



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Guido Ruiz Barría
INSTITUTO: Farmacia
FACULTAD: Ciencias

**“ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO DE PALMITOILETANOLAMIDA SOBRE
LA EXPRESIÓN DE TNF- α EN EL GANGLIO DE LA RAÍZ DORSAL DE RATAS
NEUROPÁTICAS EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE CONSTRICCIÓN
CRÓNICA DEL NERVIIO CIÁTICO (CCI)”**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Químico Farmacéutico.

EDUARDO SEBASTIÁN BRAVO BALMACEDA

VALDIVIA-CHILE

2011

*Dedicado a mis queridos padres Berta y Jaime,
y a mi hermano Cristián.*

Agradecimientos.

A mi querida madre, quien simboliza la fuerza que me impulsó a emprender este largo camino de aprendizaje, gracias por todo su amor, comprensión, apoyo, consejo y confianza, sin ella jamás podría haber llegado hasta aquí.

A mi padre, por su infinita paciencia y cariño, por haber estado en los momentos difíciles y hacerme sentir seguro de mi mismo.

A mi hermano, por su compañía, apoyo y principalmente su alegría, una de las cosas más bellas de la vida y que por momentos desaparecía en el transcurrir de este largo proceso educativo.

A don Guido Ruíz Barría, profesor patrocinante de mi tesis. Por su afecto, confianza, amistad y paciencia.

A todos quienes me han acompañado en mis días de mayor soledad, personas que de forma desinteresada me brindaron su amistad. A mis queridos amigos, en especial a Renato por estar siempre dispuesto a escuchar, por haber creído en mí en momentos decisivos y ser un apoyo en este largo proceso. A Carolina por todos estos años de amistad, confianza y su apoyo hasta el final.

Deseo agradecer al Instituto de Ciencia animal, especialmente al Dr. Alfredo Ramírez y quienes trabajan con él, por recibirme cordialmente y enseñarme las técnicas necesarias utilizadas al término de mi estudio, por su apoyo imprescindible en esta investigación.

Finalmente, deseo agradecer al Instituto de Farmacia y a la fuente de financiamiento de esta investigación, el proyecto DID S-2009-64, que hicieron posible la realización de esta tesis.

Principales abreviaturas.

AINE: antiinflamatorios no esteroideos.

ANOVA: (*analysis of variance*) análisis de varianza.

CCI: (*chronic constriction injury*) constricción crónica del nervio ciático.

DRG: (*dorsal root ganglion*) ganglio de la raíz dorsal.

DN: (*neuropathic pain*) dolor neuropático.

IL-1: interleuquina 1.

i.p.: intraperitoneal.

IR: inmunoreactividad.

NF- κ B: factor nuclear kappa B.

PEA: (*palmitoylethanolamide*) palmitoiletanolamida.

PPAR: (*peroxisome proliferator activated receptor*) receptores activados por proliferadores de peroxisomas.

TNF- α : (*tumor necrosis factor- alpha*) factor de necrosis tumoral alfa.

WD: (*wallerian degeneration*) degeneración walleriana.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Dolor neuropático	2
1.2. Mecanismos de dolor neuropático	4
1.2.1. Actividad periférica.	5
1.2.2. Sensibilización espinal.	5
1.2.3. Interacción neuroinmune.	6
1.3. Sistema neuroinmune y dolor	6
1.3.1. TNF- α y su relación con el dolor neuropático.....	8
1.3.1.1. Generalidades.....	8
1.3.1.2. Rol fisiológico.....	9
1.3.1.3. Rol fisiopatológico.....	10
1.3.1.4. Estructura.	12
1.3.1.5. Receptores.....	12
1.3.1.6. Localización de ligando y receptores.....	13
1.3.1.7. TNF- α en neuroinflamación.	14
1.4. Receptores activados por proliferadores de peroxisomas PPAR	16
1.4.1. El agonista PPAR- α PEA.....	18
1.4.2. Relación entre PPAR- α y TNF- α en dolor neuropático.....	19
II. HIPÓTESIS	21
III. OBJETIVOS	21
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	23
4.1. Material	24
4.1.1. Material Biológico.....	24
4.1.2. Fármacos, anticuerpos, y derivados séricos.	25
4.1.3. Instrumental quirúrgico.	25
4.1.4. Equipos e instrumentos.	25
4.1.5. Soluciones.	25
4.2. Métodos	26

4.2.1. Procedimientos generales.	26
4.2.1.1. Manipulación y supervisión animal: Adaptación, pesado, y examinado.....	26
4.2.1.2. Modelo animal CCI.	27
4.2.2. Procedimientos conductuales.	28
4.2.2.1. Valoración de las conductas de dolor.	28
4.2.2.2. Administración de PEA.	30
4.2.2.3. Análisis estadístico.	30
4.2.3. Procedimientos para inmunohistoquímica.....	31
4.2.3.1. Perfusión transcardíaca.	31
4.2.3.2. Procesamiento de las muestras.	31
V. RESULTADOS	33
5.1. Resultados conductuales	34
5.1.1. Validación.	35
5.1.1.1. Hiperalgnesia térmica.	35
5.1.1.2. Alodinia mecánica.	37
5.1.2. Validación v/s vehículo.	39
5.1.3. Efecto de la administración de PEA.....	42
5.1.3.1. Hiperalgnesia térmica.	42
5.1.3.2. Alodinia mecánica.	44
5.2. Resultados inmunohistoquímicos	46
VI. DISCUSIÓN	48
VII. CONCLUSIÓN	56
VIII. BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1a. Curso temporal de la conducta de hiperalgesia térmica luego de la CCI	36
Fig. 1b. Curso temporal de la conducta de hiperalgesia térmica luego de la CCI individual.....	36
Fig. 2a. Curso temporal de la conducta de alodinia mecánica luego de la CCI.....	38
Fig. 2b. Curso temporal de la conducta de alodinia mecánica luego de la CCI individual	38
Fig. 3a. Curso temporal de la conducta de hiperalgesia térmica del grupo de validación v/s vehículo luego de la CCI	40
Fig. 3b. Curso temporal de la conducta de alodinia mecánica del grupo de validación v/s vehículo luego de la CCI	41
Fig. 4a. Efecto de la administración de PEA a una dosis de 10 mg/Kg i.p. sobre la conducta de hiperalgesia térmica en el modelo de dolor animal CCI.....	43
Fig. 4b. Efecto de la administración de PEA a una dosis de 10 mg/Kg i.p. sobre la conducta de alodinia mecánica en el modelo de dolor animal CCI.....	45
Fig. 5. Inmunoreactividad (IR) a TNF- α en L5 del DRG.....	47

RESUMEN

La evidencia actual muestra que el factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*, TNF- α) tiene un papel importante en la generación del dolor neuropático. Se ha demostrado que la constricción crónica del nervio ciático (*chronic constriction injury*, CCI) induce un incremento en los niveles de TNF- α en el ganglio de la raíz dorsal (*dorsal root ganglion*, DRG) bilateralmente. Recientemente se ha determinado que la palmitoiletanolamida (PEA) tiene efectos analgésicos en modelos animales de dolor neuropático. El presente estudio evaluó la potencial relación entre el efecto de la administración de PEA a dosis analgésica, con los cambios de expresión de TNF- α en el DRG en el modelo dolor neuropático CCI. La CCI produjo conductas de dolor neuropático ipsilateral y se observó un incremento bilateral de la inmunoreactividad (IR) para TNF- α en el DRG de L4 y L5. La administración de PEA (10 mg/Kg i.p.), disminuyó significativamente la hiperalgesia térmica y la alodinia mecánica producida por el modelo de dolor neuropático. Los días en que se observó mayor efecto analgésico de PEA, los valores de umbral térmico (hiperalgesia) fueron $-2,96 \pm 0,31$ s ($-7,36 \pm 0,12$ s control) el día 5 y $-1,81 \pm 0,30$ s ($-8,52 \pm 0,18$ s control) el día 7, mientras que los del umbral mecánico (alodinia) fueron -1 rangos (-5 rangos control) el día 5, y -0,5 rangos (-6 rangos control) el día 7. En la presente investigación se demostró además que la administración de PEA (10 mg/Kg, i.p.) disminuyó el incremento bilateral de la IR a TNF- α observado en neuronas en el DRG L4 y L5 de ratas con CCI. Si bien estos hallazgos entregan clara evidencia respecto al rol regulador de PEA sobre la expresión de TNF- α en la primera neurona sensorial, los efectos bilaterales apoyan las teorías que sostienen que el efecto analgésico de PEA no se relaciona directamente con el efecto sobre la expresión de TNF- α en el DRG.

ABSTRACT

Current evidence shows that tumor necrosis factor alpha (TNF- α) plays an important role in the onset of neuropathic pain. It has been shown that chronic constriction injury (CCI) model induces a bilateral increase of TNF- α expression at the dorsal root ganglion (DRG). Recently it has been determined that the palmitoylethanolamide (PEA) has analgesic effects on animal models of neuropathic pain. The present study evaluated a potential relation between the analgesic effect of PEA and the changes on TNF- α expression at the DRG in neuropathic pain. CCI induced pain behaviors on ipsilateral paw and a bilateral increase of immunoreactivity (IR) to TNF- α in the L4 and L5 DRG was observed. Administration of PEA (10 mg/kg i.p.), reduced significantly both, thermal hyperalgesia and mechanical allodynia. Thermal threshold values (hyperalgesia) were $2,96 \pm 0,31$ s ($-7,36 \pm 0,12$ s control) on day 5 and $-1,81 \pm 0,30$ s ($-8,52 \pm 0,18$ s control) on day 7, while the mechanical threshold (allodynia) values were -1 ranks (-5 ranks control) on day 5 and -0,5 ranks (-6 ranks control) on day 7. In the present study it was also found that the administration of PEA (10 mg / kg, i.p.) reversed the bilateral increase of TNF- α IR in L4 and L5 DRG neurons observed after CCI. Although these findings give clear evidence about the regulating role of PEA on the expression of TNF- α at the first sensory neuron, the bilateral effects support the hypotheses that the analgesic effect of PEA is not related with the effect on the expression of TNF- α at the DRG.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. DOLOR NEUROPÁTICO

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) define el dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial o descrito en términos de tal daño. Por otro lado la IASP define al dolor neuropático (DN) como el dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema nervioso somatosensorial (IASP, Task Force on Taxonomy, 2011). La definición de la IASP es útil para describir un reconocible grupo de trastornos neurológicos caracterizados por dolor y otros signos y síntomas debidos a una enfermedad o a un daño en el sistema nervioso central o en el periférico. Los trastornos que característicamente están incluidos en este grupo diagnóstico son: la neuralgia post-herpética, el dolor del miembro fantasma, la neuropatía diabética dolorosa y otras polineuropatías, la neuralgia traumática y los síndromes de dolor central (Dworkin, 2002). El dolor neuropático también es uno de los principales problemas en el tratamiento de dolor por cáncer. (Stute et al., 2003; Reyes-Gibby et al., 2010).

Desde el punto de vista clínico no existe una caracterización exacta para DN, ya que esta definición engloba un grupo muy diverso de síndromes dolorosos en cuanto a su etiología y sus manifestaciones (Backonja, 2003). No obstante habitualmente suele clasificarse sobre la base etiológica del daño al sistema nervioso (central o periférico) o según la distribución anatómica del dolor. Este tipo de clasificación se ha usado para generar un diagnóstico diferencial de la neuropatía y para determinar los tratamientos disponibles, pero no permite establecer una estrategia de manejo clínico del dolor. Esto se debe a que la relación que existe entre etiología, mecanismos y síntomas es muy compleja. El dolor manifestado en diferentes enfermedades

puede generarse por un mecanismo común. Por otro lado, un mismo mecanismo puede ser responsable de diferentes síntomas, como también los síntomas en dos pacientes pueden estar generados por diferentes mecanismos. Por último, más de un mecanismo puede estar operando en un mismo paciente y estos mecanismos pueden ir cambiando en el tiempo (Woolf, 2002).

En cuanto a la sintomatología clínica inherente del DN, éstas se clasifican en dos tipos de manifestaciones dolorosas:

- a. Dolor espontáneo o estímulo-independiente, descrito como un dolor punzante de corta duración, quemante, lancinante o eléctrico (Woolf & Mannion, 1999).
- b. Dolor estímulo-dependiente, que involucra a la hiperalgesia y la alodinia (Woolf & Mannion, 1999).

El DN es un problema clínico trascendental, dado que es una afección debilitante que compromete severamente la calidad de vida. Además, el dolor neuropático responde pobremente o sólo parcialmente a las terapias disponibles, las que a menudo producen muchos efectos indeseables. La eficacia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en el dolor neuropático es controversial, y los opioides por otro lado muestran un rango amplio de efectos, siendo útiles en ciertos tipos de dolor neuropático dependiendo de la etiología, aunque muchas veces sólo generan un alivio parcial del dolor. A esto se suma que las dosis a las que son efectivos limitan su utilidad por la aparición de efectos adversos y generación de dependencia (Ruiz & Baños, 2002). Además de los opioides, en la terapia del DN se utilizan algunos fármacos tradicionalmente entendidos como coadyuvantes: antidepresivos tricíclicos, y antiepilépticos, que se han convertido en analgésicos de primera línea dada su comprobada actividad en este tipo de dolor (Ruiz & Baños, 2002). No obstante, y tal como acontece con los opioides, es frecuente la

necesidad de administrar estos fármacos en dosis elevadas y por periodos prolongados, lo que ineludiblemente involucra la aparición de efectos adversos, pudiendo obligar a la suspensión de la terapia farmacológica (Ruiz & Baños, 2002).

Los analgésicos actuales han sido descubiertos por observación empírica o serendipia. Dado que este dolor es refractario a muchos tratamientos, y por carecer de terapias farmacológicas específicas, seguras y eficaces contra el dolor neuropático, es urgente conocer y entender los mecanismos que originan y mantienen estos estados de dolor, y así encontrar dianas farmacológicas específicas sobre las que actúen nuevos fármacos que puedan revertir o anular dichos mecanismos.

1.2. MECANISMOS DE DOLOR NEUROPÁTICO.

Desde fines del siglo pasado varios mecanismos han sido propuestos y estudiados para el DN, por medio de múltiples aproximaciones experimentales, gracias a la generación de los distintos modelos animales (Baños & Ruiz, 2007). Actualmente existen conceptos claros, aunque insuficientes, respecto a la etiología del dolor neuropático. En términos generales el dolor neuropático puede ser explicado como la consecuencia de un desbalance sostenido entre mecanismos sensoriales inhibitorios y excitatorios pero, dado que diferentes mecanismos pueden converger en un caso específico, es inapropiado intentar generar una hipótesis fisiopatología unificadora para todos los estados de dolor neuropático. Este desequilibrio se originaría como un mecanismo fallido de adaptación frente a una lesión nerviosa que genera cambios plásticos de largo plazo que perpetúan una experiencia dolorosa sin ningún papel protector o reparativo

(Scholz & Woolf, 2002). Los mecanismos periféricos más comunes planteados para el dolor neuropático son aquellos relacionados con la generación de descargas ectópicas en el sitio de la lesión (Devor, 2006), la arborización colateral en el sitio del daño (Li *et al.*, 2003, Navarro *et al.*, 2007). Por otro lado, los mecanismos a nivel central tienen un papel fundamental en el mantenimiento de estos estados, reconociéndose la sensibilización central como un mecanismo de perpetuación de dolor neuropático (Woolf, 2007; 2009; 2011).

