

a307117



T  
61-05  
UAH  
RAM  
Sala

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**



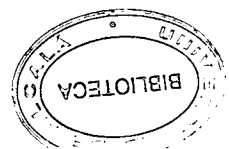
UNIVERSIDAD DE ALCALÁ REGISTRO GENERAL SECCIÓN II	
29 ABR. 2005	
ENTRADA Nº 4883	SALIDA Nº

**Efectos espinales y supraespinales de la N-ciclo-pentil adenosina (CPA) en ratas adultas con inflamación de tejidos blandos. Interacción con sistemas opioides**

**TESIS DOCTORAL**

**Guillermo Ramos Zepeda**

**2005**





Universidad  
de Alcalá

FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA

Campus universitario  
28871 Alcalá de Henares  
Madrid

D. Manuel Rodríguez Puyol, Director del Departamento de Fisiología de la Universidad de Alcalá, y D. Juan Fernando Herrero González, Profesor Titular de Fisiología de la Universidad de Alcalá:

### CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral, que lleva por título “Efectos espinales y supraespinales de la N-ciclopiptil adenosina (CPA) en ratas adultas con inflamación de tejidos blandos. Interacción con sistemas opioides”, que presenta D. Guillermo Antonio Ramos Zepeda para optar al grado de Doctor por la Universidad de Alcalá, ha sido realizada bajo la dirección de D. Juan Fernando Herrero González en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Alcalá, y cumple todos los requisitos legales para proceder a su defensa y aprobación.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Alcalá de Henares a 25 de abril de dos mil cinco.

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

EL DIRECTOR DE LA TESIS

Fdo. Dr. Manuel Rodríguez Puyol

Fdo. Dr. Juan F. Herrero



***Dedicatoria***

**Este trabajo está dedicado:**

**A mis papás.**

**A mis hermanos.**

**A Juanfer.**

***Por ser además de un excelente profesor sobre todo un buen amigo.***

**AGRADECIMIENTOS**

- A mis papás y hermanos por todo ese amor incondicional recibido siempre.
- A Juanfer y Ana por la atención y amistad brindada.
- A Mónica por ese apoyo incondicional que ha sido fundamental.
- A Nelly y Jorge por su ayuda y esas enseñanzas de la vida.
- A vos Alfonso por haberme enseñado todo lo que de vos aprendí y por ser tan buen amigo.
- A mis compañeros: Mar por esa confianza que ha hecho sentirme tan a gusto y por tu amistad, a Carlos por esos buenos momentos compartidos, a Javier y Gema por su ayuda con mis experimentos de U-50 y fentanilo.
- A mi familia y amigos.
- Al Ministerio de Ciencia y Tecnología proyecto SAF2001-1048-C03-03, y a la Comunidad de Madrid proyecto GR/SAL/0815/2004.
- A la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI).
- A la Universidad de Alcalá.
- A los laboratorios Grünenthal GmbH.
- A la Universidad de San Carlos de Guatemala, especialmente al CUNOC.

**Gracias.**

**ÍNDICE**

▪ <b>Publicaciones</b> .....	i
▪ <b>Abreviaturas</b> .....	iii
▪ <b>Resumen</b> .....	v
▪ <b>Abstract</b> .....	vii
▪ <b>Introducción</b> .....	1
1. Dolor.....	2
2. Tipos de dolor .....	3
3. Procesamiento de la información nociceptiva .....	5
3.1 Los nociceptores .....	5
3.2 Médula espinal.....	6
3.3 Vías ascendentes nociceptivas.....	7
3.4 Tálamo y corteza cerebral.....	8
3.5 Mecanismos centrales de inhibición del dolor.....	9
3.6 Sistemas inhibidores y facilitadores descendentes	10
3.7 Neurotransmisores y neuromoduladores implicados en el procesamiento de la información nociceptiva .....	11
3.8 Péptidos opioides.....	12
4. Adenosina .....	14
4.1 Estructura y origen .....	14
4.2 Transporte y metabolismo de la adenosina .....	14
4.3 Receptores de adenosina .....	17
4.4 Funciones de la adenosina .....	19
4.5 Adenosina y opioides .....	21
4.6 ¿Están implicados los receptores A1 de adenosina supraespinales en el procesamiento de la información nociceptiva? .....	22
▪ <b>Objetivos generales</b> .....	25
▪ <b>Material y métodos</b> .....	26
1. Técnica de unidades motoras aisladas (UMAs).....	27
1.1 Animales y cirugía .....	27
1.2 Cirugía preparatoria .....	28
1.3 Animales espinalizados y <i>sham-espinalizados</i> .....	29

1.4 Control del nivel de anestesia y constantes	
fisiológicas .....	30
1.5 Módulo de registro electrofisiológico .....	31
1.6 Inducción de la inflamación .....	34
1.7 Fármacos utilizados .....	35
1.8 Registro y análisis de los datos .....	37
▪ <b>Capítulo I: Actividad antinociceptiva espinal vs. supraespinal del agonista del receptor A1 de adenosina, ciclopentil adenosina, en ratas con inflamación</b> .....	40
I.1. Objetivos .....	41
I.2. Introducción.....	42
I.3. Material y métodos .....	44
1.3.a Experimentos <i>in vivo</i> en ratas adultas.....	44
1.3.a.1 Protocolo de estimulación y sistema de registro .....	44
1.3.a.2 Fármacos y análisis de datos.....	44
1.3.b Experimentos <i>in vitro</i> en ratas inmaduras .....	45
1.3.b.1 Preparación del animal .....	45
1.3.b.2 Registro electrofisiológico .....	46
1.3.b.3 Experimentos de comportamiento .....	47
1.3.b.4 Fármacos y análisis de datos.....	48
I.4. Resultados .....	48
1.4.a Experimentos <i>in vivo</i> en ratas adultas.....	48
1.4.a.1 Efecto de CPA sobre las respuestas a estimulación mecánica.....	48
1.4.a.2 Efecto de CPA sobre las respuestas a estimulación eléctrica ( <i>wind-up</i> ) .....	50
1.4.a.3 Reversión del efecto antinociceptivo de CPA por CPT.....	53
1.4.a.4 Efecto de CPA sobre la presión arterial .....	54
1.4.b Experimentos <i>in vitro</i> en ratas inmaduras .....	55
1.4.b.1 Efecto de CPA sobre el reflejo monosináptico (MSR) y el potencial lento de baja intensidad de la raíz	

ventral (SVRP) .....	55
1.4.b.2 Efecto de CPA sobre el potencial lento de la raíz ventral de alta intensidad (SVRP) y en el <i>wind-up</i> .....	57
I.5. Discusión.....	59
I.6. Conclusiones.....	65
▪ <b>Capítulo II: Interacción del agonista del receptor A1 de adenosina CPA y los receptores opioides en la modulación de los reflejos nociceptivos de la médula espinal y del <i>wind-up</i></b> .....	67
II.1. Objetivos .....	68
II.2. Introducción .....	69
II.3. Material y métodos.....	70
II.3.a Protocolo de estimulación, sistema de registro y grupos experimentales .....	70
II.3.b Cirugía preparatoria, fármacos y análisis de datos.....	71
II.4. Resultados .....	73
II.4.a Respuestas a la estimulación mecánica nociva. Recuperación del efecto de CPA después de la administración de CPT o naloxona.....	73
II.4.b Respuestas a la estimulación mecánica nociva. Prevención del efecto de la CPA por la administración previa de CPT o naloxona. ....	77
II.4.c Respuestas a estimulación eléctrica repetitiva ( <i>wind-up</i> ). Recuperación del efecto de CPA tras la administración de CPT o naloxona.....	79
II.4.d Respuestas a estimulación eléctrica o <i>wind-up</i> . Prevención del efecto de CPA por la administración previa de CPT o naloxona. ....	81
II.5. Discusión .....	82
II.6. Conclusiones .....	86



▪ <b>Capítulo III: Aumento del <i>wind-up</i> por la administración combinada de los ligandos del receptor A1 en ratas con inflamación inducida por carragenina</b> .....	88
III.1. Objetivos .....	89
III.2. Introducción .....	90
III.3. Material y métodos.....	91
III.3.a Protocolo de estimulación, sistema de registro, grupos experimentales y cirugía preparatoria.....	91
III.3.b Fármacos, protocolo de administración y análisis de datos .....	93
III.4. Resultados .....	93
III.4.a Efecto de la administración combinada de CPA seguida de CPT en animales espinalizados .....	93
III.4.b Efecto de la administración combinada de CPT seguido de la administración de la CPA en animales espinalizados .....	94
III.4.c Efecto de la administración combinada de naloxona, CPA y CPT .....	94
III.5. Discusión .....	98
III.6. Conclusiones .....	102
▪ <b>Capítulo IV: Interacción entre CPA y ligandos de los receptores opioides <math>\mu</math> y <math>\kappa</math></b> .....	104
IV.1. Objetivos .....	105
IV.2. Introducción .....	106
IV.3. Material y métodos.....	107
IV.3.a Protocolo de estimulación, sistema de registro y grupos experimentales .....	107
IV.3.b Cirugía preparatoria, fármacos y análisis de datos .....	108
IV.4. Resultados .....	109

IV.4.a Recuperación del efecto de la CPA con la administración de naloxona o nor-BNI en respuestas a estimulación mecánica .....	109
IV.4.b Recuperación del efecto de la CPA por la administración de naloxona y nor-BNI en respuestas a estimulación eléctrica repetitiva ( <i>wind-up</i> ) .....	112
IV.4.c Comparación del efecto antinociceptivo del fentanilo y del U-50,488H en ausencia y en presencia de dosis subefectivas de CPA en respuestas a estimulación mecánica nociva .....	113
IV.4.d Comparación del efecto antinociceptivo del fentanilo y del U-50,488H en ausencia y en presencia de dosis subefectivas de CPA en el <i>wind-up</i> .....	116
IV.5. Discusión .....	118
IV.6. Conclusiones .....	121
▪ <b>Conclusiones finales</b> .....	123
▪ <b>Bibliografía</b> .....	125

## **ARTÍCULOS EN REVISTAS**

- Guillermo Ramos-Zepeda, Wolfgang Schröder, Silke Rosenow, Juan F. Herrero. Spinal vs supraspinal antinociceptive activity of the adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist ciclopentil-adenosine in rats with inflammation. *European Journal of Pharmacology*. 499, 247-256. 2004.
- Guillermo Ramos-Zepeda and Juan F. Herrero. Interaction of the adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist CPA and opioid receptors in the modulation of spinal cord nociceptive reflexes and wind-up. *British Journal of Pharmacology* (en revisión).
- Guillermo Ramos-Zepeda and Juan F. Herrero. Enhancement of wind-up by the combined administration of adenosine A<sub>1</sub> receptor ligands on spinalized rats with carrageenan-induced inflammation. *Neuroscience Letters* (en revisión).

