflurano, que podría interferir con la evaluación del comportamiento nociceptivo.

En cuanto al efecto antihiperalgésico que indujeron estos fármacos el día 1 del postoperatorio, vemos que el dexketoprofeno, el tramadol, la combinación Dex:Trm, la ketamina y gabapentina indujeron todos ellos un efecto antihiperalgésico significativo. Entre ellos, el dexketoprofeno y la combinación (DEX+TRM) provocaron una inhibición completa de la hiperalgesia, mientras que el resto de fármacos indujo una inhibición parcial de aproximadamente 30-45%. El efecto antihiperalgésico fue acompañado en todos los casos, de una inhibición completa de la activación de la microglía (inmunoreactividad), no observándose diferencias entre los tratamientos. Además, la ketamina y la gabapentina también mostraron un efecto inhibitor sobre la activación de los astrocitos (inmunoreactividad), que fue significativamente mayor para la ketamina; este efecto no fue observado con los demás fármacos.

El día 21, tras la administración de la naloxona, todos los tratamiento menos el dexketoprofeno mostraron un efecto anti-hiperalgésico parcial (prevención de la aparición de SLD entre un 30-60%), siendo el efecto de la ketamina significativamente mayor. Para la ketamina y la gabapentina, el efecto antihiperalgésico estuvo acompañado con una inhibición de la activación de los astrocitos, siendo la inhibición producida por la ketamina significativamente mayor que para la gabapentina.

A las dosis administradas, la minociclina, el A-836339 y el midazolam, no mostraron ningún efecto sobre el comportamiento nociceptivo. Ante este resultado, se consideró no evaluar el efecto sobre la activación glial a excepción de la minociclina, la cual ha demostrado ser inhibitor de la microglía en diversos estudios; a pesar de ello, y en nuestras condiciones experimentales, no encontramos ningún efecto.

Estos resultados sugieren que el día 1 del postoperatorio, la inhibición de la activación de la microglía, podría tener un papel en el efecto antihiperalgésico de los fármacos estudiados; la

ausencia de reactivación microglial tras la naloxona (día 21), sugiere también que estas células no participan en la aparición de SLD. En el caso de los astrocitos, la inhibición de la activación (día 1) y re-activación (21d+Nx) de los mismos por la ketamina > la gabapentina sugiere que parte de su efecto antihiperalgésico podría estar mediado por la inhibición de la activación de estas células; sugiere también que los astrocitos podrían tener un papel relevante en los fenómenos de plasticidad neuronal que conducen a la SLD en nuestro modelo experimental.

El tramadol previene (parcialmente) la hiperalgnesia tras la naloxona sin modificar la activación astrocitaria (inmunoreactividad), indicando que este efecto es independiente de la inhibición de la activación glial.

V. Resultados

TRATAMIENTO	Efecto antihiperálgico (%)		Inhibición de la activación (%)	Inhibición de la activación (%)	
	1d	21d+Nx	MICROGLÍA	ASTROCITOS	
	1d	21d+Nx	1d	1d	21d+Nx
DEXKETOPROFENO	83,76 ± 12,70 <sup># a</sup>	6,07 ± 7,9	105,03 ± 8,96 <sup>#</sup>	-27,56 ± 8,46	-9,36 ± 7,74
TRAMADOL	32,10 ± 9,61 <sup># b</sup>	46,53 ± 8,10 <sup># a,b</sup>	76,69 ± 7,08 <sup>#</sup>	-14,83 ± 6,87	0,30 ± 8,61
DEX:TRM	78,64 ± 4,67 <sup># a</sup>	32,02 ± 9,8 <sup># b,c</sup>	104,33 ± 6,57 <sup>#</sup>	-30,60 ± 9,16	2,66 ± 12,16
KETAMINA	46,44 ± 8,5 <sup># b</sup>	60,44 ± 4,96 <sup># a</sup>	82,42 ± 4,38 <sup>#</sup>	48,17 ± 6,48 <sup>#</sup>	70,38 ± 3,53 <sup># a</sup>
GABAPENTINA	38,65 ± 10,49 <sup># b</sup>	30,51 ± 7,42 <sup># c</sup>	82,79 ± 4,31 <sup>#</sup>	36,49 ± 5,97 <sup>#</sup>	47,48 ± 5,57 <sup># b</sup>
MINOCICLINA	0,18 ± 2,99	2,83 ± 7,61	19,17 ± 9,33	-28,75 ± 6,65	-3,09 ± 6,35
A-836339	12,27 ± 6,72	5,07 ± 4,74	-	-	-
MIDAZOLAM	0,71 ± 6,38	5,19 ± 2,33	-	-	-

**Tabla 30. Resumen del efecto antihiperálgico e inhibidor de la activación glial (inmunoreactividad) de inducido por los distintos tratamientos.** Se incluyen los resultados obtenidos el día 1 del postoperatorio (1d) y el día 21 tras la administración de naloxona (21d+Nx). Se muestran los porcentajes de efecto (%) ± E.E.M sobre los umbrales nociceptivos (antihiperálgica) y sobre la activación de microglía y astrocitos (disminución activación-inmunoreactividad). En ninguno de los experimentos realizados se observó reactivación de la microglía por lo que los resultados se muestran únicamente para el día 1. El guión indica experimento no realizado. # indica efecto significativo (p<0,05) vs grupo no tratado (INC+SS); letras diferentes (a,b,c) indican diferencias (p<0,05) entre grupos para cada tiempo y parámetro evaluado. ANOVA de una vía (*post-hoc* Tukey).

## VI. DISCUSIÓN

En un modelo de dolor postincisional en el ratón, hemos investigado el efecto antihiperalgésico e inhibidor de la activación glial de diversos fármacos, utilizados en la clínica humana en el tratamiento del dolor agudo postoperatorio y/o la prevención del dolor crónico postquirúrgico. Ambos efectos (antihiperalgésico, inhibidor glial) han sido evaluados: i) en el postoperatorio inmediato (4h-2 días después de la cirugía) periodo en el que prevalece la HPO y ii) aproximadamente tres semanas más tarde (días 20-21) después de la administración de naloxona, para poner en evidencia la SLD. Puesto que la SLD constituye la base para el desarrollo de DCPQ, nuestros experimentos podrían por una parte corroborar el uso clínico de los fármacos investigados en el tratamiento de la HPO y/o la prevención del DCPQ; por otra podría establecer el papel de la glía en los mecanismos de acción de los tratamientos utilizados.

En el presente trabajo hemos demostrado que los fármacos eficaces en el tratamiento del dolor agudo postoperatorio en humanos, bloquean también la HPO en nuestro modelo, inhibiendo paralelamente el incremento de la inmunoreactividad microglial. También mostramos que los *adyuvantes* (ketamina, gabapentina), impiden parcialmente la aparición de hiperalgnesia (HPO / SLD), a la vez que la reactivación astrocitaria. Además, demostramos que el tramadol (opioide menor) evita la aparición de hiperalgnesia en ambas fase de manera independiente a la inhibición de la activación/reactivación de los astrocitos. Nuestros resultados sugieren que los adyuvantes (pero no los AINEs) podrían disminuir los cambios plásticos inducidos por la cirugía en la ME incluyendo la activación de los astrocitos en la médula espinal. El tramadol también podría prevenir los cambios plásticos espinales, mediante mecanismos probablemente relacionados con el aumento de aminas (NA, 5-HT) en la médula.

Sobre la base de la importancia reportada en los últimos años de la participación de la glía en los mecanismos de dolor-analgnesia, hemos investigado el paralelismo entre el efecto antihiperalgésico de los fármacos y la activación glial. Las células de glía participan en el inicio y mantenimiento del dolor de diversas etiologías, aceptándose hoy en día, que el dolor no es un fenómeno exclusivamente neuronal (Scholz J y Woolf CJ, 2007; Milligan ED y Watkins LR, 2009). Pensamos que los fármacos que producen analgesia-antihiperalgnesia en humanos, podrían también inhibir la activación glial, apoyando el papel de la glía en la transmisión nociceptiva. La inhibición de la glía como parte de un tratamiento multimodal, podría ser una buena estrategia para obtener analgesia en el futuro. Tal como se ha comentado en la INTRODUCCION del presente texto, los protocolos multimodales utilizados

## VI. Discusión

en la actualidad en el tratamiento del DAP son inadecuados ya que más del 60% de los pacientes presentan dolor moderado-intenso en el postoperatorio (Wu CL y Raja SN, 2011); además, entre el 15-60% de pacientes desarrollan DCPQ (Lavand'homme P, 2011). Puesto que la intensidad del DAP, es un factor predictivo del desarrollo de DCPQ (Wu LC y Raja SN, 2011), postulamos que la inhibición temprana de la activación *glial*, podría mejorar el DAP y prevenir, al menos en parte, el desarrollo de DCPQ.

Para investigar esta hipótesis, en el presente proyecto hemos utilizado un modelo animal de dolor postoperatorio (Brennan TJ y cols., 1996) que mimetiza los eventos que se producen en el postoperatorio en humanos. El modelo es especialmente útil porque permite investigar el efecto de los tratamientos sobre la hiperalgesia postoperatoria, la prevención de la SLD (y el DCPQ), así como sus efectos sobre la activación de la glía espinal (investigación traslacional). Nuestro laboratorio adaptó el modelo de la rata al ratón (Célérier E y cols., 2006), y pudo demostrar los fenómenos de HPO y SLD (Campillo A y cols., 2010 y 2011). Ambos períodos estuvieron asociados a la coexpresión de la proteína c-fos y la fosforilación de las quinasas ERK1/2 en las láminas I y II en el asta dorsal de la médula espinal evidenciando la activación neuronal (Campillo A y cols., 2010; Romero A y cols., *submitted*).

En lo que respecta a la HPO, los resultados han sido confirmados en el presente proyecto si bien con ligeras diferencias: aunque la duración de la hipersensibilidad mecánica es similar, hemos encontrado diferencias en cuanto a la magnitud del efecto; así en el presente estudio, los animales experimentaron una mayor hipersensibilidad mecánica en el postoperatorio inmediato (día 2) cuya causa podría ser la praxis quirúrgica (diferente investigador que pudiera provocar una mayor intensidad del estímulo). Cabe destacar que en estos experimentos, no se ha utilizado remifentanilo durante la anestesia, con el objetivo de evaluar el efecto antihiperalgésico de los tratamientos sin que interfiriera el efecto pronociceptivo opioide (*hiperalgesia inducida por opioides*, Cabañero D y cols., 2009a, 2009b; Célérier E y cols., 2006). En nuestro estudio, los animales fueron sometidos a anestesia con sevoflurano (3,5-3%, v/v), que, en nuestro modelo no induce ninguna alteración de los umbrales nociceptivos, pudiéndose utilizar éstos como control (Célérier E y cols., 2006). Por tanto, los animales control (*sham-operados*) recibieron únicamente sevoflurano durante 30 minutos, pero sin realizar la incisión quirúrgica.

Tras la completa recuperación de la herida quirúrgica y de los umbrales nociceptivos, la administración de un antagonista opioide como la (-)naloxona, induce de nuevo hiperalgesia mecánica, de una magnitud similar a la del postoperatorio inmediato (HPO); este fenómeno se denomina *sensibilidad latente al dolor* o *memoria del dolor* y fue descrito por nuestro grupo en el modelo de dolor incisional en el ratón (Campillo A y cols., 2011). La respuesta

(hiperalgesia) es de naturaleza opioide (*estereoespecífica*) y de origen central, puesto que no aparece tras la administración de (+)naloxona ni de naloxona metiodada, que no atraviesa la barrera hematoencefálica (Campillo A y cols., 2011). Además, la hiperalgesia apareció también tras la administración del antagonista kappa opioide nor-binaltorfimina (nor-BNI), sugiriendo la participación del sistema de la dinorfina/ receptores kappa. Por otra parte, la administración de MK-801 (antagonista de los receptores NMDA), antes de la administración del antagonista impidió la hiperalgesia (Campillo A y cols., 2011). Este hecho, sugiere que entre los cambios que permanecerían latentes y podrían conducir a la SLD, podría ser que se produjera una sobreexpresión o bien hiperactivación de los receptores NMDA (sistema pronociceptivo). Así, esto justificaría, en el presente trabajo, nuestra hipótesis de que la administración intraoperatoria de ketamina podría bloquear esta plasticidad de los receptores NMDA y evitar, al menos en parte, el desarrollo de SLD.

Con todo, a pesar de que para explicar el efecto de los antagonistas opioides existen diversas hipótesis, parece posible que la lesión quirúrgica alterase el equilibrio entre los sistemas antinociceptivos y pronociceptivos de tal forma que la sensibilización de los sistemas pronociceptivos daría lugar a la aparición de una hipersensibilidad al dolor (térmica y mecánica). El organismo iniciaría entonces procesos de compensación de los sistemas antinociceptivos hasta alcanzar un nuevo equilibrio a un nivel más elevado (SLD). Este hecho explicaría al menos en parte, la aparición de hiperalgesia después de la administración de antagonistas opioides, tras el bloqueo del sistema antinociceptivo endógeno opioide (Romero A y cols., 2011; Campillo A y cols., 2011; Célérier E y cols., 2001; **figura 23**).

Sin embargo, pensamos que otros sistemas antinociceptivos endógenos también podrían participar en la SLD ya que después de la completa recuperación de la hiperalgesia inducida por una lesión nerviosa (*partial ciatic nerve ligation*, pSNL) la depleción de los sistemas noradrenérgicos inducía nuevamente hipersensibilidad mecánica (Wang F y cols., 2012); este hecho sugiere que los sistemas noradrenérgicos podrían estar activados como parte del nuevo equilibrio antinociceptivo (cambios plásticos) que se establece después de una lesión nerviosa periférica. Sería interesante investigar si el bloqueo o antagonismo de los receptores noradrenérgicos es capaz de inducir hiperalgesia en nuestro modelo experimental.

El fenómeno de SLD denominado también 'memoria del dolor' o 'vulnerabilidad al dolor', ha sido reportado también en un modelo de dolor inflamatorio (Corder G y cols., 2013). En este estudio, los autores reproducen nuestros resultados en un modelo de inflamación inducida por CFA, utilizando la administración de naltrexona tras la completa recuperación del proceso inflamatorio. Al igual que en el modelo incisional, la administración del antagonista

## VI. Discusión

opioide induce nuevamente hiperalgesia acompañada de un incremento de la expresión de la ERK fosforilada neuronal (pero no glial) en la médula espinal; observan también un incremento de la concentración del calcio intracelular. Todo ello, de manera NMDA-dependiente, puesto que el bloqueo de estos receptores con MK-801 (antagonista NMDA) inhibe la hiperalgesia que se produce tras la administración de naltrexona (Corder G y cols., 2013). Así, estos estudios no solo corroboran nuestros hallazgos previos en el dolor postoperatorio (Campillo A y cols., 2010, 2011) y apoyan nuestras hipótesis sino que también reportan este fenómeno en un modelo de dolor inflamatorio. Por el contrario, utilizando un modelo experimental de quemadura de primer grado en humanos, la administración de naloxona no restableció la hiperalgesia secundaria alrededor de la lesión tisular (Pereira MP y cols., 2013). Es probable que diferencias en las condiciones experimentales, tales como la etiología del dolor, las dosis y el momento de administración del antagonista opioide, sean responsables de la falta de respuesta en este modelo en humanos.

En cuanto a los posibles mecanismos implicados en el fenómeno que en el presente estudio hemos denominado SLD, hemos investigado la activación de la glía espinal inducida por la incisión y su posible inhibición por fármacos analgésicos e antihiperalgésicos utilizados en la práctica clínica. Estos estudios se apoyan en experimentos recientes realizados por nuestro grupo que demuestran en el mismo modelo (ratón), que la cirugía induce un aumento en la inmunoreactividad de las células de microglía y astrocitos de la médula espinal, paralelo a la hiperalgesia observada durante la HPO y SLD (Romero A y cols., 2013). La inmunoreactividad evidencia el aumento en la expresión de los marcadores Iba-1 (microglía) y GFAP (astrocitos) que refleja la activación e hipertrofia de estas células (Romero-Sandoval A y cols., 2008). Aunque existen otros marcadores (OX-42, entre otros), en el presente estudio hemos elegido Iba-1 y GFAP puesto que son los que han demostrado una mayor correlación entre hipersensibilidad e inmunoreactividad en nuestro modelo de dolor postincisional (Romero-Sandoval A y cols., 2008). Así, inmediatamente tras la cirugía se observa una activación (aumento de inmunoreactividad) tanto de las células de microglía como de los astrocitos, que vuelven a su estado de reposo el día 7 (Romero A y cols., 2013). Concretamente, en el presente trabajo, la evaluación de tiempos más tempranos a la intervención, a permitido acotar más el momento en el cual las células de glía vuelven a su nivel de inmunoreactividad basal, siendo este el día 4 del postoperatorio. De este modo, el aumento de inmunoreactividad fue paralelo a la disminución de los umbrales nociceptivos, aunque la duración de la hiperalgesia es ligeramente superior, puesto que el día 4, cuando las células de glía ya han vuelto a su estado basal, aún se observa hipersensibilidad mecánica. Esta asociación entre la inmunoreactividad glial y la hiperalgesia postoperatoria

ha sido descrita previamente en la rata, donde la duración de ambos fenómenos es similar (4 días) (Romero-Sandoval A y cols., 2008). En nuestro estudio, el incremento de la inmunoreactividad aparece simultáneamente en la microglía y los astrocitos hecho que también apoyaría los resultados obtenidos por Romero-Sandoval A y cols. (2008) en la rata. Sin embargo, nuestros resultados discrepan de los obtenidos por otros autores que proponen una activación secuencial de la glía en la respuesta al dolor; donde la microglía estaría implicada en el inicio y los astrocitos en el mantenimiento del dolor patológico, especialmente en modelos de dolor neuropático (Zhang J y De Koninck Y, 2006). Es posible que el tipo de lesión y las condiciones experimentales pudieran explicar estas discrepancias. Nuestro grupo ha demostrado también que la administración de naloxona el día 21 no produce ninguna alteración en el número de células de microglía inmunoreactivas; estos resultados sugieren que las células de microglía no participan en la aparición de SLD. Sin embargo, en el caso de los astrocitos, la administración de naloxona provoca su reactivación, alcanzando niveles de inmunoreactividad similares a los observados en el postoperatorio inmediato. Estos datos sugieren que, los cambios asociados al desarrollo de SLD no son exclusivamente neuronales sino que también estarían relacionados con plasticidad glial (Romero A y cols., 2013).

En el presente estudio hemos evaluado el comportamiento nociceptivo y la activación glial el día 1 del postoperatorio. La selección del día 1 se debe a que la evaluación conductual del comportamiento nociceptivo podría considerarse menos precisa cuando se realiza antes de las 4 horas del postoperatorio, debido a los efectos residuales de la anestesia general. Además los niveles de hiperalgesia e inmunoreactividad son similares a las 4 horas y el día 1, por lo que los experimentos para la evaluación del efecto de los fármacos sobre ambos parámetros fueron realizados el día 1.

Por tanto, los efectos de los diferentes fármacos sobre la hiperalgesia y la inmunoreactividad glial inducida por la cirugía fueron investigados en el postoperatorio inmediato (día 1) y también el día 21 (tras la administración de naloxona). En todos los experimentos, los fármacos fueron administrados antes de finalizar la cirugía siguiendo el mismo protocolo utilizado en la clínica para evitar que los pacientes despierten con dolor (analgesia de transición). Pensamos que la administración intraoperatoria (temprana) de analgésicos/adyuvantes podría prevenir no sólo el dolor y la HPO después de la cirugía, sino también los cambios plásticos en la médula espinal (por ejemplo la activación glial), que predisponen al desarrollo de SLD y DCPQ. Sin embargo, esta administración no podría ser considerada *pre-emptive* (preventiva), puesto que fue realizada después de la incisión quirúrgica, antes de cerrar la herida. Todos los fármacos fueron administrados por vía sistémica, puesto que es poco cruenta y es la que se utiliza habitualmente en la práctica clínica en el tratamiento del DAP; la vía intratecal se emplea excepcionalmente en humanos



## VI. Discusión

para administrar analgesia preoperatoria, y por este motivo no fue utilizada en nuestro estudio. En todos los casos se administró *una única dosis* de fármaco puesto que se ha demostrado el efecto analgésico/antihiperalgésico prolongado tanto en preclínica (Zhu X y cols., 2003 y 2005) como en clínica (Moore RA y cols., 2011) de fármacos como los AINEs, entre otros. Así, en la clínica se ha mostrado este efecto analgésico prolongado aunque, el tiempo de remedicación varía en función del fármaco pudiendo alcanzar las 20 horas. En algunos casos concretos como el dexketoprofeno (20-25 mg) se mostró un efecto analgésico superior a las 6 horas en el dolor postoperatorio (Moore RA y cols., 2011). Otros estudios más recientes han descrito también este efecto para los inhibidores selectivos de la COX-2 como el etericoxib y el celecoxib (Clarke R y cols., 2014; Derry S y Moore RA, 2013); en estos casos, la duración de la analgesia antes solicitar remedicación fue de 20 y 8,4 horas, respectivamente. A pesar de que la duración del efecto no se correlaciona con la presencia de niveles plasmáticos de los fármacos en sangre, el efecto antiinflamatorio (AINEs) (De Oliveira GS y cols., 2012) u otros mecanismos como el aumento de la noradrenalina en médula espinal (tramadol, gabapentina) (Kimura M y cols., 2012; Hayashida K y cols., 2007, 2008) entre otros, podrían ser los responsables del mantenimiento analgésico/antihiperalgésico.