1.2.1. Actividad periférica.

Las descargas ectópicas son una actividad espontánea anormal en neuronas aferentes primarias (Bridges *et al.*, 2001). La frecuencia de los impulsos van en aumento a medida que la información avanza, se amplifica la señal, deformando totalmente el mensaje nociceptivo (Tortorici, 2008). Las descargas ectópicas son más frecuentes en las fibras A, encargadas de conducir el impulso nervioso rápidamente. Sin embargo, también ocurren en fibras o axones desmielinizados (Woolf, 2004). La existencia de descargas ectópicas se correlaciona adecuadamente con el inicio de la hipersensibilidad táctil y térmica (Liu *et al.*, 2000).

1.2.2. Sensibilización espinal.

La sensibilización espinal es el resultado de la lesión nerviosa y de los potenciales ectópicos, producto del aumento en la liberación de aminoácidos excitadores desde la neurona aferente primaria hiperactiva (Woolf & Mannion, 1999; Woolf, 2009). Por otro lado, citoquinas y factores tróficos activan factores de transcripción y evocan un cambio en la expresión génica y el fenotipo en la primera neurona sensorial, y en las neuronas del sistema nervioso central (SNC), que producen

cambios de larga duración, *long term potentiation* (LTP), en función de la persistencia de los cambios subyacentes en la sensibilidad.

1.2.3. Interacción neuroinmune.

Actualmente la intensa interacción química entre las células del sistema neuroinmune y neuronas es ampliamente reconocida, y ciertos trastornos en dicha interacción se asumen como componentes fundamentales en la etiología de un número importante de patologías neurodegenerativas, incluyendo al dolor neuropático. En virtud de que la presente tesis se relaciona íntimamente a este mecanismo, sus características se describen en detalle en el punto siguiente.

1.3. SISTEMA NEUROINMUNE Y DOLOR.

A partir de los modelos animales de neuropatías periféricas inflamatorias y traumáticas, ha surgido un panorama donde el sistema inmune influye como mediador del dolor patológico. En estos modelos, las células inmunitarias clásicas como neutrófilos, macrófagos y linfocitos T son reclutados en la zona afectada, desde la circulación general, y son capaces de producir una reacción inmune junto con una serie de células locales residentes inmunocompetentes. Las células residentes en los nervios periféricos son los fibroblastos, células endoteliales, células de Schwann, los mastocitos, macrófagos y células dendríticas. Si bien las células, como fibroblastos y células de Schwann no son comúnmente consideradas células inmunes, pueden funcionar como células inmunitarias de muchas maneras. Por ejemplo, la activación de células de Schwann causa la liberación de una serie de moléculas que participan en la defensa local, incluyendo

quimioquinas, citoquinas proinflamatorias. Del mismo modo, las células de Schwann expresan claramente el fenotipo de macrófago en la degeneración walleriana (*Wallerian Degeneration*, WD). El primer evento que incluye moléculas del sistema inmune como es el TNF- α , después de una lesión nerviosa es la degeneración Walleriana, y se demostró que este proceso es necesario para el desarrollo de dolor neuropático periférico (Myers et al., 1993; Ramer et al., 1997). La degeneración Walleriana es una lesión inducida por la respuesta inflamatoria endoneural atribuible a la producción de citoquinas, moléculas que median la inflamación. La degeneración Walleriana es un proceso que resultaría una vez que una fibra nerviosa se corta o se tritura, en el que la parte del axón separado del núcleo celular de la neurona degenera. Esto también se conoce como "degeneración anterógrada" (Esposito y Cuzzocrea, 2011). Como consecuencia de ello, más neutrófilos y citoquinas son liberadas de las células inmunocompetentes, siendo estas moléculas las iniciadoras de la respuesta inmune por principios de comunicación entre las neuronas y las células inmunitarias, y la promoción de cambios plásticos que establecen el dolor neuropático. Existe numerosa evidencia de estudios anteriores que indica que de entre las funciones del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el TNF- α desempeña un papel importante en la patogénesis y el mantenimiento del dolor neuropático. (Sommer et al., 2004; Ignatowski et al., 2005; Zelenka et al., 2005; Schäfers et al., 2001, 2003a, 2003b, 2004; Sorkin and Schäfers, 2008; Czeschik et al., 2008; Hagenacker et al. 2010)

1.3.1. TNF- α y su relación con el dolor neuropático.

1.3.1.1. Generalidades.

El factor de necrosis tumoral (TNF) fue descubierto casualmente por William Coley (1893), quién observó que, en pacientes con cáncer que desarrollaban una infección bacteriana se inducía una necrosis tumoral. Ya a finales del siglo XVIII se había observado clínicamente que los pacientes con cáncer que habían pasado por una infección grave experimentaban una contracción del tumor, e incluso la eliminación de éste. En 1975, se demostró que el tratamiento de ratones o conejos con 'bacilo de Calmette-Guerin (BCG) (estimulación del sistema retículo endotelial), seguido por la inyección de lipopolisacárido (LPS), llevó a la liberación en la circulación de una proteína con actividad antitumoral y citotóxica (Carswell et al., 1975). Unos años más tarde, se descubrió que el TNF estaba formado por dos productos diferentes: el TNF- α y el TNF- β también llamado linfotoxina (LT) (Nedwin et al., 1985). El factor de necrosis tumoral alfa también conocido como caquexina (Beutler et al., 1988), es una citoquina proinflamatoria pleiotrópica, nombrada así por su habilidad para destruir células tumorales y causar necrosis hemorrágica en tumores en ratones. Aislada por primera vez por Carswell y cols en 1975 (Carswell et al., 1975).

El TNF- α es producido principalmente por macrófagos en respuesta a daño tisular o infección (Krueger and Callis, 2004). Actualmente, los modelos experimentales de dolor neuropático revelan una importante modificación de los niveles de diversas citoquinas en los mismos.

1.3.1.2. Rol fisiológico de TNF- α .

El TNF- α ostenta propiedades reguladoras, inmunitarias, inflamatorias, antitumorales y actúa de modo sinérgico junto a otras citoquinas como la interleuquina-1(IL-1). Además tiene influencia en la mitogénesis, diferenciación e inmunorregulación de diferentes tipos celulares, lo que implica un importante papel de esta citoquina en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. El TNF- α es producido principalmente por monocitos, macrófagos activados y linfocitos T. También puede ser producido por linfocitos B, mastocitos, *natural killer cells*, queratinocitos, y algunas células tumorales. El TNF- α se produce en respuesta a estímulos exógenos y endógenos, siendo el más potente la endotoxina bacteriana o lipopolisacárido (LP) (Ferrero et al., 2001; Xin y Oppenheim, 2011).

En primer lugar, el TNF- α inicia la reparación de tejidos mediante la inducción de proteasas para la degradación de colágeno y promueve la remodelación o sustitución del tejido lesionado y senescente estimulando el crecimiento de fibroblastos. Además el TNF- α estimula en los queratinocitos un aumento de la producción de quimioquinas las cuales intervienen en la migración leucocitaria, asimismo el TNF- α estimula la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales (Banno et al. 2004). También el TNF- α estimula un aumento en la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células endoteliales. Otras funciones beneficiosas del TNF- α incluyen su papel en la respuesta inmune contra bacterias, ciertos hongos, virus, parásitos y las invasiones celulares, como su papel en la necrosis de tumores específicos. El TNF- α es un intermediario clave en la respuesta inmune inflamatoria estimulando en los hepatocitos el aumento de la producción de Proteína C reactiva, la cual es una proteína de fase aguda que activa el sistema del complemento. Además el TNF- α estimula la

producción de citoquinas proinflamatorias en células dendríticas, linfocitos T, y macrófagos iniciando con esto una cascada de citoquinas e incrementando la permeabilidad vascular permitiendo el reclutamiento de más macrófagos y neutrófilos en el sitio de la infección. El TNF- α secretado por macrófagos produce coagulación de la sangre que sirve para contener la infección. Por otro lado, el TNF- α ejerce propiedades reguladoras en el hipotálamo activando el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (hypothalamo-pituitary-adrenocortical, HPA), provocando la liberación de hormona liberadora de corticotropina (CRH, corticotropin releasing hormone). El TNF- α liberado durante una infección o inflamación activa el sistema HPA resultando en la liberación de cortisol, la señal de retroalimentación negativa más importantes para prevenir un exceso de defensa del huésped (Himmerich et al., 2006), los glucocorticoides inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias. Cabe mencionar que el eje HPA activado continuamente durante estrés crónico resulta en respuestas del sistema inmunológico (Himmerich et al., 2006).

1.3.1.3. Rol fisiopatológico.

Muchos efectos de TNF- α a bajas concentraciones son beneficiosos, cumpliendo funciones homeostáticas como la reparación tisular mencionada en el punto anterior. Sin embargo altas concentraciones de esta citoquina originadas por una excesiva producción de TNF- α por periodos prolongados están asociados a caquexia, de ahí su denominación de caquexina, siendo la caquexia una pérdida severa de peso caracterizada por catabolismo neto y anemia, que se produce en enfermedades como el cáncer y el SIDA (Pietrzak et al., 2008).

Cuando el TNF- α alcanza concentraciones significativas en el torrente sanguíneo sus efectos son desastrosos provocando síndromes como el shock séptico y la coagulación intravascular diseminada. Los altos niveles de TNF- α se correlacionan con un mayor riesgo de mortalidad. Originalmente se creía que la sepsis era consecuencia directa de las bacterias invasoras en sí mismo, pero se reconoció más tarde que proteínas como el TNF- α sintetizadas excesivamente inducen la sepsis (Pietrzak et al., 2008). La sepsis se produce cuando aumenta la producción de citoquinas hasta tal punto que escapa a la infección local, resultando en edema, hipoproteinanemia, neutropenia y neutrofilia (Janeway et al., 1999). Como consecuencia los órganos del cuerpo fallan, lo que lleva a la muerte. Las víctimas de la fiebre séptica experimentan disminución de la presión arterial, supresión del miocardio, deshidratación, insuficiencia renal aguda y paro respiratorio (Cerami and Tracey, 1993).

El TNF- α está involucrado en el progreso de muchas enfermedades autoinmunes como por ejemplo en la artritis reumatoídea (Haider y Knöfler., 2009), una patología crónica y degenerativa de etiología autoinmune que cursa con dolor, inflamación y destrucción de la cápsula sinovial, donde el TNF- α estimula la síntesis de metaloproteínas en los sinoviocitos provocando la degradación del cartílago. También esta citoquina está involucrada en la psoriasis, una patología crónica autoinmune caracterizada por hiperproliferación de la piel de severidad variable, en la cual se ha demostrado una sobre expresión sistémica y cutánea de TNF- α (Pietrzak et al., 2008).

1.3.1.4. Estructura.

El TNF- α es una proteína que pertenece a la familia de las citoquinas. Es primero producido como una proteína transmembrana (tmTNF), glicoproteína de 185 aminoácidos procedente de un precursor de 212 aminoácidos. El tmTNF se hidroliza mediante la denominada TACE (enzima de conversión del TNF- α) o metaloproteinasa, y pasa a una forma soluble (sTNF) (Campbell et al., 2003). Los monocitos expresan varias isoformas del TNF- α con pesos moleculares que oscilan entre 21.5-28 kDa, isoformas que difieren en pequeñas alteraciones post-translacionales de la glicosilación y fosforilización. La actividad biológica resulta de la asociación de tres monómeros para formar TNF trimérica, la cual puede estar unida a membranas celulares (m-TNF- α) o en solución (s-TNF- α), para luego unirse a su receptor, lo que conduce a la oligomerización de éste (Horiuchi et al., 2005).

1.3.1.5. Receptores.

Los receptores de TNF- α son homotrímeros, se conocen dos tipos son TNF-R1 (receptor de factor de necrosis tumoral 1) y TNF-R2 (receptor de factor de necrosis tumoral 2) de 55 y 75 kDa respectivamente (Bazzoni et al., 1996). El TNF-R1 es una proteína glicosilada de 455 aminoácidos de los cuales 171 se encuentran en la porción extracelular. Este receptor está estructuralmente relacionado con el receptor de NGF (factor de crecimiento neuronal). La porción intracelular del TNF-R1 contiene el llamado "dominio de muerte" que está implicado en los procesos que llevan a la muerte celular programada.

El TNF-R1 se une preferentemente al s-TNF- α . Por el contrario, el TNF-R2 tiene una mayor afinidad por el m-TNF- α , careciendo de dominio de muerte. Sin embargo, el TNF-R2 también puede iniciar la muerte celular pero mediada por un mecanismo indirecto a través de una mayor producción de TNF- α endógeno y así estimulando al TNF-R1 (Grell et al. 1999). Otra investigación sugiere que, a través de un mecanismo de traspaso de ligando, aprovechando su rápida disociación, aumenta la concentración de esta citoquina en las proximidades de TNFR1, dando lugar a su activación (Tartaglia et al., 1993). Los dos receptores pueden activar las vías de transducción de señales del factor nuclear kappa-B (NF- κ B). Estas opciones de múltiples señales permiten al TNF- α promover una gran variedad de respuestas celulares como la apoptosis en la proliferación celular, o la movilización de los leucocitos (Campbell et al., 2003). Por otro lado, TNF- α puede penetrar la membrana celular y formar un canal iónico a través de la membrana, inducido por una transición conformacional de hidrofílico a hidrofóbico (Kagan et al., 1992).

1.3.1.6. Localización de ligando y receptores.

TNF- α pertenece a una familia de ligandos que activan a una familia de correspondientes receptores que inician señales para la proliferación celular y apoptosis, y que están en casi todas las células (Krueger and Callis, 2004). El TNF- α es producido por numerosas células como los monocitos, los fibroblastos y las células epiteliales. Otras células que lo producen al ser estimuladas son los macrófagos o mastocitos, las células T, linfocitos B, granulocitos, células musculares lisas y queratinocitos. Las células del glioblastoma multiforme producen grandes cantidades de TNF- α . Los receptores se expresan en las células mononucleares, la membrana sinovial, también existen receptores libres en solución que han sido excretados por las células

mononucleares. Los TNF-R1 parecen estar en todas partes y se produce en las células epiteliales y fibroblastos. TNF-R2 parecen más restringidos a las células de origen hematopoyético, siendo fuertemente expresado en células T.

1.3.1.7. TNF- α en neuroinflamación.

El TNF- α representa un mediador clave de la respuesta inflamatoria, muchos aspectos de daño tisular después de la reacción inflamatoria aguda o crónica pueden ser directamente atribuidos a la inducción concomitante de la biosíntesis y la liberación de TNF- α , y proporcionan la base racional para el desarrollo de antagonistas del TNF- α (Cerami and Tracey, 1993).