## **COMUNICACIONES A CONGRESOS**

- Guillermo Ramos-Zepeda y Juan F. Herrero. Estudio de las propiedades antinociceptivas de la N-ciclopentil adenosina en animales con inflamación de tejido blando. X Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia. *Revista de Neurología*, 37, (P-133) 1150. 2003. Lleida, 6 al 9-09-2003.
- Guillermo Ramos-Zepeda y Juan F. Herrero. Spinal vs. supraspinal antinociceptive activity of the A<sub>1</sub> adenosine receptor agonist CPA. *FENS Forum Abstracts*, vol. 2, 2004. Ref.: *FENS Abstr.*, vol.2, A051.18, 2004. Lisboa, Portugal. Julio del 2004.

- Guillermo Ramos-Zepeda y Juan F. Herrero. Supraspinal Antinociceptive Actions of the A1 Adenosine Receptor Agonist CPA in Rats with Inflammation Involves Opioid Receptor Activation. Society for Neuroscience, 34<sup>th</sup> Annual Meeting. Society for Neuroscience, Abstracts referencia 520.15. San Diego, California, Estados Unidos de América, 23 al 27-10-2004.

Guillermo Antonio Ramos Zepeda ha sido becado por el programa de Becas MUTIS de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI).

**ABREVIATURAS**

- AD: adenosina desaminasa.
- ADP: difosfato de adenosina.
- AK: adenosina cinasa.
- AMP: monofosfato de adenosina.
- AMPc: 3',5'-monofosfato cíclico.
- ATP: trifosfato de adenosina.
- CCPA: cloro ciclopentil adenosina.
- CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina.
- CHA: ciclohexil adenosina.
- CI<sub>50</sub>: concentración inhibitoria 50.
- CNTs: transportadores concentradores de nucleósidos.
- CPA: ciclopentil adenosina.
- CPCPX: 1,3-dipropil-8-ciclopentil xantina.
- CPT: 8-ciclopentil-1,3-dimetil xantina.
- DE<sub>50</sub>: dosis efectiva 50.
- DIPPA: 2-(3,4-Diclorofenil)-N-metil-N-[(1S)-1-(3-isotiocianatofenil)-2-(1-pirrolidinil)etil]acetamida).
- DME: dosis mínima eficaz.
- DMSO: dimetilsulfóxido.
- e.e.m: error estándar de la media.
- ENT1: transportador equilibrador sensitivo.
- ENT2: transportador equilibrador insensitivo.
- ENTs: transportadores equilibradores de nucleósidos.
- GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico.
- GPCRs: receptores acoplados a la proteína G.
- i.c.v: intracerebroventricular.
- IASP: asociación internacional para el estudio del dolor.
- LCR: líquido cefalorraquídeo.
- MSR: reflejo monosináptico.
- NK1: neurocinina 1.
- NMDA: N-metil-D-aspartato.
- Nor-BNI: nor-binaltorfimina.

- SNC: sistema nervioso central.
- SP: sustancia P.
- SVRP: potencial lento de la raíz ventral.
- U-62,066: espiradolina.
- UMA: unidad motora aislada.
- UPHIT: 1S, 2S-trans-2-isotiocianato-4,5-dicloro-N-metil-N-[2-(1-pirrolidinil) ciclohexil] benceno acetamida 3a).

**RESUMEN**

La N6-ciclopentil adenosina (CPA) es un análogo de la adenosina que ejerce su acción de forma selectiva sobre el receptor A1. Se ha demostrado en numerosos estudios que tiene una actividad antinociceptiva central, localizada esencialmente sobre la médula espinal, y una acción periférica, sobre las terminaciones nociceptoras. Sin embargo, aunque el receptor A1 se localiza en muchas zonas supraespinales, apenas se conoce la implicación de la adenosina supraespinal en el sistema nociceptivo. Asimismo, hay evidencias que sugieren una interacción con los sistemas opioides, preferentemente en situaciones de inflamación, pero se desconoce cómo se realiza esta interacción y dónde se localiza. Por ello hemos estudiado el efecto antinociceptivo de la CPA, y su interacción con sistemas opioides  $\mu$  y  $\kappa$ , utilizando la técnica de registro electrofisiológico de unidades motoras aisladas (UMAs) en ratas macho intactas, espinalizadas y *sham-espinalizadas*. Las UMAs se activaron mediante ciclos de estimulación nociva mecánica y eléctrica, a unos parámetros capaces de generar el fenómeno medular de *wind-up*. En una primera serie de experimentos observamos que la CPA produjo una reducción dosis dependiente de las respuestas a estimulación mecánica y eléctrica en animales intactos y *sham-espinalizados*, pero no en animales espinalizados, lo cual demuestra claramente un efecto preferentemente supraespinal, en las presentes condiciones experimentales. También observamos que la cirugía espinal potencia el efecto de la CPA, lo que indica la existencia de un sistema inhibitor descendente mediado por la adenosina que se potencia con la cirugía vertebral. Un sistema similar al descrito con opioides endógenos.

En una segunda serie de experimentos, observamos que la administración del antagonista específico de los receptores A1, ciclopentil dimetil xantina (CPT) apenas revirtió el efecto de la CPA en animales intactos y *sham-espinalizados*, pero fue capaz de prevenir el efecto de la CPA cuando se administró 30 minutos antes de la dosis máxima estudiada. Sin embargo, el antagonista no selectivo de los receptores opioides naloxona, fue capaz de revertir el efecto de la CPA tanto en animales intactos como en *sham-espinalizados*, pero cuando se administró antes de la

dosis máxima de la CPA no fue capaz de prevenir su efecto. Estos resultados demuestran que la actividad antinociceptiva de la CPA se debe a una interacción directa con el receptor A1 de la adenosina pero, además, está ligada a una actividad secundaria de los receptores opioides en animales adultos con inflamación. Por último, otra observación muy importante en este estudio fue el aumento significativo del fenómeno de *wind-up* en animales espinalizados tras la administración conjunta de CPA y CPT, alcanzando incluso un valor muy similar al observado en animales intactos. Estos resultados sugieren que la depresión del fenómeno de *wind-up*, característica de los animales espinalizados, es dependiente en gran medida del sistema A1 de la adenosina y puede ser revertida tras la administración conjunta del agonista y del antagonista de este sistema por un mecanismo de acción desconocido.

En una última serie de experimentos estudiamos la reversión del efecto de la CPA con dosis bajas de naloxona, selectivas para el receptor  $\mu$ , y con el antagonista selectivo de los receptores  $\kappa$ , nor-binaltorfimina (nor-BNI). Observamos que dosis bajas de naloxona no revierten el efecto antinociceptivo de la CPA mientras que sí se revierte con nor-BNI. Los resultados nos permiten concluir que la interacción entre la CPA y los receptores opioides se realiza preferentemente sobre los receptores  $\kappa$ .



**ABSTRACT**

The adenosine derivative N6-cyclopentyladenosine (CPA) is a selective agonist for the A1 receptor type. It is a very potent antinociceptive drug whose actions have been located within the spinal cord and at peripheral sites. However, although high concentrations of the adenosine A1 receptor are located at supraspinal areas of the central nervous system, little is known about the involvement of supraspinal adenosine in the nociceptive system. In addition, some studies suggest an interaction between adenosine and opioid systems but it is not known how and where this interaction occurs. We have, therefore, studied the antinociceptive effect of CPA and its interactions with  $\mu$  and  $\kappa$  opioid receptors using the technique of electrophysiological recording of single motor units (SMUs) in intact, spinalized and sham-spinalized male rats. SMUs were activated by noxious mechanical stimulation and by repetitive electrical stimulation that generates the wind-up phenomenon.

In a first series of experiments, we observed that CPA dose-dependently reduced the responses to noxious mechanical and electrical stimulation in intact and sham-spinalized animals, but not in spinalized rats. This clearly suggests that, in the present experimental conditions, CPA effect was mainly localized at supraspinal sites. We also observed that surgery of sham-spinalization induced an enhancement of CPA effect, indicating that spine-related surgery triggers an endogenous antinociceptive system that involves the adenosine systems, similar to that previously observed with endogenous opioids.

In a second series of experiments, we observed that CPA effect in intact and sham-spinalized animals was only partially reversed by the selective adenosine A1 receptor antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT). However, the pretreatment with CPT inhibited any effect of CPA. The non-selective opioid receptor antagonist naloxone induced full reversal of CPA activity but pretreatment with naloxone did not inhibit the effect. These results suggest that although the antinociceptive activity of CPA is initiated by its interaction with the adenosine A1 receptor, a secondary activation of opioid receptors is also present in the maintenance of the

analgesia, in adult rats with inflammation. Finally, we observed an important increase of wind-up when CPA and CPT were injected together in spinalized animals, in such a way that the level of wind-up was similar to that observed in animals with an intact spinal cord. These results suggest that the depression of wind-up in spinalized animals, observed in previous studies, is dependent on the activity of the adenosine A1 receptor and can be prevented by the combined administration of CPA and CPT. The mechanism involved in this effect is not known.

In a third series of experiments, we studied the reversal of CPA effect by low doses of naloxone (selective for the  $\mu$  opioid receptor) and by the  $\kappa$  opioid receptor antagonist nor-binaltorphimine (nor-BNI). We observed that low doses of naloxone did not induce any reversal of CPA effect. However, the administration of nor-BNI induced full reversal of CPA antinociception. This indicates that the interaction suggested by adenosine and opioid systems is mainly related to  $\kappa$  opioid receptors.

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. DOLOR**

El dolor es una experiencia individual compleja que incluye aspectos sensoriales, emocionales y sociales. Es importante comprender que un mismo dolor no será experimentado de igual forma por distintas personas. Esto es porque los mensajes que el dolor envía a nuestro cerebro son interpretados de forma diferente por cada persona, y porque nuestra experiencia individual en la vida diseña la forma en que experimentamos y expresamos nuestro dolor. El principal problema lo encontramos en los dolores que deberían desaparecer pero no lo hacen. No existe un tiempo específico tras el cual un dolor agudo se convierte en crónico; esto depende de la forma individual de cada dolor y persona. Por regla general, si el dolor ha durado mucho más de lo que se esperaba cuando comenzó, puede convertirse en un dolor crónico.