Los fármacos investigados en el presente trabajo fueron seleccionados sobre la base de su utilización clínica para tratar el dolor agudo postoperatorio y/o prevenir el DCPQ. Pertenecen a distintas familias tales como: AINES (dexketoprofeno), opioides (tramadol), antagonistas del receptor NMDA (ketamina) y anticonvulsivantes (gabapentina). Estudiamos además el efecto de otros fármacos como son las tetraciclinas (minociclina), los agonistas de los receptores cannabinoides CB2 (A-836339) y las benzodiacepinas (midazolam), para establecer si presentan un posible efecto antihiperalgésico en nuestro modelo experimental, que pudiera ser extrapolado a la clínica humana.

El **dexketoprofeno** (AINE) y el **tramadol** (opioide) son analgésicos eficaces de uso común en el tratamiento del DAP (De Oliveira Jr GS y cols., 2012; Stamer UM y cols., 2003). Con frecuencia se utilizan asociados durante la analgesia multimodal, aunque se desconoce de momento si el efecto analgésico de la combinación es superior al de cada uno de ellos individualmente. En animales sanos y en modelos animales de inflamación aguda y crónica (CFA), nuestro grupo ha investigado el efecto antinociceptivo de estos fármacos solos y asociados en distintas proporciones, demostrando que existe sinergia entre ambos cuando se administran en una proporción 1:1 (Miranda HF y cols., 2009 y 2012). Sin embargo, esta interacción sinérgica se alteraba (antagonismo, aditividad) cuando la ratio de las concentraciones combinadas cambiaba. Por este motivo en el presente proyecto hemos

combinado estos fármacos 1: 1, evaluando por primera vez el tipo de interacción entre el dexketoprofeno y el tramadol en el dolor postquirúrgico en el ratón.

Analizaremos primero los efectos de cada uno de los fármacos utilizados individualmente. En el postoperatorio, la administración de AINES provoca una reducción tanto de la intensidad del dolor postoperatorio, como de los requerimientos de opioides y sus efectos indeseados (White PF, 2005). En modelos preclínicos se ha demostrado que los AINES inducen analgesia y reducen la inflamación debido a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas; como consecuencia, disminuyen la sensibilización periférica y probablemente también la central (Woolf CJ y Chong MS, 1993).

El dexketoprofeno, es un AINE con una mayor selectividad para la COX-1 que para la COX-2; de hecho, la concentración de fármaco necesaria para inhibir *in vitro* el 80% ( $IC_{80}$ ) de la isoforma COX-1 es de 0,0034  $\mu$ M mientras que para la COX-2 es 4  $\mu$ M (Warner TD y cols., 1999). Ambas isoformas de la enzima son responsables de la síntesis de prostaglandinas, y están presentes tanto a nivel neuronal como glial (principalmente microglía), de manera constitutiva en el caso de la COX-1 e inducible tras la lesión en el caso de la COX-2. La localización de las COXs en las células de glía, hace que sea especialmente interesante el estudio de la inmunoreactividad de estas células ya que es posible que el mecanismo antihiperalgésico este directamente relacionado con un efecto sobre la glía y, concretamente, sobre la microglía.

En nuestro estudio, la administración intraoperatoria de una única dosis de dexketoprofeno, eliminó completamente la HPO inducida por la cirugía durante los dos primeros días del postoperatorio (4 horas- 2 días). Este efecto prolongado del fármaco ha sido observado anteriormente en ratas después de la administración intratecal de inhibidores de las COX (Zhu X y cols., 2003, 2005) donde el efecto antihiperalgésico pudo ser observado durante más de cuatro días. Este efecto prolongado podría estar en relación al hecho que estos fármacos inhiben la síntesis de prostaglandinas, componentes importantes tanto en la sensibilización periférica como central. Concretamente, en nuestros estudios, la administración intraoperatoria contribuiría al bloqueo preventivo de la síntesis de estas (no permitiendo que se produzca sensibilización) inhibiendo la enzima constitutiva (COX-1); es más, probablemente este mecanismo también explicaría este efecto prolongado tras la administración intratecal de inhibidores de la COX-1 (Zhu X y cols., 2005), aunque en este caso no se puede descartar que también sea debido a que tras la administración local (médula espinal) la eliminación del fármaco más retardada.

El dexketoprofeno es un AINE *no selectivo*, pero con mayor afinidad por la enzima COX-1 (Warner TD y cols., 1999), lo que podría explicar su efecto antihiperalgésico, ya que se ha postulado que la COX-1 periférica sería la principal responsable de la hiperalgnesia postoperatoria (Zhu X y cols., 2003, 2005). Estos autores muestran que la administración

## VI. Discusión

intratecal de inhibidores selectivos o con gran afinidad por la COX-1 (ketorolaco) inhiben la hiperalgesia mecánica inducida por la incisión plantar en la rata, mientras que los inhibidores selectivos de la COX-2 no la modifican. Sin embargo, Yamamoto T y colaboradores (2000), observaron que la administración sistémica de inhibidores de la COX-2 tiene un efecto antihiperalgésico en el modelo de dolor postoperatorio en rata, que podría estar en relación a la inhibición periférica de la COX-2 y disminución de la síntesis de prostaglandinas. Cabe destacar que en estos trabajos la inhibición de la hiperalgesia fue parcial, mientras que nuestros resultados muestran una inhibición total; puesto que nuestro protocolo experimental utilizamos la vía sistémica y un AINE *no selectivo*, es posible que la inhibición total observada esté en relación a la inhibición de ambas isoformas de la enzima localizadas tanto a nivel periférico como central.

Paralelamente al efecto antihiperalgésico, la administración intraoperatoria de dexketoprofeno, inhibió completamente la inmunoreactividad de la microglía el día 1 del postoperatorio. Es posible que el DEX actúe inhibiendo el aumento de la COX-1 espinal inducido por la cirugía (Zhu X y cols., 2003), que se expresa principalmente en la microglía (Calvello R y cols., 2012). Este hecho contrasta con los resultados obtenidos tras la inducción de una inflamación periférica (CFA) donde los niveles de COX-1 en la médula espinal se mantienen inalterados mientras que se produce un incremento de la COX-2 (Beiche F y cols., 1998). Así, nuevamente, las diferencias de expresión de las isoformas de COXs ponen de manifiesto las diferencias entre la patofisiología del dolor postoperatorio y el inflamatorio.

Por otra parte, Calvello R y colaboradores (2012) mostraron en células de microglía *in vitro*, que la aplicación de un estímulo proinflamatorio (lipopolisacárido, LPS) incrementa la expresión de las COX-1 y 2 y, que ésta se reduce tras la administración de AINEs; este hecho iba acompañado de la reducción de la liberación de sustancias proinflamatorias (que activan tanto a las células de glía como a la neurona). Este mecanismo podría explicar, al menos en parte, la inhibición de la hiperalgesia y del incremento de inmunoreactividad de la microglía. Cabe destacar que, en este estudio *in vitro*, los inhibidores de la COX-1 pudieron bloquear la síntesis de PGE<sub>2</sub>, prostaglandina que participa en la sensibilización de las neuronas (Calvello R y cols., 2012). Puesto que el dexketoprofeno es más selectivo COX-1 estos resultados apoyarían no solo el efecto preventivo total de la inmunoreactividad glial sino también la prevención de la hiperalgesia gracias a la inhibición temprana de la producción de PGE<sub>2</sub>, evitando la excitabilidad que produce sobre la neurona.

En el caso de los astrocitos, la administración de DEX no modificó el incremento en inmunoreactividad inducido por la cirugía el día 1. El hecho podría estar en relación a que las COXs, particularmente la COX-1, se expresan sobre todo en la microglía y no en

astrocitos (Calvillo R y cols., 2012). La baja concentración o ausencia de ésta enzima en astrocitos explicaría la falta de efecto sobre este tipo de célula glial. Así, en nuestro modelo, estos resultados sugieren que los astrocitos no estarían involucrados en el efecto antihiperalgésico del DEX. Contrariamente a estos resultados, el ketorolaco fue capaz de disminuir la activación astrocitaria y a la vez bloquear totalmente la hiperalgia en un modelo de dolor neuropático (Dong L y cols., 2013). Cabe destacar que, este efecto antihiperalgésico paralelo al bloqueo de la inmunoreactividad glial únicamente se producía cuando el fármaco se administró tras la lesión pero no antes. Así, el momento de administración del fármaco podría marcar las diferencias con nuestro estudio; si bien, las divergencias entre los modelos experimentales también podrían ser responsables de estas discrepancias.

En cuanto al desarrollo de SLD, el dexketoprofeno no mostró ningún tipo de prevención de la hiperalgia tras la administración de naloxona; asimismo, tampoco pudo prevenir la reactivación astrocitaria. Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio del dexketoprofeno sobre la hiperalgia y la activación de la microglía durante el postoperatorio temprano, no es capaz de prevenir los cambios plásticos que conllevan a la SLD y que posiblemente incluyan una plasticidad astrocítica.

El efecto analgésico del **tramadol** en el tratamiento del DAP ha sido repetidamente demostrado en la práctica clínica (Stamer UM y cols., 2003). Este opioide menor presenta un mecanismo dual como agonista de los receptores opioide e inhibidor de la recaptación de monoaminas (NA, 5-HT). En el presente estudio, la administración intraoperatoria de una dosis única de tramadol bloqueó parcialmente la HPO (4h-2d), corroborando el efecto antihiperalgésico observado el día 1 del postoperatorio por Kimura M y colaboradores (2012) en ratas, 15 minutos, y hasta 2 horas, tras administración intraperitoneal e intratecal del fármaco. Sin embargo, el efecto observado en nuestros experimentos fue algo más prolongado en el tiempo, hecho que podría estar relacionado con el modelo animal (rata, ratón) o el protocolo experimental utilizado. Por otra parte, se ha demostrado que la cirugía induce un incremento de los niveles espinales de noradrenalina (NA) a partir de las 3 horas del postoperatorio (Wang Y y cols., 2008), alcanzando su pico el día 1 tras la intervención, mientras la serotonina lo alcanza el día 3; la administración intraperitoneal de 20 mg/kg de tramadol provocó el incremento de ambas en más de un 250% (Kimura M y cols., 2012). Así un estímulo como la cirugía induce la activación de sistemas antinociceptivos, como la liberación de monoaminas, las cuales, al actuar sobre sus receptores situados tanto a nivel pre- como postsináptico y en las interneuronas en médula espinal reducen la transmisión nociceptiva; puesto que el tramadol bloquea la recaptación de estas monoaminas, induce un incremento del tiempo que estas producen antinocicepción. Es más, en un modelo de dolor

## VI. Discusión

neuropático en ratas, también se ha observado que tras interrumpir una administración crónica de tramadol (7 días, 20 mg/kg ip, al día), su efecto se prolonga hasta 6 días, observándose además un incremento en la actividad inhibitoria de las vías descendentes noradrenérgicas (incremento en médula espinal de las fibras inmunoreactivas para D $\beta$ H (dopamina beta hidroxilasa) enzima que transforma dopamina en noradrenalina) (Sakakiyama M y cols., 2014). Este efecto persistente no está en relación a la acumulación del fármaco, sino que es posible que el tramadol (al igual que otros opioides), induzca cambios plásticos en las vías de señalización del dolor, que posiblemente podrían implicar una exacerbación de la activación de las vías descendentes noradrenérgicas. De hecho, apoyando esta teoría, demostraron también que la antihiperalgnesia inducida por el tramadol no se veía alterada por la naloxona pero sí por la yohimbina (antagonista receptores  $\alpha$ -adrenérgicos). Así, en el presente estudio, a pesar de no poder descartar un efecto residual de la anestesia, el mayor efecto antihiperalgésico observado a las 4 horas respecto a los días 1-2 del postoperatorio podría sugerir que el efecto inicial sería opioide y monoaminérgico, mientras que, posteriormente, este último sería el responsable de mantener los niveles elevados y sostenidos de NA y 5-HT fomentando la antihiperalgnesia.

El efecto antinociceptivo del tramadol (Apaydin S y cols., 2000) y de los agonistas  $\alpha$ -2 adrenérgicos (Bantel C y cols., 2005; Omiya Y y cols., 2008), está aumentado en el dolor neuropático; este hecho estaría en relación con el incremento de la actividad de los receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos (pre- y postsinápticos) que atenúan la transmisión glutamatérgica en la médula espinal en situaciones de dolor patológico (Chen SR y cols., 2011). Este efecto está mediado por una disminución de las corrientes excitatorias glutamatérgicas postsinápticas (incrementadas en el dolor patológico) debido, en parte, al incremento de la amplitud de las corrientes postsinápticas a través de los canales de potasio GIRK (inhibitorias, hiperpolarización) que inducen los agonistas del receptor  $\alpha$ -2 adrenérgicos; este fenómeno se demostró que era mayor en ratas con una neuropatía que en animales *naïve* y que estaba relacionado con la antinocicepción (Chen SR y cols., 2011). En nuestro modelo, es posible que la incisión induzca también una sobreexpresión/activación de los receptores noradrenérgicos, lo que podría contribuir al prolongado efecto antihiperalgésico del tramadol.

El componente serotoninérgico en la analgesia inducida por el tramadol es más controvertido. Mientras que en el modelo de dolor postincisional en el ratón algunos autores muestran un efecto antihiperalgésico del tramadol activando las vías descendentes serotoninérgicas (Yanarates O y cols., 2010), otros han descrito un efecto facilitador de la nocicepción por activación de los receptores 5-HT $_3$  en modelos de dolor neuropático

(Rahman W y cols., 2006). El hecho que el ondansetron (antagonista 5-HT<sub>3</sub>) reduce la analgesia inducida por tramadol en el DAP en humanos sugiere que el opioide favorece la activación de las vías inhibitorias descendentes (Arcioni R y cols., 2002).

Es interesante mencionar que el efecto antihiperalgésico del tramadol observado en nuestro estudio, también podría estar en relación a su efecto antiinflamatorio. El tramadol induce la proliferación de algunas células inmunes como los esplenocitos, responsables a su vez del aumento de la IL-2 implicada en la respuesta inmune (Sacerdote P y cols., 1997). Curiosamente, estos efectos son diferentes a los descritos tras la administración de otros opioides, como la morfina, que inducen inmunosupresión (Taub DD y cols., 1991). El efecto del tramadol sobre el sistema inmune se produce a dosis mucho más bajas (1 mg/kg) que las necesarias para inducir un efecto antinociceptivo (rango 20-80 mg/kg, test *hot plate*). Es más, la administración crónica de tramadol demostró tener efecto antinociceptivo (*hot plate*) sin desarrollar tolerancia, mientras que desaparecía el efecto inmunomodulador (Sacerdote P y cols., 1997); así, estos experimentos sugerirían no solo una disociación entre ambos efectos sino también una posible tolerancia del sistema inmune. A pesar de que las dosis empleadas en el presente estudio (100 mg/kg) son muy superiores a las que producen un efecto antiinflamatorio (1 mg/kg), no podemos descartar que el efecto antiinflamatorio del tramadol no pudiera contribuir a la antihiperalgnesia observada.

Existe amplia evidencia clínica y preclínica de la aparición de hiperalgnesia tras la administración aguda y crónica de opioides mayores (HIO) tales como el fentanilo, el remifentanilo y el alfentanilo, entre otros (Célérier E y cols., 2006; Cabañero D y cols., 2009a,b; Angst MS y Clark JD, 2006). Sin embargo, un metanálisis reciente muestra que en el periodo postoperatorio, sólo se pudo demostrar HIO en pacientes que habían recibido dosis altas de remifentanilo durante la cirugía (Fetcher D y Martínez V, 2014). En cuanto a la posibilidad de que el tramadol pueda provocar hiperalgnesia (HIO), no hemos encontrado ningún estudio preclínico que lo demuestra, aunque una publicación reciente de dos casos clínicos muestra que la administración crónica de tramadol *aparentemente* provocó dolor generalizado con la aparición de HIO (Lee SH y cols., 2014); en ambos casos los pacientes recibieron dosis altas de tramadol de forma crónica refiriendo un cambio en las características del dolor al aumentar las dosis (Lee SH y cols., 2014). En nuestro estudio, el efecto del tramadol sobre los umbrales nociceptivos no ha sido evaluado en animales *sham* operados. Esto es debido a que en modelos animales el tramadol no modifica de forma significativa los umbrales nociceptivos (*Von Frey*) cuando se administra por distintas vías (intratecal, sistémica) de forma aguda o crónica (Mei XP y cols., 2013a; Sakakiyama M y cols., 2014); por el contrario y siguiendo el mismo protocolo de administración, la morfina indujo HIO en animales no manipulados (Sakakiyama M y cols., 2014).

## VI. Discusión

Además del leve efecto inhibitor de la HPO (4h-2d), el tramadol también previene aproximadamente en un 50%, la hiperalgesia inducida por la naloxona el día 21 tras la intervención (SLD). Estos resultados sugieren que el tramadol podría prevenir cambios plásticos en el sistema nervioso inducidos por la cirugía gracias a la disminución de la transmisión nociceptiva en el postoperatorio temprano o bien este opioide menor habría contribuido a fomentar un nuevo equilibrio (SLD) de los sistemas inhibitorios descententes noradrenérgicos. En el primero de los casos, el incremento sostenido de noradrenalina podría haber fomentado la disminución de las corrientes glutamatérgicas mediante la activación de los receptores  $\alpha 2$ - adrenérgicos postsinápticos; este hecho podría haber disminuido la sobreexpresión/activación de receptores implicados en la plasticidad neuronal, como los NMDA. En la segunda hipótesis, la administración intraoperatoria de tramadol habría contribuido a acrecentar la actividad del sistema noradrenérgico como parte de los mecanismos compensatorios antinociceptivos que se desarrollan durante la SLD. Estos sistemas, igual que el sistema opioide endógeno se mantendrían constitutivamente activados (Campillo A y cols., 2011; Corder G y cols., 2013) hecho que explicaría porque el antagonismo de los receptores opioides (naloxona) induce nuevamente hiperalgesia pero con una magnitud menor.

En nuestro estudio, la administración aguda de una dosis alta de tramadol en ausencia de incisión (animales *sham*-operados) induce activación astrocitaria un día después de su administración, sin modificar la inmunoreactividad de la microglía. Además, en animales postincisión, el día 1 del postoperatorio, el tramadol inhibe la activación de la microglía sin modificar la activación de los astrocitos; tampoco modificó la reactivación astrocitaria inducida por la administración de naloxona.

El efecto del tramadol sobre la inhibición de la inmunoreactividad microglial en nuestro estudio, podría estar en relación con una *acción directa o indirecta* sobre la producción de citoquinas de estas células. Todo ello, contribuiría a interrumpir el *feedback* positivo entre la activación neuronal y glial, que ocurre tras la lesión tisular (Milligan ED y Watkins LR, 2009). En nuestro estudio observamos una inhibición total de la inmunoreactividad de la microglía el día 1 del postoperatorio, coincidiendo en el tiempo con un efecto antihiperálgico parcial. Este efecto ha sido observado también en un modelo de dolor neuropático tras la administración intratecal de tramadol (10  $\mu$ g), asociado a antihiperálgico (Mei XP y cols., 2013a); en este trabajo, los autores detectan una menor inhibición de la microglía a la observada por nosotros, mostrando además que el tramadol inhibe la expresión de Fos neuronal en mayor proporción que la inhibición de la glía (Mei XP y cols., 2013a). Puesto que la proteína Fos refleja la activación neuronal, es posible que el tramadol, a través de los receptores opioides y noradrenérgicos neuronales disminuya la transmisión nociceptiva y la

liberación de sustancias pronociceptivas que actúan sobre la glía bloqueando así la inmunoreactividad glial. Ante las evidencias reportadas, el efecto inhibitor total observado en nuestros experimentos se podría deber, en parte, a una *acción indirecta* sobre la microglía; así, la lesión induciría excitabilidad neuronal acompañada de liberación de varios transmisores como aminoácidos excitatorios, ATP o quimioquinas, como la fractalina, que es un activador de la microglía, liberación prevenida por el tratamiento con tramadol. De este modo, la reducción de la excitabilidad neuronal inducida por el tramadol podría ser la responsable de la disminución de la inmunoreactividad microglial; así, además se reduciría la liberación de sustancias excitatorias por parte de la glía que, al actuar sobre la neurona, contribuyen a la sensibilización y a la manifestación de ésta mediante hiperalgesia. Es más, la acción específica del tramadol sobre el receptor  $\mu$  opioide podría ser responsable, en parte, de la reducción de la excitabilidad neuronal, como ya se ha visto previamente con opioides que prevenían la expresión de Fos en médula espinal (Hammond DL y cols., 1998).