En relación al dolor neuropático existe un amplio cuerpo de información que describe su rol en esta condición. Ya en 1996 se demostró que la administración endoneural de TNF- α en el nervio ciático induce conductas de dolor neuropático (Wagner and Myers, 1996), además se observó un aumento rápido y sostenido de las concentraciones y la sensibilidad de los receptores del TNF- α , tanto en el propio nervio lesionado como en los correspondientes ganglios de las raíces dorsales, así como en el nervio contralateral (Schäfers et al. 2003a). Se demostró que tanto neuronas lesionadas como no lesionadas del DRG ipsilateral presentan un aumento en la inmunoreactividad a TNF- α después de la CCI (Schäfers, 2003a). También en este modelo de constricción del nervio ciático se observó un aumento local del TNF- α , atribuyéndose la hiperalgesia propia del modelo experimental a esta respuesta proinflamatoria neural (Schäfers et al. 2003a). En el modelo de dolor CCI la administración de un inhibidor del TNF- α , etanercept, produce una respuesta analgésica evidente (Sommer et al., 2001). Por otro lado, ratones knock out para TNF-R1 muestran una reducción del grado de activación de MAPK (Crisafulli C. et al.,

2009). El incremento en la producción de citoquinas como el TNF- α , y neurotrofinas como el NGF, se relaciona directamente con la generación de conductas de dolor neuropático y con los cambios fenotípicos observados tanto en la periferia como a nivel espinal y que son propios de estos estados (Thacker et al., 2007, Uceyler & Sommer, 2008). Estos incluyen modificaciones en el fenotipo de receptores, canales, moléculas de adhesión y otras proteínas, redistribución de la expresión de péptidos neuromoduladores, mielinización de fibras C y arborizaciones a nivel tisular, ganglionar y espinal, entre otras (Scholz & Woolf, 2008).

La literatura provee evidencia de la activación de diferentes kinasas por TNF- α . La aplicación de TNF- α en la raíz nerviosa de la rata aumenta la fosforilación de ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) con un tiempo de latencia de varias horas (Takahashi, 2006), mientras que el uso agudo de TNF- α en cultivos de neuronas del DRG induce la fosforilación de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) y de la p38 (*protein kinase p38*), pero no de ERK (Schäfers and Sorkin, 2008), lo que sugiere roles diferentes para las tres familias de moléculas de la proteína kinasa activada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK).

Actualmente se conoce que, a nivel intracelular, los segundos mensajeros involucrados tanto en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como de neurotrofinas y en los cambios fenotípicos producidos por estas, pertenecen principalmente a la familia de la MAPK, específicamente las vías p38 y ERK. Un importante estudio de Noguchi determinó hace algunos años que, en el modelo animal CCI, existe un incremento en la fosforilación de ERK en neuronas dañadas medianas a grandes del ganglio de la raíz dorsal y en células gliales, mientras que se observó un incremento en la fosforilación de p38 en neuronas no lesionadas pequeñas a medianas del DRG y en células gliales (Obata et al., 2004). Hallazgos similares se han obtenido mediante otros

modelos animales de dolor neuropático (Ciruela et al., 2003, Zhuang et al., 2005). Por otro lado, se ha descrito que factores de transcripción típicamente activados por citoquinas pro-inflamatorias, como NF- κ B (Meunier et al., 2007, Sun et al., 2006, Tegeder et al., 2004) y STAT (Dominguez et al., 2008) se ven también elevados en las células gliales en estados de dolor neuropático.

1.4. RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS, (PPAR).

Dentro de la superfamilia de receptores nucleares destaca una familia de receptores llamados receptores activados por proliferadores de peroxisomas. Los (PPAR) (*peroxisome proliferator-activated receptor*), son proteínas que actúan como factores de transcripción dependientes de ligando. Tres isoformas de PPAR han sido identificadas, la familia está compuesta por PPAR α , PPAR γ y PPAR δ/β (Berger, J.P., 2005), siendo todos receptores nucleares que forman heterodímeros obligados con el receptor de retinoides X (RXR), de esta forma se unen constitutivamente a elementos de respuesta denominados genéricamente PPRE (*peroxisome proliferator response element*) (Bensinger & Tontonoz, 2008). Los tres receptores se distribuyen distintamente en diversos tejidos, pero están los tres presentes tanto en células gliales como en neuronas (Moreno et al., 2004).

Se ha identificado una larga lista de agonistas de estos receptores, y entre los ligandos endógenos se cuentan ácidos grasos insaturados, eicosanoides, componentes de proteínas de baja densidad (LDL) o de muy baja densidad (VLDL) oxidadas. Entre los agonistas sintéticos de estos

receptores se encuentran fármacos de actual uso terapéutico como los fibratos para el PPAR- α (Bensinger & Tontonoz, 2008).

Una vez activados los PPARs por unión con sus ligandos, pueden actuar de forma directa, por transactivación, donde se forma un heterodímero con el receptor del ácido 9-cis retinoico RXR, y es capaz de reconocer secuencias específicas del DNA uniéndose a PPRE. Si el ligando no está presente, el heterodímero PPAR/RXR forma complejos de alta afinidad con proteínas nucleares impidiendo que se una al DNA. La otra forma de acción es vía indirecta por transrepresión, donde el PPAR interfiere en las vías de otros factores de transcripción, inhibiendo la transcripción génica al interferir con NF-kB (factor nuclear kappa-B), STAT (señal de traducción y activador de transcripción). Esta actividad podría ser la base del mecanismo a través del cual los PPAR ejercen efectos antiinflamatorios, anti-hiperalgésicos y anti-alodinia en diversos modelos.

Los PPAR tienen un rol como reguladores de la inflamación y de la inmunidad disminuyendo la síntesis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e iNOS, entre otras moléculas (Bensinger & Tontonoz, 2008, Glass & Ogawa, 2006, Van Neerven & Mey, 2007). En cualquier caso, los mecanismos de transrepresión dependiente de ligando que explican estos efectos aún no están totalmente dilucidados.

1.4.1. El agonista PPAR- α PEA.

La palmitoiletanolamida (PEA) agonista del receptor PPAR- α , es un lípido endógeno que está involucrado en la activación de mecanismos protectores como resultado de la estimulación de una respuesta inflamatoria (Costa et al., 2008). El descubrimiento de PEA se remonta a 1957, cuando se descubrió la actividad anti-inflamatoria de los componentes de la yema de huevo. Posteriormente, PEA fue aislado e identificado en tejido de mamíferos en 1965, y fue utilizado en clínica durante la década de los 70 para el tratamiento de la influenza y enfermedades respiratorias agudas en la antigua Checoslovaquia, sin embargo fue sacado del mercado y los motivos se desconocen (Lo Verme et al., 2005). La PEA es usado actualmente en una composición veterinaria para restaurar la reactividad de la piel en animales, comercializado bajo el nombre Redonyl por la empresa italiana Innovet. (Lo Verme et al., 2005). Tanto PEA como PPAR- α (Moreno et al., 2004) se encuentran en el SNC y pueden ser modulados durante estados patológicos, como el dolor neuropático.

Específicamente respecto a conductas de dolor estudiadas mediante modelos animales de neuropatías, en los últimos años se han publicado los primeros trabajos que, utilizando agonistas y antagonistas de PPAR, que involucran claramente a estos receptores en el dolor neuropático. En ratones, y utilizando un modelo de CCI modificado, se determinó que una única administración de agonistas de receptor PPAR- α produce una potente analgesia 30 minutos después de la inyección (LoVerme et al., 2006). El mismo grupo reportó que la administración sistémica repetida del agonista PPAR- α PEA, disminuyó la expresión espinal de TNF- α en un modelo de daño espinal (Genovese et al., 2008). En concordancia con el estudio conductual referido anteriormente, otro grupo determinó que la administración de L-29, un análogo de PEA con

actividad agonista PPAR- α , produce un rápido efecto analgésico en dos modelos animales de dolor neuropático distintos de CCI (Wallace et al., 2007). Finalmente, un trabajo muy interesante utilizando CCI en ratones, describió que la administración sistémica repetida de PEA reduce la hiperalgesia térmica y la alodinia mecánica. Cabe hacer notar que a nivel L4-L6 de la médula espinal, la administración i.p. de PEA restauró los niveles fisiológicos de la expresión de TNF- α (Costa et al., 2008).

1.4.2. Relación entre PPAR- α y TNF- α en dolor neuropático.

Varios mediadores pro-inflamatorios estimulan la translocación nuclear y la actividad de unión del NF- κ B al DNA. El NF- κ B regula la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-6, factores de transcripción, quimioquinas, y enzimas como la óxido nítrico sintasa (iNOS) y cicloxigenasa 2 (COX-2), que son importantes en la inmunidad, la inflamación y en el dolor neuropático (George et al, 2000).

En células no estimuladas, dímeros de NF- κ B se mantienen en el citoplasma mediante la unión a proteínas inhibidoras denominadas I κ Bs (por ejemplo, I κ B α , I κ B β y I κ B ϵ). En respuesta a una estimulación celular (por ejemplo, citoquinas, glutamato, daño oxidativo, factores de crecimiento), este complejo de múltiples subunidades kinasa, I κ B kinasa (IKK), son activadas y fosforiladas rápidamente en el dominio regulatorio N-terminal para degradarlas, liberándose inmediatamente NF- κ B de forma activa, el cual se transloca al núcleo para iniciar la transcripción de mediadores que están involucrados en la patogénesis del dolor neuropático. Hace dos años, un interesante estudio se focalizó en la degradación de I κ B- α y la translocación nuclear de NF- κ B,

donde se ha demostrado que la PEA suprimió la señalización de NF- κ B en el núcleo de neuronas del DRG (D'Agostino et al., 2009). Además, el tratamiento repetido con PEA resultó en una inhibición significativa de la *up-regulation* de la actividad de unión de NF- κ B al DNA que se observa en estados de dolor neuropático (Costa et al., 2008; Genovese et al., 2008).

Entonces, a dosis a las que un agonista PPAR- α produce analgesia, se ha demostrado que produce también una disminución de la expresión de TNF- α en células neuronales. Además a dosis a las que un agonista PPAR- α produce analgesia, se ha demostrado que produce también una disminución de la activación de NF- κ B en células neuronales. Muy probablemente parte del efecto analgésico de PEA se deba entonces a la disminución de TNF- α por disminución de translocación de NF- κ B. Esto podría explicar los mecanismos por los cuales la PEA ejerce una *down-regulation* sobre la expresión de TNF- α en neuronas del DRG.

II. HIPÓTESIS

- *“La administración i.p. de PEA, a dosis analgésica en el modelo de dolor neuropático CCI (constricción crónica del nervio ciático), produce una disminución en la expresión de TNF- α en células del ganglio de la raíz dorsal”*

III. OBJETIVOS

General:

- Evaluar la potencial relación entre el efecto de la administración de PEA a dosis analgésica, con los cambios de expresión de TNF- α en el ganglio de la raíz dorsal en dolor neuropático.

Específicos:

- 1) Reproducir las conductas de dolor neuropático, hiperalgesia térmica y alodinia mecánica, propias del modelo CCI.
- 2) Reproducir los efectos descritos para el modelo CCI, sobre los patrones de expresión de TNF- α , en el ganglio de la raíz dorsal.

- 3) Reproducir los efectos analgésicos de PEA en el modelo de CCI.

- 4) Determinar el efecto de la administración de PEA a dosis analgésica, sobre los patrones de expresión de TNF- α , en células del ganglio de la raíz dorsal.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Material Biológico

Para la realización de los experimentos se utilizaron 33 ratas machos de la cepa Sprague-Dawley (n=6 para cada tratamiento), de entre 2 a 3 meses de edad y de un peso entre 200 y 350 gramos.

Las ratas fueron obtenidas del servicio de estabulario del Instituto de Histología de la Universidad Austral de Chile. Durante el periodo en que se llevaron a cabo las mediciones conductuales, los animales fueron estabulados de a 6 por jaula, con acceso a agua y alimento. Se mantuvieron en condiciones estándar de luz (ciclo de luz/oscuridad de 12 horas), temperatura ($20 \pm 2^\circ \text{C}$).

Consideraciones éticas y de bioseguridad:

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las Directrices Éticas para la Investigación de Dolor Experimental en Animales Concientes de la Asociación Internacional para el estudio del dolor, el Manual de Normas de Bioseguridad de CONICYT y la Norma de uso de Animales de Investigación de la Universidad Austral de Chile. Los animales fueron adecuadamente estabulados, y los signos de sufrimiento innecesario controlados diariamente. Aquellos animales no procesados mediante inmunohistoquímica y solo utilizados en estudios conductuales fueron eutanasiados con una sobredosis de pentobarbital i.p. Todos los residuos orgánicos fueron congelados, almacenados y subsecuentemente incinerados.

4.1.2. Fármacos, anticuerpos, y derivados séricos.

El agonista PPAR- α palmitoiletanolamida (PEA) fue comprado a Genytec S.A. El anticuerpo anti-TNF- α , y el suero normal de burro se compraron a Fermelo S.A.

4.1.3. Instrumental quirúrgico.

Los instrumentos utilizados en las operaciones realizadas en este estudio, tales como bisturíes, tijeras (de disección y de hilo), pinzas (lisas y dentadas) y retractor manual fueron comprados a Fine Science Tools (F.S.T., Canadá) y a proveedores locales.

4.1.4. Equipos e instrumentos.

Para las mediciones conductuales se utilizó el equipo Plantar Test 37370 (Hargreaves et al 1988), (Ugo Basile, Italia) y los Filamentos de Von Frey (Tal et al 1994) (North Coast, U.S.A.).

Para realizar la perfusión transcardíaca se utilizó la bomba de caudal constante MasterFlex 7553-75 de Cole Parmer (Ontario, Canadá).

Para la obtención de los cortes histológicos se utilizó el criostato Microm Cryo-Star HM 560 Cryostat (Walldorf, Germany) y posteriormente para la captura de imágenes se utilizó el microscopio de epifluorescencia Leica DMI 3000B (Wetzlar, Alemania).

4.1.5. Soluciones.

Las soluciones fueron preparadas en el laboratorio. La solución de Olmos (Hoffman y Le, 2004) que contiene etilenglicol, glicerol y PBS (pH=7,2) se usó como solución crioprotectora. La solución de Zamboni que contiene ácido pícrico, paraformaldehído al 4%, glutaraldehído al 0,05% y PBS (pH=7,2) se usó como solución fijadora (Sheehan y Hrapchak, 1980).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Procedimientos generales.

4.2.1.1. Manipulación y supervisión animal: Adaptación, pesado, y examinado.

Una vez recibidos los animales, estos fueron examinados con el objeto de que cumplan con las condiciones necesarias para el experimento. Aunque los estudios conductuales evalúan conductas de dolor, se evitó someter a los animales a dolor excesivo, porque además de ocasionar sufrimiento innecesario, puede afectar la correcta interpretación de las conductas observadas.

El estado del animal se vigiló de acuerdo al Protocolo de Supervisión propuesto por Morton y Griffiths, el cual permite evaluar si el animal sufre dolor o molestia, al detectar cambios en el peso (pérdida de peso), la apariencia física (piloerección marcada), cromodaciorrea o autotomía y la respuesta a la manipulación de los animales.

Para ser fiables, las evaluaciones de las conductas de dolor deben realizarse en un ambiente conocido por el animal, y nunca medir en animales con estrés. Por ello, fue necesario someter a los animales a un proceso de adaptación a la presencia y al contacto con el experimentador. Esta adaptación fue iniciada cinco días antes de comenzar las evaluaciones conductuales, en donde se pesó a todos los animales, se manipularon y examinaron, para posteriormente ser colocados durante 15 min. en los equipos o jaulas en los cuales su conducta sería estudiada.