El dolor se produce como consecuencia de la exposición de la piel y otros órganos a un estímulo nocivo mecánico, térmico o químico. Según la asociación internacional para el estudio del dolor (IASP), se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial, o descrito en términos de tal daño (IASP 1979, 1986). La activación de nociceptores específicos tiene como consecuencia un dolor nociceptivo o fisiológico, que está presente en todos los individuos y es útil y necesario para la supervivencia. Sin embargo, el dolor también puede resultar por un daño en las fibras sensoriales, o por daño en el sistema nervioso central (SNC), el dolor neuropático o patológico, como por ejemplo aquel que caracteriza a síndromes tales como la neuralgia del trigémino, el dolor del miembro fantasma, etc (Millan, 1998). En este caso, el dolor pierde su carácter de elemento protector, para convertirse en una alteración patológica que puede marcar completamente la vida de una persona y las de su entorno. Durante la última década ha habido muchos avances en el campo de la medicina, pero desafortunadamente todavía no existe una terapia efectiva para muchos de estos tipos de dolor.

Entre la exposición inicial de los tejidos a estímulos nocivos y la percepción del dolor, existe un complejo número de circuitos y mecanismos

a través de los cuales los estímulos nocivos son codificados como un mensaje nociceptivo y son procesados progresivamente y transmitidos a los centros nerviosos superiores. Estos procesos de integración ocurren en el asta dorsal de la médula espinal, o su equivalente en la sensibilidad de la cara y del cuello, el núcleo del trigémino (procesamiento primario), centros de relevo supraespinales como los que se encuentran en el tronco del encéfalo o en el tálamo (procesamiento secundario), así como en estructuras corticolímbicas.

## **2. TIPOS DE DOLOR**

Existen distintas clasificaciones del dolor en función de su origen, localización, velocidad de aparición y otros parámetros. Sin embargo, la clasificación propuesta por Cerveró y Laird en 1991 es quizá una de las más aceptadas por su carácter funcional y por tener en cuenta la posible evolución del dolor desde una situación aguda, hasta la situación patológica o neuropática, con ligeras variaciones, esta clasificación básica del dolor se sigue utilizando en la actualidad:

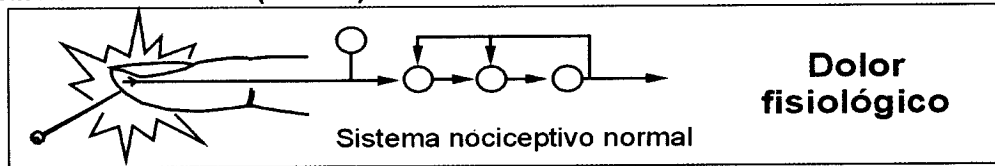
- **Dolor de fase 1:** es el dolor producido por el procesamiento de estímulos de corta duración o poco intensos. Es conocido también como dolor fisiológico o dolor protector, y es necesario para la supervivencia y el bienestar del individuo. En este tipo de dolor, debido a que es un proceso fisiológico, su intensidad y duración están directamente relacionados con la intensidad y la duración del estímulo que lo provoca (Figura I.1).
- **Dolor de fase 2:** es el dolor que se produce como consecuencia del daño a un tejido por estímulos mecánicos, térmicos o químicos, prolongados o intensos, que producen una reacción inflamatoria como parte del proceso de curación, por lo que es conocido también como dolor inflamatorio. La liberación de mediadores inflamatorios tiene dos consecuencias sobre los nociceptores periféricos en el área afectada. Primero, la sensibilización de los nociceptores, que da lugar a una disminución en el umbral de respuesta, hasta el punto que pueden ser activados con estímulos inocuos, fenómeno

conocido con el nombre de alodinia, y estímulos que antes provocaban un dolor moderado y que ahora provocan un dolor exagerado, fenómeno conocido como hiperalgesia. Segundo, la activación de los receptores silentes, que no muestran actividad bajo condiciones normales, pero que se vuelven activos cuando el tejido que inervan está inflamado (Figura I.1).

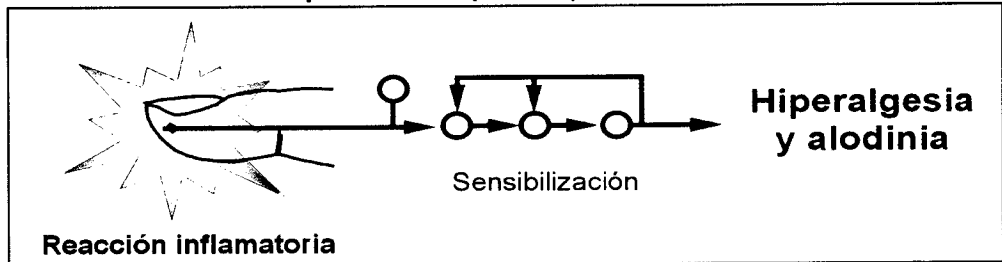
Básicamente se ha distinguido una hiperalgesia primaria y una secundaria. La hiperalgesia primaria se produce por la liberación de mediadores inflamatorios tales como la sustancia P, histamina, prostaglandinas, etc. y se debe a la sensibilización de los receptores periféricos en la zona lesionada. La hiperalgesia secundaria se produce por la sensibilización central, que se debe a un descenso del umbral, cambios en la excitabilidad y en la neuroquímica de las neuronas del asta dorsal, secundario al aumento de las aferencias periféricas (Cerveró y Laird, 1991; Schmidt et al., 2000; Treede, et al., 1992; Basbaum y Jessel, 2000; Schaible, et al., 2002).

- **Dolor de fase 3:** es un dolor anormal, generalmente producido por daño de los nervios periféricos o del propio sistema nervioso central. Es conocido también como dolor patológico o neuropático. Se caracteriza por aparecer dolor espontáneo, junto con una disminución del umbral de estimulación, alodinia e hiperalgesia. Se produce por la formación de circuitos que multiplican la información nociceptiva y por alteración de los mediadores químicos implicados en el procesamiento nociceptivo. En este tipo de dolor no existe una relación entre la estimulación nociva periférica y la del dolor, por lo que estímulos muy pequeños pueden desencadenar un dolor intenso y duradero, o inclusive se puede producir en ausencia de estímulos (como el dolor de miembro fantasma). Este dolor es de muy difícil tratamiento (Figura I.1).

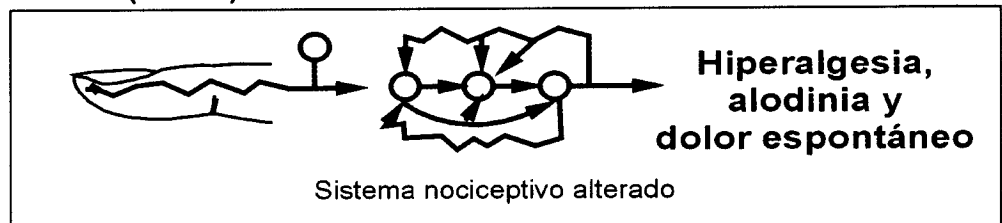
**Estimulo nocivo breve (Fase 1)**



**Estimulo nocivo intenso o persistente (Fase 2)**



**Cronificación (Fase 3)**



**Figura I.1.** Representación esquemática de los tres tipos de dolor y sus consecuencias, propuestos por Cerveró y Laird en 1991.

### 3. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN NOCICEPTIVA

El dolor es una sensación o percepción de sensaciones, en cambio la nocicepción se refiere al proceso sensorial que provee las señales que producen el dolor. El dolor suele ser una consecuencia directa de la activación de los nociceptores, pero en algunas ocasiones, la experiencia consciente del dolor y la nocicepción pueden ocurrir independientemente.

#### 3.1 Los nociceptores

Las vías nociceptivas empiezan en las neuronas bipolares somestésicas que tienen su cuerpo celular en el ganglio raquídeo. Estas neuronas poseen un axón que se bifurca y da lugar a una terminal periférica que es el verdadero nociceptor y a la aferente primaria o central (López-

García y Herrero, 1998) que efectúa la primera sinapsis en la vía nociceptiva.

Los nociceptores pueden ser clasificados de acuerdo con el tipo de estímulo al que responden, y estos pueden ser: mecanonociceptores, termonociceptores y nociceptores polimodales. Estos últimos responden a estímulos mecánicos, térmicos, así como también a estímulos químicos. Otro tipo son los nociceptores silentes, que en condiciones normales no se activan con estímulos nocivos y son activados en condiciones de inflamación o cuando sus umbrales de activación disminuyen profundamente (Dmitrieva y McMahon, 1996; Basbaum y Jessel, 2000).

Las fibras somestésicas se pueden clasificar básicamente en cuatro tipos de acuerdo a su diámetro y velocidad de conducción:  $A\alpha$  que son las fibras mielinizadas más gruesas (12-20 $\mu$ m), con una alta velocidad de conducción 70-120m/s.  $A\beta$  que son fibras delgadas (5-15 $\mu$ m) con una velocidad de conducción de 30-70m/s.  $A\delta$  que son las fibras más finas mielinizadas (3-8 $\mu$ m) y tienen una velocidad de conducción de 10-30m/s. Y por último las fibras no mielinizadas o fibras C que tienen un diámetro de 0.2 a 1.5 $\mu$ m y una velocidad de conducción muy lenta (0.5-2.5m/s) (Caterina y Julius, 1999; Millan, 1999).

Los nociceptores están formados por fibras  $A\delta$  y C, y bajo condiciones normales sólo estas fibras transmiten la información nociceptiva (Basbaum y Jessel, 2000; Millan, 1998).

### **3.2 Médula espinal**

Las fibras aferentes nociceptivas entran a la médula espinal a través de las raíces dorsales y hacen sinapsis directamente (monosinapsis) o indirectamente (polisinapsis), con tres tipos de neuronas básicamente: neuronas de tipo I (o de bajo umbral), que reciben información no nociceptiva en condiciones fisiológicas. Neuronas de tipo II, o de rango dinámico amplio o convergentes, reciben información tanto nociceptiva como de baja intensidad y, por último, neuronas de tipo III o nociespecíficas, que reciben exclusivamente información nociceptiva (Herrero y Headley, 1995; López-García y Herrero, 1998; Basbaum y Jessel, 2000).



### **3.3 Vías ascendentes nociceptivas**

Después de la integración de la información en la médula espinal, la información nociceptiva se transmite a centros superiores por varias vías:

- **Tracto Espinotalámico:** es la principal vía por la cual la información nociceptiva accede al cerebro. Sus axones se proyectan al lado contralateral de la médula espinal y ascienden por la sustancia blanca anterolateral, terminando en el tálamo. Esta vía contribuye a la discriminación sensorial y los componentes afectivo motivacionales del dolor, así como también a desencadenar la actividad en los sistemas de control descendente (Basbaum y Jessel, 2000).
- **Tracto Espinorreticular:** asciende por el cuadrante anterolateral de la médula espinal y termina en la formación reticular y el tálamo. Esta vía parece estar implicada directamente en la activación de sistemas de control descendente (Basbaum y Jessel, 2000).
- **Tracto Espinomesencefálico:** se proyecta del cuadrante anterolateral de la médula espinal a la formación reticular del mesencéfalo y a la sustancia gris periacueductal, y por la vía del tracto espinoparabraquial, se proyecta al núcleo parabraquial. Sucesivamente, las neuronas del núcleo parabraquial proyectan a la amígdala, uno de los componentes más importantes del sistema límbico. Se cree que contribuye al componente afectivo del dolor (Basbaum y Jessel, 2000).
- **Tracto Espinocervical:** surge de neuronas en el núcleo cervical lateral, localizado en la sustancia blanca lateral en la parte superior de los dos segmentos cervicales de la médula espinal. La mayoría de axones cruzan la línea media y ascienden al núcleo talámico y al cerebro medio. Este tracto participa en los componentes sensoriales y afectivos del dolor (Basbaum y Jessel, 2000).
- **Tracto Espinohipotálamico:** sus fibras se proyectan directamente a los centros supraespinales de control autonómico y participa en la activación de las respuestas neuroendocrinas y cardiovasculares (Basbaum y Jessel, 2000).