Por otra parte, el bloqueo del incremento de inmunoreactividad glial observado también podría estar en relación a una *acción directa* de la noradrenalina y serotonina, puesto que el tramadol inhibe la recaptación de ambas monoaminas y sus respectivos receptores están presentes en las células de microglía. Concretamente, en el caso de los receptores adrenérgicos no solo se han descrito en estas células sino que también se ha observado que su conformación y expresión cambia en función de su estado inactivo ( $\beta$ -adrenérgicos) o activo ( $\alpha_{2A}$  – adrenérgicos) (Gyoneva S y cols., 2013). De hecho, en estudios *in vitro* con células de microglía activadas por LPS, los antidepresivos inhibidores de la recaptación de serotonina y/o noradrenalina muestran un efecto antiinflamatorio reduciendo la liberación de NO y TNF- $\alpha$  4 y 24 horas tras el estímulo (Tynan RJ y cols., 2012).

Otros estudios *in vivo*, también han relacionado el tramadol con una disminución de la inmunoreactividad glial aunque sin discernir entre una acción directa o indirecta (Mei XP y cols., 2013b). En este estudio mostraron que el tramadol disminuye el aumento de la quinasa p38 fosforilada (activada) en la microglía el tercer día tras la ligadura del nervio ciático; induciendo a la vez una disminución de la IL-1 $\beta$  (Mei XP y cols., 2013b).

El día 1 del postoperatorio, la administración intraoperatoria de tramadol no provocó cambios en la activación astrocitaria inducida por la cirugía. Sin embargo, el tramadol por si solo (animales *sham-operados*) induce el mismo nivel de activación astrocitaria que la cirugía. Cuando ambos factores concurren (cirugía y tramadol) observamos el mismo nivel de activación, sugiriendo que tras la cirugía, el tramadol podría tener un efecto inhibitorio enmascarado por el efecto estimulante de la activación astrocitaria. También es posible que el porcentaje de activación astrocitaria observado en nuestro estudio (aproximadamente un



## VI. Discusión

11 %, **Figura 49 y Tabla 12**) sea el máximo que nos permite detectar la metodología utilizada, por lo que no podemos observar un efecto estimulante mayor (sumación de efectos), en animales que han recibido tramadol durante la cirugía. El efecto activador de los astrocitos no ha sido observado después de la administración crónica de tramadol, mientras si pudo ser demostrado en animales que habían recibido morfina (Sakakiyama M y cols., 2014). El aumento en la inmunoreactividad astrocitaria inducido por la incisión ha sido previamente reportado por nuestro grupo en animales que recibieron remifentanilo durante la cirugía (Romero A y cols., 2013). La activación glial tras la administración de opioides ha sido relacionada con la HIO y con la tolerancia-opioide, sugiriendo que la glía podría tener un papel relevante en ambos fenómenos por medio de la activación de los receptores TLR4 presentes en la glía; es más, la HIO desaparecía cuando se administraban simultáneamente el opioide mas un inhibidor de la glía, manteniendo de esta forma el efecto analgésico (Hutchinson MR y cols., 2007; Song P y Zhao ZQ, 2001). Sin embargo, ante la falta de evidencia clínica y experimental de que el tramadol pueda inducir hiperalgia opioide, es difícil afirmar que la estimulación de la inmunoreactividad astrocitaria inducida por el tramadol en nuestro modelo esté relacionada con la hiperalgia postoperatoria.

Por otra parte, en un modelo dolor neuropático, Sakakiyama M y colaboradores (2014), observaron que el tramadol administrado de forma crónica, podía prevenir y revertir el dolor neuropático; los autores sugieren que el efecto antinociceptivo podría estar mediado por la inhibición de los astrocitos a través de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos y, en contraposición con nuestros estudios y otros (Tynan RJ y cols., 2012; Gyoneva S y cols., 2013), sin alterar la inmunoreactividad de la microglía inducida por la lesión. Este mecanismo adrenérgico mediante el cual el tramadol inhibía el incremento de la inmunoreactividad astrocitaria, era evidenciado puesto que la administración previa de naloxona no alteraba el efecto del fármaco mientras que si lo hacía la administración de yohimbina (antagonista de los receptores  $\alpha_2$ - adrenérgicos). Así estos autores pudieron demostrar la naturaleza monoaminérgica (y no opioide) del efecto del tramadol sobre los astrocitos.

En nuestros estudios, tampoco podemos descartar que el tramadol, a pesar de no disminuir la inmunoreactividad inducida por la cirugía, no induzca un efecto antihiperalgésico mediado por liberación de sustancias antinociceptivas y descrito en las células de astrocitos activadas (Milligan ED y Watkins LR, 2009). Con todo, también es posible que este fármaco proporcione antihiperalgia en el postoperatorio inmediato (HPO) por mecanismos totalmente independientes a la inhibición de la activación astrocitaria. Es más, nuestros estudios han demostrado que el tramadol previene parcialmente el desarrollo de SLD sin modificar la reactivación astrocitaria inducida por la naloxona; sugiriendo que en la

prevención del desarrollo de SLD que proporciona este opioide menor, no están implicados cambios en la activación de los astrocitos.

Un hecho a destacar, es que la activación astrocitaria inducida por la administración de tramadol el día 1 postadministración, no se prolonga en el tiempo, puesto que no se observa a los 21 días del postmanipulación tras la administración de naloxona. Este hecho pondría de manifiesto las diferencias entre la inmunoreactividad astrocitaria inducida por el tramadol y por el remifentanilo (opioide mayor). Este último no solo induce inmunoreactividad astrocitaria el día 1 sino también reactivación astrocitaria tras la administración de naloxona asociada a hiperalgesia (Romero A y cols., 2013).

En base al uso clínico del dexketoprofeno y el tramadol en el tratamiento del DAP, donde generalmente se utilizan simultáneamente durante la analgesia multimodal, nos planteamos valorar el efecto de la combinación sobre la hiperalgesia postoperatoria y la activación glial inducida por la cirugía el día 1 del postoperatorio.

En estudios anteriores, nuestro grupo ha podido demostrar sinergia para el efecto antinociceptivo de la combinación dexketoprofeno / tramadol en animales sanos y modelos animales de dolor agudo y crónico-inflamatorio (Miranda HF y cols., 2009, 2012); sin embargo aun a pesar uso clínico, los efectos de la combinación, no han sido investigados hasta el momento en el modelo de dolor postquirúrgico. Los mecanismos implicados en los efectos de la combinación no se conocen con exactitud. Algunos autores han postulado que, en la médula espinal, las prostaglandinas podrían inhibir la liberación de NA presináptica (Taiwo YO y Levine JD y cols., 1988). Así, la inhibición de la síntesis de las prostaglandinas inducida por el dexketoprofeno podría incrementar los niveles de NA, hecho que podría aumentar / potenciar los efectos antinociceptivos del tramadol.

En nuestros experimentos, utilizamos un análisis isoblográfico para investigar la presencia de interacción entre los fármacos. Para ello se obtuvieron curvas dosis respuesta de cada uno de los fármacos (individualmente y en combinación) el día 1 del postoperatorio; estas curvas (**figura 51, tabla 13**) ponen de manifiesto las diferencias entre el efecto antihiperalgésico del dexketoprofeno y el tramadol. Así, el dexketoprofeno demostró ser un eficaz antihiperalgésico (alcanzando un  $E_{max}$  del 100%) frente al escaso efecto antihiperalgésico inducido por el tramadol ( $E_{max}$  del 42 %). Contrariamente, el tramadol demostró una potencia *antinociceptiva* muy superior al dexketoprofeno ante estímulos térmicos (*hot plate*) o químicos (ácido acético) tanto en animales sanos como en presencia de inflamación aguda y crónica (Miranda HF y cols., 2012; 2009). Estas discrepancias destacan una vez más las diferencias entre las características del dolor incisional y otros

## VI. Discusión

tipos de dolor nociceptivo, así como la importancia del estímulo utilizado en la evaluación de los efectos analgésico y antihiperalgésico de los distintos fármacos.

Cuando analizamos el efecto antihiperalgésico de la combinación, observamos que fue total durante la HPO (80%), mientras que fue solo parcial (30%) durante la SLD (día 21 + naloxona); estos resultados reflejan aproximadamente la sumación de los efectos antihiperalgésicos de ambos fármacos.

En cuanto a los efectos de la combinación dexketoprofeno : tramadol sobre la glía, observamos el mismo perfil que tras la administración individual de los fármacos. Así, el día 1 del postoperatorio, la combinación bloqueó totalmente el incremento de la inmunoreactividad de la microglía inducida por la cirugía, sin alterar la activación astrocitaria. Este hecho está en concordancia con el efecto aditivo observado en el comportamiento nociceptivo. Un punto a destacar, es que la activación astrocitaria inducida por el tramadol individualmente (sólo) en animales *sham* operados, no fue observada cuando se administró la combinación; es posible que este efecto del tramadol sea dosis-dependiente y no se observe a las dosis utilizadas en la combinación (1:1), hecho que confirman otros estudios recientes (Sakakiyama M y cols., 2014). No obstante, aunque la administración individual de dexketoprofeno no indujo ningún efecto sobre los astrocitos, no podemos descartar que este AINE actúe impidiendo el incremento de inmunoreactividad inducido por el tramadol en animales *sham-operados*.

Según se ha descrito en Métodos, se llevo a cabo el análisis isoblográfico de la asociación dexketoprofeno/tramadol, combinados en un proporción 1:1 en base a su potencia antihiperalgésica, obteniendo los índices de interacción. Los resultados muestran que no hubo interacción entre los fármacos, y que los efectos son aditivos a todos los niveles de efecto (20, 50, 80%). De momento, no tenemos una hipótesis válida que pueda explicar la falta de interacción entre estos fármacos en el modelo de DAP, aunque el tipo y la intensidad del estímulo parecerían responsables del cambio en el tipo de interacción (sinergia, sumación). A pesar de ello, cabe destacar que estudios previos mostraron que la variación de los ratios de concentración de la combinación resultaban en una interacción diferente entre los fármacos (Miranda HF y cols., 2009,2012). Así no podemos descartar que la variación de los ratios de concentración combinados pudieran resultar en una interacción entre los fármacos (Tallarida RJ y cols., 1997).

A pesar de la falta de interacción de los fármacos, la coadministración de estos presenta una ventaja importante puesto que induce un *efecto protector dual* proporcionando una prevención tanto de la HPO como del desarrollo de SLD.

La **ketamina** y la **gabapentina** son dos fármacos utilizados en el tratamiento del dolor, que con frecuencia se incluyen en el grupo de “adyuvantes”. En el contexto del presente trabajo

tienen especial interés puesto que hasta el momento, son los únicos fármacos que han demostrado un efecto *preventivo* sobre la aparición de DCPQ en humanos (Chaparro LE y cols., 2013; Clarke H y cols., 2012). Concretamente, la evidencia clínica muestra que estos fármacos administrados en el periodo perioperatorio disminuyen la incidencia del DCPQ, aunque las mejores pautas y protocolos para su uso no han sido establecidos de forma definitiva. Como parte del presente proyecto, hemos investigado la implicación de las células de glía en el efecto antihiperalgésico de la ketamina y la gabapentina en el modelo de dolor postincisional en el ratón (HPO, LPS).

La ketamina es un excelente analgésico / anestésico, utilizado en el tratamiento del DAP en pacientes con dolor intenso (Laskowski K y cols., 2011). En nuestro modelo, pudimos demostrar que la administración intraoperatoria de una única dosis de ketamina previene en aproximadamente un 50 % la HPO (4horas, 1 día). Este hecho podría estar en relación al efecto antiinflamatorio del fármaco, que ha sido demostrado tanto *in vitro* (Kawasaki T y cols., 1999) como *in vivo* (Takenaka I y cols., 1994); este efecto es más pronunciado cuando la ketamina se administra antes del estímulo (Taniguchi T y cols., 2001), hecho que apoyaría su administración intraoperatoria. El mecanismo antiinflamatorio se cree que está en relación a la disminución de la liberación de citoquinas proinflamatorias (tales como TNF- $\alpha$ , IL-6 o IL-8), sin alterar los niveles de las citoquinas antiinflamatorias (KawasaKi T y cols., 1999; Kawasaki C y cols., 2001). La ketamina podría producir este efecto antiinflamatorio/antihiperalgésico a través de mecanismos mediados por los TLR o bien NMDA. En el primero de los casos, la ketamina demostró bloquear la activación de los receptores TLR impidiendo la unión de las moléculas liberadas y células dañadas por la lesión (DAMPs, *damage associated molecular pattern*) que actúan como agonistas sobre los TLR; la inhibición de esta interacción impide la activación de la cascada de señalización que conducen a la producción de moléculas pronociceptivas (Chen TL y cols., 2009). En el segundo de los casos, el antagonismo de los receptores NMDA reduce la entrada de calcio y la activación de segundos mensajeros (MAPK) impidiendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias además de inhibir la transmisión excitatoria (Li Y y cols., 2012).

Puesto que ambos receptores se encuentran expresados no solo en neuronas sino también en las células de glía (microglía y astrocitos) en el SNC (Kaindl AM y cols., 2012; Dzamba D y cols., 2013), la ketamina actuaría tanto a nivel neuronal como glial. De hecho, en el presente proyecto, observamos que durante la HPO (día 1) el efecto antihiperalgésico parcial de la KET coincide en el tiempo con un bloqueo completo de la activación de la microglía. De manera similar, Mei XP y colaboradores (2011) demostraron que la ketamina disminuía la hiperalgnesia mecánica paralelamente a la inhibición de la activación de la

## VI. Discusión

microglía en un modelo de dolor neuropático. En este estudio, los autores sugieren que la inhibición de la microglía podría estar en relación a un mecanismo *indirecto* bloqueando la activación de la vía de la quinasa p38 a través de la inhibición de la activación de los TLR3 o bien *directo* a través del antagonismo de los receptores NMDA.

Durante el periodo HPO (día 1), observamos que la ketamina inducía también una reducción parcial de la activación astrocitaria que alcanzó aproximadamente un 50%. Nuestros resultados, apoyan estudios previos en un modelo de inflamación *in vitro* inducido por LPS, en el cual también observaban reducción de la inmunoreactividad astrocitaria tras la administración de ketamina (Wu Y y cols., 2012). En este estudio, los autores mostraron que el LPS inducía una sobreexpresión de los receptores TLR4, activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la liberación de sustancias proinflamatorias. La administración de ketamina redujo la liberación de estas citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ), y la expresión y activación de TLR4 y NF- $\kappa$ B respectivamente.

Así, de manera similar a la microglía, la ketamina inhibiría la activación de los astrocitos mediante la supresión de la activación de los receptores TLR. Otro estudio interesante muestra en un modelo de dolor neuropático en ratas, que la ketamina induce antihiperalgnesia tanto por vía sistémica como intratecal, aunque sólo ésta última provocó la disminución de la inmunoreactividad astrocitaria (Mei X y cols., 2009). Las discrepancias con nuestros resultados respecto a la vía de administración, podrían estar en relación a las dosis administradas (que fueron mayores en nuestro caso), el tiempo o momento de administración del fármaco (intraoperatorio) y/o las diferencias entre modelos experimentales.

La expresión de receptores NMDA en astrocitos a nivel de la médula espinal es controvertida (Ziak D y cols., 1998; Nagy GG y cols., 2004). Así, la presencia de un antagonista de la subunidad NR2B del receptor NMDA inhibió la activación los astrocitos en cocultivos de neurona-glia pero no en cultivos de astrocitos purificados (Kato H y cols., 2006); este hecho puso de manifiesto un efecto *indirecto* sobre los astrocitos que podría estar en relación al antagonismo de los receptores NMDA neuronales. También, algunos estudios en dolor neuropático, no descartan la posibilidad de que la inhibición astrocitaria asociada a la antihiperalgnesia tras la administración de ketamina sea un efecto indirecto a través del bloqueo de los receptores NMDA neuronales (Mei X y cols., 2009; Mei XP y cols., 2011). La lesión nerviosa induce liberación de NO vía activación de los receptores NMDA neuronales (Yonehara N y cols., 2003) y esta sustancia (NO) promueve la expresión de la proteína GFAP en los astrocitos (activación); el bloqueo de los receptores NMDA neuronales disminuiría la liberación de NO, reduciendo así el aumento de inmunoreactividad astrocitaria. En otro estudio realizado también en un modelo de dolor neuropático, se observó que la ketamina intratecal bloqueaba el aumento de la quinasa JNK fosforilada (familia MAPK),

coincidiendo con una disminución de la hiperalgesia (Mei XP y cols., 2011). Esta quinasa aumenta tras la lesión nerviosa, y como consecuencia se produce un aumento de la transcripción de sustancias pronociceptivas; esta vía de señalización es específica de los astrocitos (pero no de la microglía) y podría ser responsable de la activación de los astrocitos en modelos de dolor neuropático (Gao YJ y cols., 2009).

El día 1 del postoperatorio, aunque la hiperalgesia y la activación astrocitaria sufren un porcentaje de inhibición similar después de la administración de ketamina (60 y 48%, respectivamente), parece improbable que el efecto antihiperalgésico (parcial) pudiera explicarse sobre la base de la inhibición astrocitaria. Así por ejemplo otros fármacos utilizados en el estudio como el dexketoprofeno, muestran, en el mismo tiempo de evaluación, un efecto antihiperalgésico total (completo) sin que se puedan detectar cambios en la inmunoreactividad astrocitaria. Sin embargo, es posible que la inhibición parcial de la activación astrocitaria observada el día 1 después de la ketamina, pudiera prevenir ciertos cambios asociados al desarrollo de SLD. De hecho, nuestros resultados muestran que la administración intraoperatoria de ketamina evita parcialmente la hiperalgesia inducida por naloxona (el día 21) y a la vez bloquea (casi) totalmente la reactivación astrocitaria; este hecho sugiere que la ketamina intraoperatoria previene cambios plásticos a nivel de la glía espinal que participan en la aparición de SLD. Entre los cambios plásticos (neuronales y/o gliales) que podría prevenir la ketamina, podrían incluirse el bloqueo de la *posible* sobreexpresión de receptores NMDA y TLRs, descrita en modelos *invitro e invivo* inflamatorios y neuropáticos (Wu Y y cols., 2012; Bettoni I y cols., 2008; Pu S y cols., 2013). De hecho, otros fármacos, como la minociclina, han demostrado una reducción de la sobreexpresión de los receptores NMDA acompañada de la disminución de la hiperalgesia mecánica en un modelo de dolor neuropático (Pu S y cols., 2013). Resultados previos obtenidos por nuestro grupo apoyan también la participación de receptores NMDA en el desarrollo de SLD después de una incisión quirúrgica. Así, experimentos realizados en nuestro laboratorio (Campillo y cols., 2011) y reproducidos posteriormente por otros autores en un modelo de dolor inflamatorio (Corder G y cols., 2013) pusieron de manifiesto la importancia de los receptores NMDA en la SLD. En nuestros estudios anteriores, el día 21 del postoperatorio pudimos observar que la administración de MK-801 (antagonista NMDA), previa a la administración de un antagonista opioide, impidió la aparición de la hiperalgesia. Así, a pesar de que nuestros experimentos no permiten determinar por qué mecanismo/s la ketamina previene la SLD podríamos sugerir que la administración temprana de este fármaco quizás contribuya a la prevención de la posible sobreexpresión de estos receptores (NMDA), tanto neuronales como astrocíticos. Aún así, tampoco podemos descartar que la disminución de la excitabilidad neuronal así como la activación astrocitaria y, por tanto, la disminución de sustancias pronociceptivas en el postoperatorio temprano, pudieran

## VI. Discusión

contribuir a la prevención de la sensibilización central y evitar cambios plásticos, de manera independiente a una sobreexpresión de los receptores NMDA. De hecho, es importante resaltar también, que los receptores NMDA astrocitarios son más sensibles a la presencia de glutamato; este hecho se debe a que la activación astrocitaria no requiere, a diferencia de la neuronal, despolarización, y que, además, los receptores NMDA astrocitarios no presentan el bloqueo de  $Mg^{2+}$  lo que favorece su rápida activación (Verkhatsky A y Kirchhoff F, 2007). Estos hechos apoyarían de nuevo a la administración intraoperatoria de ketamina para evitar la plasticidad asociada a la activación de los receptores NMDA en astrocitos los cuales serían activados en etapas muy tempranas tras el estímulo (cirugía).

Nuestros resultados experimentales apoyan por tanto los hallazgos clínicos relacionados con la prevención de la aparición de DCPQ en pacientes que han recibido ketamina perioperatoria.

Los **gabapentinoides** son otra familia de fármacos que se utilizan para prevenir la aparición de DCPQ en humanos (Clarke H y cols., 2012); han sido investigados en el presente trabajo con el fin de establecer su efecto antihiperalgésico en nuestro modelo, así como su posible inhibición de la activación glial en la medula espinal. Hemos utilizado la gabapentina, puesto que existe una mayor experiencia y evidencia clínica en relación a su efecto sobre la prevención del DCPQ. La gabapentina carece de efecto antinociceptivo en modelos de dolor agudo (Laughlin TM y cols., 2002), aunque es eficaz en modelos de dolor crónico neuropático. En nuestro estudio, administramos una dosis única de **gabapentina** por vía intraperitoneal, 30 minutos antes de iniciar la cirugía. Esta modificación en el momento de administración (pre- versus intraoperatoria) del fármaco se llevó a cabo para mimetizar al máximo los protocolos clínicos que evalúan el efecto a largo plazo del fármaco, en los cuales la gabapentina se administra antes de la cirugía (Schmidt PC y cols., 2013).