4.2.1.2. Modelo animal CCI (Constricción crónica del nervio ciático).

La inducción de dolor neuropático se realizó mediante el modelo animal CCI (Bennett & Xie, 1988). El modelo de dolor neuropático se escogió teniendo en cuenta varios criterios como la fiabilidad, la reproducibilidad, la especificidad, y dado que este modelo se ha utilizado en gran medida en los estudios que describen el papel de los sistemas neuroinmunes en el dolor neuropático. Además, presenta algunas ventajas a diferencia de otros modelos como el de transección del nervio, ya que no presenta dolor bilateral lo que permite utilizar la extremidad operada y sin ligadura como control. Otra propiedad es que generalmente no ocurre autotomía. Los síntomas se manifiestan 7 días después de la ligadura y persisten hasta 3 meses. El modelo consistió en inducir una mononeuropatía periférica, efectuando 4 ligaduras laxas con catgut crómico, localizadas antes de la trifurcación del nervio ciático (ya que lo que se busca es comprimir el nervio sin dañar la circulación epineural), alrededor del nervio de la pata izquierda, permitiendo así, observar la conducta animal a medida que se desarrolla la sensibilidad al dolor neuropático.

Previo a la cirugía (correspondiente al día “0” en nuestro estudio), se efectuaron 2 mediciones. La primera el día -3 y la segunda el día -1, a modo de establecer los valores de línea base que representan el estado normal del animal, de esta forma se comparó con los valores postoperatorios, y se estableció estadísticamente la inducción de dolor de la CCI.

Para realizar la CCI, todos los animales fueron anestesiados con pentobarbital (40 mg/Kg i.p.). Una vez que se logró exponer el nervio ciático a la altura del bíceps femoral, y a una longitud aproximada de 7 mm, se realizaron 4 ligaduras laxas (con catgut crómico 4.0, BBRAUN, Chile) en el nervio ciático de la pata izquierda, con una distancia aproximada de 1 mm entre cada

ligadura, para luego suturar y continuar con la pata derecha, en la cual no se realizan las 4 ligaduras. En la pata derecha, una vez expuesto el nervio ciático se suturan los tejidos sin realizar ligaduras, ya que esta incisión tiene el fin de llevar un control respecto de la pata izquierda.

Se trabajaron 3 grupos para los estudios conductuales, de los cuales el primero consistió en un grupo de validación del modelo, para graficar el curso temporal de las conductas de dolor (hiperalgesia térmica y alodinia mecánica) de manera de determinar las conductas dolorosas. Se escogió el día 1 post-operatorio como el día de inicio para la administración i.p. de PEA.

4.2.2. Procedimientos conductuales.

4.2.2.1. Valoración de las conductas de dolor.

La hiperalgesia térmica y la alodinia mecánica fueron evaluadas según fue descrito previamente (Ruiz et al., 2004). Tanto la hiperalgesia térmica como la alodinia mecánica fueron evaluadas día por medio, desde del día 1 (postoperatorio), hasta el día 15 postoperatorio, con excepción del grupo administrado con PEA que se midió hasta el día 7 postoperatorio.

La hiperalgesia térmica se midió según el método de Hargreaves y colaboradores, consistente en la determinación del intervalo transcurrido hasta la retirada de la pata ante un estímulo nociceptivo suministrado por una fuente de calor. Para la hiperalgesia térmica se utilizó el Plantar Test (Hargreaves et al., 1988). De acuerdo a este método, el umbral nociceptivo térmico al calor se determina midiendo la latencia de retirada de la pata del animal del suelo. La latencia de

retirada se define como el tiempo transcurrido desde la aplicación de calor hasta la retirada de la extremidad.

Una vez depositadas las ratas individualmente en cada uno de los compartimentos del Plantar Test, correspondientes a cajas de metacrilato transparente, se esperó aproximadamente 15 min. a que las ratas se tranquilizaran mitigando su conducta de estrés característica (acicalado o *grooming*) y de exploración. Para comenzar la medición, se situó una fuente de calor radiante (que se encuentra bajo el suelo del compartimento), bajo la zona media de la superficie plantar de la pata trasera del animal, zona inervada por el nervio ciático. Para calibrar y pactar un valor de intensidad del haz IR, se realizó un barrido de lecturas de latencia, a modo de conseguir que la latencia de la pata sin tratamiento (control) fluctúe alrededor de los 10 segundos. El estímulo térmico fue aplicado alternativamente a las patas izquierda y derecha, con un intervalo de 2,5 min. entre estímulo, de modo que para una misma pata el intervalo fue de 5 min., para evitar así una reacción inflamatoria, hasta registrar un total de 5 mediciones por cada pata. Los valores analizados corresponden a la diferencia entre el tiempo de latencia de la pata izquierda menos el tiempo de latencia de la pata derecha (ipsilateral – contralateral), y a partir de estas diferencias se generó un promedio de las diferencias.

Para la evaluación de alodinia mecánica se utilizaron los Filamentos de Von Frey, según el método descrito por Tal y Bennett (Tal y Bennett, 1994). Estos corresponden a monofilamentos de nylon los cuales, cuando son aplicados contra una superficie con una fuerza suficiente para doblarlos, ejercen una presión determinada señalada por el número de filamento que se está usando. Para comenzar las mediciones se emplearon los filamentos en orden creciente de fuerza, aplicando cada filamento tres veces en distintos, pero adyacentes, lugares en la superficie plantar de la rata, con intervalos de 3 segundos entre estímulo, realizando 5 mediciones con intervalos de

5 min por pata. Una respuesta positiva al estímulo se definió como la elevación rápida de la pata, siendo el primer filamento en producir al menos dos respuestas positivas, aquel designado como umbral de alodinia mecánica.

4.2.2.2. Administración de PEA.

Para evaluar el efecto de PEA, en este estudio se trabajó con un grupo de 6 ratas, a cada una de las cuales se les administró una dosis de PEA de 10 mg/Kg una vez al día por siete días a partir del día 1 post-CCI. (Costa *et al.*, 2008). El PEA fue disuelto primero en etanol y luego llevado a una relación 1:9 etanol: salino, y administrado por vía i.p. una hora antes de la evaluación. El efecto se evaluó a través de las mediciones de hiperalgesia térmica y alodinia mecánica los días 1, 3, 5, y 7 post-CCI, 1 hora después de la administración de PEA.

4.2.2.3. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron registrados como diferencias de la pata ipsilateral menos la pata contralateral. En los gráficos las desviaciones negativas a partir de la línea basal indicaron la presencia de hiperalgesia térmica o alodinia mecánica.

Para la estadística de hiperalgesia térmica, el registro de diferencias fue analizado mediante un análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas de variables continuas (tiempo, s), seguido de un test de Dunnett para comparar los registros con la basal. Para la estadística de alodinia

mecánica, los registros de diferencias fueron comparados con la basal mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon, debido a que los rangos asignados a los filamentos de Von Frey corresponden a una medida de variable no paramétrica. Se consideró como diferencia significativa un valor de $P < 0,05$.

4.2.3. Procedimientos para inmunohistoquímica.

4.2.3.1. Perfusión transcardíaca.

En los animales, se indujo anestesia profunda con pentobarbital sódico (50 mg/Kg i.p.). Una vez comprobando que el grado de anestesia fuese el adecuado por ausencia del reflejo de compresión de la cola, se procedió a la apertura de la cavidad torácica del animal y a la inserción de un catéter a nivel del ventrículo izquierdo. Luego se realizó un corte en la vena cava inferior y de inmediato se perfundió con 500 ml de una solución fría (8°C) de tampón fosfato (pH 7,4) y paraformaldehído al 4%, adicionando 0,1 ml de solución de heparina. La velocidad de perfusión se reguló mediante una bomba de perfusión de modo que no tardase más de 30 min.

4.2.3.2. Procesamiento de las muestras.

Inmediatamente después de la extracción, las muestras fueron depositadas individualmente en tubos y fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4 % frío en PBS, y mantenidas a 8° C por 24 horas, al día siguiente, se fijaron por inmersión en solución de Zamboni durante toda la noche a 8°C. Luego se mantuvieron en solución de sacarosa al 20% en PBS a 8°C durante 24 horas, para

finalmente mantenerlas crioprotegidas a -20°C en solución de Olmos, hasta el momento de ser procesadas. Las muestras de tejido fueron incluidas en un bloque de medio de montaje (OCT Tissue-Tek Sakura, New Zealand), congeladas y cortadas con un criostato. Se hicieron cortes de $14\ \mu\text{m}$ de grosor para los ganglios. Las muestras fueron incubadas por flotación durante 1 hora en una solución de TF 0,1 M/Tri-X 0,3%/NDS 1%. Posteriormente se incubó con anticuerpo primario, anticuerpo de cabra anti- TNF- α (1:100) (SantaCruz) diluido en TF 0,1 M/Tri-X 0,3%/NDS 1% y se incubó con la muestra durante toda la noche a 4°C . Al día siguiente se realizaron 4 lavados de 1 hora cada uno con una solución de TF 0,1 M/Tri-X 0,3%. Se aplicó el anticuerpo secundario, anti-cabra 488, y se incubó con la muestra durante toda la noche a 4°C . Finalmente se realizaron dos lavados de 1 hora cada uno con la solución de TF 0,1M/Tri-X 0,3%/NDS1%. Las secciones fueron montadas sobre portaobjetos gelatinizados y se secaron en una estufa a 40°C durante 10 min. Las muestras así montadas se deshidrataron en un baño de etanol 70%, seguido de un baño de etanol 95%, y finalmente un baño de etanol 100%, todos de 2 minutos de duración. Por último, se montó el cubreobjetos con medio de montaje Dako® y se dejó secar. Como control de especificidad, algunas secciones de ganglio fueron incubados sin anticuerpo primario y procesados del modo aquí descrito, dando como resultado una completa ausencia de tinción. Las muestras fueron observadas utilizando un microscopio de epifluorescencia. Las imágenes fueron captadas utilizando una cámara digital acoplada al microscopio. Los parámetros de captura de imágenes se mantuvieron constantes para todas las fotografías.

V. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS CONDUCTUALES.

En todos los animales intervenidos quirúrgicamente para realizar el modelo animal CCI, en los días posteriores a la cirugía se observaron posturas características y habituales en ratas sometidas al modelo (Bennett and Xie, 1987). Estas posturas características fueron disminuyendo en intensidad a lo largo de los experimentos, pero se mantuvieron observables en todos los animales. Las posturas incluyeron marcha atáxica, orientación exterior y curvatura de la zona plantar de la pata intervenida (postura de protección o *guarding behavior*), apiñamiento de los dedos y cojeo moderado y permanente, además se observó una curvatura general del dorso del animal. Tres de los animales presentaron autotomía o automutilación, produciéndose graves heridas al morderse la pata izquierda. Los animales que expresaron automutilación fueron descartados del experimento y reemplazados, luego se sacrificaron inmediatamente administrándoles una sobredosis de pentobarbital (i.p.).

5.1.1. Validación.

5.1.1.1. Hiperalgnesia térmica.

En la evaluación de la hiperalgnesia térmica los valores basales de registros de diferencias fueron cercanos a cero (0,2). Esto es porque para cada animal las latencias de ambas patas frente al estímulo térmico son muy similares y por ende, la diferencia entre dichas latencias es, en promedio, cercana a cero. Esto se interpreta como ausencia de hiperalgnesia térmica. Del mismo modo, los valores negativos en los promedios de registros de diferencias denotarán hiperalgnesia.

La constricción crónica del nervio ciático provocó hiperalgnesia térmica significativa en la pata tratada, que se comenzó a observar el día 3 post-CCI (-2,9) y se mantuvo hasta el día 17 (-5,0). Dicha hiperalgnesia se constató dado que los promedios de las diferencias entre la latencia de la pata tratada menos la de la pata control alcanzaron valores negativos y por debajo de la línea basal en todos los días señalados. El día en que se observó mayor hiperalgnesia térmica fue el día 11 (-10,6). A partir de dicho día la hiperalgnesia comenzó a remitir y para el día 21 se observó una franca reversión de la hiperalgnesia, acercándose los registros de las diferencias al valor basal (0,1). Fig.1a.

En los seis animales utilizados en la validación se observaron registros de diferencias muy similares entre sí a medida que el experimento progresaba, lo que demostró una alta consistencia del modelo utilizado y generó una escasa dispersión para los valores promedio de registros de diferencias calculados. Fig.1b.

Fig.1a.

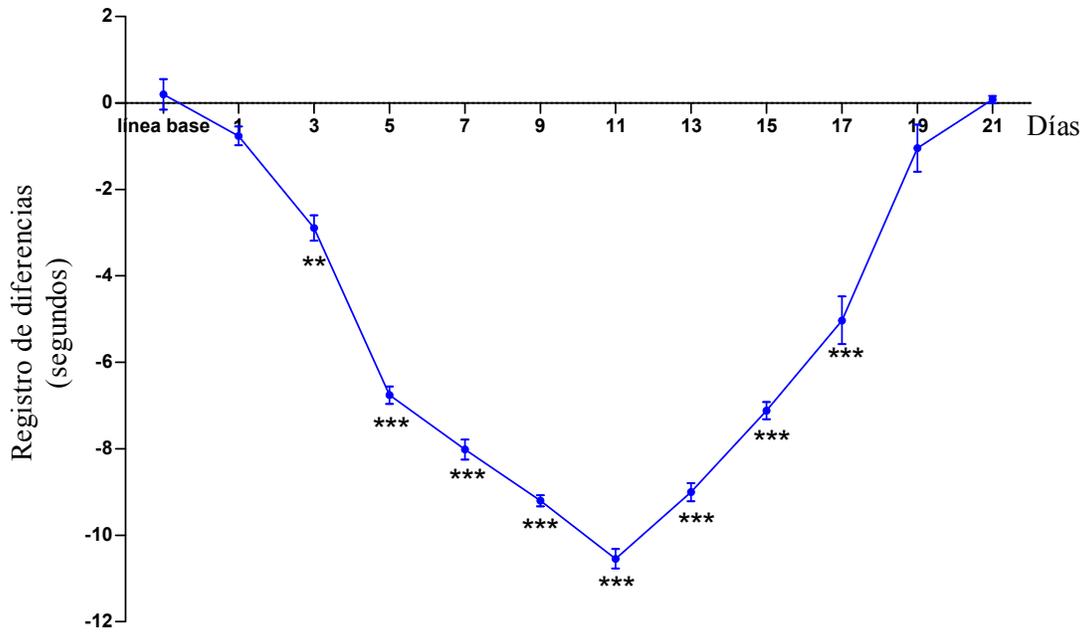


Fig.1b.