### **3.4 Tálamo y corteza cerebral**

El tálamo es el objetivo de muchos tractos nociceptivos ascendentes y es considerado como el relevo crucial para la recepción y el procesamiento de la información nociceptiva en su camino hacia la corteza. La información nociceptiva es procesada en los núcleos del tálamo, siendo de particular importancia el grupo de núcleos laterales y mediales. El grupo de núcleos laterales del tálamo comprende el núcleo medial ventroposterior, el núcleo lateral ventroposterior, y el núcleo posterior. Estos núcleos reciben información por la vía del tracto espinotalámico, principalmente de las neuronas nociespecíficas y de las de rango dinámico amplio en las láminas I y V de la médula espinal. Las neuronas de estos núcleos tienen pequeños campos receptores, igual que las neuronas espinales que se proyectan a ellos. El tálamo lateral puede por lo tanto estar relacionado con la localización del daño.

El grupo de núcleos mediales del tálamo, comprende el núcleo central lateral del tálamo y el complejo intralaminar. La mayor parte de la información la reciben de las láminas VII y VIII de la médula espinal. Muchas neuronas del tálamo medial responden óptimamente a estímulos nocivos pero también tiene extensas proyecciones al ganglio basal y diferentes áreas corticales. Se sabe que está relacionado con el procesamiento de la información nociceptiva (Basbaum y Jessel, 2000).

La evocación de la sensación dolorosa se efectúa en la corteza somestésica primaria, pero existen otras áreas involucradas como la corteza anterior del cíngulo y la corteza insular. Por medio de la tomografía por emisión de positrones se ha determinado que estas dos últimas también participan en el procesamiento nociceptivo, la circunvolución cíngulada, se cree que participa en el proceso del componente emocional del dolor, y la corteza insular, cuya función se asocia con la integración de los componentes sensitivos, afectivos y cognoscitivos del dolor (Kenshalo e Isensee, 1983; Basbaum y Jessel, 2000).

### **3.5 Mecanismos centrales de inhibición del dolor**

El sistema nervioso central posee circuitos moduladores que tienen como función regular la percepción del dolor. El primer sitio de modulación es la médula espinal o su equivalente en la sensibilidad de la cara, el núcleo del trigémino, en donde las interconexiones entre vías aferentes nociceptivas y no nociceptivas pueden controlar la transmisión de la información nociceptiva hacia el cerebro (Basbaum y Jessel, 2000). Sabemos que en la médula espinal existe un control local o medular de la transmisión de la información nociceptiva que dio lugar a "la teoría de la compuerta", formulada en 1965 por Melzack y Wall. Según la teoría, las neuronas de la lámina V y posiblemente lámina I del asta dorsal de la médula espinal, reciben información excitadora convergente de las fibras no nociceptivas A $\beta$  y de las nociceptivas, fibras A $\delta$  y C. Las fibras A $\beta$  inhiben el disparo de las neuronas en la lámina V por la activación de interneuronas inhibitoras en la lámina II. Las fibras A $\delta$  y C excitan las neuronas de la lámina V, pero también inhiben el disparo de las interneuronas inhibitoras de la lámina II, las cuales son activadas por las fibras A $\beta$ . En otras palabras, las fibras aferentes no nociceptivas "cierran" y las fibras aferentes nociceptivas "abren" una compuerta para la transmisión central de estímulos nociceptivos que entran (Basbaum y Jessel, 2000).

Además del control medular, existe un control supraespinal o superior de la transmisión de la información nociceptiva. De esta forma se ha observado que la estimulación eléctrica de la sustancia gris periacueductal, la sustancia gris que rodea el cuarto ventrículo y el acueducto cerebral, produce una profunda y selectiva analgesia. La estimulación de la sustancia gris periacueductal bloquea también el reflejo de retirada mediado por la médula espinal y producido por estimulación nociva. Este bloqueo ocurre gracias a la activación de vías descendentes que inhiben neuronas nociceptivas en la médula espinal. También posee conexiones excitadoras con neuronas del bulbo raquídeo rostroventral, en particular con neuronas serotoninérgicas en la línea media del núcleo magno del rafe. La estimulación del bulbo rostroventral produce inhibición de las neuronas

medulares del asta dorsal, incluyendo neuronas del tracto espinotalámico, que responde a estimulación nociva.

Otros sistemas inhibidores descendentes que suprimen la actividad nociceptiva de las neuronas del asta dorsal se originan en el locus ceruleus noradrenérgico y otros núcleos del tronco del encéfalo (Basbaum y Jessel, 2000).

Se ha demostrado que la analgesia inducida por opioides comparte las mismas vías de la analgesia producida por estimulación eléctrica supraespinal. Por medio de microinyección de morfina u otros opiáceos en regiones específicas del cerebro de ratas, se ha observado una inhibición de las respuestas de las neuronas nociceptivas en el asta dorsal. La sustancia gris periacueductal es el sitio más sensible para provocar éste efecto, lo que demuestra que la morfina induce analgesia por medio de la activación de vías inhibitoras descendentes (Basbaum y Jessel, 2000).

### **3.6 Sistemas inhibidores y facilitadores descendentes**

Las vías descendentes originadas en el tronco del encéfalo y otras estructuras, juegan un papel muy importante en la modulación e integración de los mensajes nociceptivos en el asta dorsal. Los sistemas involucrados en estos mecanismos inhibidores descendentes son opioides, serotoninérgicos, noradrenérgicos y en menor grado dopaminérgicos (Fields y Basbaum, 1994; Holstege et al., 1996; Millan, 1995).

Las vías descendentes modulan (generalmente reducen) la liberación de neurotransmisores de las terminales nociceptivas de las fibras aferentes periféricas (Fields y Basbaum, 1994; Travagli y Williams, 1996). Además, la activación de vías descendentes inhibe la respuesta nociceptiva de las neuronas de proyección, directa e indirectamente, por medio de la inhibición de neuronas excitadoras y la excitación de neuronas inhibitoras (Fields y Basbaum, 1994; Lin et al., 1994; López-García y King, 1996). Ciertos estudios han demostrado que las vías descendentes inhiben preferentemente la excitabilidad generada por estímulos nocivos, más que la producida por estímulos inocuos, en las neuronas convergentes o de clase 2 de la médula espinal (Fields y Basbaum, 1994).

Sin embargo, las vías descendentes no ejercen exclusivamente acciones inhibitoras sobre las neuronas del asta dorsal. Es más, distintas sustancias pueden ejercer múltiples acciones en el asta dorsal, dependiendo del tipo de neurona que sea su diana (por ejemplo una interneurona inhibitora o una neurona de proyección) y del receptor activado (por ejemplo receptores serotoninérgicos inhibitoros o excitadores). Además, las vías descendentes inhibitoras y facilitadoras hacia el asta dorsal pueden derivarse incluso de una misma estructura (Monhemius et al., 1997). Hay evidencia de que los mecanismos facilitadores descendentes ejercen acciones excitadoras sobre las terminales nociceptivas de fibras aferentes periféricas, así como también, en neuronas intrínsecas del asta dorsal (Almeida et al., 1996; Bardin et al., 1997; Millan, 1995). Algunas de estas neuronas intrínsecas pueden ser interneuronas inhibitoras, pero otras son probablemente interneuronas excitadoras y neuronas de proyección. En este último caso, su activación tendría como resultado un incremento de la transmisión nociceptiva.

El papel de muchos de los neurotransmisores localizados en el asta dorsal y que intervienen en la facilitación descendente no se conoce aún y podrían ofrecernos una estrategia para lograr una analgesia complementaria.

### **3.7 Neurotransmisores y neuromoduladores implicados en el procesamiento de la información nociceptiva**

Hay numerosos neuromoduladores que actúan en el procesamiento de la información nociceptiva: opioides, glutamato, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), neuropéptidos como la sustancia P (SP), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), trifosfato de adenosina (ATP), óxido nítrico, prostaglandinas, etc. (He et al., 1990; Schaible y Grubb, 1993; Todd y Spike, 1993). Todos estos numerosos sistemas se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellos mediadores químicos cuya liberación facilita la transmisión del mensaje nociceptivo (sistemas pronociceptivos o proalgésicos) y sistemas inhibitorios de esta transmisión (sistemas antinociceptivos o analgésicos). El equilibrio o desequilibrio entre ambos tipos de sistemas da

lugar a la evocación más o menos intensa de la sensación de dolor o bien a la aparición de analgesia. Es imposible comentar todos ellos en esta introducción, y tampoco es el objetivo de este trabajo reunir toda la información disponible sobre este tema. Por ello nos vamos a referir únicamente a aquellos sistemas relevantes para el presente estudio.

### **3.8 Péptidos opioides**

Se sabe que los opiáceos como la morfina y el fentanilo son fármacos analgésicos efectivos. Sus acciones son similares a las que realizan de forma natural los sistemas opioides endógenos. Entre estos se conocen cuatro familias de péptidos opioides: encefalinas, endorfinas, endomorfina y dinorfinas, que activan tres tipos de receptores opioides específicos:  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  (Pasternak, 1993; Reisine, 1995). Estas cuatro familias de péptidos son capaces, como consecuencia de la activación de los receptores opioides, de inducir acciones farmacológicas similares a la morfina y ser antagonizados por el antagonista opioide no selectivo naloxona a distintas concentraciones.

Entre las acciones de los opioides destaca por su interés clínico la analgesia. Los opioides producen básicamente una inhibición de la liberación de neurotransmisores desde terminales de neuronas sensoriales primarias aferentes, bloqueando de esta forma la transmisión de la información nociceptiva que entra en el SNC. Este bloqueo puede suceder en distintos niveles: periférico, espinal y supraespinal, y está relacionado con la distribución anatómica de los receptores opioides (Kanjhan, 1995).