En nuestro estudio pudimos observar que la gabapentina inhibió parcialmente la HPO (4h, 1d). El efecto antihiperalgésico que induce la gabapentina, está bien establecido que se debe a la inhibición de la excitabilidad neuronal mediante el bloqueo de la subunidad  $\alpha 2\delta$  de los canales de calcio, además de inhibir indirectamente el tráfico de estos canales a la membrana celular (Hendrich J y cols., 2008; Li CY y cols., 2006; Luo ZD y cols., 2002). Recientemente se ha podido demostrado que la expresión de la subunidad  $\alpha 2\delta$ , está incrementada 4 horas tras la administración de CFA, es decir casi inmediatamente tras el estímulo inflamatorio (Yang J y cols., 2012). También se ha postulado que la sobreexpresión de dicha subunidad es necesaria para el rápido desarrollo de hiperalgnesia mecánica tras la ligadura parcial del nervio ciático; este hecho ha sido demostrado mediante experimentos utilizando animales *knock-out* para la subunidad, que desarrollaron hiperalgnesia de manera

retardada después de la ligadura (Patel R y cols., 2013). Es más, la administración de gabapentina disminuye la sobreexpresión de estas subunidades en modelos de dolor neuropático e inflamatorio (Luo ZD y cols., 2002; Yang J y cols., 2012).

Sin embargo, además del bloqueo de la subunidad  $\alpha 2\delta$ , se han propuesto otros mecanismos de acción para explicar los efectos antihiperalgésicos de la gabapentina. Entre ellos, los más relevantes son el bloqueo de las corrientes de sodio (Yang RH y cols., 2009) y la apertura de los canales de potasio (Mixcoatl-Zecuatl T y cols., 2004), que inhibirían la hiperexcitabilidad y la actividad neuronal espontánea (anómala), disminuyendo de esta forma la sensibilización al dolor. Se ha postulado también un efecto antiinflamatorio observado a dosis muy bajas (1 mg/kg) en un modelo de dolor inflamatorio inducido por carragenina (Dias JM y cols., 2014) y la estimulación de las vías inhibitorias descendentes noradrenérgicas como mecanismos de la gabapentina (Hayashida K y cols., 2007; Suto T y cols., 2014).

La activación de las vías noradrenérgicas descendentes, fue reportada a dosis similares a las utilizadas en nuestros experimentos (100 mg/kg), tanto en humanos como en modelos animales de dolor postquirúrgico (Hayashida K y cols., 2007). En el postoperatorio, el efecto antihiperalgésico inducido por la administración oral e intracerebroventricular de gabapentina en ratas pudo ser bloqueado por la administración de idazoxan, un antagonista de los receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos. Sin embargo, y en contraposición a nuestros estudios, el efecto antihiperalgésico de la gabapentina se prolongaba hasta un máximo de 4 horas. En estos estudios, a diferencia de los nuestros, el fármaco se administraba 24 horas tras la cirugía; hecho que podría estar en relación a las diferencias observadas. De hecho, se ha demostrado (en clínica) que los efectos prolongados derivados de la administración perioperatoria de gabapentina implican la administración preoperatoria del fármaco (Schmidt PC y cols., 2013). De acuerdo con esto, Hayashida K y colaboradores (2007) observaron, en su estudio clínico, que tras la cirugía, aquellos pacientes que habían recibido gabapentina antes de la operación (90 minutos) tenían incrementados los niveles de noradrenalina en el líquido cefalorraquídeo.

Otros estudios preclínicos apoyan el mecanismo noradrenérgico de la gabapentina en modelos de dolor neuropático, donde observaron que la depleción del sistema noradrenérgico (6-hidroxi dopamina (6-OHDA)) bloqueaba también el efecto antihiperalgésico (Tanabe M y cols., 2005). Igualmente, también corroboran que el momento de administración de este anticonvulsivante podría determinar la duración del efecto; así la administración intratecal o intracerebroventricular postquirúrgica tuvo un efecto antihiperalgésico de hasta 2 horas.



## VI. Discusión

En otros modelos, como la inflamación crónica inducida por CFA (monoartritis), la administración aguda (Zhang WS y cols., 2009) y crónica (Yang J-L y cols., 2012) de gabapentina también pudo prevenir la hiperalgesia térmica y mecánica, respectivamente. En el primer caso, la administración de la gabapentina fue posterior a la inducción de la inflamación observándose un efecto antihiperalgésico que se prolongaba hasta las 2 horas. Sin embargo, el segundo caso, la administración crónica de gabapentina se iniciaba antes de la inducción de la inflamación (CFA); tras la interrupción del tratamiento el efecto se prolongaba 3 días.

Con todo, podríamos sugerir que el efecto antihiperalgésico duradero ( $\geq 1$  día) observado en nuestros experimentos estaría en relación al momento de administración (preoperatorio). Además, ante las evidencias de otros estudios, es posible que entre los múltiples mecanismos por los cuales la gabapentina induce antihiperalgesia, la activación de las vías noradrenérgicas pudiera ser partícipe. Sin embargo, los mecanismos por los cuales este anticonvulsivante activaría estas vías descendentes inhibitorias son controvertidos y no ha podido ser establecido de forma definitiva.

Recientemente se ha propuesto que la gabapentina ejercería esta acción mediante un mecanismo dependiente de los transportadores de glutamato (GLT-1) expresados en los astrocitos a nivel de *locus coeruleus*, y de manera independiente a las subunidades  $\alpha 2\delta$  de la neurona (Suto T y cols., 2014). En este estudio demostraron que la gabapentina incrementaba el nivel de glutamato en el LC de manera dependiente a los recaptadores de glutamato GLT-1, puesto que la depleción de estos (*knock-down* GLT-1) eliminaba este aumento; todo ello conducía a la estimulación de las vías inhibitorias descendentes noradrenérgicas. Por el contrario, la administración intratecal de gabapentina reduce los niveles de glutamato en médula espinal, apoyando su efecto inhibitorio local vía las subunidades  $\alpha 2\delta$  del canal de calcio (Suto T y cols., 2014; Hendrich J y cols., 2008; Li CY y cols., 2006). Estos resultados indican que el efecto de la gabapentina sobre los niveles de glutamato no es global en todo el sistema nervioso central. Puesto que en nuestros experimentos la gabapentina se administra vía sistémica, los efectos antihiperalgésicos observados podrían deberse tanto a acciones espinales como supraespinales del fármaco; sin embargo, no podemos discernir ambas acciones.

La NA liberada por la activación de las vías descendentes inhibidoras tras la administración de gabapentina, actuaría también sobre los astrocitos de la médula espinal. En los astrocitos, la NA se une a los receptores  $\alpha/\beta$ -adrenérgicos incrementando la recaptación de glutamato al astrocito mediante el aumento de la actividad de los transportadores de

glutamato dependientes de sodio (GLT1/GLAST) y el incremento de la eliminación de  $K^+$  gracias a la estimulación de la bomba  $Na^+/K^+$  (O'Donnell J y cols., 2012).

En nuestros estudios, observamos que la gabapentina indujo una disminución de la inmunoreactividad astrocitaria a la vez que un efecto antihiperalgésico el día 1 del postoperatorio. Sin embargo, no podemos afirmar que estos resultados se deban a una acción directa sobre estas células gliales. Parece improbable que la prevención de la inmunoreactividad astrocitaria esté relacionada a la prevención de la hiperalgesia en este período, puesto que otros fármacos utilizados en el estudio (dexketoprofeno, tramadol) han demostrado el mismo efecto sin alterarla. De hecho, Yang J y colaboradores (2012), observaron que la antihiperalgesia inducida por la gabapentina crónica, estaba asociada a una disminución de la inmunoreactividad de la microglía, pero no de los astrocitos. Nuestro trabajo apoya estos resultados puesto que observamos una disminución de la inmunoreactividad de la microglía durante el postoperatorio temprano (1d) asociado a la inhibición de la hiperalgesia. Puesto que las subunidades  $\alpha 2\delta$  no se han detectado hasta el momento, en los astrocitos ni en la microglía, los autores sugieren que la disminución de la inmunoreactividad se debería a una acción indirecta vía disminución de la liberación neuronal de neurotransmisores pronociceptivos para muchos de los cuales si que expresan receptores. Es más, en estos estudios la antihiperalgesia coincidió con una disminución de la liberación de la quimioquina pronociceptiva fractalquina, sustancia liberada por la neurona y cuyo receptor, que también disminuyó su expresión, está únicamente expresado en la microglía pero no en los astrocitos.

El bloqueo de la sobreexpresión de las subunidades  $\alpha 2\delta$  inducida por la gabapentina en modelos de dolor neuropático e inflamatorio (Luo ZD y cols., 2002; Yang J y cols., 2012) podrían estar en relación a la prevención parcial del desarrollo de SLD observado en nuestro estudio. Se podría postular que la administración intraoperatoria de gabapentina previene la sobreexpresión de las subunidades  $\alpha 2\delta$  en la médula espinal y produce antihiperalgesia. Sin embargo, puesto que las subunidades  $\alpha 2\delta$  no se expresan en los astrocitos, este mecanismo no podría explicar la prevención de la reactivación astrocitaria (asociada a la antihiperalgesia) observada tras la administración de naloxona (21d+Nx, SLD). No obstante, la liberación de NA inducida por la activación de las vías inhibitoras descendentes, actuaría a nivel neuronal y glial (astrocitos) disminuyendo la excitabilidad y la transmisión neuronal en la médula espinal. Es posible por tanto, que durante la SLD se sobreexpresen simultáneamente los sistemas compensatorios inhibitorios opioides (sistema opioide endógeno) y aminérgicos (NA y 5HT), fenómeno que se podría producir de manera similar en aquellos animales que recibieron tramadol, tal y como hemos sugerido anteriormente.

## VI. Discusión

Puesto que uno de los objetivos del presente estudio ha sido establecer el papel de la glía en los efectos antihiperalgésicos de distintos analgésicos y adyuvantes, quisimos también investigar si los compuestos capaces de inhibir la actividad glial presentan un efecto antihiperalgésico en el dolor postincisional en el ratón. Entre los inhibidores de la glía más utilizados experimentalmente encontramos la minociclina, la doxiciclina, la pentoxifilina y el fluorocitrato. Entre ellos, la **minociclina**, ha sido extensamente utilizada por otros autores tanto en estudios preclínicos como clínicos. Es una tetraciclina con un efecto antiinflamatorio demostrado independiente de su acción antimicrobiana (Amin AR y cols., 1996); se ha descrito que inhibe la activación glial y proporciona neuroprotección en múltiples modelos animales de procesos degenerativos del sistema nervioso, como son la isquemia cerebral (Yrjänheikki J y cols., 1998,1999), la enfermedad de Parkinson (Wu DC y cols., 2002), la esclerosis múltiple (Brundula V y cols., 2002), la neurotoxicidad inducida por glutamato (Tikka TM y Koistinaho JE, 2001), la enfermedad de Huntington (Chen M y cols., 2000) o la esclerosis lateral amiotrófica (Zhu S y cols., 2002). Además, la minociclina tiene efectos antinociceptivos, disminuyendo a su vez la activación de la microglía y la liberación de moléculas pronociceptivas en modelos animales de dolor inflamatorio (Bastos LFS y cols., 2007; Saito O y cols., 2010; Chacur M y cols., 2009), neuropático (Raghavendra V y cols., 2003; Mei XP y cols., 2011) y postoperatorio (Ito N y cols., 2009).

La minociclina ha sido considerada un inhibidor 'selectivo' o 'especifico' de la activación de la microglía y utilizada como una herramienta farmacológica. Sin embargo, tanto la minociclina como otras tetraciclinas actúan también sobre otros tipos celulares como son los linfocitos T, los macrófagos y las neuronas (Brundula V y cols., 2002; Kim TH y cols., 2011). Los estudios realizados con MINO en modelos de dolor postoperatorio (Ito N y cols., 2009) y neuropático (Mei XP y cols., 2011) ponen en evidencia, que la inhibición de la microglía inducida por la minociclina no siempre va acompañada de antihiperalgesia.

Aunque en modelos de dolor inflamatorio (carragenina, LPS o CFA), la administración sistémica o intratecal de minociclina induce un claro efecto antihiperalgésico (Bastos LFS y cols., 2007; Hua XY y cols., 2005), existe cierta controversia en cuanto a su efecto antihiperalgésico en modelos de dolor postoperatorio y neuropático. En el modelo de dolor incisional en rata, Ito N y colaboradores (2009) demostraron que la administración intraperitoneal de minociclina (50 mg/kg) inducía un ligero (pero significativo) efecto antihiperalgésico cuando el tratamiento se administraba 24 pero no 72 horas postcirugía. Sin embargo, dicho efecto antihiperalgésico únicamente fue detectable 30 minutos tras la administración y los autores no mostraban si este estaba relacionado con la disminución de la inmunoreactividad de la microglía. Además, la cirugía indujo un aumento de la quinasa p38 fosforilada en microglía, y la administración de un inhibidor de esta quinasa no consiguió bloquear la hiperalgesia. Curiosamente, en el mismo trabajo, no observaron efecto

antihiperalgésico cuando administraban el fármaco 1 hora antes de la intervención y posteriormente dos veces al día durante 3 o 7 días, aunque sí, inhibición de la microglía (día 3). Contrariamente, cuando los mismos experimentos fueron realizados en un modelo de dolor neuropático, tanto la minociclina como el inhibidor del p38 disminuyeron la hipersensibilidad y atenuaron la inmunoreactividad glial.

En nuestras condiciones experimentales (dosis única de 50 mg/kg de minociclina i.p. durante la cirugía), no observamos ningún efecto antihiperalgésico ni 4 horas ni 1 día postcirugía, así como tampoco cambios en la inmunoreactividad glial el día 1 del postoperatorio. Nuestros resultados podrían estar en relación con la corta duración del efecto antihiperalgésico (30 minutos postadministración) de la minociclina descrito anteriormente en rata (Ito N y cols., 2009); hecho que haría indetectable el efecto, si existe, en nuestros tiempos de evaluación (4h, 1d postcirugía/administración). Por otra parte, la falta de inhibición de la microglía en nuestros experimentos podría sugerir que el fármaco no ha alcanzado la médula espinal. Sin embargo, puesto que se ha demostrado que el tratamiento crónico inhibe la microglía sin producir antihiperalgesia es posible, tal y como ya sugirieron Ito N y colaboradores (2009), que la microglía tenga un papel secundario en el desarrollo de hiperalgesia en el modelo de dolor postoperatorio.

En el caso del dolor neuropático, Raghavendra y colaboradores (2003) mostraron que la administración intraperitoneal de minociclina una hora antes de la ligadura del nervio ciático en ratas y, posteriormente una vez al día prevenía la hiperalgesia mecánica y térmica además de inhibir la inmunoreactividad microglial durante todo el período de administración (10 días). Este mismo tratamiento no mostró efecto antihiperalgésico cuando se administraba a partir del día 5 tras la manipulación a pesar de que producía una inhibición parcial de la microglía. Otros autores también han observado el efecto antihiperalgésico de la minociclina intratecal cuando se administra los primeros días tras la ligadura del nervio ciático (1, 3 y 7 días), pero no si se administra en fases posteriores, cuando ya está establecido el dolor neuropático (10 ó 21 días después de la ligadura; Mei XP y cols., 2011); sin embargo, curiosamente, en ambos casos la minociclina inhibía la inmunoreactividad microglial. Este hecho sugeriría que el efecto antihiperalgésico de la minociclina podría deberse a un mecanismo independiente de la microglía. Posteriormente, estos autores mostraron la reducción de la hiperalgesia e inmunoreactividad glial tras la administración crónica (4 días) por vía intratecal, sola o en combinación con tramadol. Así, en el dolor neuropático la minociclina parece ser un tratamiento efectivo; sin embargo, cabe destacar que estos estudios indican que el momento de administración de este fármaco es crucial para que se observe el efecto, sugiriendo que la *ventana temporal* para la intervención terapéutica después de la aplicación del estímulo es muy reducida.

## VI. Discusión

A nivel clínico, el efecto analgésico de la minociclina, ha sido investigado recientemente en 100 pacientes intervenidos de una disectomía lumbar (Martinez V y cols., 2013). Los pacientes recibieron minociclina oral (100 mg / día) desde el día previo a la cirugía hasta el día 8 del postoperatorio i paracetamol vía sistémica en el postoperatorio; ningún otro analgésico fue administrado. El tratamiento no modificó la incidencia ni la intensidad de dolor en postoperatorio inmediato, ni tampoco la incidencia de DCPQ tres meses después de la intervención (análisis intensidad mediante escala numérica del 0-10 (NRS, *Numerical rating scale*);  $\geq 3$  dolor clínicamente relevante). Los autores, sin embargo, sugieren que el dolor preoperatorio presente en los pacientes incluidos en el estudio, podría ser una explicación para la falta de efecto, puesto que, como ya se había descrito en modelos animales, la minociclina no inhibía la hiperalgesia una vez instaurado el dolor neuropático (Mei XP y cols., 2011). Así, no descartan que este tratamiento pudiera ser efectivo en otro tipo de cirugías en las cuales los pacientes no presenten dolor crónico preoperatorio. Sin embargo, tampoco excluyen que la inhibición de la microglía no sea un tratamiento adecuado para el dolor postoperatorio, hipótesis también postulada en estudios preclínicos (Ito N y cols., 2009), a pesar de que sus experimentos no permiten asegurar que este hecho se haya producido.

En nuestros experimentos, además, la minociclina no protegió frente a la hiperalgesia y la reactivación astrocitaria tras la administración de naloxona el día 21; así este tratamiento tampoco pudo prevenir el desarrollo de SLD.

En el presente estudio, estudiamos también el efecto del agonista de los receptores cannabinoides tipo II (CB2), **A-836339**. Estos receptores se encuentran en la periferia (sistema inmune) y en el SNC, expresándose tanto en neuronas como en las células de glía. Se ha descrito una sobreexpresión de estos receptores en el GRD y en el SNC, en presencia de una lesión inflamatoria o nerviosa (Guindon J y Hohmann AG, 2008). En las neuronas, su activación induce una disminución de la excitabilidad neuronal y liberación de neurotransmisores, disminuyendo así la hipersensibilidad al dolor. En el caso de los receptores CB2 presentes en microglía y astrocitos, su activación, disminuye la liberación de citoquinas y quimioquinas durante la respuesta inflamatoria, a través de la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Panikashvili D y cols., 2005); como consecuencia se produce su efecto antiinflamatorio.

Existen diversos compuestos agonistas selectivos del receptor CB2 que han mostrado efecto antihiperalgésico en modelos animales de dolor inflamatorio (Hsieh GC y cols., 2011; Valenzano KJ y cols., 2005), neuropático (Valenzano KJ y cols., 2005; Yao BB y cols., 2009)

y postoperatorio (Yao BB y cols., 2009; Valenzano KJ y cols., 2005; LaBuda CJ y cols., 2005; Sun Y y cols., 2014; Romero-Sandoval A y Eisenach JC, 2007).

Entre los agonistas CB2, estudios *in vitro* tanto en rata y en humanos muestran que el compuesto A-836339 presenta una mayor selectividad por el receptor CB2 frente al CB1; el compuesto además demostró tener un efecto antihiperalgésico en el modelo de dolor postincisional en ratas (Yao BB y cols., 2009). Sobre la base de estos estudios pensamos que el compuesto A-836339 podría ser un compuesto útil para el tratamiento de la HPO y/o la prevención de la SLD en nuestro modelo experimental.

Concretamente, Yao BB y colaboradores (2009) demostraron que la administración intraperitoneal de A-836339 inhibía la hiperalgnesia postoperatoria cuando se administraba 30 minutos antes de la evaluación de las 2 y las 24 horas del postoperatorio (entre un 60-70%). En nuestro estudio, la administración de una dosis de 30 mg/kg ip del fármaco durante la cirugía, provocó un efecto antihiperalgésico ligeramente inferior (40%) a las 4h del postoperatorio; sin embargo, a pesar de que la dosis es superior a la utilizada por el grupo de Yao, el tiempo transcurrido hasta la evaluación es mayor, hecho que podría explicar las divergencias. A diferencia de otros fármacos evaluados en el presente estudio (DEX, TRM, KET, GBP), el efecto antihiperalgésico del A-836339 sólo pudo ser observado a las 4 horas del postoperatorio; así este fármaco no inducía una antihiperalgnesia prolongada. Es poco probable que la falta de efecto sea debida a la dosis del fármaco administrada puesto ya se había demostrado en nuestro modelo experimental en rata con otros compuestos selectivos para el receptor CB2 (AM1241, GW405833, HU-308) que la administración el día 1 del postoperatorio de 30 mg/kg inducía antihiperalgnesia 1 hora tras la administración (LaBuda CJ y cols., 2005). Es más, en el caso del trabajo de Yao BB y colaboradores (2009) la dosis que inducía antihiperalgnesia era menor (10 mg/kg). Sin embargo en ambos trabajos, únicamente se evaluó el efecto 30 minutos ó 1 hora tras la administración, por lo que podría ser que este efecto no se prolongara en el tiempo. De hecho, la duración del efecto antihiperalgésico del agonista CB2 GW405833, fue evaluada en el modelo de dolor postoperatorio (Valenzano KJ y cols., 2005); en este estudio demostraron que el día 1 del postoperatorio, este compuesto inducía un efecto dosis-dependiente (3-30 mg/kg, ip) 1, 3 y 5 horas postadministración; sin embargo, su efecto máximo (60% antihiperalgnesia) se producía durante las primera hora a la dosis máxima (30 mg/kg) y, 24 horas después, carecía de efecto. Tanto en este estudio como en nuestros experimentos una única dosis del fármaco tiene un efecto de corta duración, este hecho sugeriría que serían necesarias dosis repetidas para prolongar este efecto; sin embargo, es posible que la vía de administración también pudiera condicionar la duración del efecto. Así, recientemente, Sun Y y colaboradores (2014) demostraron un efecto antihiperalgésico

## VI. Discusión

prolongado tras la administración intratecal del agonista CB2 JWH015. En este estudio, el JWH015 fue administrado 30 minutos antes de la incisión e indujo un efecto antihiperalgésico desde las 6 hasta las 48 horas postcirugía, efecto que a su vez estuvo asociado a una reducción de la inmunoreactividad microglial y astrocitaria inducida por la cirugía.