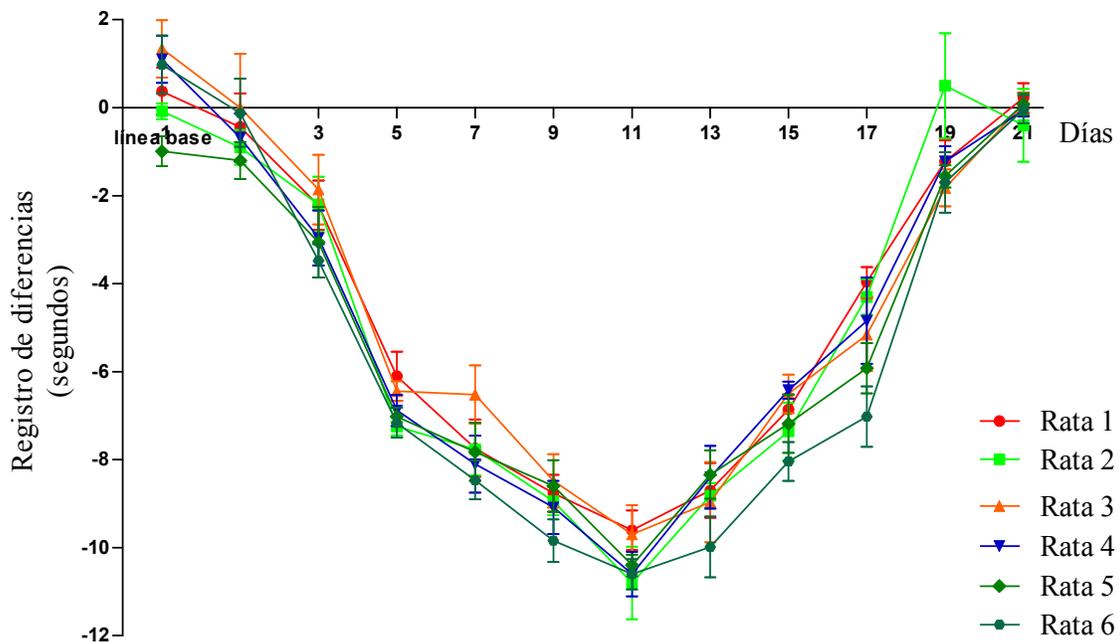


Figura 1. Curso temporal de la conducta de hiperalgesia térmica luego de la CCI. Cada punto representa el promedio de los registros de diferencias de las latencias (pata tratada - pata control). a) Para el grupo de animales ($n = 6$) en cada uno de los días evaluados y b) para cada uno de los animales. La CCI produjo una disminución significativa de los valores de registros de diferencias a partir del día 3 y hasta el día 17, comparados con la línea base. Los asteriscos denotan el grado de significancia estadística (promedio \pm E.S., ANOVA seguido de test de Dunnett).

5.1.1.2. Alodinia mecánica.

En la evaluación de la alodinia mecánica los valores basales de registros de diferencias fueron cercanos a cero (0,0). Esto es porque para cada animal los valores obtenidos de ambas patas frente al estímulo mecánico son muy similares y por ende, la diferencia entre dichos valores es, en promedio, cercana a cero. Esto se interpreta como ausencia de alodinia mecánica. Del mismo modo, los valores negativos en los promedios de registros de diferencias denotarán alodinia.

Por otro lado, la constricción crónica del nervio ciático provocó alodinia mecánica significativa en la pata tratada, que se comenzó a observar el día 3 post-CCI (-1,7) y se mantuvo hasta el día 17 (-3,2). Dicha alodinia se constató dado que los promedios de las diferencias entre los valores de la pata tratada menos la de la pata control alcanzaron valores negativos y por debajo de la línea basal en todos los días señalados. El día en que se observó mayor alodinia térmica fue el día 9 (-6,2). A partir de dicho día la alodinia comenzó a remitir y para el día 21 se observó una franca reversión de la alodinia, acercándose los registros de las diferencias al valor basal (-0,3). Fig.2a. En los seis animales utilizados en la validación se observaron registros de diferencias muy similares entre sí a medida que el experimento progresaba, lo que demostró una alta consistencia del modelo utilizado y generó una escasa dispersión para los valores promedio de registros de diferencias calculados. Fig.2b.

Fig.2a.

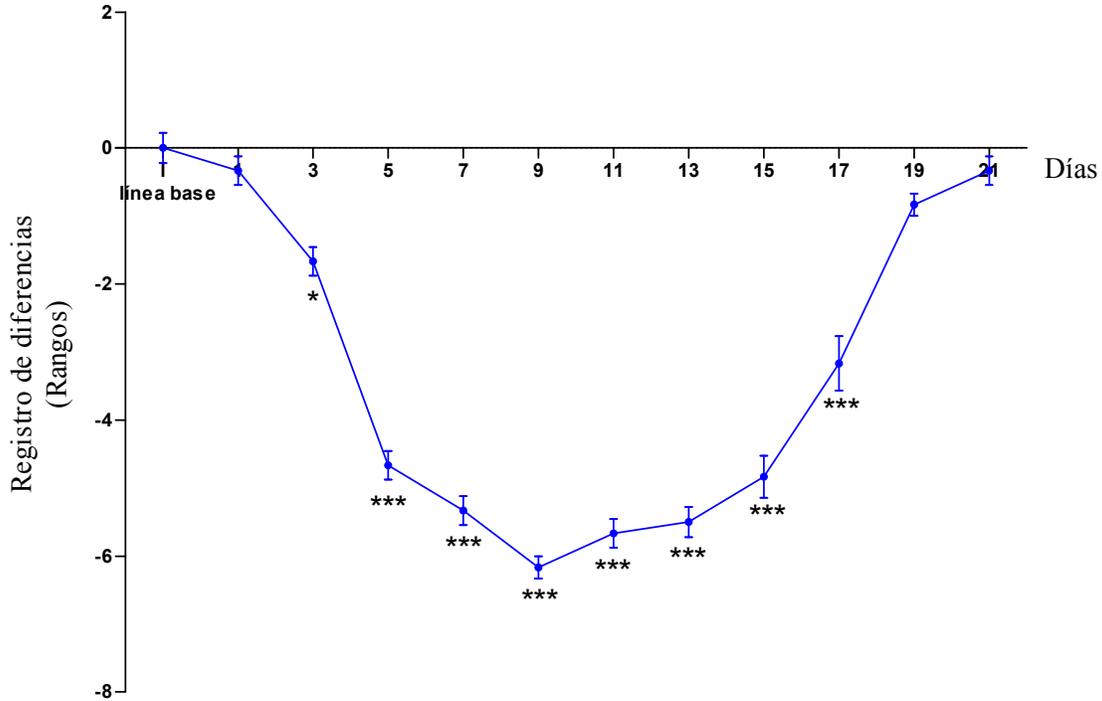


Fig.2b.

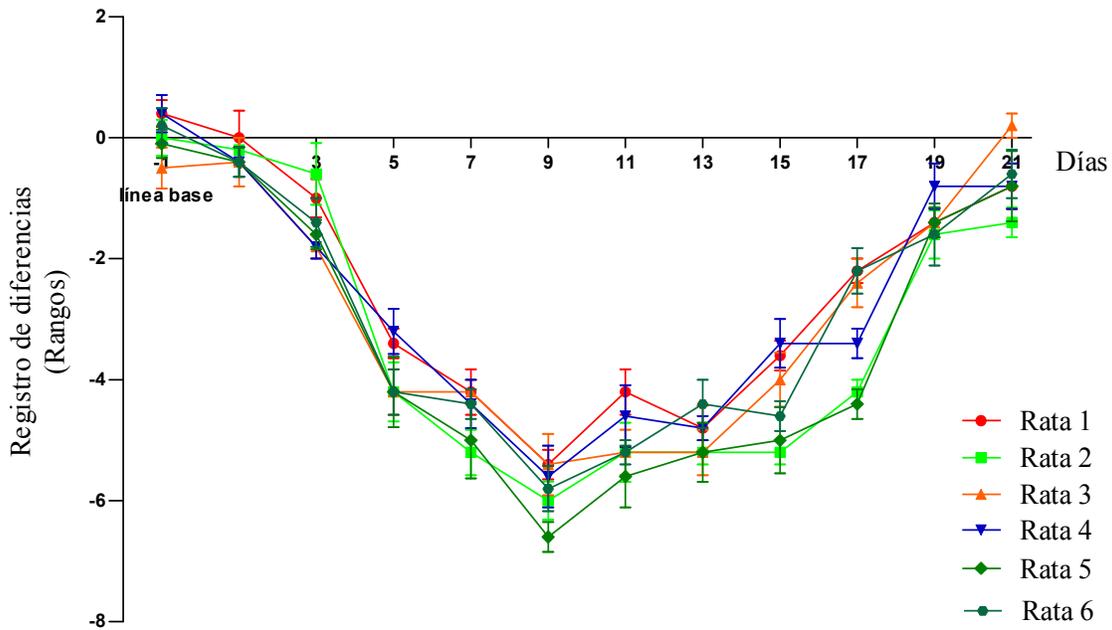


Figura 2. Curso temporal de la conducta de alodinia mecánica después de la CCI. Cada punto representa el promedio de los registros de diferencias de los rangos (pata tratada - pata control). a) Para el grupo de animales ($n = 6$) en cada uno de los días evaluados y b) para cada uno de los animales. La CCI produjo una disminución significativa de los valores de registros de diferencias a partir del día 3 y hasta el día 17, comparados con la línea base. Los asteriscos denotan el grado de significancia estadística (prueba no paramétrica de Wilcoxon).

5.1.2. Validación v/s vehículo.

Tanto los valores de los promedios de registros de diferencias de la validación como los del grupo con administración de vehículo (etanol/suero fisiológico, 1:10) , tanto en la evaluación de la hiperalgesia térmica como en la evaluación de la alodinia mecánica, fueron valores negativos con respecto a la línea base. Esto se interpreta como presencia de hiperalgesia térmica y alodinia mecánica respectivamente.

En los dos grupos de animales utilizados (validación y vehículo) se observaron registros de diferencias muy similares entre sí a medida que el experimento progresaba, coincidiendo el día 11, el día en que se produjo el valor mayor tanto para el grupo de validación (-10,5) como para el grupo tratado con vehículo (-11,5) en la medición de hiperalgesia térmica. Los valores mayores obtenidos en la medición de alodinia mecánica fueron el día 9 tanto en el grupo de validación (-6,1) como en el grupo tratado con vehículo (-6,0). La ausencia de diferencias significativas entre los grupos a lo largo del experimento demostró la inexistencia de un posible efecto analgésico del vehículo administrado y una alta consistencia del modelo utilizado. Fig. 3a) Hiperalgesia térmica y 3b) Alodinia mecánica.

Fig. 3a.

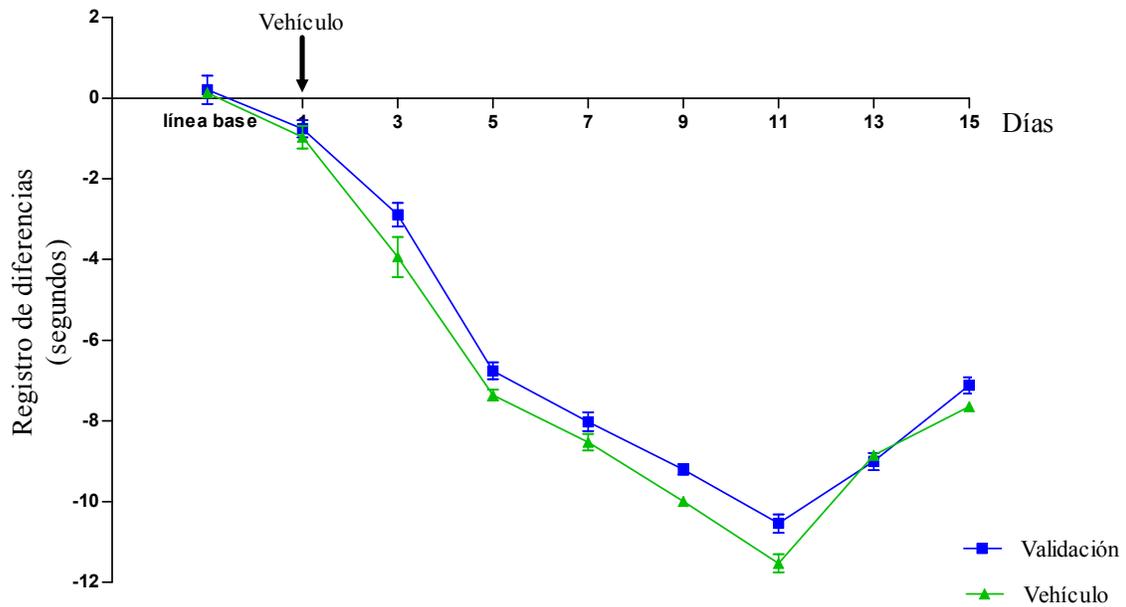


Figura 3a. Curso temporal de la conducta de hiperalgesia térmica del grupo validación v/s vehículo luego de la CCI. Cada punto representa el promedio de los registros de diferencias de las latencias (pata tratada - pata control) para cada grupo de animales ($n = 6$) en cada uno de los días evaluados. ■) La CCI produjo una disminución significativa de los valores de registros de diferencias a partir del día 3 y hasta el día 15, comparados con la línea base. ▲) La CCI produjo una disminución significativa de los valores de registros de diferencias con respecto a la línea base, la cual no fue alterada por la administración de vehículo (promedio \pm E.S., ANOVA seguido de post-test de Bonferroni).

Fig. 3b.

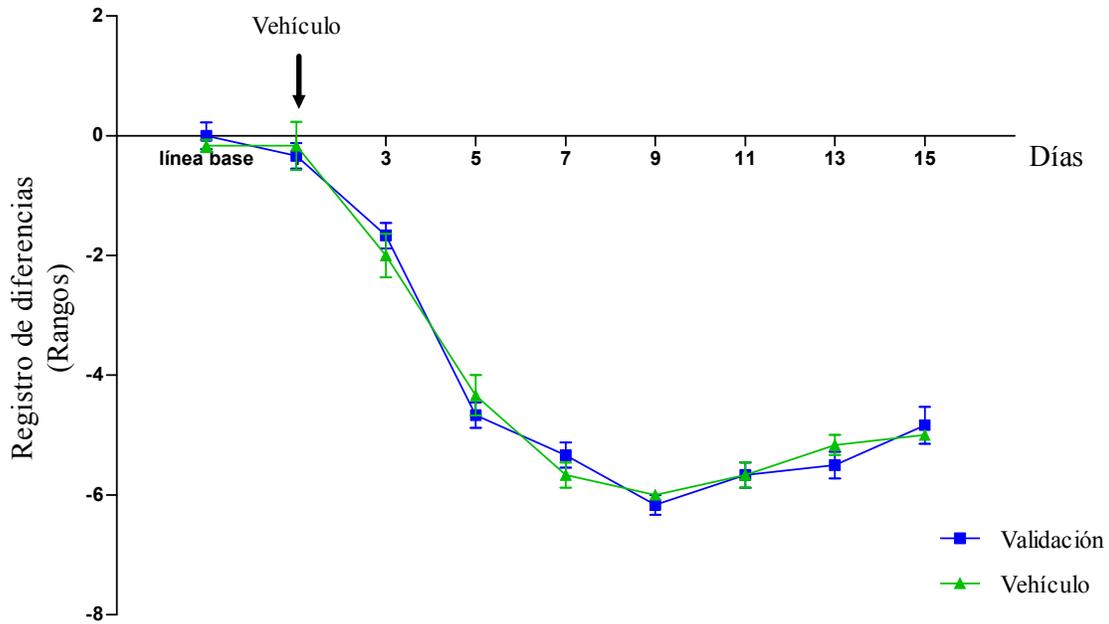


Figura 3b. Curso temporal de la conducta de alodinia mecánica del grupo validación v/s vehículo luego de la CCI. Cada punto representa el promedio de los registros de diferencias de los rangos (pata tratada - pata control) para cada grupo de animales ($n = 6$) en cada uno de los días evaluados. ■) La CCI produjo una disminución significativa de los valores de registros de diferencias a partir del día 3 y hasta el día 15, comparados con la línea base. ▲) La CCI produjo una disminución significativa de los valores de registros de diferencias con respecto a la línea base, la cual no fue alterada por la administración de vehículo (prueba no paramétrica de Wilcoxon).