Los receptores opioides se encuentran en diversas áreas del cerebro, particularmente en la sustancia gris periacueductal y en la médula espinal (Pasternak, 1993), así como en el sistema nervioso periférico (Stein, 1995) concretamente en neuronas mientéricas intestinales (Hutchinson et al., 1975). Los receptores opioides pertenecen al grupo de receptores celulares de membrana, asociados a proteínas G, que son receptores formados por siete dominios transmembrana, siendo los extremos amino y carboxilo terminal las regiones que más divergen entre los distintos subtipos de receptores opioides.

Los receptores opioides actúan acoplados a proteínas G inhibitoras de la adenilato ciclasa, su activación produce una disminución de los niveles de AMPc, lo cual produce una alteración de la fosforilación de proteínas intracelulares, cierre de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes e incremento de la conductancia al  $\text{K}^+$ . Estas alteraciones producen finalmente disminución de la excitabilidad de la membrana neuronal, inhibición de la transmisión sináptica y cambios en la expresión génica (Childers, 1991).

Los receptores  $\mu$  están distribuidos ampliamente en el SNC y en la periferia. Los agonistas selectivos del receptor  $\mu$  son potentes analgésicos, lo cual nos indica que estos receptores ubicados en estructuras espinales, supraespinales y periféricas, juegan un importante papel en la nocicepción (Hansen y Morgan, 1984; Stein, 1993). También están implicados en el control de numerosas funciones fisiológicas como la respiración, funciones cardiovasculares, tránsito intestinal, aprendizaje y memoria, secreción hormonal y respuestas inmunes. Sus agonistas exógenos más utilizados en la clínica son la morfina y el fentanilo. El etonitazeno con estructura derivada o similar al fentanilo parece ser el agonista más potente y selectivo de este receptor (Emmerson et al., 1994). El antagonista naloxona tiene una afinidad más alta por el receptor  $\mu$  que por el resto de receptores (Magnan et al., 1982; Emmerson et al., 1994).

El receptor  $\delta$  tiene una distribución más restringida que el receptor  $\mu$ . Está implicado en varios procesos fisiológicos como la analgesia, la integración motora, la motilidad gastrointestinal, el olfato, la respiración, la función cognitiva, las alteraciones emocionales, etc. (Dhawan et al., 1996; Paeile, 1999). Sus principales agonistas son las encefalinas y péptidos derivados de estas (Lord et al., 1977). El primer antagonista sintetizado para estos receptores fue el naltrindol, un derivado de la naltrexona (Portoghese et al., 1988).

El principal y más relevante sitio de distribución de los receptores  $\kappa$  es el asta posterior de la médula espinal, especialmente en láminas superficiales. Su distribución en el resto del SNC es compleja ya que existen diferencias importantes según la especie animal (Paeile, 1999). Están implicados en la nocicepción, la diuresis, la alimentación y el sistema

endocrino (Hansen y Morgan, 1984). Algunos de los agonistas exógenos más selectivos son el U-50,488H (Lahti et al., 1982; Von Voigtlander et al., 1983), el U-69,593 (Lahti et al., 1985) y el U-62,066 (espiradolina; Von Voigtlander y Lewis, 1988). El más importante antagonista del receptor  $\kappa$  es la nor-binaltorfimina (nor-BNI), un derivado de la morfina (Portoghese et al., 1987), el 1S, 2S-trans-2-isotiocianato-4,5-dicloro-N-metil-N-[2-(1-pirrolidinil) ciclohexil] benceno acetamida 3a (UPHIT) y el 2-(3,4-Diclorofenil)-N-metil-N-[(1S)-1-(3-isotiocianatofenil)-2-(1-pirrolidinil)etil]acetamida (DIPPA) (De Costa et al., 1989; Chang et al., 1994).

## 4. ADENOSINA

### 4.1 Estructura y origen

La adenosina es un nucleósido de la adenina presente en todas las células del organismo e implicada en la regulación de muchos procesos fisiológicos. La figura 1.2 representa la estructura de la adenosina formada por una base de purina (adenina) y una pentosa.

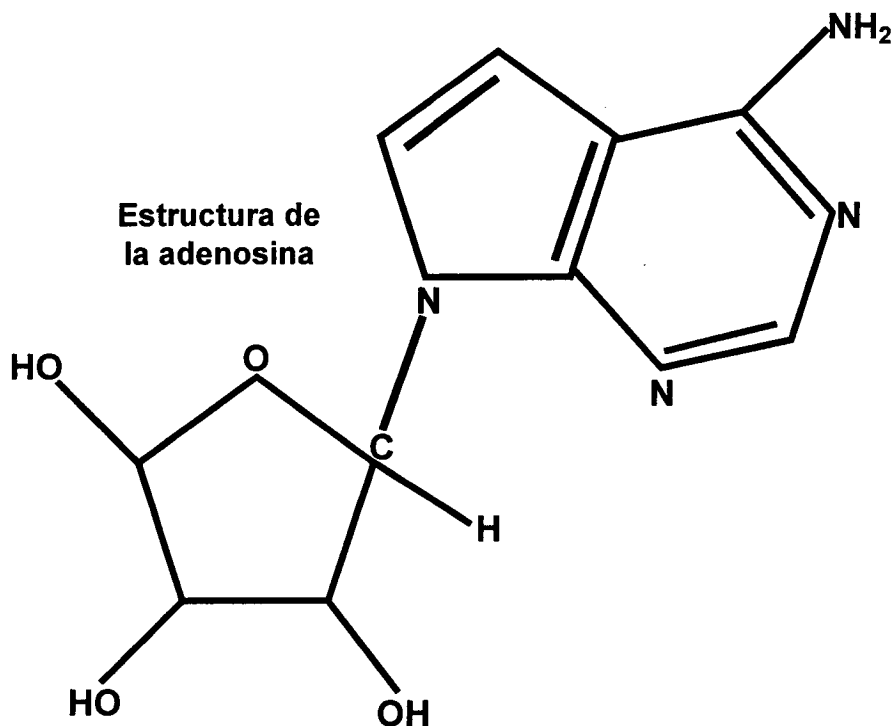
La adenosina puede ser liberada desde las células metabólicamente activas por difusión facilitada o generada extracelularmente por vía de degradación del ATP. Dentro de la célula, la adenosina se puede formar a partir del ATP por la acción de la 5'-nucleotidasa intracelular (Figura 1.3). Fuera de la célula se forma por el metabolismo o liberación de las ecto-nucleotidasas, la principal es la ecto-5'-nucleotidasa. La adenosina puede también originarse dentro de la célula a partir del 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) o de los receptores acoplados a la proteína G (GPCRs) con subsecuente conversión a AMP por la fosfodiesterasa (Figura 1.3; Rosenberg y Li, 1995; Brundage et al., 1997). Otra fuente de formación de la adenosina dentro de la célula es a partir de la S-adenosil-homocisteína (Figura 1.3; Latini y Pedata, 2001).

### 4.2 Transporte y metabolismo de la adenosina

La adenosina es liberada al espacio extracelular a través de los canales de la membrana celular, por moléculas transportadoras de



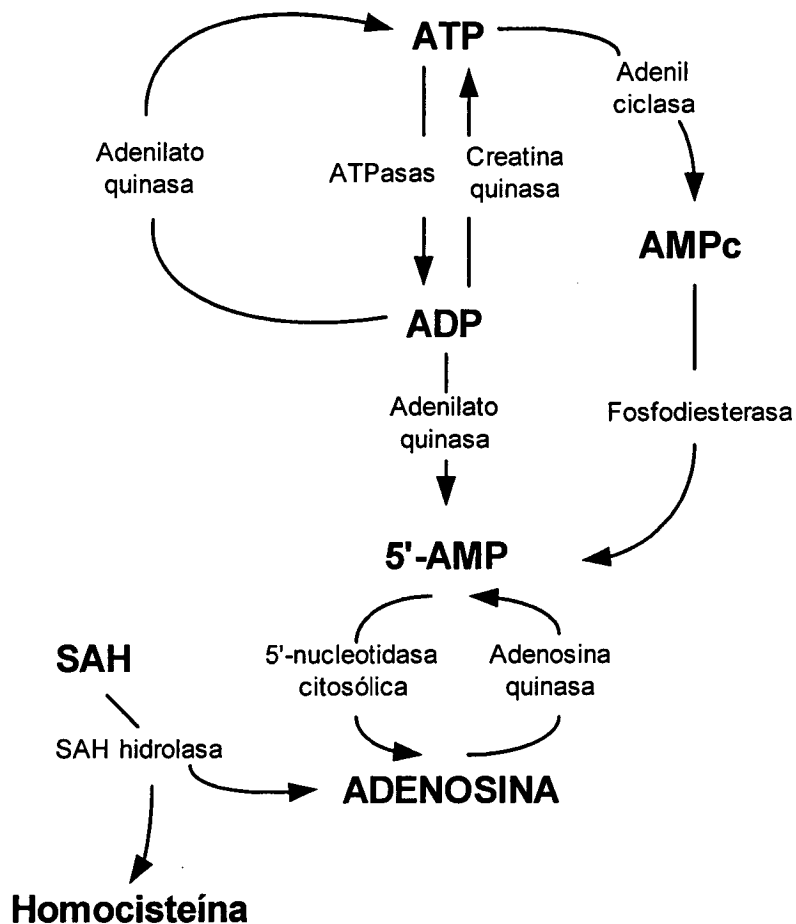
nucleósidos específicas. Hay dos tipos de transportadores de nucleósidos, los transportadores equilibradores de nucleósidos (ENTs), los cuales transportan nucleósidos a través de la membrana en cualquier dirección siguiendo el gradiente de concentración, y los transportadores concentradores de nucleósidos (CNTs), que intervienen en el flujo de nucleósidos a través de un gradiente de concentración y están acoplados al gradiente de  $\text{Na}^+$  transmembrana (Thorn y Jarvis, 1996).



**Figura 1.2.** Estructura molecular de la adenosina compuesta por la pentosa y adenina.

Hay dos formas de ENT, un transportador equilibrador sensible (ENT1), que es sensible a bajas concentraciones de nitrobeniltioinosina, y un equilibrador insensible (ENT2) que es mucho menos sensible de inhibición por nitrobeniltioinosina. Ambos transportadores son inhibidos por dipiridamol. Estudios recientes demuestran que aunque los dos tipos de ENT se encuentran presentes en el SNC, el ENT2 es el transportador predominante en el cerebro de ratas (Anderson et al., 1999a y b).

En su metabolismo la adenosina intracelular es fosforilada a AMP por la adenosina cinasa (AK), o desaminada a inosina por la adenosina deaminasa (AD; Geiger et al., 1997). La AK es una enzima citosólica que está distribuida ampliamente en el cerebro, mientras que la AD es una enzima citosólica y extracelular que esta concentrada en ciertas regiones del cerebro y la médula espinal, como en los cuerpos y vesículas sinápticas, células gliales y el cerebelo (Franco et al., 1997; Geiger et al., 1997).