De hecho, estudios anteriores (Romero-Sandoval A y Eisenach JC, 2007) también habían demostrado el efecto de este compuesto (JWH015) tras la administración intratecal (10 µg) el día 1 postcirugía; este efecto que se prolongaba en todos los tiempos evaluados (30 min, 1, 2 y 4 horas) y que estaba asociado a una prevención de la inmunoreactividad tanto microglial como astrocitaria. Es más, demostraban que el mecanismo por el cual inducía antihiperalgesia era de origen central, puesto que la administración intraplantar de un antagonista de los receptores CB2 (AM630) no bloqueaba el efecto, mientras que sí lo hacía tras su administración vía intratecal. De hecho, la administración de la misma dosis por vía intraperitoneal no tuvo efecto antihiperalgésico en el mismo período.

Estos estudios ponen de manifiesto la importancia de la acción central del fármaco y concretamente su efecto sobre las células de microglía y astrocitos. Sin embargo, tampoco se puede descartar que este efecto se deba a una acción sobre las neuronas en la médula espinal, que como se ha dicho expresan receptores CB2.

Con todo, estos estudios no solo ponen de manifiesto la necesidad de la administración intratecal, para obtener un efecto prolongado sino también descartan que la falta de efecto duradero sea debida a la administración de una única dosis. Una cuestión que apoyaría la administración del compuesto por esta vía sería la falta de solubilidad, siendo necesaria el uso de solventes especiales (5% DMSO/95% PEG-400 v/v); así ante los resultados obtenidos en el presente estudio y teniendo en cuenta las diferencias observadas con el estudio de Sun Y y cols (2014) pensamos que es posible que tras su administración sistémica, el compuesto no alcance el SNC o lo haga en una proporción muy pequeña; de esta forma, el efecto observado sería debido a la modulación periférica del sistema inmune donde los receptores están presentes y pueden mediar una acción antiinflamatoria. Aún así tampoco podemos descartar que las diferencias pudieran ser debidas a las divergencias entre los perfiles farmacológicos de los diversos agonistas de los receptores CB2 (Yao BB y cols., 2009).

Por otra parte, la administración intraoperatoria de A-836339 no modificó la hiperalgesia inducida por la naloxona (día 21 del postoperatorio). La ausencia de efecto antihiperalgésico el día 1 y la falta de prevención de la SLD muestran que el compuesto carece de efecto prolongado en nuestras condiciones experimentales. Debido a los resultados obtenidos, no se llevó a cabo la evaluación de la inmunoreactividad glial. A pesar de ello, no descartamos

que otros compuestos similares (por ejemplo JWH015) o la administración del A-836339 por vía intratecal pudieran prevenir el desarrollo de SLD.

Por último hemos investigado también el efecto del **midazolam** sobre la HPO y la SLD. Este fármaco se ha utilizado para explorar si los ansiolíticos podrían modificar la sensibilización nociceptiva en nuestro modelo. En la práctica clínica, algunos rasgos psicológicos, como la ansiedad, son factores predictivos para el desarrollo de DCPQ y los ansiolíticos se utilizan ampliamente en el periodo perioperatorio para inducir sedación. Además, en modelos animales, algunas benzodiazepinas como el midazolam, han mostrado tener un efecto antinociceptivo tanto cuando se administran solos (Chiba S y cols., 2009) como en combinación con 5-HT (Nishiyama T y cols., 2009). El midazolam también presenta un efecto antihiperalgésico en modelos animales de dolor neuropático (Shih A y cols., 2008; Lim J y cols., 2006).

En presencia de dolor neuropático, disminuye la modulación GABAérgica inhibitoria en relación a una pérdida de neuronas gabaérgicas, una disminución de su actividad y/o la depleción de GABA por pérdida de las enzimas que lo sintetizan (Dickenson AH y cols., 1997). Así, en un modelo preclínico de dolor neuropático, Miletic G y colaboradores (2003), observaron que la hiperalgia térmica estaba asociada a una disminución significativa de los niveles del transportador de GABA GAT-1 en la médula espinal; la infusión crónica de midazolam por vía sistémica (2 mg/kg/h durante 7 días) revertía ambos efectos, que pudieron ser bloqueados mediante la coadministración del antagonista GABA flumazenil (antagonista de las benzodiazepinas) (Shih A y cols., 2008). También, en otro estudio en dolor neuropático (CCI), Lim J y colaboradores (2006) observaron que la administración intratecal crónica (7 días) de midazolam iniciada inmediatamente tras la cirugía reducía significativamente la hiperalgia mecánica y térmica desde el día 1 del postoperatorio. Además, demostraron que el efecto estaba mediado por el receptor GABA<sub>A</sub> puesto que la administración de bicuculina (antagonista del GABA<sub>A</sub>) bloqueaba el efecto antihiperalgésico del midazolam. En el mismo trabajo, los autores observaron también que la administración de midazolam reducía la sobreexpresión de receptores AMPA inducida por la lesión nerviosa (CCI) efecto que fue bloqueado por la bicuculina.

Tras la administración de una dosis única de midazolam (4 mg/kg durante la cirugía), en nuestro estudio no pudimos detectar antihiperalgia ni a las 4 horas ni el día 1 del postoperatorio. La falta de efecto podría estar en relación a la vía de administración o el protocolo experimental utilizado. De hecho, se ha reportado un efecto antihiperalgésico temprano (día 1 postinfusión) tras la administración intratecal (Lim J y cols., 2006) pero no cuando se administra por vía sistémica (Shih A y cols., 2008), donde se observa una



## VI. Discusión

reducción de la hiperalgesia los días 3 y 7 después de la de infusión. En ambos estudios, el efecto del midazolam sobre la pérdida del transportador GAT-1 o sobre la sobreexpresión de los receptores AMPA se pudo observar tras el tratamiento crónico, sugiriendo la necesidad de una administración repetida para poder prevenir o revertir la hiperalgesia. Sin embargo, no podemos descartar que las diferencias entre el dolor neuropático y postoperatorio puedan ser las responsables de la falta de efecto del midazolam en nuestro estudio. Hasta el momento, no existen trabajos preclínicos que estudien el efecto del midazolam sobre el dolor postincisional, aunque su efecto analgésico/antihiperalgésico ha sido investigado en humanos (Grupta R y cols., 2012; Frölich MA y cols., 2013). Con todo, el efecto analgésico del midazolam en la clínica es controvertido: así se ha reportado que la combinación de midazolam y ketamina administrada antes de la extracción del tercer molar proporciona analgesia significativa además de reducir la inflamación (Grupta R y cols., 2012). Por el contrario, Frölich MA y colaboradores (2013), reportaron en voluntarios sanos, que la administración de midazolam incrementaba la sensación de dolor ante estímulos térmicos (frío, calor) y eléctricos.

Debido a que el midazolam no provocó antihiperalgnesia en nuestro modelo, no se llevó a cabo la evaluación del efecto sobre la inmunoreactividad glial. Sin embargo estudio previos realizados por otros autores muestran que, en la médula espinal, los receptores GABA se expresan tanto en neuronas como en las células de glía (astrocitos >> microglía) (Yoon BE y cols., 2012). Estudios *in vitro* de cultivos de células de glía activadas (por IL-1 $\beta$  o LPS) muestran que el midazolam disminuye la liberación de interleuquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 $\beta$ ) (Tanabe K y cols., 2011; Tanaka T y cols., 2013); este efecto se observa sobre todo en la microglía y está en relación al bloqueo de factores de transcripción como STAT3 (responsable de la producción de citoquinas proinflamatorias). Hasta el momento no existen estudios *in vivo* que relacionen el efecto antihiperalgésico con una disminución de la inmunoreactividad glial.

A modo de resumen, bajo nuestras condiciones experimentales no pudimos observar un efecto antihiperalgésico tras la administración de midazolam; sin embargo, no descartamos que este efecto se pudiera observar con protocolos de administración crónica, de forma similar a como se ha demostrado en modelos de dolor neuropático. Además, es posible que con la administración crónica se pudiera observar algún efecto sobre la microglía y astrocitos espinales. Con todo, las controversias percibidas en los estudios clínicos, junto con nuestros resultados (negativos) sugieren que las benzodiazepinas podrían ser poco eficaces como antihiperalgésicos en el tratamiento del dolor postoperatorio.

## RESUMEN

En el presente trabajo hemos investigado el efecto de distintos analgésicos y adyuvantes utilizados en el tratamiento del DAP en humanos, sobre la hiperalgesia postoperatoria (HPO), el desarrollo de sensibilización latente al dolor (SLD) y la activación glial en la medula espinal.

Nuestros resultados muestran que el dexketoprofeno, el tramadol, la ketamina y la gabapentina inhiben (total o parcialmente) la HPO y a la vez, todos ellos previenen completamente el aumento de inmunoreactividad de la microglía inducida por la cirugía. Cabe mencionar que durante la HPO, únicamente el dexketoprofeno es capaz de prevenir totalmente la hiperalgesia, mientras que el resto de fármacos (tramadol, ketamina y gabapentina) lo hacen de manera parcial. Estos resultados sugieren, que la microglía podría participar en los mecanismos implicados en la aparición de HPO desempeñando un papel secundario, puesto que su total inhibición no siempre bloquea completamente la hiperalgesia. Nuestros resultados también demuestran que algunos fármacos (tramadol = ketamina>gabapentina) protegen frente al desarrollo de SLD. En el caso de la ketamina y la gabapentina, este efecto es paralelo al bloqueo de la reactivación de la inmunoreactividad astrocitaria, apoyando la experiencia clínica en lo que respecta a la prevención del DCPQ que inducen. El efecto preventivo podría estar en relación a que estos fármacos impiden o bloquean los cambios plásticos inducidos por la incisión, cambios que probablemente incluyen activación de los astrocitos espinales. Sin embargo, entre los efectos de los fármacos estudiados, hemos demostrado que el tramadol previene (al igual que la ketamina) la aparición de SLD, efecto que se produce de manera independiente a la plasticidad astrocitaria. Por otra parte, la ketamina y la gabapentina inhiben también la sobreexpresión de receptores NMDA y la subunidad  $\alpha 2\delta$  respectivamente inducidas por la cirugía, poniendo de manifiesto en nuestro estudio, la posible importancia de la administración preventiva (intraoperatoria) de los tratamientos

Es posible también que la activación de las vías noradrenérgicas descendentes pudiera participar en los mecanismos implicados en la acción antihiperalgésica del tramadol y la gabapentina, así como en la prevención de la SLD. De hecho, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio han podido demostrar por primera vez que en el GRD, la incisión quirúrgica induce un aumento significativo de la densidad de las fibras simpáticas y de las neuronas TH positivas (tirosina hidroxilasa, enzima responsable de la formación de DOPA, dopamina, noradrenalina y adrenalina), sugiriendo su participación en la hiperalgesia postoperatoria; sin embargo la administración de naloxona no provocó reactivación simpática, por lo que es posible que estas vías pudieran estar involucradas en la HPO pero no en el desarrollo de SLD (Romero A y cols., *submitted*).

## VI. Discusión

En conclusión nuestros resultados sugieren que la microglía activada podría participar en la hiperalgesia postoperatoria aunque su inhibición no sería un factor clave para su prevención. Por el contrario, es poco probable que los astrocitos participen en la etiología de la HPO en nuestro modelo, ya que algunos fármacos (dexketoprofeno por ejemplo) previenen totalmente la hiperalgesia sin alterar la inmunoreactividad astrocitaria. Sin embargo, los astrocitos podrían ser factores clave en el desarrollo de la SLD, ya que la prevención de su activación en el postoperatorio temprano (ketamina, gabapentina) protege frente a la aparición de cambios plásticos involucrados en la vulnerabilidad al dolor. No obstante, la plasticidad neuronal sería también un factor determinante, puesto que fármacos que no protegen frente a la *plasticidad astrocitaria* como el tramadol, han demostrado ser eficaces en la prevención de la SLD. Con todo, estos resultados sugieren que la administración de fármacos como el tramadol, la gabapentina o la ketamina en protocolos terapéuticos de analgesia multimodal, podrían presentar beneficios adicionales frente al desarrollo de SLD y el DCPQ, protegiendo frente a los cambios plásticos neuronales y gliales que induce la cirugía.

**VII. CONCLUSIONES**

1. En un modelo de dolor postoperatorio, la cirugía induce dolor, hiperalgesia y activación glial. El dexketoprofeno inhibe completamente la hiperalgesia postoperatoria (4h-2d), mientras que el tramadol induce una inhibición parcial. Ambos fármacos bloquean totalmente el incremento de inmunoreactividad microglial sin modificar la inmunoreactividad astrocitaria (1d)
2. El dexketoprofeno no modifica la hiperalgesia inducida por la naloxona el día 21 del postoperatorio (SLD), mientras que el tramadol la inhibe en un 46%. Ninguno de los fármacos protege frente la reactivación astrocitaria tras la administración de naloxona. No se observó reactivación de la microglía tras la naloxona.
3. Existe un paralelismo entre la antihiperalgesia inducida por el dexketoprofeno y prevención de la inmunoreactividad de la microglía, no de los astrocitos, el día 1 del postoperatorio; asociación que no se establece de forma completa en el caso del tramadol.
4. La prevención de la hiperalgesia inducida por el tramadol tras la administración de naloxona (21d+Nx) es independiente a la reactivación astrocitaria puesto que no existe paralelismo entre ambos parámetros.
5. En animales *sham* operados, el tramadol induce un incremento pasajero de la inmunoreactividad de los astrocitos, pero no de la microglía (1d); la administración de naloxona 21 días después del tratamiento (21d+Nx) no induce reactivación astrocitaria. En ausencia de cirugía, el dexketoprofeno carece de efecto sobre la inmunoreactividad glial.
6. El dexketoprofeno es más efectivo que el tramadol como antihiperalgésico en el postoperatorio temprano (4h-2d).
7. El análisis isoblográfico del efecto antihiperalgésico de la combinación de dexketoprofeno y tramadol (1:1) del postoperatorio, demostró la ausencia de interacción entre los fármacos a todos los niveles de efecto (ED<sub>20</sub>, ED<sub>50</sub>, ED<sub>80</sub>). Los efectos antihiperalgésicos del dexketoprofeno y el tramadol el día 1 del postoperatorio son por tanto aditivos.
8. La combinación de dexketoprofeno-tramadol bloqueó en un 30% la hiperalgesia inducida por la naloxona (SLD).

## VII. Conclusiones

9. La combinación dexketoprofeno-tramadol bloqueó completamente la activación glial el día 1 del postoperatorio, sin modificar la activación ni reactivación astrocitaria.
10. La combinación dexketoprofeno-tramadol proporciona antihiperlgesia en el período postoperatorio temprano y previene parcialmente el desarrollo de sensibilización latente al dolor, por lo que podría ser de gran utilidad en el tratamiento del dolor postoperatorio y la prevención del dolor crónico postquirúrgico en humanos.
11. La administración de ketamina o gabapentina previene parcialmente la hiperlgesia postoperatoria (4h, 1d) bloqueando totalmente el incremento en la inmunoreactividad microglial y parcialmente la astrocitaria.
12. La ketamina y la gabapentina previenen de forma incompleta la hiperlgesia inducida por la naloxona, demostrando que impiden parcialmente el desarrollo de SLD. El efecto antinociceptivo estuvo acompañado de una inhibición parcial de la reactivación astrocitaria. La ketamina mostró un efecto mayor sobre ambos parámetros, apoyando los resultados en la prevención del DCPQ en el hombre.
13. Existe un paralelismo entre la antihiperlgesia inducida por ketamina o gabapentina y la prevención de la activación/reactivación astrocitaria inducida por la cirugía (HPO, SLD). Esta asociación no se produce de manera completa en el caso de la antihiperlgesia y la inmunoreactividad de la microglía (HPO).
14. La administración intraoperatoria de una única dosis de minociclina por vía intraperitoneal, no provocó ningún cambio sobre el aumento de inmunoreactividad glial inducida por la cirugía, ni modificó la hiperlgesia postoperatoria en ningún tiempo de evaluación (1d, 21d+Nx). La falta de efecto podría estar relacionada con el protocolo de administración utilizado.
15. El agonista cannabinoide CB2 A-836339, impidió parcialmente la aparición de hiperlgesia a las 4 horas del postoperatorio, pero no tuvo efecto el día 1 del postoperatorio. Tampoco previene la hiperlgesia inducida por la naloxona (21d+Nx). La falta de efecto prolongado podría estar relacionada con la vía de administración del fármaco y/o la solubilidad del mismo.
16. La administración de midazolam no previene la hiperlgesia postoperatoria ni tampoco la inducida tras la administración de naloxona el día 21 (SLD). La falta de efecto podría estar relacionada con la necesidad de aplicar protocolos de administración crónica.

**VIII. BIBLIOGRAFÍA**

Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*. 2011 dic;115(6):1363–81.

Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res*. 2004 mar 12;1000(1-2):40–56.

Amin AR, Attur MG, Thakker GD, Patel PD, Vyas PR, Patel RN, et al. A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 nov 26;93(24):14014–9.

Angst MS, Clark JD. Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review. *Anesthesiology*. 2006 mar;104(3):570–87.

Apaydin S, Uyar M, Karabay NU, Erhan E, Yegul I, Tuglular I. The antinociceptive effect of tramadol on a model of neuropathic pain in rats. *Life Sci*. 2000 mar;66(17):1627–37.

Araque A, Navarrete M. Glial cells in neuronal network function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 2010 ago 12;365(1551):2375–81.

Arcioni R, della Rocca M, Romanò S, Romano R, Pietropaoli P, Gasparetto A. Ondansetron inhibits the analgesic effects of tramadol: a possible 5-HT(3) spinal receptor involvement in acute pain in humans. *Anesth. Analg.* 2002 jun;94(6):1553–1557, table of contents.

Ashton JC, Milligan ED. Cannabinoids for the treatment of neuropathic pain: clinical evidence. *Curr Opin Investig Drugs*. 2008 ene;9(1):65–75.

Aubrun F, Bunge D, Langeron O, Saillant G, Coriat P, Riou B. Postoperative morphine consumption in the elderly patient. *Anesthesiology*. 2003 jul;99(1):160–5.

Auffinger B, Lam S, Kraninger J, Shen J, Roitberg BZ. The impact of obesity on surgeon ratings and patient-reported outcome measures after degenerative cervical spine disease surgery. *World Neurosurg*. 2013 oct 18;

Baba H, Goldstein PA, Okamoto M, Kohno T, Ataka T, Yoshimura M, et al. Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 2):

## VIII. Bibliografía

effects on somatodendritic sites of GABAergic neurons. *Anesthesiology*. 2000 feb;92(2):485–92.

Bantel C, Eisenach JC, Duflo F, Tobin JR, Childers SR. Spinal nerve ligation increases alpha2-adrenergic receptor G-protein coupling in the spinal cord. *Brain Res*. 2005 mar 15;1038(1):76–82.

Barbanoj MJ, Gich I, Artigas R, Tost D, Moros C, Antonijoan RM, et al. Pharmacokinetics of dexketoprofen trometamol in healthy volunteers after single and repeated oral doses. *J Clin Pharmacol*. 1998 dic;38(12 Suppl):33S–40S.

Barbaro NM, Heinricher MM, Fields HL. Putative pain modulating neurons in the rostral ventral medulla: reflex-related activity predicts effects of morphine. *Brain Res*. 1986 feb 26;366(1-2):203–10.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009 oct 16;139(2):267–84.

Bastos LFS, de Oliveira ACP, Watkins LR, Moraes MFD, Coelho MM. Tetracyclines and pain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*. 2012 mar;385(3):225–41.

Bastos LFS, Merlo LA, Rocha LTS, Coelho MM. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of doxycycline and minocycline in different experimental models. *Eur. J. Pharmacol*. 2007 dic 8;576(1-3):171–9.

Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, et al. Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science*. 2002 mar 22;295(5563):2282–5.

Beiche F, Brune K, Geisslinger G, Goppelt-Struebe M. Expression of cyclooxygenase isoforms in the rat spinal cord and their regulation during adjuvant-induced arthritis. *Inflamm. Res*. 1998 dic;47(12):482–7.