5.1.3. Efecto de la administración de PEA.

5.1.3.1. Hiperalgnesia térmica.

La constricción crónica del nervio ciático en el grupo control provocó hiperalgnesia térmica significativa. Los valores negativos en los promedios de registros de diferencias de latencias denotaron la hiperalgnesia térmica. Estos valores fueron comparados con los valores del grupo intervenido con una dosis al día de PEA (10 mg/Kg) administrado una hora antes de las evaluaciones, lo que produjo diferencias significativas entre los grupos.

La administración de PEA por siete días, a partir del día 1 después de la CCI, provocó valores de diferencias de registros cercanos a cero, semejantes a valores basales, no patológicos. Se observó además, una disminución de las conductas de dolor espontáneo, que presentaron los animales los primeros días después de la CCI. En los días en que se observó mayor hiperalgnesia térmica en el grupo control, se observó valores menores en el grupo tratado $-7,36 \pm 0,12$ s (control), $-2,96 \pm 0,31$ s (PEA) el día 5 y $-8,52 \pm 0,18$ s (control), $-1,81 \pm 0,30$ s (PEA) el día 7. Fig. 4a.

Fig. 4a.

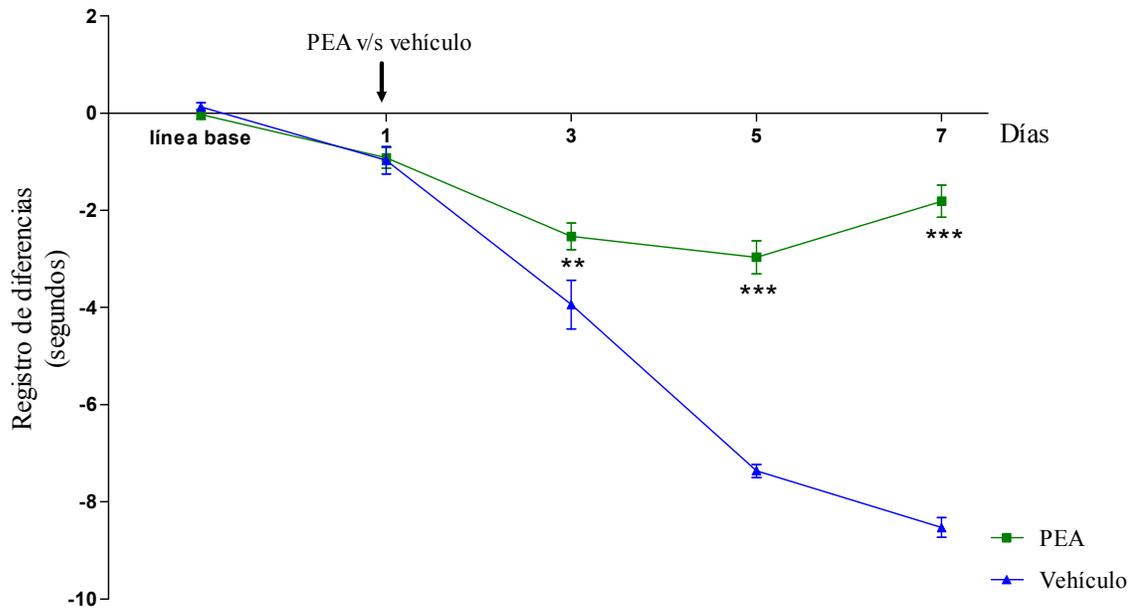


Figura 4a. Efecto de la administración de PEA a una dosis de 10 mg/Kg i.p. sobre la conducta de hiperalgesia térmica en el modelo de dolor animal CCI. Cada punto representa el promedio de los registros de diferencias de las latencias (pata tratada - pata control) para el grupo de animales ($n = 6$) en cada uno de los días evaluados. La administración de PEA produjo diferencias significativas de los valores con respecto al grupo control (■ = grupo intervenido con PEA; ▲ = grupo control). Los *** representan el grado de significancia estadística (promedio \pm E.S., ANOVA seguido de post-test de Bonferroni).

5.1.3.2. Alodinia mecánica.

La constricción crónica del nervio ciático en el grupo control provocó alodinia mecánica significativa. Los valores negativos en los promedios de registros de diferencias de los rangos denotaron la alodinia mecánica. Estos valores fueron comparados con los valores del grupo intervenido con una dosis al día de PEA (10 mg/Kg) administrado una hora antes de las evaluaciones, lo que produjo diferencias significativas entre los grupos.

La administración de PEA por siete días, a partir del día 1 después de la CCI, provocó valores de diferencias de registros cercanos a cero, semejantes a valores basales, no patológicos. Se observó además, una disminución de las conductas de dolor espontáneo, que presentaron los animales los primeros días después de la CCI. En los días en que se observó mayor alodinia mecánica en el grupo control, se observó valores menores en el grupo tratado. Los valores son -5 (control), -1 (PEA) el día 5, y -6 (control), -0,5 (PEA) el día 7 (valores en medianas). Fig. 4b.

Fig. 4b.

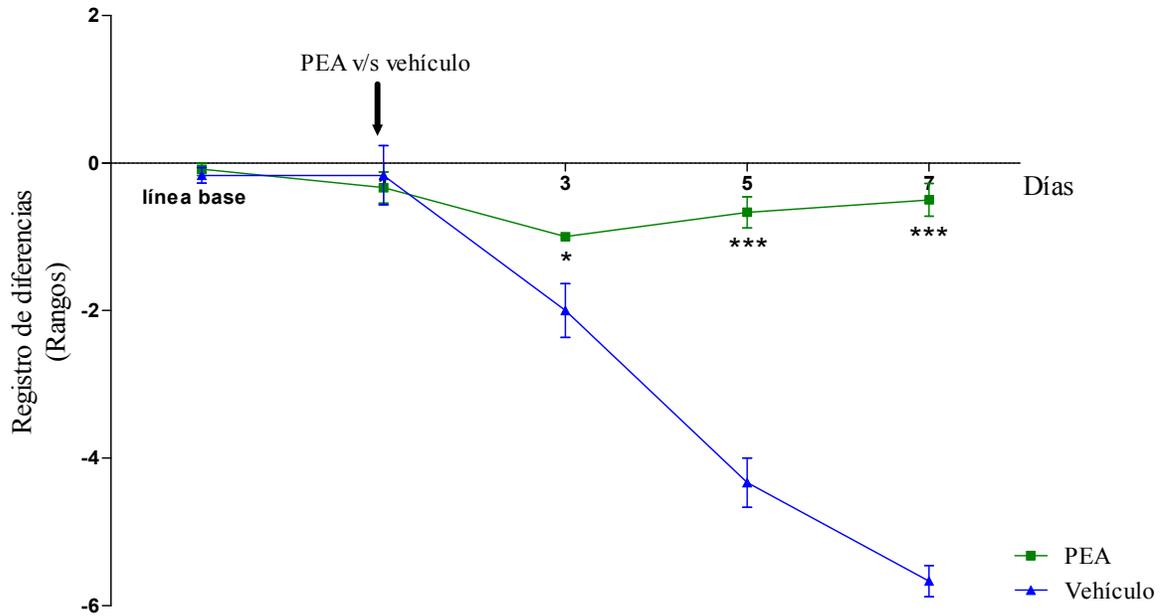


Figura 4b. Efecto de la administración de PEA a una dosis de 10 mg/Kg i.p. sobre la conducta de alodinia mecánica en el modelo de dolor animal CCI. Cada punto representa el promedio de los registros de diferencias de las diferencias de los rangos (pata tratada - pata control) para el grupo de animales ($n = 6$) en cada uno de los días evaluados. La administración de PEA produjo diferencias significativas de los valores con respecto al grupo control (■ = grupo intervenido con PEA; ▲ = grupo control). Los *** representan el grado de significancia estadística (prueba no paramétrica de Wilcoxon).

5.2. RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.

En muestras de ganglio de la raíz dorsal (DRG) de ratas, se observó la inmunoreactividad para TNF- α en L4 y L5 del ganglio ipsilateral y contralateral. La inmunoreactividad a TNF- α fue predominantemente localizada en células neuronales del DRG.

En el DRG L4 y L5 ipsilateral y contralateral de ratas naive se observó inmunoreactividad para TNF- α , localizada en el citoplasma de células neuronales, en las cuales los núcleos se observan sin tinción. Sí bien, en este estudio no se realizó una medición del tamaño celular, a simple vista se observó que los cuerpos celulares son de tamaño más pequeño y la tinción fue aparentemente de menor intensidad que en el grupo con CCI. Fig. 5 (A y B). Por otro lado, en el DRG L4 y L5 ipsilateral y contralateral de ratas 7 días después de la CCI, la inmunoreactividad a TNF- α fue de mayor intensidad con respecto al grupo control (naive). Se observó además tinción nuclear y en células aparentemente de mayor tamaño que el grupo control. La distribución fue principalmente en células neuronales del ganglio, con escasa o nula presencia de células teñidas en las fibras. Fig. 5 (C y D). A diferencia de lo anterior, en el DRG L4 y L5 ipsilateral y contralateral de ratas con CCI, la administración de PEA (10mg/Kg i.p.) disminuyó el incremento bilateral de la inmunoreactividad a TNF- α en comparación con el grupo sin tratamiento. Se observó células con núcleos teñidos y sin teñir, principalmente de pequeño tamaño. La densidad de la población de células teñidas aparentemente fue menor que en el grupo con CCI, la distribución celular fue exclusivamente en el ganglio y no en las fibras. Fig. 5 (E y F).

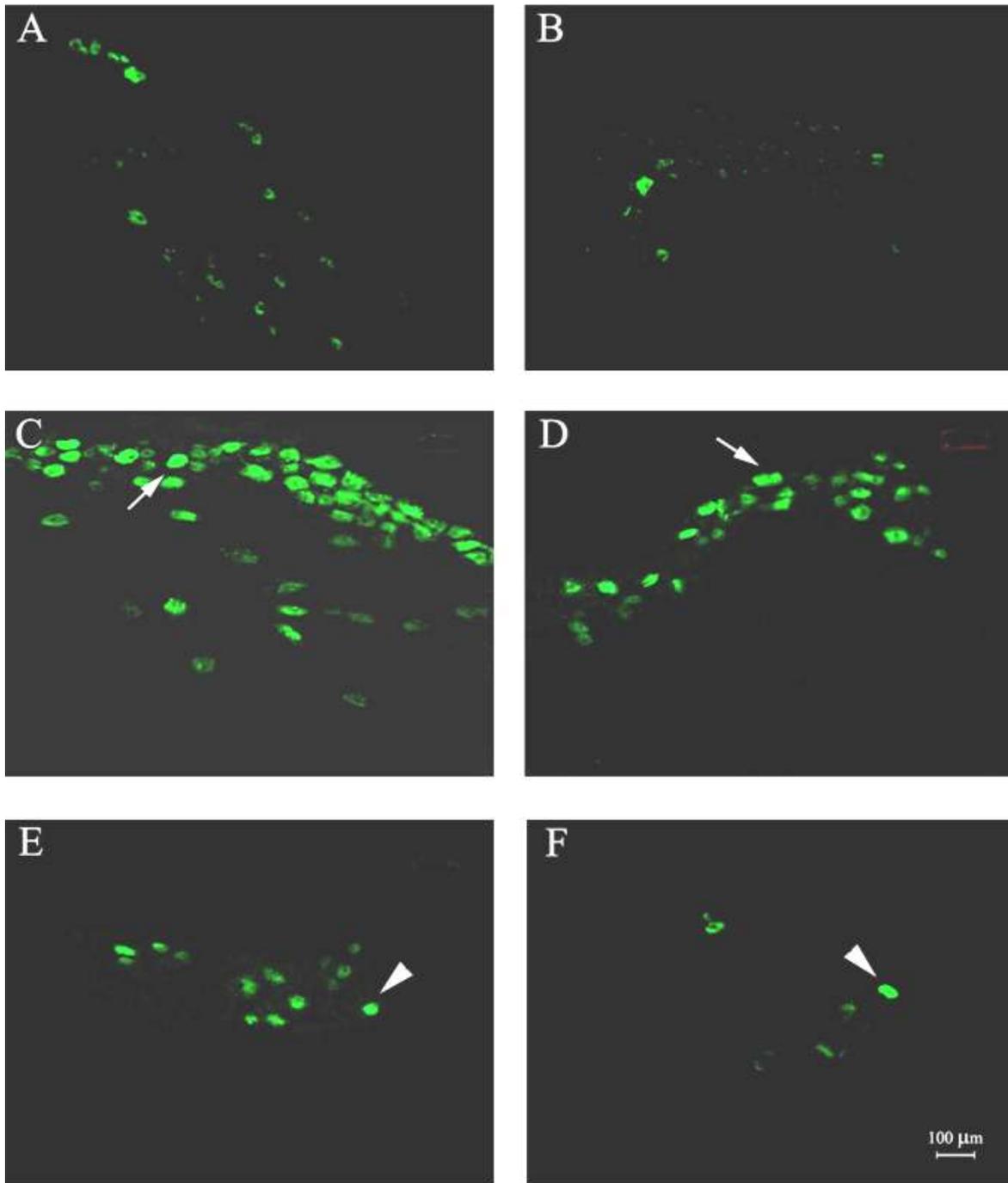


Figura 5. Inmunoreactividad (IR) a $\text{TNF-}\alpha$ en L5 del DRG. (Izq=ipsi, Der=contralateral). (A y B) Representan el DRG de ratas naive, con una baja reactividad a $\text{TNF-}\alpha$. (C y D) El DRG de ratas 7 días después de la CCI, mostrando una población de células con IR a $\text{TNF-}\alpha$ mucho mayor al grupo control. (E y F) El DRG de ratas 7 días después de la CCI tratadas con PEA. (Arrow) Muestra células intensamente teñidas. (Arrowhead) Muestra algunas células con IR a $\text{TNF-}\alpha$ después de la administración de PEA.

VI. DISCUSIÓN

En la presente tesis se ha demostrado que la administración diaria de PEA (10 mg/Kg i.p.) por una semana, resulta en una disminución de la expresión de TNF- α en neuronas de L4 y L5 del DRG de ratas con CCI. Dicha disminución es bilateral y revierte el incremento bilateral de TNF- α observado en el modelo de CCI y descrito recientemente por otros autores. Tras replicarse el efecto analgésico de PEA descrito por Costa et al., (2008). La PEA disminuyó de forma significativa las conductas de hiperalgesia térmica y de alodinia mecánica en el modelo de CCI. Las mediciones conductuales se realizaron 1 hora después de la administración de la PEA. En el día 1 no se observó diferencia con la línea base, pero en los días 3, 5 y 7 después de la CCI se observó un claro efecto analgésico, siendo el día de mayor analgesia el día 7. Los resultados conductuales confirmaron que la administración repetida de PEA conduce a una respuesta más potente y de mayor duración que una administración aguda (Costa et al., 2008).