**Figura 1.3.** Principales vías para la formación intracelular de adenosina. La adenosina es formada a partir de la 5'-AMP por la 5'-nucleotidasa citosólica y es convertida de nuevo a 5'-AMP por la adenosina cinasa (lo que requiere ATP como donador de fosfato). La adenosina puede ser también formada por la acción de la S-adenosil homocisteína hidrolasa (SAH).

### **4.3 Receptores de adenosina**

Las purinas (adenosina, AMP, ADP, ATP) realizan muchos de sus efectos actuando sobre receptores específicos clasificados en dos subgrupos principales: receptores P1 y P2. La adenosina es farmacológicamente activa sobre los receptores de membrana P1 (Burnstock, 1972). Pertenecen a la familia de receptores acoplados a la proteína G (GPCR) o grupo de receptores de siete dominios transmembrana, estos receptores han sido clonados y caracterizados en varias especies de mamíferos incluyendo humanos (Fredholm y Linden, 2001).

Los receptores P1 se subdividen en A1, A2<sub>A</sub>, A2<sub>B</sub> y A3 (Fredholm et al., 1994). Los receptores A1 y A2 han sido localizados en el cerebro (Goodman y Snyder, 1982) y en la médula espinal y los receptores A1 y A2<sub>A</sub> se han implicado en las funciones de neuromodulación. Los receptores A1 tienen una expresión muy alta principalmente en la sustancia gelatinosa, corteza cerebral, cerebelo, hipocampo y asta dorsal de la médula espinal (Choca et al., 1988; Fredholm y Linden, 2001). Los receptores A2<sub>A</sub> poseen altos niveles de expresión en neuronas gabaérgicas situadas en el núcleo caudado, putamen, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio y bulbo olfatorio (Tabla I.1; Fredholm y Linden, 2001). Los receptores A2<sub>B</sub> poseen bajos niveles de expresión en el cerebro (Tabla I.1; Dixon et al., 1996) y los receptores A3 tienen aparentemente niveles intermedios de expresión en el cerebelo e hipocampo humano y bajos niveles en el resto del cerebro (Tabla I.1; Fredholm y Linden, 2001).

Los receptores A1 en la médula espinal se han asociado con efectos antinociceptivos, dando lugar su activación a una disminución del AMPc. (Karlsten et al., 1990; Sawynok, 1991; Lee y Yaksh, 1996). Los agonistas selectivos del receptor A1 son la ciclopentil adenosina (CPA) que es el agonista más específico; la cloro ciclopentil adenosina (CCPA) y la ciclohexil adenosina (CHA). Entre los antagonistas del receptor A1 se encuentra el 1,3-dipropil-8-ciclopentil xantina (CPCPX) y el 8-ciclopentil-1,3-dimetil xantina (CPT) un antagonista más selectivo que el anterior (Tabla I.1; Fredholm y Linden, 2001).

Receptor	A1	A2 <sub>A</sub>	A2 <sub>B</sub>	A3
<b>Agonistas selectivos</b>	CPA, CCPA, CHA.	CGS21680, HENECA, CV-1808, CV-1674, ATL146e	Ninguno.	CI-IB-MECA.
<b>Antagonistas selectivos</b>	8-Ciclopentil-1,3-dimetil xantina, DPCPX.	Moderadamente selectivos: ZM241385, KF 17387, CSC.	MRS1754, enprofilina.	MRS 1220, MRE 3008-F20, MRS 1191, MRS 1523.
<b>Funciones en los tejidos</b>	Nocicepción, bradicardia, inhibición de la lipólisis, reducción del filtrado glomerular, reducción de la actividad simpática y parasimpática, inhibición presináptica, hiperpolarización neuronal.	Regulación de la integración sensorial-motora en ganglios basales, inhibición de la agregación plaquetaria y de leucocitos polimorfonucleares, vasodilatación, protección contra el daño isquémico, estimulación de la actividad sensitiva nerviosa.	Relajación de la musculatura lisa vascular y de intestino, inhibición de la función de monocitos y macrófagos, aumento de la liberación de mediadores en mastocitos (algunas especies).	Aumento de la liberación de mediadores en mastocitos (algunas especies).
<b>Distribución</b>	Cerebro (corteza, cerebelo, hipocampo), asta dorsal de médula espinal. En menor cantidad en otras regiones cerebrales, músculo esquelético, hígado, riñón, esófago, colón y pulmón (posiblemente en bronquio)	Bazo, timo, leucocitos (linfocitos y granulocitos), plaquetas, neuronas gabaérgicas (núcleo caudado, putamen, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio) y bulbo olfatorio. En menor cantidad en corazón, pulmón y vasos sanguíneos.	Colón, intestino delgado y vejiga. En menor cantidad en pulmón, vasos sanguíneos, mastocitos, ojo, cerebro, hígado, ovario.	Mastocitos (ratas) y en menor cantidad en cerebelo, hipocampo, pulmón, bazo, tiroides, corazón e intestino.

**Tabla I.1.** Resumen de los principales agonistas, antagonistas, funciones sobre tejidos y distribución de los receptores de la adenosina (sacado de Fredholm et al. 2001).

La activación del receptor A2 posee un efecto contrario al receptor A1, produce pronocicepción por medio del incremento de los niveles de AMPc en la terminación nerviosa sensorial (Sawynok, 1998).

La activación del receptor A3 de adenosina produce también un comportamiento nociceptivo a través de la liberación de histamina y serotonina de los mastocitos y la acción de estos mediadores químicos en las terminaciones nerviosas (Sawynok, 1998).

En la tabla I.1, resumimos las principales características de estos receptores, así como su distribución.

### **4.4 Funciones de la adenosina**

En la actualidad es motivo de discusión intensa la razón por la cual el principal combustible celular, el ATP, constituyente esencial de todas las células y su metabolito la adenosina, están directamente implicados en la comunicación neuronal. La adenosina es una sustancia que está presente en todas las células, incluyendo las neuronas y la glia, y es liberada aparentemente de todas ellas al espacio extracelular (Ribeiro et al., 2002). Está involucrada en muchos mecanismos reguladores, tanto en condiciones fisiológicas, como fisiopatológicas (Pelleg y Porter, 1990; Abracchio y Burnstock, 1998). Se ha reconocido que es un importante modulador de la neurotransmisión y ha sido implicado en muchas funciones como la regulación de la vigilia y el sueño, la ansiedad, la neuroprotección, el aprendizaje y la memoria (Ribeiro et al., 2003). En ciertas condiciones patológicas, la adenosina se comporta como un neuroprotector, actuando en las neuronas, regulando el flujo cerebral y limitando la activación de células inflamatorias a nivel central. Esta actividad puede ser de especial relevancia en situaciones como accidentes cerebrovasculares y epilepsia (Fredholm, 1997; Dunwiddie y Fredholm, 1997; Mayne et al., 2001).

El principal aspecto de interés en nuestro estudio se centra en la actividad antinociceptiva de la adenosina. Una actividad que deriva preferentemente de la activación del receptor A1 (Lee y Yaksh, 1996; Nakamura et al., 1997; Poon y Sawynok, 1998; Khandwala et al., 1998). La administración de agonistas del receptor A1 en la pata inflamada de ratas produce antinocicepción en un modelo de hiperalgesia por presión (Taiwo y Levine, 1990) y en el modelo de concentración baja de formalina (Karlsten et al., 1992). La acción del agonista del receptor A1 parece que se ejerce

directamente sobre la terminación nerviosa sensorial y es el resultado de la inhibición de la adelinato ciclasa y la disminución en la producción de AMPc (Taiwo y Levine, 1991; Khasar et al., 1995). Sin embargo, existen evidencias de que la actividad periférica del receptor A1 es más compleja, se ha propuesto que el receptor A1 de la adenosina forma parte de un complejo multirreceptor periférico junto con el receptor  $\mu$ -opioide y el  $\alpha$ -adrenérgico y que actúan en las áreas periféricas como un grupo de receptores que comparte mecanismos de acción comunes (Aley y Levine, 1997).

El interés sobre los análogos de la adenosina, fue más prominente cuando la acción antinociceptiva de éstos, administrados por vía sistémica, se atribuyó a una función sobre la médula espinal (Post, 1984; Holmgren et al., 1986). Desde entonces la mayor parte de estudios han utilizado como ruta la administración directa de adenosina o sus análogos en la médula espinal, para evaluar sus propiedades antinociceptivas. Estos estudios han demostrado que la adenosina administrada directamente sobre la médula espinal o en forma sistémica produce antinocicepción utilizando varios modelos de experimentación, incluyendo la prueba de dolor nociceptivo agudo, pruebas de dolor inflamatorio y pruebas de dolor neuropático. En humanos la administración espinal de adenosina también produce analgesia, especialmente en estados de sensibilización (Belfrage et al., 1999; Eisenach et al., 2002). También se observa una potente analgesia cuando se administra la adenosina como adyuvante de la anestesia por vía intracerebroventricular (i.c.v; Zarate et al., 1999).

Los receptores A1 de adenosina esta localizados principalmente en la sustancia gelatinosa (Goodman y Snyder, 1982; Geiger et al., 1984; Choca et al., 1988), en las neuronas postsinápticas a las aferentes primarias y en las proyecciones descendentes dentro del asta dorsal (Geiger et al., 1984; Choca et al., 1988). Un gran número de mecanismos celulares han sido implicados con la antinocicepción espinal producida por la adenosina. Estos incluyen la hiperpolarización de las neuronas nociceptivas, por interacción con los canales de  $K^+$  sensibles al ATP (Salter et al., 1993; Li y Perl, 1994). Esta acción probablemente participa en la acción de inhibición postsináptica de la sustancia P y los aminoácidos excitadores (Doi et al., 1987; DeLander y Wahl, 1991). La última acción puede ser de particular importancia para la

inhibición del fenómeno de *wind-up* que ha sido observada después de la administración en la médula espinal de un análogo de la adenosina (Reeve y Dickenson, 1995). También hay evidencia de una acción presináptica de la adenosina sobre las terminaciones aferentes, ya que los análogos de adenosina inhiben la liberación de sustancia P y del péptido relacionado con el gen de la calcitonina, cuando se aplica sobre rodajas de médula espinal que son estimuladas eléctricamente (Santicioli et al., 1993). Se ha demostrado también que puede inhibir la liberación de aminoácidos excitadores de forma presináptica. Una acción que resulta de la inhibición de la entrada de calcio dentro de las terminaciones nerviosas (Burke y Nadler, 1988).