Bettoni I, Comelli F, Rossini C, Granucci F, Giagnoni G, Peri F, et al. Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: efficacy of a new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice. *Glia*. 2008 sep;56(12):1312–9.

Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: role in neuroinflammatory and neurodegenerative disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010 nov;9(5):564–73.

Blake DR, Robson P, Ho M, Jubb RW, McCabe CS. Preliminary assessment of the efficacy, tolerability and safety of a cannabis-based medicine (Sativex) in the treatment of pain caused by rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006 ene;45(1):50–2.

Blum RA, Comstock TJ, Sica DA, Schultz RW, Keller E, Reetze P, et al. Pharmacokinetics of gabapentin in subjects with various degrees of renal function. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1994 ago;56(2):154–9.

Bosakowski T, Levin AA. Serum citrate as a peripheral indicator of fluoroacetate and fluorocitrate toxicity in rats and dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1986 sep 30;85(3):428–36.

Bradford HF. Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog. Neurobiol.* 1995 dic;47(6):477–511.

Breder CD, Dewitt D, Kraig RP. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 1995 may 1;355(2):296–315.

Brenchat A, Zamanillo D, Hamon M, Romero L, Vela JM. Role of peripheral versus spinal 5-HT(7) receptors in the modulation of pain undersensitizing conditions. *Eur J Pain*. 2012 ene;16(1):72–81.

Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. 1996 mar;64(3):493–501.

Brennan TJ. Pathophysiology of postoperative pain. *Pain*. 2011 mar;152(3 Suppl):S33–40.

Bruce J, Thornton AJ, Powell R, Johnston M, Wells M, Heys SD, et al. Psychological, surgical, and sociodemographic predictors of pain outcomes after breast cancer surgery: a population-based cohort study. *Pain*. 2014 feb;155(2):232–43.

Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, Bernard CC, Yong VW. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain*. 2002 jun;125(Pt 6):1297–308.

Cabañero D, Campillo A, Célrier E, Romero A, Puig MM. Pronociceptive effects of remifentanil in a mouse model of postsurgical pain: effect of a second surgery. *Anesthesiology*. 2009 dic;111(6):1334–45.



## VIII. Bibliografía

Cabañero D, Célérier E, García-Nogales P, Mata M, Roques BP, Maldonado R, et al. The pro-nociceptive effects of remifentanil or surgical injury in mice are associated with a decrease in delta-opioid receptor mRNA levels: Prevention of the nociceptive response by on-site delivery of enkephalins. *Pain*. 2009 ene;141(1-2):88–96.

Calvello R, Panaro MA, Carbone ML, Cianciulli A, Perrone MG, Vitale P, et al. Novel selective COX-1 inhibitors suppress neuroinflammatory mediators in LPS-stimulated N13 microglial cells. *Pharmacol. Res*. 2012 ene;65(1):137–48.

Campillo A, Cabañero D, Romero A, García-Nogales P, Puig MM. Delayed postoperative latent pain sensitization revealed by the systemic administration of opioid antagonists in mice. *Eur. J. Pharmacol*. 2011 abr 25;657(1-3):89–96.

Campillo A, González-Cuello A, Cabañero D, García-Nogales P, Romero A, Milanés MV, et al. Increased spinal dynorphin levels and phospho-extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 and c-Fos immunoreactivity after surgery under remifentanil anesthesia in mice. *Mol. Pharmacol*. 2010 feb;77(2):185–94.

Catella-Lawson F, McAdam B, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, Antes L, et al. Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 1999 may;289(2):735–41.

Célérier E, González JR, Maldonado R, Cabañero D, Puig MM. Opioid-induced hyperalgesia in a murine model of postoperative pain: role of nitric oxide generated from the inducible nitric oxide synthase. *Anesthesiology*. 2006 mar;104(3):546–55.

Célérier E, Laulin JP, Corcuff JB, Le Moal M, Simonnet G. Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: a sensitization process. *J. Neurosci*. 2001 jun 1;21(11):4074–80.

Chacur M, Lambert D, Hoheisel U, Mense S. Role of spinal microglia in myositis-induced central sensitisation: an immunohistochemical and behavioural study in rats. *Eur J Pain*. 2009 oct;13(9):915–23.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs:

cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002 oct 15;99(21):13926–31.

Chang EY, Chen X, Sandhu A, Li C-Y, Luo ZD. Spinal 5-HT<sub>3</sub> receptors facilitate behavioural hypersensitivity induced by elevated calcium channel  $\alpha$ -2-delta-1 protein. *Eur J Pain.* 2013 abr;17(4):505–13.

Chang K-Y, Dai C-Y, Ger L-P, Fu M-J, Wong KC, Chan K-H, et al. Determinants of patient-controlled epidural analgesia requirements: a prospective analysis of 1753 patients. *Clin J Pain.* 2006 dic;22(9):751–6.

Chao MV, Rajagopal R, Lee FS. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin. Sci.* 2006 feb;110(2):167–73.

Chaparro LE, Smith SA, Moore RA, Wiffen PJ, Gilron I. Pharmacotherapy for the prevention of chronic pain after surgery in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;7:CD008307.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods.* 1994 Jul;53(1):55–63

Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, et al. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* 2000 jul;6(7):797–801.

Chen S-R, Chen H, Yuan W-X, Pan H-L. Increased presynaptic and postsynaptic  $\alpha$ -2-adrenoceptor activity in the spinal dorsal horn in painful diabetic neuropathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011 abr;337(1):285–92.

Chen T-L, Chang C-C, Lin Y-L, Ueng Y-F, Chen R-M. Signal-transducing mechanisms of ketamine-caused inhibition of interleukin-1 beta gene expression in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophage-like Raw 264.7 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009 oct 1;240(1):15–25.

Chen X, Shu S, Bayliss DA. HCN1 channel subunits are a molecular substrate for hypnotic actions of ketamine. *J. Neurosci.* 2009 ene 21;29(3):600–9.

## VIII. Bibliografía

Cheng SC, Kumar S, Casella GA. Effects of fluoroacetate and fluorocitrate on the metabolic compartmentation of tricarboxylic acid cycle in rat brain slices. *Brain Res.* 1972 jul 13;42(1):117–28.

Chiba S, Nishiyama T, Yoshikawa M, Yamada Y. The antinociceptive effects of midazolam on three different types of nociception in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 2009 ene;109(1):71–7.

Cho I-H, Chung YM, Park C-K, Park S-H, Lee H, Li HY, et al. Systemic administration of minocycline inhibits formalin-induced inflammatory pain in rat. *Brain Res.* 2006 feb 9;1072(1):208–14.

Chu LF, Angst MS, Clark D. Opioid-induced hyperalgesia in humans: molecular mechanisms and clinical considerations. *Clin J Pain.* 2008 ago;24(6):479–96.

Clarke H, Bonin RP, Orser BA, Englesakis M, Wijeyesundera DN, Katz J. The prevention of chronic postsurgical pain using gabapentin and pregabalin: a combined systematic review and meta-analysis. *Anesth. Analg.* 2012 ago;115(2):428–42.

Clarke R, Derry S, Moore RA. Single dose oral etoricoxib for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;5:CD004309.

Codd EE, Shank RP, Schupsky JJ, Raffa RB. Serotonin and norepinephrine uptake inhibiting activity of centrally acting analgesics: structural determinants and role in antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995 sep;274(3):1263–70.

Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res.* 1990 dic 3;535(1):155–8.

Coggeshall RE. Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog. Neurobiol.* 2005 dic;77(5):299–352.

Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ.* 2014;348:f7656.

Corder G, Doolen S, Donahue RR, Winter MK, Jutras BL, He Y, et al. Constitutive  $\mu$ -opioid receptor activity leads to long-term endogenous analgesia and dependence. *Science.* 2013 sep 20;341(6152):1394–9.

Coull JAM, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. 2005 dic 15;438(7070):1017–21.

Coutaux A, Adam F, Willer J-C, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*. 2005 oct;72(5):359–71.

Crofford LJ. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. *Arthritis Res. Ther*. 2013;15 Suppl 3:S2.

Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Mazzon E, McDonald MC, Dugo L, Di Paola R, et al. Beneficial effects of GW274150, a novel, potent and selective inhibitor of iNOS activity, in a rodent model of collagen-induced arthritis. *Eur. J. Pharmacol*. 2002 oct 18;453(1):119–29.

D'Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth*. 2008 jul;101(1):8–16.

Davies NM, Good RL, Roupe KA, Yáñez JA. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?--Not as easy as 1, 2, 3. *J Pharm Pharm Sci*. 2004 jul 9;7(2):217–26.

De Leo JA, Tawfik VL, LaCroix-Fralish ML. The tetrapartite synapse: path to CNS sensitization and chronic pain. *Pain*. 2006 may;122(1-2):17–21.

De Oliveira GS Jr, Agarwal D, Benzon HT. Perioperative single dose ketorolac to prevent postoperative pain: a meta-analysis of randomized trials. *Anesth. Analg*. 2012 feb;114(2):424–33.

Denson DD, Eaton DC. Ketamine inhibition of large conductance Ca(2+)-activated K+ channels is modulated by intracellular Ca2+. *Am. J. Physiol*. 1994 nov;267(5 Pt 1):C1452–1458.

Derry CJ, Derry S, Moore RA. Single dose oral ibuprofen plus paracetamol (acetaminophen) for acute postoperative pain. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;6:CD010210.

Derry S, Moore RA. Single dose oral celecoxib for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;10:CD004233.

## VIII. Bibliografía

Deumens R, Steyaert A, Forget P, Schubert M, Lavand'homme P, Hermans E, et al. Prevention of chronic postoperative pain: cellular, molecular, and clinical insights for mechanism-based treatment approaches. *Prog. Neurobiol.* 2013 may;104:1–37.

Devor M. Evidence for heritability of pain in patients with traumatic neuropathy. *Pain.* 2004 mar;108(1-2):200–201; author reply 202.

Dias JM, de Brito TV, de Aguiar Magalhães D, da Silva Santos PW, Batista JA, do Nascimento Dias EG, et al. Gabapentin, a Synthetic Analogue of Gamma Aminobutyric Acid, Reverses Systemic Acute Inflammation and Oxidative Stress in Mice. *Inflammation.* 2014 may 7;

Dickenson AH, Chapman V, Green GM. The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. *Gen. Pharmacol.* 1997 may;28(5):633–8.

Dong L, Smith JR, Winkelstein BA. Ketorolac reduces spinal astrocytic activation and PAR1 expression associated with attenuation of pain after facet joint injury. *J. Neurotrauma.* 2013 may 15;30(10):818–25.

Dong X, Han S, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell.* 2001 sep 7;106(5):619–32.

Duthie DJ. Remifentanil and tramadol. *Br J Anaesth.* 1998 jul;81(1):51–7.

Dzamba D, Honsa P, Anderova M. NMDA Receptors in Glial Cells: Pending Questions. *Curr Neuropharmacol.* 2013 may;11(3):250–62.

Edwards JE, McQuay HJ, Moore RA. Combination analgesic efficacy: individual patient data meta-analysis of single-dose oral tramadol plus acetaminophen in acute postoperative pain. *J Pain Symptom Manage.* 2002 feb;23(2):121–30.

Eichenberger U, Neff F, Svetcic G, Björger S, Petersen-Felix S, Arendt-Nielsen L, et al. Chronic phantom limb pain: the effects of calcitonin, ketamine, and their combination on pain and sensory thresholds. *Anesth. Analg.* 2008 abr;106(4):1265–1273, table of contents.

- Eisenach JC. Preventing chronic pain after surgery: who, how, and when? *Reg Anesth Pain Med.* 2006 feb;31(1):1–3.
- Farquhar-Smith WP, Egertová M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice AS, Elphick MR. Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol. Cell. Neurosci.* 2000 jun;15(6):510–21.
- Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004 jul;5(7):565–75.
- Fields HL, Heinricher MM, Mason P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu. Rev. Neurosci.* 1991;14:219–45.
- Fillingim RB, King CD, Ribeiro-Dasilva MC, Rahim-Williams B, Riley JL 3rd. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain.* 2009 may;10(5):447–85.
- Fletcher D, Martinez V. Opioid-induced hyperalgesia in patients after surgery: a systematic review and a meta-analysis. *Br J Anaesth.* 2014 jun;112(6):991–1004.
- Fonnum F, Johnsen A, Hassel B. Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. *Glia.* 1997 sep;21(1):106–13.
- Franklin A, Parmentier-Batteur S, Walter L, Greenberg DA, Stella N. Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *J. Neurosci.* 2003 ago 27;23(21):7767–75.
- Frölich MA, Zhang K, Ness TJ. Effect of sedation on pain perception. *Anesthesiology.* 2013 mar;118(3):611–21.
- Gagliese L, Gauthier LR, Macpherson AK, Jovellanos M, Chan VWS. Correlates of postoperative pain and intravenous patient-controlled analgesia use in younger and older surgical patients. *Pain Med.* 2008 abr;9(3):299–314.
- Gao Y, Yang Y, Guan Q, Pang X, Zhang H, Zeng D. IL-1beta modulate the Ca(2+)-activated big-conductance K channels (BK) via reactive oxygen species in cultured rat aorta smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* 2010 may;338(1-2):59–68.

## VIII. Bibliografía

Gao Y-J, Zhang L, Samad OA, Suter MR, Yasuhiko K, Xu Z-Z, et al. JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J Neurosci*. 2009 Apr 1;29(13):4096–108

Gatta L, Piscitelli F, Giordano C, Boccella S, Lichtman A, Maione S, et al. Discovery of prostamide F2 $\alpha$  and its role in inflammatory pain and dorsal horn nociceptive neuron hyperexcitability. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e311111.

Gerbershagen HJ, Dagtekin O, Rothe T, Heidenreich A, Gerbershagen K, Sabatowski R, et al. Risk factors for acute and chronic postoperative pain in patients with benign and malignant renal disease after nephrectomy. *Eur J Pain*. 2009 sep;13(8):853–60.

Giordano J. The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. *Pain Physician*. 2005 jul;8(3):277–90.

Gjeilo KH, Stenseth R, Klepstad P. Risk Factors and Early Pharmacological Interventions to Prevent Chronic Postsurgical Pain Following Cardiac Surgery. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2014 jun 17;

Gong J-P, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu Q-R, Tagliaferro PA, Brusco A, et al. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*. 2006 feb 3;1071(1):10–23.

González JC, Egea J, Del Carmen Godino M, Fernandez-Gomez FJ, Sánchez-Prieto J, Gandía L, et al. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca(2+) signalling in hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci*. 2007 nov;26(9):2481–95.

Goodman&Guilman's. The pharmacological basis of therapeutics' 11th Ed. Cap.21 pg 547,553

Gordon GRJ, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha WRAKJS, Fisher TE, Bains JS. Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat. Neurosci*. 2005 ago;8(8):1078–86.

Graham BA, Brichta AM, Callister RJ. Moving from an averaged to specific view of spinal cord pain processing circuits. *J Neurophysiol*. 2007 Sep;98(3):1057–63

Greenblatt DJ, Shader RI, Divoll M, Harmatz JS. Benzodiazepines: a summary of pharmacokinetic properties. *Br J Clin Pharmacol.* 1981;11 Suppl 1:11S–16S.

Greenfield LJ Jr. Molecular mechanisms of antiseizure drug activity at GABAA receptors. *Seizure.* 2013 oct;22(8):589–600.

Guindon J, Hohmann AG. A physiological role for endocannabinoid-derived products of cyclooxygenase-2-mediated oxidative metabolism. *Br. J. Pharmacol.* 2008 abr;153(7):1341–3.

Guindon J, Hohmann AG. Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.* 2008 ene;153(2):319–34.

Gupta R, Sharma K, Dhiman UK. Effect of a combination of oral midazolam and low-dose ketamine on anxiety, pain, swelling, and comfort during and after surgical extractions of mandibular third molars. *Indian J Dent Res.* 2012 abr;23(2):295–6.

Guy S, Mehta S, Leff L, Teasell R, Loh E. Anticonvulsant medication use for the management of pain following spinal cord injury: systematic review and effectiveness analysis. *Spinal Cord.* 2014 feb;52(2):89–96.

Gyoneva S, Traynelis SF. Norepinephrine modulates the motility of resting and activated microglia via different adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 2013 may 24;288(21):15291–302.

Hammond DL, Wang H, Nakashima N, Basbaum AI. Differential effects of intrathecally administered delta and mu opioid receptor agonists on formalin-evoked nociception and on the expression of Fos-like immunoreactivity in the spinal cord of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998 ene;284(1):378–87.

Hanani M. Satellite glial cells: more than just «rings around the neuron». *Neuron Glia Biol.* 2010 feb;6(1):1–2.

Harirforoosh S, Asghar W, Jamali F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *J Pharm Pharm Sci.* 2013;16(5):821–47.



## VIII. Bibliografía

Hay CH, Trevethick MA, Wheeldon A, Bowers JS, de Belleruche JS. The potential role of spinal cord cyclooxygenase-2 in the development of Freund's complete adjuvant-induced changes in hyperalgesia and allodynia. *Neuroscience*. 1997 jun;78(3):843–50.

Hayashi Y, Kawaji K, Sun L, Zhang X, Koyano K, Yokoyama T, et al. Microglial Ca(2+)-activated K(+) channels are possible molecular targets for the analgesic effects of S-ketamine on neuropathic pain. *J. Neurosci*. 2011 nov 30;31(48):17370–82.

Hayashida K, Kimura M, Yoshizumi M, Hobo S, Obata H, Eisenach JC. Ondansetron reverses antihypersensitivity from clonidine in rats after peripheral nerve injury: role of  $\gamma$ -aminobutyric acid in  $\alpha$ 2-adrenoceptor and 5-HT<sub>3</sub> serotonin receptor analgesia. *Anesthesiology*. 2012 ago;117(2):389–98.

Hayashida K-I, DeGoes S, Curry R, Eisenach JC. Gabapentin activates spinal noradrenergic activity in rats and humans and reduces hypersensitivity after surgery. *Anesthesiology*. 2007 mar;106(3):557–62.

Hayashida K-I, Obata H, Nakajima K, Eisenach JC. Gabapentin acts within the locus coeruleus to alleviate neuropathic pain. *Anesthesiology*. 2008 dic;109(6):1077–84.

Haydon PG. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci*. 2001 mar;2(3):185–93.

Hendrich J, Van Minh AT, Heblich F, Nieto-Rostro M, Watschinger K, Striessnig J, et al. Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the  $\alpha$ 2 $\delta$  ligand gabapentin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008 mar 4;105(9):3628–33.

Hijazi Y, Boulieu R. Contribution of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 isoforms to N-demethylation of ketamine in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 2002 jul;30(7):853–8.

Holtman JR Jr, Crooks PA, Johnson-Hardy JK, Hojomat M, Kleven M, Wala EP. Effects of norketamine enantiomers in rodent models of persistent pain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2008 oct;90(4):676–85.

Honoré E. The neuronal background K<sub>2</sub>P channels: focus on TREK1. *Nat. Rev. Neurosci*. 2007 abr;8(4):251–61.

Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, et al. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience*. 2000;98(3):585–98.

Hsieh GC, Pai M, Chandran P, Hooker BA, Zhu CZ, Salyers AK, et al. Central and peripheral sites of action for CB<sub>2</sub> receptor mediated analgesic activity in chronic inflammatory and neuropathic pain models in rats. *Br. J. Pharmacol.* 2011 ene;162(2):428–40.

Hsu Y-W, Somma J, Hung Y-C, Tsai P-S, Yang C-H, Chen C-C. Predicting postoperative pain by preoperative pressure pain assessment. *Anesthesiology*. 2005 sep;103(3):613–8.

Hu SS-J, Bradshaw HB, Chen JS-C, Tan B, Walker JM. Prostaglandin E2 glycerol ester, an endogenous COX-2 metabolite of 2-arachidonoylglycerol, induces hyperalgesia and modulates NFkappaB activity. *Br. J. Pharmacol.* 2008 abr;153(7):1538–49.

Hua X-Y, Svensson CI, Matsui T, Fitzsimmons B, Yaksh TL, Webb M. Intrathecal minocycline attenuates peripheral inflammation-induced hyperalgesia by inhibiting p38 MAPK in spinal microglia. *Eur. J. Neurosci.* 2005 nov;22(10):2431–40.

Hucho T, Levine JD. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron*. 2007 ago 2;55(3):365–76.

Hurley RW, Cohen SP, Williams KA, Rowlingson AJ, Wu CL. The analgesic effects of perioperative gabapentin on postoperative pain: a meta-analysis. *Reg Anesth Pain Med.* 2006 jun;31(3):237–47.

Hustveit O, Maurset A, Oye I. Interaction of the chiral forms of ketamine with opioid, phencyclidine, sigma and muscarinic receptors. *Pharmacol. Toxicol.* 1995 dic;77(6):355–9.

Hutchinson MR, Bland ST, Johnson KW, Rice KC, Maier SF, Watkins LR. Opioid-induced glial activation: mechanisms of activation and implications for opioid analgesia, dependence, and reward. *ScientificWorldJournal*. 2007;7:98–111.

Hutchinson MR, Zhang Y, Brown K, Coats BD, Shridhar M, Sholar PW, et al. Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone: involvement of toll-like receptor 4 (TLR4). *Eur. J. Neurosci.* 2008 jul;28(1):20–9.