La PEA es un ácido graso endógeno que se origina a partir del ácido palmítico y la etanolamida perteneciente a la familia de las aciletanolamidas, la cual actúa como agonista PPAR- α . Existe amplia información de los efectos de PEA en modelos de dolor tanto inflamatorios como neuropáticos, existiendo datos tanto pre-clínicos como clínicos. (Para una revisión ver, Darmani et al., 2005). También existe información reciente en algunas patologías como el síndrome del túnel carpiano (Conigliaro et al., 2011).

Una investigación reciente demostró que la administración de PEA (30 mg/Kg i.p.) en dos modelos de dolor inflamatorio que incluyeron un modelo de artritis experimental y uno de constricción inflamatoria, PEA redujo significativamente la hiperalgesia térmica y la alodinia mecánica (LoVerme et al., 2006).

Por otro lado, en un estudio descrito por Wallace et al., (2007) se demostró el efecto de L-29, un análogo sintético de PEA, en diversos modelos de dolor neuropático que incluyeron un modelo de ligadura parcial del nervio ciático (LPN), uno de etiología viral y uno inducido por fármaco. En este estudio una dosis de L-29 (10 mg/Kg i.p.) disminuyó significativamente la hipersensibilidad térmica o mecánica.

Finalmente, un estudio descrito por Costa et al., (2008) demostró el efecto de PEA (10 mg/Kg i.p.) en un modelo de constricción crónica del nervio ciático (CCI), en el cual PEA disminuyó de forma significativa las conductas de hiperalgesia térmica y de alodinia mecánica.

Aunque, al presente no hay claridad en relación al mecanismo por el cual PEA actúa como analgésico en el dolor neuropático, existen al menos tres mecanismos propuestos no excluyentes entre sí. El primero es el dependiente de su receptor, y está basado en la capacidad de PEA de estimular directamente a los PPAR- α , capaces de mediar muchos de los efectos antiinflamatorios y analgésicos, pudiendo inhibir la translocación del NF- κ B (LoVerme et al., 2005; D'Agostino et al., 2009; Petrosino et al., 2010). El segundo es el denominado efecto de séquito o de *entourage*, el cual postula que PEA actúa compitiendo por la enzima que hidroliza al endocanabinoide anandamida (AEA), la cual actúa como agonista de los receptores canabinoides, haciendo que esta última no sea degradada y favoreciendo su efecto analgésico intrínseco (Lim et al., 2003; Wallace et al., 2007; Costa et al., 2008). El tercer mecanismo propone que PEA puede comportarse como un autacoide local capaz de modular negativamente la activación de mastocitos, mecanismo ALIA (Autacoid Local Injury Antagonism), disminuyendo la degranulación de la célula cebada. Este efecto farmacológico de PEA podría ser mediado por la interacción con el receptor 2 de canabinoide (CB2) presente en los mastocitos (Facci et al., 1995;

LoVerme et al., 2005; Costa et al., 2008; Petrosino et al., 2010; Esposito et al., 2011). De hecho, actualmente existe una preparación farmacéutica que contiene el principio activo PEA micronizado, comercializado en Italia bajo el nombre de Normast ®, se indica para las condiciones patológicas sustentadas por la hiper-reactividad mediada por los mastocitos (Petrosino et al., 2010).

Una de las debilidades de esta investigación es no haber administrado un antagonista de los PPAR- α de modo de discriminar el mecanismo. No obstante, muy probablemente y como se discutirá más tarde, la disminución de TNF- α (nuestro foco de atención) no está relacionada con la vía de los cannabinoides.

Evidencia acumulada demuestra que, en modelos de dolor neuropático, se observa un incremento en la expresión de TNF- α en el DRG correspondiente a la extremidad lesionada (incremento ipsilateral) (Schäfers et al., 2003a; Ohtori et al., 2004; Xu et al., 2006; Costa et al., 2008). Particularmente Schäfers et al., (2003) demostraron en el modelo de CCI, que los niveles de expresión de TNF- α aumentan significativamente en neuronas de L4 y L5 del DRG de la pata ipsilateral de ratas, 4 días después de la lesión. Un hallazgo similar fue encontrado en el presente estudio, en el que se observó un aumento bilateral de la inmunoreactividad a TNF- α en L4 y L5 del DRG de ratas, 8 días después de la CCI. Al respecto, la información existente hasta el momento en cuanto a los cambios en la expresión de TNF- α en modelos de dolor neuropáticos a nivel contralateral es contradictoria. En un modelo animal distinto al de CCI (modelo de transección de la raíz ventral, VRT) se demostró el incremento de la inmunorreactividad para TNF- α y para el receptor 1 de TNF- α (TNF-R1) en L4 y L5 del DRG ipsilateral, pero no en el

contralateral, después de inducida la lesión (Xu et al., 2006). Por el contrario, recientemente se demostró mediante test de ELISA en un modelo CCI, un aumento bilateral de TNF- α en L4 y L5 del DRG a niveles 4 veces mayores que en ratas sin ligadura. Aunque, los niveles de TNF- α se mantuvieron cercanos a los basales en los días 1 y 3 después de la lesión, en los días 7 y 14 se observó un aumento bilateral, de los cuales el pico fue el día 7 (Jančálek et al., 2010).

Para intentar explicar un mecanismo por el cual se produce un aumento en la expresión de TNF- α en dolor neuropático, se puede considerar la relación de esta citoquina con otras moléculas alteradas en esta condición patológica. En un estudio descrito por Wei et al., (2007) se demostró que, la administración de un inhibidor de NF-kB antes de la inyección de TNF- α en el nervio ciático, bloqueó el incremento de la inmunoreactividad de TNF- α en L4 y L5 del DRG. En otra investigación, descrita por Genovese et al., (2008) se demostró que, en un modelo de daño espinal (*spinal cord injury*, SCI), los niveles de I κ B- α se redujeron significativamente 24 horas después de la lesión. Así mismo, en otro estudio descrito por D'Agostino et al., (2009) se demostró que tras el daño por carragenina disminuyó significativamente la expresión de I κ B- α en el DRG de ratones. Además en este mismo estudio, después de la inyección de carragenina se incrementó significativamente la translocación de la subunidad p65 de NF-kB en el DRG. Del mismo modo, en un modelo de CCI se demostró que la actividad de unión al DNA de NF-kB, se incrementa en ratones lesionados (Costa et al., 2008). La activación de NF-kB y el consecuente aumento en el nivel de ARNm que codifica para el TNF- α demostrado por Costa et al., (2008), demuestran que NF-kB es el principal responsable de los patrones de expresión de TNF- α en

estados de dolor neuropático producidos tras una CCI. Sin embargo, el mecanismo preciso por el cual aumenta contralateralmente TNF- α en el DRG tras una CCI, aún no ha sido dilucidado.

En general, los mecanismos para alterar la expresión de citoquinas en el DRG no asociado al daño, podrían ser mediados por una señalización neuronal o no neuronal. Probablemente el incremento contralateral de TNF- α está relacionado con una reacción neuroinflamatoria general del sistema nervioso. Recientemente, en un estudio descrito por Jančálek et al., (2010) se demostró en un modelo de CCI que no sólo aumenta bilateralmente TNF- α en L4 y L5 del DRG, sino que también se observó un incremento bilateral con la misma intensidad en C4 y C5 del DRG después de 14 días de inducida la lesión. Estos cambios bilaterales de TNF- α en el DRG homónimo y heterónimo al nervio dañado, indican que la señalización sistémica no debe ser excluida. El flujo de sangre es, probablemente, una ruta para el transporte de moléculas de señalización desde el nervio lesionado a la proximidad de las neuronas aferentes en el DRG no lesionado (contralateral) (Jančálek et al., 2010).

Hasta donde se conoce, este es el primer estudio que describe el efecto de un fármaco que normaliza los niveles de TNF- α bilateralmente en el DRG de ratas con CCI. La mayor parte de los estudios se han concentrado en evaluar el efecto de fármacos a nivel ipsilateral, describiendo una disminución del aumento de TNF- α en el DRG de la extremidad lesionada (ipsilateral).

En este momento, se sabe que fármacos como (PEA, rapamycina y talidomida), administrados en diferentes modelos animales de dolor neuropático, tienen un efecto analgésico y además una acción de regulación negativa de la expresión de TNF- α , en la médula espinal (Costa et al., 2008; Orhan et al., 2010; Xu et al., 2006). Además, en una investigación en la que se administró talidomida 2 horas antes de la inducción de neuropatía, ésta bloqueó la hiperalgesia térmica y la

alodinia mecánica junto con disminuir la expresión de TNF- α en el DRG y en la médula espinal. Sin embargo, cuando el fármaco se aplicó a los 7 días después de la cirugía, no se logró revertir el comportamiento de dolor (Xu et al., 2006). Estos datos apoyan la idea de que el aumento de TNF- α en el DRG y en el asta dorsal de la médula espinal es esencial para la iniciación, pero no para el mantenimiento del dolor neuropático inducido experimentalmente. Está claro que la presencia alterada de TNF- α en el DRG de ratas con CCI, no es mantenida en el tiempo. Ello puede obedecer a que esta citoquina tiene un pico los primeros días después de la CCI y comienza a retornar a sus niveles basales a las dos semana después de la operación (Sommer & Schäfers, 2004). Esto indica que TNF- α actúa en el origen del dolor neuropático y no tiene participación en el mantenimiento de esta condición. En base a lo anteriormente discutido podría hipotetizarse que, un fármaco analgésico en dolor neuropático, que basa su mecanismo en la disminución de la expresión de TNF- α , no tendría efecto si se administra pasadas 3 semanas luego de inducida la lesión. No obstante, para la demostración de esta hipótesis se necesitan otros estudios.

Durante la inflamación endoneural inducida por la CCI, varios mediadores pro-inflamatorios, estimulan la translocación nuclear y la actividad de unión al DNA de NF-kB, causando que este factor regule la expresión de TNF- α . Posiblemente PEA ejerce su efecto sobre TNF- α inhibiendo la activación de NF-kB, ya sea reduciendo la fosforilación de la subunidad p65 del factor de transcripción (Costa et al., 2008) o por prevenir la degradación de las I κ Bs (D'Agostino et al., 2009), lo que produce la disminución de la síntesis de TNF- α . La evidencia demuestra fuertemente que PEA actúa como agonista PPAR- α (LoVerme et al., 2005, 2006; Genovese et al.,

2008; D'Agostino et al, 2009; Petrosino et al., 2010). Probablemente, la PEA se acopla a su PPAR- α y por transrepresión de la subunidad p65 impide la transcripción. También la PEA podría actuar disminuyendo los niveles de TNF- α por medio de la disminución de la infiltración y activación de células mastocitos, los cuales ya sabemos, liberan mediadores que promueven la síntesis de más citoquinas (Esposito et al., 2011).

En suma, la presente investigación es la primera en demostrar que PEA disminuyó el incremento bilateral de la inmunoreactividad de TNF- α en L4 y L5 del DRG de ratas después de una CCI. Este hallazgo puede tener implicaciones en el diseño de futuros estudios y en el desarrollo de diferentes enfoques terapéuticos para el dolor neuropático.

VII. CONCLUSIÓN

- El modelo experimental de dolor neuropático CCI produce un aumento bilateral de la inmunoreactividad de TNF- α en L4 y L5 del DRG de ratas.
- El incremento de la inmunoreactividad bilateral de TNF- α en L4 y L5 del DRG inducido por el modelo CCI, parece tener la misma intensidad tanto en el DRG ipsilateral como en el contralateral.
- La administración vía intraperitoneal de PEA a dosis de 10 mg/Kg disminuyó el incremento bilateral de la inmunoreactividad de TNF- α en L4 y L5 del DRG, inducido por el modelo animal CCI.
- La administración vía intraperitoneal de PEA a dosis de 10 mg/Kg disminuyó el incremento bilateral de TNF- α en L4 y L5 del DRG, al parecer con la misma eficacia tanto en el DRG ipsilateral como en el contralateral.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Backonja, M. (2003) Defining neuropathic pain. *Anesth. analg.*, 97, 789-790.
- Baños, J. E. & Ruiz, G. (2007) Modelos experimentales de dolor neuropático en animales, Tratado de dolor neuropático, edited by J. Serra Catafau, pp. Madrid: *Editorial Médica Panamericana*, 57-64.
- Bensinger, S. J. and Tontonoz, P. (2008). Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature*, 454, 470-477.
- Bennett, G. J. and Xie, Y. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders on pain sensations like those seen in man. *Pain*, 33, 87-107.
- Berger, J. P., Akiyama, T. and Meinke, P. (2005). PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 26, 244–251.
- Campbell, I. K., Roberts, L. J. and Wicks, I. P. (2003) Molecular targets in immune-mediated diseases: the case of tumour necrosis factor and rheumatoid arthritis. *Immunology and Cell Biology*, 81, 354–366.
- Carswell, E., Old, L., Kassel, R., Green, N., Fiore, N. and Williamson, B. (1975). An Endotoxin-Induced Serum Factor that Causes Necrosis of Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sci.*, 72, 3666-3670.
- Cerami, A. and Tracey, K. (1993) Tumour necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 9, 317-343.
- Ciruela, A., Dixon, A. and Bramwell, S. (2003) Identification of MEK1 as a novel target for the treatment of neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.*, 138, 751-756.
- Conigliaro, R., Drago, V., Foster, P. S., Schievano, C. and Di Marzo, V. (2011) Use of palmitoylethanolamide in the entrapment neuropathy of the median in the wrist. *Minerva Med.*, 102, 141-147.
- Costa, B., Comelli, F., Bettoni, I., Colleoni, M. and Giagnoni, G. (2008) The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB (1), TRPV1 and PPAR gamma receptors and neurotrophic factors. *Pain*, 139, 541-550.

Crisafulli, C., Galuppo, M. and Cuzzocrea, S. (2009) Effects of genetic and pharmacological inhibition of TNF-[alpha] in the regulation of inflammation in macrophages. *Pharmacological Research*, 60, 332-340.

Czeschik, J.C., Hagenacker, T., Schäfers, M. and Büsselberg, D. (2008) TNF-[alpha] differentially modulates ion channels of nociceptive neurons. *Neuroscience Letters*, 434, 293-298.

Darmani, N. A., Izzo A. A., Degenhardt, B., Valenti, M., Scaglione, G., Capasso, R., Sorrentini, I. and Di Marzo, V. (2005) Involvement of the cannabimimetic compound, N-palmitoyl-ethanolamine, in inflammatory and neuropathic conditions: review of the available pre-clinical data, and first human studies. *Neuropharmacology*, 48, 1154-1163.

D'Agostino, G., La Rana, G., Russo, R., Sasso, O., Iacono, A., Esposito, E., Raso, G., Cuzzocrea, S., LoVerme, J., Piomelli, D., Meli, R. and Calignano, A. (2009) Central administration of palmitoylethanolamide reduces hyperalgesia in mice via inhibition of NF-[kappa]B nuclear signalling in dorsal root ganglia. *European Journal of Pharmacology*, 613, 54-59.