### 4.5 Adenosina y opioides

Un vínculo entre los sistemas de adenosina y opioide fue encontrado inicialmente cuando se investigaba el papel del AMPc en la acción de la morfina. Un gran número de estudios ha demostrado que la administración sistémica de adenosina y sus análogos potencian la antinocicepción inducida por la morfina (Ahlijanian y Takemori, 1985; Contreras et al., 1990; Malec y Michalska, 1990). Se ha demostrado también que la administración de morfina produce la liberación de adenosina en preparaciones de médula espinal *in vivo* e *in Vitro* (Sweeney et al., 1987 y Sweeney et al., 1989). En esta liberación se cree que está implicado el receptor  $\mu$ , y no los receptores opioides  $\delta$  o  $\kappa$ , aunque también se ha observado una sinergia entre los agonistas de los receptores  $\mu$  y  $\delta$  (Cahill et al., 1996). La liberación de adenosina por morfina es calcio dependiente, e implica a los canales tipo N de  $\text{Ca}^{2+}$ ; ocurre de forma bidireccional y se origina de las neuronas sensibles a la capsaicina (Sweeney et al., 1989).

Asimismo, algunos estudios de comportamiento han evidenciado la liberación espinal de adenosina por opioides. De esta manera, la administración espinal de metilxantinas inhibe la analgesia espinal producida por morfina (DeLander y Hopkins, 1986; Sweeney et al., 1987) y los opioides  $\mu$ , pero en menor grado o ninguno la analgesia mediada por los receptores opioides  $\delta$  y  $\kappa$  (DeLander et al., 1992; Cahill et al., 1995).

La habilidad de la morfina para estimular la liberación de un gran número de neurotransmisores clásicos, puede ser resultado de la activación de la proteína cinasa C. De esta manera, la morfina aumenta la formación de inositol 1,4,5-trifosfato por vía de la proteína G sensible a la toxina pertúsica, aumenta la disponibilidad intracelular de  $Ca^{2+}$  y activa la proteína cinasa C, la cual puede fosforilar las proteínas sinápticas implicadas en la liberación de neurotransmisores (Sarne et al., 1996; Smart y Lambert, 1996). Dentro de las neuronas sensoriales, la activación de la proteína cinasa C aumenta la liberación de neuropéptidos (Barber y Vasko, 1996), y hay evidencias de que la morfina puede activar la proteína cinasa C en dichas neuronas (Inoue y Ueda, 2000).

Además es importante recalcar que la administración de morfina produce una liberación de adenosina no sólo en la médula espinal sino también en algunas partes del SNC y el sistema nervioso periférico (Fredholm y Vernet, 1978; Stone, 1981; Wu et al., 1982; Sweeney et al., 1993).

### **4.6 ¿Están implicados los receptores A1 de adenosina supraespinales en el procesamiento de la información nociceptiva?**

Como hemos visto anteriormente la mayor parte de estudios sobre el efecto antinociceptivo mediado por la adenosina y sus análogos que se han realizado, se han centrado en el papel que tienen estos en la médula espinal y en los tejidos periféricos. Pero sabemos además que existen receptores A1 de adenosina distribuidos ampliamente en el cerebro, incluyendo la corteza cerebral, el cerebelo y el hipocampo (Fredholm et al., 2001) de los cuales no se ha descrito si tienen alguna función en el desarrollo de la antinocicepción.

Es por eso por lo que nos interesamos en estudiar el papel que tienen los receptores A1 de adenosina localizados en zonas supraespinales, en el procesamiento medular de la información nociceptiva, analizando las acciones antinociceptivas del análogo de la adenosina N<sup>6</sup>-ciclopentil adenosina (CPA).

También como se comentó antes, se ha sugerido que a nivel periférico puede existir una cooperación entre los sistemas de receptores



opioides,  $\alpha$ -adrenérgicos y A1 de adenosina, funcionando como un complejo receptorial con mecanismos intracelulares comunes (Aley y Levine, 1997). Y hemos visto cómo existe un alto grado de interacción entre los sistemas opioides y de la adenosina. Por ello también nos hemos preguntado si existe alguna relación entre los sistemas de receptores opioides y A1 de adenosina a nivel central en el procesamiento de la información nociceptiva.

## **OBJETIVOS GENERALES**

**OBJETIVOS GENERALES**

1. Determinar si el efecto antinociceptivo de la adenosina se localiza a nivel supraespinal o exclusivamente espinal.
2. Si el efecto se ejerce también a nivel supraespinal, determinar si está mediado por los receptores A1.
3. Estudiar si en el efecto antinociceptivo de la adenosina existe una implicación de los receptores opioides.
4. Si existe una interacción entre estos dos sistemas, determinar si está mediada por los receptores opioides  $\mu$  o  $\kappa$ .
5. Si dicha interacción ocurre, estudiar si existe una potenciación o sinergismo del efecto antinociceptivo de los opiáceos  $\mu$  o  $\kappa$  por la activación de los receptores A1 de adenosina.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **1. Técnica de unidades motoras aisladas (UMAs)**

La técnica de UMAs se basa en el estudio del “reflejo de retirada” el cual es un reflejo puramente espinal y nociceptivo. Mediante esta técnica medimos las respuestas nociceptivas directas de la médula espinal sin necesidad de realizar una gran cirugía, y por tanto, utilizando un sistema más fisiológico y menos traumático. Esta técnica además nos permite registrar el conocido “código de frecuencia” que permite determinar la intensidad de la respuesta nociceptiva en función de la intensidad del estímulo y del grado de sensibilización de la médula espinal. Asimismo, al registrar la actividad de una única unidad motora, en músculos implicados en este reflejo, y cuantificar potenciales de acción al ser activada con estímulos nocivos, la técnica nos permite estudiar el efecto antinociceptivo (o analgésico) de algún fármaco si éste reduce su número de respuestas al administrarlo (Herrero y Headley, 1991; Herrero et al., 1997; De Felipe et al., 1998; Romero-Sandoval et al., 2003; Gaitán et al., 2003).

La técnica permite además combinar distintos tipos de estimulación, tanto natural (mecánica o térmica) como artificial (eléctrica). Esta última provoca la activación de fibras A $\beta$ , A $\delta$  y C y por tanto, permite discriminar respuestas de baja y alta intensidad, así como estudiar el fenómeno de *wind-up* (ver más adelante). Por último, la técnica permite estudiar animales normales, o distintos tipos de sensibilización medular y estudiar la implicación directa de la médula espinal en respuestas nociceptivas o la influencia de sistemas supraespinales moduladores en estas respuestas. Para ello se utilizan animales con inflamación de tejido blando, artritis, neuropatía, animales espinalizados o intactos.

### **1.1. Animales y Cirugía**

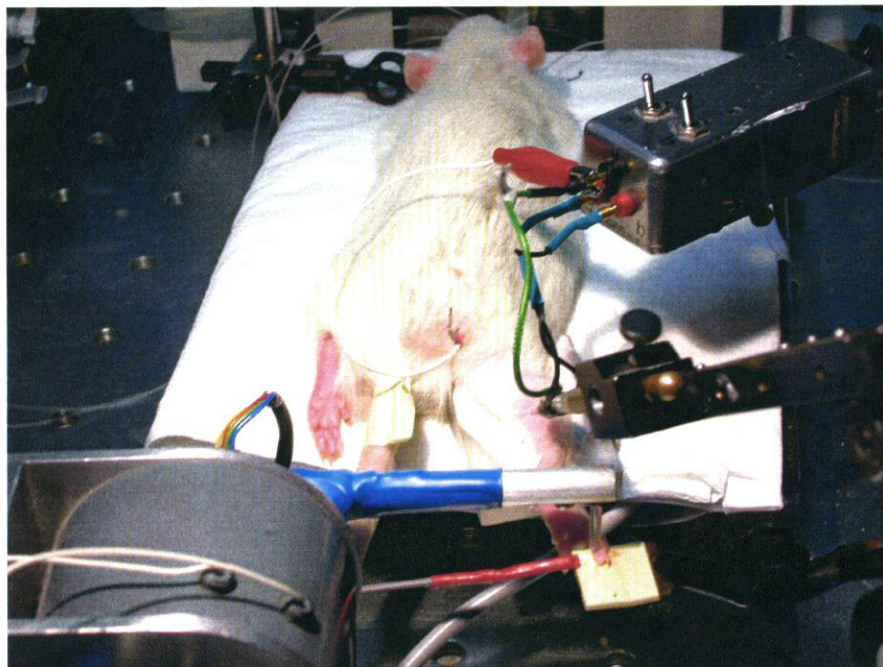
En el presente trabajo se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con peso comprendido entre 225-330g que fueron criadas en el animalario de la Universidad de Alcalá bajo condiciones estándar de temperatura, ciclos de luz/oscuridad, comida y agua *ad libitum* de acuerdo con el reglamento de este centro.

### **1.2. Cirugía preparatoria**

Para el registro de las UMAs realizamos una cirugía preparatoria bajo anestesia con halotano en oxígeno al 5 % para inducción y 2-3 % para mantenimiento. La cirugía consistió, primero, en la canulación de la tráquea (para mantener las vías aéreas permeables) con un catéter de polietileno de 2 mm de diámetro, 2 ó 3 anillos por debajo de la glándula tiroides. Después se canuló una arteria carótida (para monitorizar la presión arterial), y dos ramas superficiales de las venas yugulares (una para la administración de los fármacos en estudio y otra para fluidoterapia y administración del anestésico que sustituye al halotano al finalizar la cirugía). Para la canulación de los vasos sanguíneos se utilizaron catéteres de polietileno de 0.96 mm de diámetro externo y 0.58 mm de diámetro interno (PORTEX) los cuales son fijados con hilos de sutura de seda trenzada 3/0.

Al finalizar la cirugía se sustituyó el halotano por  $\alpha$ -cloralosa administrada por vía intravenosa con una dosis de inducción de 50 mg/kg y mantenimiento de 20 mg/kg/hora por medio de una bomba de infusión, diluida en solución salina y administrada a razón de 1 ml/h. Este protocolo de infusión permite mantener un nivel de anestesia estable, y que por tanto las respuestas nociceptivas también lo sean y, además, un nivel de fluidoterapia e hidratación adecuados. Por último, se introdujo subcutáneamente un electrodo de bola de plata clorurada en la pata trasera derecha del animal, cerca del lugar de registro, para derivación a tierra. La pata trasera derecha del animal fue fijada en semiextensión con escayola a una base de acrílico, diseñada especialmente para tal efecto (55 mm de largo y 40 mm de ancho; Figura M.1).

Después de la cirugía de preparación del animal, se dejó reposar por lo menos una hora antes de iniciar el registro electrofisiológico (Figura M.1).



**Figura M.1.** Preparación del animal para el registro de UMAs. La pata trasera está fijada a una base de metacrilato con escayola y se puede observar el “pincher” para la estimulación mecánica y las agujas para estimulación eléctrica sobre el dedo de la pata trasera derecha, así como el electrodo de registro insertado en los músculos de la pata trasera derecha.