## VIII. Bibliografía

Imani F, Rahimzadeh P. Gabapentinoids: gabapentin and pregabalin for postoperative pain management. *Anesth Pain Med.* 2012;2(2):52–3.

Inoue K. ATP receptors of microglia involved in pain. *Novartis Found. Symp.* 2006;276:263–272; discussion 273–281.

Ip HYV, Abrishami A, Peng PWH, Wong J, Chung F. Predictors of postoperative pain and analgesic consumption: a qualitative systematic review. *Anesthesiology.* 2009 Sep;111(3):657–77

Ito A, Kumamoto E, Takeda M, Shibata K, Sagai H, Yoshimura M. Mechanisms for ovariectomy-induced hyperalgesia and its relief by calcitonin: participation of 5-HT<sub>1A</sub>-like receptor on C-afferent terminals in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 2000 ago 15;20(16):6302–8.

Ito N, Obata H, Saito S. Spinal microglial expression and mechanical hypersensitivity in a postoperative pain model: comparison with a neuropathic pain model. *Anesthesiology.* 2009 sep;111(3):640–8.

J Edmond Charlton. *Antipyretic Analgesics: Nonsteroidals, acetaminophen and phenazone derivatives.* IASP Press Seattle 2005

Janero DR, Vadivel SK, Makriyannis A. Pharmacotherapeutic modulation of the endocannabinoid signalling system in psychiatric disorders: drug-discovery strategies. *Int Rev Psychiatry.* 2009 abr;21(2):122–33.

Ji R-R, Samad TA, Jin S-X, Schmoll R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron.* 2002 sep 26;36(1):57–68.

Ji RR, Woolf CJ. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol. Dis.* 2001 feb;8(1):1–10.

Joly V, Richebe P, Guignard B, Fletcher D, Maurette P, Sessler DI, et al. Remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia and its prevention with small-dose ketamine. *Anesthesiology.* 2005 jul;103(1):147–55.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001 sep 13;413(6852):203–10.

Kaindl AM, Degos V, Peineau S, Gouadon E, Chhor V, Loron G, et al. Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Ann. Neurol*. 2012 oct;72(4):536–49.

Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci*. 1998 dic;1(8):683–92.

Kato H, Narita M, Miyatake M, Yajima Y, Suzuki T. Role of neuronal NR2B subunit-containing NMDA receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> influx and astrocytic activation in cultured mouse cortical neurons and astrocytes. *Synapse*. 2006 ene;59(1):10–7.

Katz J, Poleshuck EL, Andrus CH, Hogan LA, Jung BF, Kulick DI, et al. Risk factors for acute pain and its persistence following breast cancer surgery. *Pain*. 2005 dic 15;119(1-3):16–25.

Kawasaki C, Kawasaki T, Ogata M, Nandate K, Shigematsu A. Ketamine isomers suppress superantigen-induced proinflammatory cytokine production in human whole blood. *Can J Anaesth*. 2001 sep;48(8):819–23.

Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Ogata J, Inoue Y, Shigematsu A. Ketamine suppresses proinflammatory cytokine production in human whole blood in vitro. *Anesth. Analg*. 1999 sep;89(3):665–9.

Kawasaki Y, Zhang L, Cheng J-K, Ji R-R. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J. Neurosci*. 2008 may 14;28(20):5189–94.

Kehlet H, Wilmore DW. Multimodal strategies to improve surgical outcome. *Am. J. Surg*. 2002 jun;183(6):630–41.

Kim TH, Kim HI, Kim J, Park M, Song J-H. Effects of minocycline on Na<sup>+</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res*. 2011 ene 25;1370:34–42.

## VIII. Bibliografía

Kimura M, Obata H, Saito S. Antihypersensitivity effects of tramadol hydrochloride in a rat model of postoperative pain. *Anesth. Analg.* 2012 ago;115(2):443–9.

LaBuda CJ, Koblisch M, Little PJ. Cannabinoid CB2 receptor agonist activity in the hindpaw incision model of postoperative pain. *Eur. J. Pharmacol.* 2005 dic 19;527(1-3):172–4.

Langford RM, Mares J, Novotna A, Vachova M, Novakova I, Notcutt W, et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of THC/CBD oromucosal spray in combination with the existing treatment regimen, in the relief of central neuropathic pain in patients with multiple sclerosis. *J. Neurol.* 2013 abr;260(4):984–97.

Laskowski K, Stirling A, McKay WP, Lim HJ. A systematic review of intravenous ketamine for postoperative analgesia. *Can J Anaesth.* 2011 oct;58(10):911–23.

Laughlin TM, Tram KV, Wilcox GL, Birnbaum AK. Comparison of antiepileptic drugs tiagabine, lamotrigine, and gabapentin in mouse models of acute, prolonged, and chronic nociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002 sep;302(3):1168–75.

Lavand'homme P. The progression from acute to chronic pain. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2011 oct;24(5):545–50.

Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain.* 2005 may;115(1-2):71–83.

Lee H, Lee S, Cho I-H, Lee SJ. Toll-like receptors: sensor molecules for detecting damage to the nervous system. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2013 feb;14(1):33–42.

Lee SH, Cho SY, Lee HG, Choi JI, Yoon MH, Kim WM. Tramadol induced paradoxical hyperalgesia. *Pain Physician.* 2013 Jan;16(1):41–4

Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science.* 2005 abr 22;308(5721):512–7.

Lewis KS, Han NH. Tramadol: a new centrally acting analgesic. *Am J Health Syst Pharm.* 1997 mar 15;54(6):643–52.

Li C-Y, Zhang X-L, Matthews EA, Li K-W, Kurwa A, Boroujerdi A, et al. Calcium channel alpha2delta1 subunit mediates spinal hyperexcitability in pain modulation. *Pain*. 2006 nov;125(1-2):20–34.

Li Y, Shi J, Yang BF, Liu L, Han CL, Li WM, et al. Ketamine-induced ventricular structural, sympathetic and electrophysiological remodelling: pathological consequences and protective effects of metoprolol. *Br. J. Pharmacol.* 2012 mar;165(6):1748–56.

Lim J, Lim G, Sung B, Wang S, Mao J. Intrathecal midazolam regulates spinal AMPA receptor expression and function after nerve injury in rats. *Brain Res.* 2006 dic 6;1123(1):80–8.

Liu F-L, Chen T-L, Chen R-M. Mechanisms of ketamine-induced immunosuppression. *Acta Anaesthesiol Taiwan.* 2012 dic;50(4):172–7.

Lombard C, Nagarkatti M, Nagarkatti P. CB2 cannabinoid receptor agonist, JWH-015, triggers apoptosis in immune cells: potential role for CB2-selective ligands as immunosuppressive agents. *Clin. Immunol.* 2007 mar;122(3):259–70.

Luo ZD, Calcutt NA, Higuera ES, Valder CR, Song Y-H, Svensson CI, et al. Injury type-specific calcium channel alpha 2 delta-1 subunit up-regulation in rat neuropathic pain models correlates with antiallodynic effects of gabapentin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002 dic;303(3):1199–205.

Ma L, Nagai J, Ueda H. Microglial activation mediates de novo lysophosphatidic acid production in a model of neuropathic pain. *J. Neurochem.* 2010 nov;115(3):643–53.

Macdonald RL, Greenfield LJ Jr. Mechanisms of action of new antiepileptic drugs. *Curr. Opin. Neurol.* 1997 abr;10(2):121–8.

Mantyh PW. Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006 oct;7(10):797–809.

Marbán E. Cardiac channelopathies. *Nature.* 2002 ene 10;415(6868):213–8.

Marietta MP, Way WL, Castagnoli N Jr, Trevor AJ. On the pharmacology of the ketamine enantiomorphs in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1977 jul;202(1):157–65.

## VIII. Bibliografía

Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*. 2003 oct 3;302(5642):84–8.

Martinez V, Ben Ammar S, Judet T, Bouhassira D, Chauvin M, Fletcher D. Risk factors predictive of chronic postsurgical neuropathic pain: the value of the iliac crest bone harvest model. *Pain*. 2012 jul;153(7):1478–83.

Martinez V, Szekely B, Lemarié J, Martin F, Gentili M, Ben Ammar S, et al. The efficacy of a glial inhibitor, minocycline, for preventing persistent pain after lumbar discectomy: a randomized, double-blind, controlled study. *Pain*. 2013 ago;154(8):1197–203.

Mason P, Fields HL. Axonal trajectories and terminations of on- and off-cells in the cat lower brainstem. *J. Comp. Neurol*. 1989 oct 8;288(2):185–207.

Mathisen LC, Skjelbred P, Skoglund LA, Oye I. Effect of ketamine, an NMDA receptor inhibitor, in acute and chronic orofacial pain. *Pain*. 1995 may;61(2):215–20.

Mátyás F, Yanovsky Y, Mackie K, Kelsch W, Misgeld U, Freund TF. Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia. *Neuroscience*. 2006;137(1):337–61.

Maund E, McDaid C, Rice S, Wright K, Jenkins B, Woolacott N. Paracetamol and selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs for the reduction in morphine-related side-effects after major surgery: a systematic review. *Br J Anaesth*. 2011 mar;106(3):292–7.

McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 ene 5;96(1):272–7.

McCall WD, Tanner KD, Levine JD. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neurosci. Lett*. 1996 abr 12;208(1):45–8.

McCormick Z, Chang-Chien G, Marshall B, Huang M, Harden RN. Phantom limb pain: a systematic neuroanatomical-based review of pharmacologic treatment. *Pain Med*. 2014 feb;15(2):292–305.

- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2001 nov;1(2):135–45.
- Mei X, Wang W, Wang W, Li Y, Zhang H, Wu S, et al. Inhibiting astrocytic activation: a novel analgesic mechanism of ketamine at the spinal level? *J. Neurochem.* 2009 jun;109(6):1691–700.
- Mei X-P, Chen L, Wang W, Wu D, Wang L-Y, Zhang T, et al. Combination of tramadol with minocycline exerted synergistic effects on a rat model of nerve injury-induced neuropathic pain. *Neurosignals.* 2013;21(3-4):184–96.
- Mei X-P, Sakuma Y, Xie C, Wu D, Ho I, Kotani J, et al. Depressing Interleukin-1 $\beta$  Contributed to the Synergistic Effects of Tramadol and Minocycline on Spinal Nerve Ligation-Induced Neuropathic Pain. *Neurosignals.* 2013b oct 23;
- Mei X-P, Xu H, Xie C, Ren J, Zhou Y, Zhang H, et al. Post-injury administration of minocycline: an effective treatment for nerve-injury induced neuropathic pain. *Neurosci. Res.* 2011 jul;70(3):305–12.
- Mei X-P, Zhang H, Wang W, Wei Y-Y, Zhai M-Z, Wang W, et al. Inhibition of spinal astrocytic c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation correlates with the analgesic effects of ketamine in neuropathic pain. *J Neuroinflammation.* 2011;8(1):6.
- Mei X-P, Zhou Y, Wang W, Tang J, Wang W, Zhang H, et al. Ketamine depresses toll-like receptor 3 signaling in spinal microglia in a rat model of neuropathic pain. *Neurosignals.* 2011;19(1):44–53.
- Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science.* 1965 nov 19;150(3699):971–9.
- Mickle A, Kannampalli P, Bruckert M, Miranda A, Banerjee B, Sengupta JN. Pronociceptive effect of 5-HT(1A) receptor agonist on visceral pain involves spinal N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *Neuroscience.* 2012 sep 6;219:243–54.
- Miki K, Zhou Q-Q, Guo W, Guan Y, Terayama R, Dubner R, et al. Changes in gene expression and neuronal phenotype in brain stem pain modulatory circuitry after inflammation. *J. Neurophysiol.* 2002 feb;87(2):750–60.



## VIII. Bibliografía

Miletic G, Draganic P, Pankratz MT, Miletic V. Muscimol prevents long-lasting potentiation of dorsal horn field potentials in rats with chronic constriction injury exhibiting decreased levels of the GABA transporter GAT-1. *Pain*. 2003 sep;105(1-2):347–53.

Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 1999 ene;57(1):1–164.

Miller AM, Stella N. CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *Br. J. Pharmacol.* 2008 ene;153(2):299–308.

Milligan ED, Langer SJ, Sloane EM, He L, Wieseler-Frank J, O'Connor K, et al. Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10. *European Journal of Neuroscience*. 2005;21(8):2136–48.

Milligan ED, Sloane EM, Watkins LR. Glia in pathological pain: a role for fractalkine. *J. Neuroimmunol.* 2008 jul 31;198(1-2):113–20.

Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009 ene;10(1):23–36.

Miranda HF, Prieto JC, Pinardi G. Spinal synergy between nonselective cyclooxygenase inhibitors and morphine antinociception in mice. *Brain Res.* 2005 jul 12;1049(2):165–70.

Miranda HF, Puig MM, Romero MA, Prieto JC. Effects of tramadol and dexketoprofen on analgesia and gastrointestinal transit in mice. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009 feb;23(1):81–8.

Miranda HF, Romero MA, Puig MM. Antinociceptive and anti-exudative synergism between dexketoprofen and tramadol in a model of inflammatory pain in mice. *Fundam Clin Pharmacol.* 2012 jun;26(3):373–82.

Mixcoatl-Zecuatl T, Medina-Santillán R, Reyes-García G, Vidal-Cantú GC, Granados-Soto V. Effect of K<sup>+</sup> channel modulators on the antiallodynic effect of gabapentin. *Eur. J. Pharmacol.* 2004 ene 26;484(2-3):201–8.

Moayedi M, Davis KD. Theories of pain: from specificity to gate control. *J. Neurophysiol.* 2013 ene;109(1):5–12.

Moore RA, Derry S, McQuay HJ, Wiffen PJ. Single dose oral analgesics for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;(9):CD008659

Moran MM, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 ago;10(8):601–20.

Morgado C, Pereira-Terra P, Cruz CD, Tavares I. Minocycline completely reverses mechanical hyperalgesia in diabetic rats through microglia-induced changes in the expression of the potassium chloride co-transporter 2 (KCC2) at the spinal cord. *Diabetes Obes Metab.* 2011 feb;13(2):150–9.

Nagy GG, Watanabe M, Fukaya M, Todd AJ. Synaptic distribution of the NR1, NR2A and NR2B subunits of the N-methyl-d-aspartate receptor in the rat lumbar spinal cord revealed with an antigen-unmasking technique. *Eur. J. Neurosci.* 2004 dic;20(12):3301–12.

Naidu PS, Booker L, Cravatt BF, Lichtman AH. Synergy between enzyme inhibitors of fatty acid amide hydrolase and cyclooxygenase in visceral nociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009 abr;329(1):48–56.

Nasu-Tada K, Koizumi S, Tsuda M, Kunifusa E, Inoue K. Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X4, a key molecule for mechanical allodynia. *Glia.* 2006 may;53(7):769–75.

Nikodemova M, Watters JJ, Jackson SJ, Yang SK, Duncan ID. Minocycline down-regulates MHC II expression in microglia and macrophages through inhibition of IRF-1 and protein kinase C (PKC)α/β. *J. Biol. Chem.* 2007 may 18;282(20):15208–16.

Nishiyama T. Interaction between midazolam and serotonin in spinally mediated antinociception in rats. *J Anesth.* 2009;23(2):249–55.

Noppers I, Olofsen E, Niesters M, Aarts L, Mooren R, Dahan A, et al. Effect of rifampicin on S-ketamine and S-norketamine plasma concentrations in healthy volunteers after intravenous S-ketamine administration. *Anesthesiology.* 2011 jun;114(6):1435–45.

O'Donnell J, Zeppenfeld D, McConnell E, Pena S, Nedergaard M. Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem. Res.* 2012 nov;37(11):2496–512.

## VIII. Bibliografía

Obata H, Li X, Eisenach JC. Spinal adenosine receptor activation reduces hypersensitivity after surgery by a different mechanism than after nerve injury. *Anesthesiology*. 2004 may;100(5):1258–62.

Obata K, Katsura H, Miyoshi K, Kondo T, Yamanaka H, Kobayashi K, et al. Toll-like receptor 3 contributes to spinal glial activation and tactile allodynia after nerve injury. *J. Neurochem*. 2008 jun 1;105(6):2249–59.

Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J. Neurochem*. 2004 feb;88(4):844–56.

Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem*. 2001 mar 30;276(13):10229–33.

Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J. Immunol*. 2004 sep 15;173(6):3916–24.

Omiya Y, Yuzurihara M, Suzuki Y, Kase Y, Kono T. Role of alpha2-adrenoceptors in enhancement of antinociceptive effect in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol*. 2008 sep 11;592(1-3):62–6.

Onaivi ES, Ishiguro H, Gong J-P, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, et al. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2006 ago;1074:514–36.

Ong CKS, Seymour RA, Lirk P, Merry AF. Combining paracetamol (acetaminophen) with nonsteroidal antiinflammatory drugs: a qualitative systematic review of analgesic efficacy for acute postoperative pain. *Anesth. Analg*. 2010 abr 1;110(4):1170–9.

Ostenfeld T, Price J, Albanese M, Bullman J, Guillard F, Meyer I, et al. A randomized, controlled study to investigate the analgesic efficacy of single doses of the cannabinoid receptor-2 agonist GW842166, ibuprofen or placebo in patients with acute pain following third molar tooth extraction. *Clin J Pain*. 2011 oct;27(8):668–76.

Palazzo E, Luongo L, Bellini G, Guida F, Marabese I, Boccella S, et al. Changes in cannabinoid receptor subtype 1 activity and interaction with metabotropic glutamate subtype

5 receptors in the periaqueductal gray-rostral ventromedial medulla pathway in a rodent neuropathic pain model. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012 mar;11(2):148–61.

Pan PH, Coghil R, Houle TT, Seid MH, Lindel WM, Parker RL, et al. Multifactorial preoperative predictors for postcesarean section pain and analgesic requirement. *Anesthesiology*. 2006 mar;104(3):417–25.

Panikashvili D, Mechoulam R, Beni SM, Alexandrovich A, Shohami E. CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-kappa B inhibition. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2005 abr;25(4):477–84.

Parente L, Perretti M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem. Pharmacol*. 2003 ene 15;65(2):153–9.

Parsons CG, Gruner R, Rozental J, Millar J, Lodge D. Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). *Neuropharmacology*. 1993 dic;32(12):1337–50.

Patel R, Bauer CS, Nieto-Rostro M, Margas W, Ferron L, Chaggar K, et al.  $\alpha\delta$ -1 gene deletion affects somatosensory neuron function and delays mechanical hypersensitivity in response to peripheral nerve damage. *J. Neurosci*. 2013 oct 16;33(42):16412–26.

Paulsen RE, Contestabile A, Villani L, Fonnum F. An in vivo model for studying function of brain tissue temporarily devoid of glial cell metabolism: the use of fluorocitrate. *J. Neurochem*. 1987 may;48(5):1377–85.

Pereira MP, Werner MU, Ringsted TK, Rowbotham MC, Taylor BK, Dahl JB. Does naloxone reinstate secondary hyperalgesia in humans after resolution of a burn injury? A placebo-controlled, double-blind, randomized, cross-over study. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e64608.

Perkins FM, Kehlet H. Chronic pain as an outcome of surgery. A review of predictive factors. *Anesthesiology*. 2000 oct;93(4):1123–33.

Perl ER. Ideas about pain, a historical view. *Nat. Rev. Neurosci*. 2007 ene;8(1):71–80.

## VIII. Bibliografía

Peters ML, Sommer M, de Rijke JM, Kessels F, Heineman E, Patijn J, et al. Somatic and psychologic predictors of long-term unfavorable outcome after surgical intervention. *Ann. Surg.* 2007 mar;245(3):487–94.

Petho G, Reeh PW. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. *Physiol. Rev.* 2012 oct;92(4):1699–775.

Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth. Analg.* 2003 oct;97(4):1108–16.

Petrosino S, Palazzo E, de Novellis V, Bisogno T, Rossi F, Maione S, et al. Changes in spinal and supraspinal endocannabinoid levels in neuropathic rats. *Neuropharmacology.* 2007 feb;52(2):415–22.

Piomelli D, Astarita G, Rapaka R. A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007 oct;8(10):743–54.

Piomelli D, Sasso O. Peripheral gating of pain signals by endogenous lipid mediators. *Nat. Neurosci.* 2014 feb;17(2):164–74.

Piomelli D. More surprises lying ahead. The endocannabinoids keep us guessing. *Neuropharmacology.* 2014 ene;76 Pt B:228–34.

Pogatzki EM, Gebhart GF, Brennan TJ. Characterization of Adelta- and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision. *J. Neurophysiol.* 2002 feb;87(2):721–31.

Pogatzki-Zahn EM, Wagner C, Meinhardt-Renner A, Burgmer M, Beste C, Zahn PK, et al. Coding of incisional pain in the brain: a functional magnetic resonance imaging study in human volunteers. *Anesthesiology.* 2010 feb;112(2):406–17.

Porter JT, McCarthy KD. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog. Neurobiol.* 1997 mar;51(4):439–55.

Proudfoot AT, Bradberry SM, Vale JA. Sodium fluoroacetate poisoning. *Toxicol Rev.* 2006;25(4):213–9.

Pu S, Xu Y, Du D, Yang M, Zhang X, Wu J, et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and expression of spinal NMDA receptor 1 subunit in rat neuropathic pain model. *J. Physiol. Biochem.* 2013 sep;69(3):349–57.