Devor, M. (2006) Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J Pain* 7, S3-S12.

Dominguez, E., Rivat, C., Pommier, B., Mauborgne, A. and Pohl, M. (2008) JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord by microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat. *J Neurochem* 107, 50-60.

Dworkin, R. (2002) An overview of neuropathic pain: syndromes: symptoms, signs, and several mechanisms. *Clin J Pain* 18, 343-349.

Esposito, E., Paterniti, I., Mazzon, E., Genovese, T., Di Paola, R., Galuppo, M. and Cuzzocrea, S. (2011) Effects of palmitoylethanolamide on release of mast cell peptidases and neurotrophic factors after spinal cord injury. *Brain Behavior and Immunity*., 25, 1099-1112.

Ferrero, E., Zocchi, M., Magni, E., Panzeri, C., Curnis, F., Rugarli, C. and Corti, A. (2001) Roles of tumor necrosis factor p55 and p75 receptors in TNF-a-induced vascular permeability. *Am. J Physiol Cell Physiol.*, 281, C1173-C1179.

Genovese, T., Esposito, E., Mazzon, E., Di Paola, R., Meli, R., Bramanti, P., Piomelli, D., Calgnano, A. and Cuzzocrea, S. (2008) Effects of palmitoylethanolamide on signaling pathways implicated in the development of spinal cord injury. *J Pharmacol Exp Ther* 326, 12-23.

Glass, C. K. and Ogawa, S. (2006) Combinational roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 6, 44-55.

Grell, M., Zimmermann, G. and Gottfried, E. (1999) Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *Embo. J.*, 18, 3034–3043.

Haider, S. and M. Knöfler. (2009) Human Tumour Necrosis Factor: Physiological and Pathological Roles in Placenta and Endometrium. *Placenta* 30, 111-123.

Hagenacker, T., Czeschik, J.C., Schäfers, M. and Büsselberg, D. (2010) Sensitization of voltage activated calcium channel currents for capsaicin in nociceptive neurons by tumor-necrosis-factor-[alpha]. *Brain Research Bulletin*, 81, 157-163.

Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. and Joris, J. (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32, 77-88.

Himmerich, H., Binder, E. B., Knzel, H. E., Schuld, A., Lucae, S., Uhr, M., PollmScher, T., Holsboer, F. and Ising, M. (2006) Successful Antidepressant Therapy Restores the Disturbed Interplay Between TNF-[alpha] System and HPA Axis. *Biological Psychiatry*, 60, 882-888.

Hoffman, G. and Le, W. (2004) Cryoprotectant anti-freeze in immunocytochemistry and in situ hybridization. *Peptides*, 25, 425-431.

Horiuchi, T., Mitoma, H., Hatta, N., Tsukamoto, H., Harashima, S. and Kikuchi, Y. (2005) Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF-alpha. *Gastroenterology*, 128, 376-392.

IASP, Task Force on Taxonomy of the IASP Seattle, IASP, (2011).

Ignatowski, Tracey A., Sud, R., Reynolds, J., Knight, P. and Spengler, R. (2005) The dissipation of neuropathic pain paradoxically involves the presence of tumor necrosis factor-[alpha] (TNF). *Neuropharmacology*, 48, 448-460.

Krueger, G. and Callis, K. (2004) Potential of Tumor Necrosis Factor inhibitors in Psoriasis and Psoriatic arthritis. *Arch. Dermatol.*, 140, 218-225.

Li, L., Xian, C., Zhong, J.-H. and Zhou, X.-F. (2003) Lumbar 5 ventral root transection-induced upregulation of nerve growth factor in sensory neurons and their target tissues: a mechanism in neuropathic pain. *Mol. Cel. Neurosci.*, 23, 232-250.

Li, Y., Dorsi, M. J., Meyer, R. A. and Belzberg, A. J. (2000) Mechanical hyperalgesia after an L5 spinal nerve lesion in the rat is not dependent on input from injured nerve fibers. *Pain*, 85, 493-502.

Liu, C. N., Michaelis, M., Amir, R. and Devor, M. (2000) Spinal nerve injury enhances subthreshold membrane potential oscillations in DRG neurons: relation to neuropathic pain. *J. Neurophysiol.* 84, 205–215.

LoVerme, J., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A. and Piomelli, D. (2005) The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sciences*, 77, 1685-1698.

LoVerme, J., Russo, R., La Rana, G., Fu, J., Farthing, J., Mattace-Raso, G., Meli, R., Hohmann, A., Calignano, A., and Piomelli, D. (2006) Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator activated receptor- α . *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 319, 1051-1061.

Meunier, A., Latremoliere, A., Dominguez, E., Mauborgne, A., Philippe, S., Hamon, M., Mallet, J., Benoliel, J. and Pohl, M. (2007). Lentiviral-mediated targeted NF-kappa B blockade in dorsal spinal cord glia attenuates sciatic nerve injury- induced neuropathic pain in the rat. *Mol. Ther.*, 15, 687-697.

Moreno, S., Farili-Cacchioli, S. and Cerú, M. P. (2004) Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*, 123, 131-145.

Moreira, A. L., Sampaio, E. P., Zmuidzinis, A., Frindt, P., Smith, K. A. and Kaplan, G. (1993) Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J. Exp. Med.*, 177, 1675-1680.

Myers, R., Yamamoto, T., Yaksh, T. and Powell, H. (1993) The role of focal nerve ischemia and Wallerian degeneration in peripheral nerve injury induced hyperesthesia. *Anesthesiology*, 78, 308-316.

- Navarro, X., Vivó, M. and Valero-Cabré, A. (2007) Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*, 82, 163-201.
- Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Mizushima, T., Fukuoka, T., Tokunaga, A. and Noguchi, K. (2004) Differential activation of MAPK in injured and uninjured DRG neurons following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 2881-2895.
- Ohtori, S., Takahashi, K., Moriya, H. and Myers, R. (2004) TNF-alpha and TNFalpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine*, 29, 1082-1088.
- Petrosino, S., Teresa I. and Di Marzo, V. (2010) N-palmitoyl-ethanolamine: Biochemistry and new therapeutic opportunities. *Biochimie* 92, 724-727.
- Pietrzak, A. T., Zalewska, A., Chodorowska, G., Krasowska, D., Michalak-Stoma, A., Nockowski, P., Osemlak, P., Paszkowski, T. and Rolinski, J. M. (2008) Cytokines and anticytokines in psoriasis. *Clinica Chimica Acta*, 394, 7-21.
- Ramer, M. S., Kawaja, M. D., Henderson, J. T., Roder, J. C. and Bisby, M. A. (1997) Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sympathetic sprouting into DRG. *Pain*, 72, 71-78.
- Ramer, M. S., Thompson, S. and McMahon, S. (1999) Causes and consequences of sympathetic basket formation in dorsal root ganglia. *Pain*, S111-S120.
- Reyes-Gibby, C., Morrow, P., Bennett, M., Jensen, M. and Shete, S. (2010) Neuropathic Pain in Breast Cancer Survivors: Using the ID Pain as a Screening Tool. *Journal of Pain and Symptom Management*, 39, 882-889.
- Ruiz, G. & Baños, J. E. (2002) Fármacos utilizados en el tratamiento del dolor neurogénico., Dolor neurogénico en rehabilitación, edited by S. de la Barrera, M. Ferreiro, A. Montoto, & S. Rodríguez, pp. Madrid: Entheos. 41-58.
- Ruiz, G., Ceballos, D., & Baños, J. E. (2004) Behavioral and histological effects of endoneurial administration of nerve growth factor: possible implications in neuropathic pain. *Brain Res* 1011, 1-6.

Ruiz, G. & Baños, J.-E. (2005) The effect of endoneurial nerve growth factor on calcitonin gene-related peptide expression in primary sensory neurons. *Brain Res*, 1042, 44-52.

Schäfers, M., Brinkhoff, J., Neukirchen, S., Marziniak, M. and Sommer, C. (2001) Combined epineural therapy with neutralizing antibodies to tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 receptor has an additive effect in reducing neuropathic pain in mice. *Neurosci. Lett.*, 14, 113-116.

Schäfers, M., Geis, C., Svensson, C. I., Luo, Z. D. and Sommer, C. (2003a) Selective increase of tumour necrosis factor-alpha in injured and spared myelinated primary afferents after chronic constrictive injury of rats ciatic nerve. *Eur J Neurosci.*, 17, 791–804.

Schäfers, M., Lee, D. H., Brors, D., Yaksh, T. L. and Sorkin, L. S., (2003b) Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation. *J. Neurosci.*, 23, 3028–3038.

Schäfers, M., Marziniak, M., Sorkin, L.S., Yaksh, T.L. and Sommer, C. (2004). Cyclooxygenase inhibition in nerve-injury- and TNF-induced hyperalgesia in the rat. *Exp. Neurol.*, 185, 160 –168.

Schäfers, M. and Sorkin, S. (2008) Effect of cytokines on neuronal excitability. *Neuroscience Letters*, 437, 188-193.

Sheehan, D.C. y Hrapchak, B.B. (1980) Theory and Practice of Histotechnology. p. p. 46-48.

Shibata, H., Yoshioka, Y., Ikemizu, S., Kobayashi, K., Yamamoto, Y., Mukai, Y., Okamoto, T., Taniai, M., Kawamura, M., Abe, Y., Nakagawa, S., Hayakawa, T., Nagata, S., Yamagata, Y., Mayumi, T., Kamada, H. and Tsutsumi, Y. (2004) Functionalization of tumor necrosis factor-alpha using phage display technique and PEGylation improves its antitumor therapeutic window. *Clin. Cancer Res.*, 10, 8293–8300.

Orhan, C. E., İnal, A. and Iker, S. (2010) Antihyperalgesic and antiallodynic effect of sirolimus in neuropathic pain and the role of cytokines in this effect. *Neuroscience Letters*, 481, 17-20.

Scholz, J. and Woolf, C. J. (2002) Can we conquer pain? *Nature* 5, 1062-1067.

Scholz, J. & Woolf, C. (2008). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci.*, 10, 1361-1368.

Shamash, S., Reichert, F. and Rothenker, S. (2002) The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and interleukin-1 β . *J. Neurosci.*, 22, 3052-3060.

Sommer, C., and Schäfers, M. (1997) Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed Wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. *Brain Res.*

Sommer, C., Schmidt, C. and George, A. (1998) Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp. Neurol.*, 151, 138–142.

Sommer, C., Petrusch, S., Lindenlaub, T. and Toyka, K. (1999) Neutralizing antibodies to interleukin 1-receptor reduce pain associated behavior in mice with experimental neuropathy. *Neurosci. Lett.*, 270:25-28.

Sommer, C., Schäfers, M., Marziniak, M., and Toyka, K. V. (2001) Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. *J Peripher Nerv Syst.*, 6, 67–72.

Sommer, C. and Schäfers, M. (2004) Mechanisms of neuropathic pain: the role of cytokines. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 1, 441- 448.

Sorkin, L. S., Xiao, W. H., Wagner, R. and Myers, R. R. (1997) Tumour necrosis factor- α induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. *Neuroscience* 81, 255–262.

Sorkin, L. and Doom, C. (2000) Epineural application of TNF elicits an acute mechanical hyperalgesia in the awake rat. *J. Periph. Nerv. Syst.*, 5, 96-100.

Sun, T., Song, W., Fu, Z., Liu, Z., Liu, Y. and Yao, S. (2006) Alleviation of neuropathic pain by intrathecal injection of antisense oligonucleotides to p65 subunit of NF- κ B. *Br. J. Anaesth.*, 97, 553-558.

Stute, P., Soukup J., Menzel, M., Sabatowski, R. and Grond, S. (2003) Analysis and treatment of different types of neuropathic cancer pain. *Journal of Pain and Symptom Management*, 26, 1123-1131.

- Takahashi, N., Kikuchi, S., Shubayev, V. I., Campana, W. M., Myers, R.R. (2006) TNF-alpha and phosphorylation of ERK in DRG and spinal cord: insights into mechanisms of sciatica. *Spine*, 31, 523–529.
- Tal, M. and Bennett, G. J. (1994) Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain*, 57, 375-382.
- Tegeder, I., Niederberger, E., Schmidt, R., Kunz, S., Gühring, H., Ritzeler, O., Michaelis, M. and Geisslinger, G. (2004) Specific inhibition of I κ B kinase reduces hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain models in rats. *J. Neurosci.*, 24, 1637-1645.
- Thacker, M. A., Clarck, A. K., Marchand, F. and McMahon, S. B. (2007) Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth. Analg.*, 105, 838-847.
- Tortorici, V. and Gómez-Barrios, V. (2008) Fisiopatología del dolor neuropático. En Consenso Venezolano de Dolor Neuropático. Asociación Venezolana para el Estudio del Dolor (AVED) 11-28.
- Uceyler, N. and Sommer, C. (2008) Cytokine regulation in animal models of neuropathic pain and in human diseases. *Neurosci. Lett.*, 6, 194-198.
- Van Neerven, S. and Mey, J. (2007) RAR/RXR and PPAR/RXR signaling in spinal cord injury. PPAR Research. vol. 2008 Article. ID 29275, 14 pages.
- Wagner, R. and Myers, R. R. (1996) Endoneurial injection of TNF- α produces neuropathic pain behavior. *Neuroreport*; 7, 2897-2901.
- Wallace, V. C. J., Segerdahl, A. R., Lambert, D. M., Vandevoorde, S., Blackbeard, J., Pheby, T., Hasnie, F. and Rice, A. S. C. (2007) The effect of the palmitoylethanolamide analogue, palmythoylethanolamide (L-29) on pain behaviour in rodent models of neuropathy. *Br J Pharmacol.* 151, 1117-1128.
- Woolf, C. J. and Mannion, R. J. (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, and management, *Lancet*, 353, 1959-1964.
- Woolf C. J. (2004) Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: Implications for diagnosis and therapy. *Life Sci*, 74, 2605-2610.

Woolf C. J. (2007) Central sensitization: uncovering the relation between pain and plasticity. *Anesthesiology*, 106, 864–867.

Woolf, C. J. (2009) Central sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *The Journal of Pain*, 10, 895-926.

Woolf, C. J. (2011) Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, 152, S2-S15.

Yoon, Y., Na, H. and Chung J. M., (1996) Contributions of injured and intact afferents to neuropathic pain in an experimental rat model, *Pain*, 64, 27-36.

Zelenka, M., Schäfers, M. and Sommer, C. (2005) Intraneural injection of interleukin-1 [beta] and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. *Pain*, 116, 257-263.

Zhou, X-F., Deng, Y-S., Xian, C. J., Zhong, J-H. (2000) Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats. *Eur J. Neurosci.*, 12, 100-105.

Zhuang, Z.-Y., Gerner, P., Woolf, C. J. and Ji, R. R. (2005) ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain* 114, 149-159.

Xin, C. and Oppenheim, J. (2011) Contrasting effects of TNF and anti-TNF on the activation of effector T cells and regulatory T cells in autoimmunity. *FEBS Letters*.

Xu, J. T., Xin, W. J., Zang, Y., Wu, C. Y. and Liu, X. G. (2006) The role of tumor necrosis factor-alpha in the neuropathic pain induced by Lumbar 5 ventral root transection in rat. *Pain*, 123, 306-321.