Raffa RB, Clark-Vetri R, Tallarida RJ, Wertheimer AI. Combination strategies for pain management. *Expert Opin Pharmacother.* 2003 oct;4(10):1697–708.

Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an «atypical» opioid analgesic. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992 ene;260(1):275–85.

Raghavendra V, Tanga F, DeLeo JA. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003 ago;306(2):624–30.

Rahman W, Suzuki R, Webber M, Hunt SP, Dickenson AH. Depletion of endogenous spinal 5-HT attenuates the behavioural hypersensitivity to mechanical and cooling stimuli induced by spinal nerve ligation. *Pain.* 2006 ago;123(3):264–74.

Rawlinson A, Kitchingham N, Hart C, McMahon G, Ong SL, Khanna A. Mechanisms of reducing postoperative pain, nausea and vomiting: a systematic review of current techniques. *Evid Based Med.* 2012 jun;17(3):75–80.

Ribeiro R, Wen J, Li S, Zhang Y. Involvement of ERK1/2, cPLA2 and NF- $\kappa$ B in microglia suppression by cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2013 ene;100-101:1–14.

Rittner HL, Hackel D, Voigt P, Mousa S, Stolz A, Labuz D, et al. Mycobacteria attenuate nociceptive responses by formyl peptide receptor triggered opioid peptide release from neutrophils. *PLoS Pathog.* 2009 abr;5(4):e1000362.

Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipilä S, et al. Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J. Neurosci.* 2004 may 12;24(19):4683–91.

Rogawski MA, Bazil CW. New molecular targets for antiepileptic drugs:  $\alpha(2)\delta$ , SV2A, and  $K(v)7/KCNQ/M$  potassium channels. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2008 jul;8(4):345–52.

## VIII. Bibliografía

Romero A, Miranda HF, Puig MM. Antinociceptive effects of morphine, fentanyl, tramadol and their combination, in morphine-tolerant mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2010 dic;97(2):363–9.

Romero A, Rojas S, Cabañero D, Gispert JD, Herance JR, Campillo A, et al. A 18F-fluorodeoxyglucose MicroPET imaging study to assess changes in brain glucose metabolism in a rat model of surgery-induced latent pain sensitization. *Anesthesiology.* 2011 nov;115(5):1072–83.

Romero A, Romero-Alejo E, Vasconcelos N, Puig MM. Glial cell activation in the spinal cord and dorsal root ganglia induced by surgery in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2013 feb 28;702(1-3):126–34.

Romero-Sandoval A, Chai N, Nutile-McMenemy N, Deleo JA. A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. *Brain Res.* 2008 jul 11;1219:116–26.

Romero-Sandoval A, Eisenach JC. Spinal cannabinoid receptor type 2 activation reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision. *Anesthesiology.* 2007 Apr;106(4):787–94

Romero-Sandoval EA, Horvath RJ, DeLeo JA. Neuroimmune interactions and pain: focus on glial-modulating targets. *Curr Opin Investig Drugs.* 2008 jul;9(7):726–34.

Roubille C, Martel-Pelletier J, Davy J-M, Haraoui B, Pelletier J-P. Cardiovascular adverse effects of anti-inflammatory drugs. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2013 mar;12(1):55–67.

Rudin A, Wölner-Hanssen P, Hellbom M, Werner MU. Prediction of post-operative pain after a laparoscopic tubal ligation procedure. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2008 ago;52(7):938–45.

Sacerdote P, Bianchi M, Manfredi B, Panerai AE. Effects of tramadol on immune responses and nociceptive thresholds in mice. *Pain.* 1997 sep;72(3):325–30.

Saito O, Svensson CI, Buczynski MW, Wegner K, Hua X-Y, Codeluppi S, et al. Spinal glial TLR4-mediated nociception and production of prostaglandin E(2) and TNF. *Br. J. Pharmacol.* 2010 ago;160(7):1754–64.

Sakakiyama M, Maeda S, Isami K, Asakura K, So K, Shirakawa H, et al. Preventive and Alleviative Effect of Tramadol on Neuropathic Pain in Rats: Roles of  $\alpha$ 2-Adrenoceptors and Spinal Astrocytes. *J. Pharmacol. Sci.* 2014 feb 19;124(2):244–57.

Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, et al. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature.* 2001 mar 22;410(6827):471–5.

Sasso O, Bertorelli R, Bandiera T, Scarpelli R, Colombano G, Armirotti A, et al. Peripheral FAAH inhibition causes profound antinociception and protects against indomethacin-induced gastric lesions. *Pharmacol. Res.* 2012 may;65(5):553–63.

Sawdy R, Slater D, Fisk N, Edmonds DK, Bennett P. Use of a cyclo-oxygenase type-2-selective non-steroidal anti-inflammatory agent to prevent preterm delivery. *Lancet.* 1997 jul 26;350(9073):265–6.

Schmidt PC, Ruchelli G, Mackey SC, Carroll IR. Perioperative gabapentinoids: choice of agent, dose, timing, and effects on chronic postsurgical pain. *Anesthesiology.* 2013 nov;119(5):1215–21.

Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjörk E, Handwerker H. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J. Neurosci.* 1995 ene;15(1 Pt 1):333–41.

Schnoebel R, Wolff M, Peters SC, Bräu ME, Scholz A, Hempelmann G, et al. Ketamine impairs excitability in superficial dorsal horn neurones by blocking sodium and voltage-gated potassium currents. *Br. J. Pharmacol.* 2005 nov;146(6):826–33.

Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nat. Neurosci.* 2002 nov;5 Suppl:1062–7.

Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat. Neurosci.* 2007 nov;10(11):1361–8.

Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS. Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:102.



## VIII. Bibliografía

Seib RK, Paul JE. Preoperative gabapentin for postoperative analgesia: a meta-analysis. *Can J Anaesth*. 2006 may;53(5):461–9.

Sheng WS, Hu S, Min X, Cabral GA, Lokensgard JR, Peterson PK. Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Glia*. 2005 ene 15;49(2):211–9.

Shih A, Miletic V, Miletic G, Smith LJ. Midazolam administration reverses thermal hyperalgesia and prevents gamma-aminobutyric acid transporter loss in a rodent model of neuropathic pain. *Anesth. Analg*. 2008 abr;106(4):1296–1302, table of contents.

Shimaoka M, Iida T, Ohara A, Taenaka N, Mashimo T, Honda T, et al. Ketamine inhibits nitric oxide production in mouse-activated macrophage-like cells. *Br J Anaesth*. 1996 ago;77(2):238–42.

Shohami E, Gallily R, Mechoulam R, Bass R, Ben-Hur T. Cytokine production in the brain following closed head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant. *J. Neuroimmunol*. 1997 feb;72(2):169–77.

Sikandar S, Dickenson AH. Visceral pain: the ins and outs, the ups and downs. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2012 mar;6(1):17–26.

Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, et al. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA*. 2000 sep 13;284(10):1247–55.

Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J. Immunol*. 2001 sep 1;167(5):2887–94.

Snider WD, McMahon SB. Tackling Pain at the Source: New Ideas about Nociceptors. *Neuron*. 1998 abr;20(4):629–32.

Song P, Zhao ZQ. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. *Neurosci. Res*. 2001 mar;39(3):281–6.

Stamer UM, Lehnen K, Höthker F, Bayerer B, Wolf S, Hoefft A, et al. Impact of CYP2D6 genotype on postoperative tramadol analgesia. *Pain*. 2003 sep;105(1-2):231–8.

Ständer S, Schmelz M, Metze D, Luger T, Rukwied R. Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *J. Dermatol. Sci.* 2005 jun;38(3):177–88.

Stein C, Zöllner C. Opioids and sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(194):495–518.

Stella N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia*. 2010 jul;58(9):1017–30.

Stella N. Cell biology. Anatomy of prostaglandin signals. *Science*. 2011 nov 11;334(6057):768–9.

Stellwagen D, Malenka RC. Synaptic scaling mediated by glial TNF- $\alpha$ . *Nature*. 2006 abr 20;440(7087):1054–9.

Sugawara K, Zákány N, Hundt T, Emelianov V, Tsuruta D, Schäfer C, et al. Cannabinoid receptor 1 controls human mucosal-type mast cell degranulation and maturation in situ. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013 jul;132(1):182–93.

Sugiura T, Kondo S, Kishimoto S, Miyashita T, Nakane S, Kodaka T, et al. Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 2000 ene 7;275(1):605–12.

Sun Y, Zhang W, Liu Y, Liu X, Ma Z, Gu X. Intrathecal injection of JWH015 attenuates remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia by inhibiting activation of spinal glia in a rat model. *Anesth. Analg.* 2014 abr;118(4):841–53.

Sung B, Lim G, Mao J. Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *J. Neurosci.* 2003 abr 1;23(7):2899–910.

## VIII. Bibliografía

Sung C-S, Cherng C-H, Wen Z-H, Chang W-K, Huang S-Y, Lin S-L, et al. Minocycline and fluorocitrate suppress spinal nociceptive signaling in intrathecal IL-1 $\beta$ -induced thermal hyperalgesic rats. *Glia*. 2012 dic;60(12):2004–17.

Suto T, Severino AL, Eisenach JC, Hayashida K-I. Gabapentin increases extracellular glutamatergic level in the locus coeruleus via astroglial glutamate transporter-dependent mechanisms. *Neuropharmacology*. 2014 feb 1;81C:95–100.

Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J. Neurosci*. 2004 ene 7;24(1):1–7.

Svensson CI, Schäfers M, Jones TL, Powell H, Sorkin LS. Spinal blockade of TNF blocks spinal nerve ligation-induced increases in spinal P-p38. *Neurosci. Lett*. 2005 may 13;379(3):209–13.

Taiwo YO, Levine JD. Prostaglandins inhibit endogenous pain control mechanisms by blocking transmission at spinal noradrenergic synapses. *J. Neurosci*. 1988 abr;8(4):1346–9.

Takenaka I, Ogata M, Koga K, Matsumoto T, Shigematsu A. Ketamine suppresses endotoxin-induced tumor necrosis factor alpha production in mice. *Anesthesiology*. 1994 feb;80(2):402–8.

Tallarida R.J. *Drugs synergism and dose-effect data analysis*, Chapman & Hall/CRC Press, Boca Raton, FL, 2000 pp 59-63

Tallarida RJ, Kimmel HL, Holtzman SG. Theory and statistics of detecting synergism between two active drugs: cocaine and buprenorphine. *Psychopharmacology (Berl.)*. 1997 oct;133(4):378–82.

Tallarida RJ. Revisiting the isobole and related quantitative methods for assessing drug synergism. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2012 jul;342(1):2–8.

Tanabe K, Kozawa O, Iida H. Midazolam suppresses interleukin-1 $\beta$ -induced interleukin-6 release from rat glial cells. *J Neuroinflammation*. 2011;8:68.

- Tanabe M, Takasu K, Kasuya N, Shimizu S, Honda M, Ono H. Role of descending noradrenergic system and spinal alpha2-adrenergic receptors in the effects of gabapentin on thermal and mechanical nociception after partial nerve injury in the mouse. *Br J Pharmacol*. 2005 Mar;144(5):703–14
- Tanaka T, Kai S, Matsuyama T, Adachi T, Fukuda K, Hirota K. General anesthetics inhibit LPS-induced IL-1 $\beta$  expression in glial cells. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e82930.
- Taniguchi T, Shibata K, Yamamoto K. Ketamine inhibits endotoxin-induced shock in rats. *Anesthesiology*. 2001 oct;95(4):928–32.
- Tan-No K, Takahashi H, Nakagawasai O, Nijima F, Sakurada S, Bakalkin G, et al. Nociceptive behavior induced by the endogenous opioid peptides dynorphins in uninjured mice: evidence with intrathecal N-ethylmaleimide inhibiting dynorphin degradation. *Int. Rev. Neurobiol*. 2009;85:191–205.
- Tate CG. A crystal clear solution for determining G-protein-coupled receptor structures. *Trends Biochem. Sci*. 2012 sep;37(9):343–52.
- Taub DD, Eisenstein TK, Geller EB, Adler MW, Rogers TJ. Immunomodulatory activity of mu- and kappa-selective opioid agonists. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Jan 15;88(2):360–4
- Tawfic QA. A review of the use of ketamine in pain management. *J Opioid Manag*. 2013 oct;9(5):379–88.
- Telleria-Diaz A, Schmidt M, Kreuzsch S, Neubert A-K, Schache F, Vazquez E, et al. Spinal antinociceptive effects of cyclooxygenase inhibition during inflammation: Involvement of prostaglandins and endocannabinoids. *Pain*. 2010 ene;148(1):26–35.
- Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J. Immunol*. 2001 jun 15;166(12):7527–33.
- Torrecilla M, Marker CL, Cintora SC, Stoffel M, Williams JT, Wickman K. G-protein-gated potassium channels containing Kir3.2 and Kir3.3 subunits mediate the acute inhibitory effects of opioids on locus ceruleus neurons. *J. Neurosci*. 2002 jun 1;22(11):4328–34.

## VIII. Bibliografía

Trang T, Beggs S, Wan X, Salter MW. P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation. *J. Neurosci.* 2009 mar 18;29(11):3518–28.

Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature.* 2003 ago 14;424(6950):778–83.

Tynan RJ, Weidenhofer J, Hinwood M, Cairns MJ, Day TA, Walker FR. A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. *Brain Behav. Immun.* 2012 mar;26(3):469–79.

Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Häcker H, et al. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.* 2001 ago 17;276(33):31332–9.

Valder CR, Liu J-J, Song Y-H, Luo ZD. Coupling gene chip analyses and rat genetic variances in identifying potential target genes that may contribute to neuropathic allodynia development. *J. Neurochem.* 2003 nov;87(3):560–73.

Valenzano KJ, Tafesse L, Lee G, Harrison JE, Boulet JM, Gottshall SL, et al. Pharmacological and pharmacokinetic characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, GW405833, utilizing rodent models of acute and chronic pain, anxiety, ataxia and catalepsy. *Neuropharmacology.* 2005 abr;48(5):658–72.

van Noort JM. Stress proteins in CNS inflammation. *J. Pathol.* 2008 ene;214(2):267–75.

VanDenKerkhof EG, Peters ML, Bruce J. Chronic pain after surgery: time for standardization? A framework to establish core risk factor and outcome domains for epidemiological studies. *Clin J Pain.* 2013 ene;29(1):2–8.

Vane JR. My life and times with enzymes and mediators. *Med. Sci. Monit.* 2001 ago;7(4):790–800.

Verkhatsky A, Kirchhoff F. NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist.* 2007 feb;13(1):28–37.

Viguiet F, Michot B, Hamon M, Bourgoin S. Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms —Implications of 5-HT<sub>7</sub> and other 5-HT receptor types. *European Journal of Pharmacology*. 2013 sep 15;716(1–3):8–16.

Wang F, Eisenach JC, Peters CM. Depletion of spinal norepinephrine increases the duration of mechanical hypersensitivity and spinal glial activation following acute incision and partial nerve injury in the rat. 14th IASP World Congress. Milan 2012

Wang Y, Feng C, Wu Z, Wu A, Yue Y. Activity of the descending noradrenergic pathway after surgery in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2008 nov;52(10):1336–41.

Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 jun 22;96(13):7563–8.

White PF. The changing role of non-opioid analgesic techniques in the management of postoperative pain. *Anesth. Analg.* 2005 nov;101(5 Suppl):S5–22.

Wiffen PJ, Derry S, Moore RA, Aldington D, Cole P, Rice ASC, et al. Antiepileptic drugs for neuropathic pain and fibromyalgia - an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;11:CD010567.

Winkler CW, Hermes SM, Chavkin CI, Drake CT, Morrison SF, Aicher SA. Kappa opioid receptor (KOR) and GAD67 immunoreactivity are found in OFF and NEUTRAL cells in the rostral ventromedial medulla. *J. Neurophysiol.* 2006 dic;96(6):3465–73.

Wodarski R, Clark AK, Grist J, Marchand F, Malcangio M. Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pain*. 2009 sep;13(8):807–11.

Wolff T, Miller T, Ko S. Aspirin for the Primary Prevention of Cardiovascular Events: An Update of the Evidence for the U.S. Preventive Services Task Force [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2009

Woolf CJ, Chong MS. Preemptive analgesia--treating postoperative pain by preventing the establishment of central sensitization. *Anesth. Analg.* 1993 ago;77(2):362–79.

## VIII. Bibliografía

Woolf CJ, King AE. Dynamic alterations in the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 1990 ago;10(8):2717–26.

Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science.* 2000 jun 9;288(5472):1765–9.

Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain.* 2011 mar;152(3 Suppl):S2–15.

Wu CL, Raja SN. Treatment of acute postoperative pain. *Lancet.* 2011 jun 25;377(9784):2215–25.

Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, et al. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J. Neurosci.* 2002 mar 1;22(5):1763–71.

Wu Y, Li W, Zhou C, Lu F, Gao T, Liu Y, et al. Ketamine inhibits lipopolysaccharide-induced astrocytes activation by suppressing TLR4/NF- $\kappa$ B pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* 2012;30(3):609–17.

Yamamoto T, Sakashita Y, Nozaki-Taguchi N. Anti-allodynic effects of oral COX-2 selective inhibitor on postoperative pain in the rat. *Can J Anaesth.* 2000 abr;47(4):354–60.

Yanagihara Y, Ohtani M, Kariya S, Uchino K, Aoyama T, Yamamura Y, et al. Stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of ketamine and its active metabolite, norketamine, in human plasma. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2000 sep 15;746(2):227–31.

Yanarates O, Dogrul A, Yildirim V, Sahin A, Sizlan A, Seyrek M, et al. Spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors play an important role in the antinociceptive and antihyperalgesic effects of tramadol and its metabolite, O-Desmethyltramadol, via activation of descending serotonergic pathways. *Anesthesiology.* 2010 mar;112(3):696–710.

Yang J-L, Xu B, Li S-S, Zhang W-S, Xu H, Deng X-M, et al. Gabapentin reduces CX3CL1 signaling and blocks spinal microglial activation in monoarthritic rats. *Mol Brain.* 2012;5:18.

Yang R-H, Wang W-T, Chen J-Y, Xie R-G, Hu S-J. Gabapentin selectively reduces persistent sodium current in injured type-A dorsal root ganglion neurons. *Pain*. 2009 may;143(1-2):48–55.

Yao BB, Hsieh G, Daza AV, Fan Y, Grayson GK, Garrison TR, et al. Characterization of a cannabinoid CB2 receptor-selective agonist, A-836339 [2,2,3,3-tetramethyl-cyclopropanecarboxylic acid [3-(2-methoxy-ethyl)-4,5-dimethyl-3H-thiazol-(2Z)-ylidene]-amide], using in vitro pharmacological assays, in vivo pain models, and pharmacological magnetic resonance imaging. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009 ene;328(1):141–51.

Yonehara N, Kudo C, Kamisaki Y. Involvement of NMDA-nitric oxide pathways in the development of tactile hypersensitivity evoked by the loose-ligation of inferior alveolar nerves in rats. *Brain Res.* 2003 feb 14;963(1-2):232–43.

Yoon B-E, Woo J, Lee CJ. Astrocytes as GABA-ergic and GABA-ceptive cells. *Neurochem. Res.* 2012 nov;37(11):2474–9.

Yoshimura M, Furue H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *J. Pharmacol. Sci.* 2006 jun;101(2):107–17.

Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 dic 22;95(26):15769–74.

Yrjänheikki J, Tikka T, Keinänen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 nov 9;96(23):13496–500.

Yu L, Ran B, Li M, Shi Z. Gabapentin and pregabalin in the management of postoperative pain after lumbar spinal surgery: a systematic review and meta-analysis. *Spine*. 2013 oct 15;38(22):1947–52.

Zhang J, De Koninck Y. Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J. Neurochem.* 2006 may;97(3):772–83.



## VIII. Bibliografía

Zhang W-S, Xu H, Xu B, Sun S, Deng X-M, Zhang Y-Q. Antihyperalgesic effect of systemic dexmedetomidine and gabapentin in a rat model of monoarthritis. *Brain Res.* 2009 abr 6;1264:57–66.

Zhou L-J, Yang T, Wei X, Liu Y, Xin W-J, Chen Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to spinal long-term potentiation and mechanical hypersensitivity by activation of spinal microglia in rat. *Brain Behav. Immun.* 2011 feb;25(2):322–34.

Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BYS, Ona V, Li M, et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature.* 2002 may 2;417(6884):74–8.

Zhu X, Conklin DR, Eisenach JC. Preoperative inhibition of cyclooxygenase-1 in the spinal cord reduces postoperative pain. *Anesth. Analg.* 2005 may;100(5):1390–1393

Zhu X, Eisenach JC. Cyclooxygenase-1 in the spinal cord is altered after peripheral nerve injury. *Anesthesiology.* 2003 nov;99(5):1175–9.

Ziak D, Chvátal A, Syková E. Glutamate-, kainate- and NMDA-evoked membrane currents in identified glial cells in rat spinal cord slice. *Physiol Res.* 1998;47(5):365–75.

Zychowska M, Rojewska E, Kreiner G, Nalepa I, Przewlocka B, Mika J. Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. *J. Neuroimmunol.* 2013 sep 15;262(1-2):35–45.