### **1.3 Animales espinalizados y *sham-espinalizados***

Tras la cirugía preparatoria descrita anteriormente, en los grupos de animales espinalizados y *sham-espinalizados*, se realizó una incisión a lo largo de la columna dorsal y luego dos incisiones a cada lado de las apófisis espinosas sobre el músculo, aproximadamente desde T-8 hasta T-10. Los músculos laterales fueron separados de las apófisis aplicando localmente una solución de lidocaína (B-Braun) al 1 % con adrenalina (Sigma) 10  $\mu\text{g/ml}$ , para evitar los descensos de la presión arterial, así como para prevenir la posible sensibilización central por exceso de aferencias nociceptivas. Posteriormente se desarticuló la unión a nivel de T-9, T-10, y con un cortahueso se realizó la laminectomía desde T-11 hasta T-8 ó T-9, una vértebra por encima de donde observamos la desviación lateral de la vena

dorsal de la médula espinal. Para evitar hemorragias en el transcurso de la cirugía se utilizó un hemostático de colágeno (Lyostypt, B Braun).

En el grupo de animales *sham-espinalizados* después de la laminectomía se procedió a la apertura de la duramadre a lo largo de toda la médula espinal expuesta.

En el grupo de los animales espinalizados se procedió a seccionar la médula espinal por encima de donde se desvía la vena dorsal de la médula con el fin de evitar hemorragias. Por último, se colocó sobre la médula seccionada una pequeña torunda de algodón bañada en suero salino para evitar la deshidratación del tejido de la médula, se cerró la incisión en dos planos y se le aplicó una pomada de lidocaína y prilocaína sobre la herida quirúrgica para disminuir las aferencias nociceptivas.

Tras la cirugía se dejó reposar al animal por lo menos una hora y media después de la espinalización para que se recuperara del choque postquirúrgico.

### **1.4 Control del nivel de anestesia y constantes fisiológicas**

Para asegurar la mayor reproducibilidad posible de los resultados en este tipo de experimentos hay que controlar que el nivel de anestesia sea el adecuado y similar en todos los animales. Por ello utilizamos una infusión constante del anestésico mediante bomba de infusión; además se inspeccionaron los siguientes parámetros como indicadores del nivel de anestesia: presión arterial, reflejo auditivo y corneal, frecuencia respiratoria, y reflejo de retirada a estímulos nocivos. Se consideró que el nivel de anestesia era bajo si los reflejos auditivo y corneal eran intensos, si existía reflejo de retirada brusco al aplicar estímulos nocivos leves/moderados, o si la frecuencia respiratoria era alta a la inspección ocular. Se consideró un nivel muy profundo de anestesia cuando ocurría lo contrario (reflejos auditivo y corneal totalmente ausentes, respiración superficial y con frecuencia baja y ausencia de reflejo de retirada a estímulos nocivos altos) y/o si la presión arterial media estaba por debajo de 100 mmHg.



Durante todo el experimento se controlaron las constantes vitales del animal. La temperatura central se mantuvo a  $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  por medio de una manta termorreguladora (Harvard) conectada a una sonda rectal.

La respiración del animal se logró mantener estable por medio de la canulación traqueal, ya que nos permite tener un buen acceso para extraer el exceso de secreciones que podrían obstruir las vías respiratorias y así mantenerlas permeables. Durante todo el experimento, el animal respiró una mezcla de aire enriquecido con oxígeno y humidificada.

La presión arterial fue medida en todo momento por medio de la cánula arterial que se conecta a un transductor de presión estándar (Elcomatic, EM750, serie 2283) que permite registrar la presión sistólica y diastólica en mmHg de forma digital, y la presión arterial media de forma analógica. Para evitar una obstrucción de la cánula se rellenó con una solución heparinizada (heparina 5 U.I./ml; Sigma). Los experimentos se realizaron sólo si los animales tenían la presión arterial sistólica por encima de 100 mmHg, excepto por caídas propias de la acción del fármaco.

### **1.5 Módulo de registro electrofisiológico**

Para obtener el registro electrofisiológico utilizamos: un electrodo bipolar, un preamplificador, un módulo de filtros y amplificador (Neurolog), un osciloscopio analógico y un osciloscopio digital (Hameg) y un convertidor A/D (CED1.1401 plus).

El electrodo bipolar que se utilizó para el registro electrofisiológico está hecho a partir de una aguja hipodérmica de acero inoxidable (G26 x 20 mm), a la que se le perforaron dos agujeros de 2 mm en ambos lados de su base. Se introdujeron por el bisel hasta los dos agujeros dos hilos de tungsteno recubiertos de teflón y bañados en resina epoxi. Los extremos del bisel son limados de tal manera que los hilos no tengan contacto con la aguja ni entre sí. Los extremos de cada agujero son unidos a dos conectores de 1 mm a los que se sueldan los dos cables de tungsteno, luego en la parte superior de la base de la aguja se suelda con estaño un cable con un conector de 2 mm y que sirve para conexión a tierra.

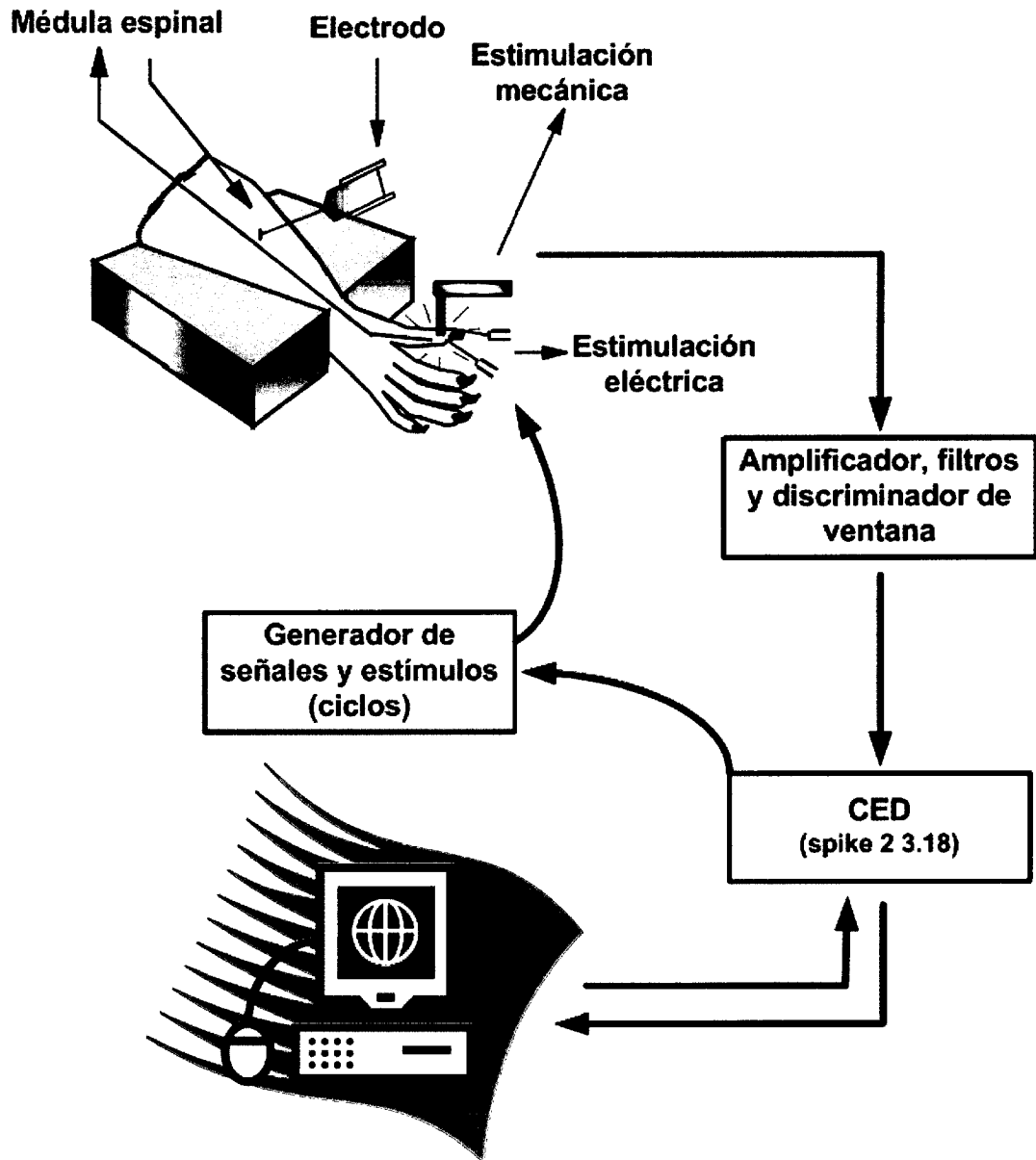
El electrodo se coloca en un micromanipulador y es introducido percutáneamente en la pata trasera derecha del animal, sobre los músculos implicados en el reflejo de retirada, donde registra la actividad bioeléctrica de las unidades motoras (Figuras M.1 y M.2). Para la búsqueda y aislamiento de unidades motoras, se aplicó una presión de intensidad media sobre los dedos de la pata del animal mientras se movía el electrodo con el micromanipulador. La actividad registrada se pasó a un preamplificador, con una ganancia de 10X. Desde aquí se envió al siguiente módulo, el de filtros y amplificador (Figura M.2), el aislamiento de la unidad se completa gracias a la utilización de un discriminador de ventana.

La señal pasa por tres tipos de filtros: un filtro "notch", de 50 Hz que evita la interferencia del ruido producido por la frecuencia eléctrica, un filtro de baja frecuencia que filtra las señales de hasta 500 Hz y un filtro de alta frecuencia que filtra las señales desde 1000 Hz.

La actividad de las UMAs es visualizada en el osciloscopio analógico a tiempo real y en un osciloscopio digital donde se guarda en memoria para analizar continuamente su forma y tamaño.

Finalmente la señal es enviada a un convertidor analógico-digital (CED 1401 plus), que digitaliza la señal aislada y a un ordenador (Figura M.2). Esta transformación permite analizar los datos en tiempo real a través del programa comercial (Spike 2 3.18).

Cuando una unidad motora es aislada aplicamos para el registro dos tipos de estímulos: estimulación mecánica o natural y estimulación eléctrica, en forma alterna y en ciclos de 3 minutos de duración (Figura M.3).



**Figura M.2.** Representación esquemática del módulo de registro fisiológico. La señal se registra a través de un electrodo bipolar, pasa por un amplificador y filtros, hasta un convertidor analógico-digital (CED) y mediante un programa comercial (spike 2 3.8) se registra la señal aislada en un ordenador.

La estimulación mecánica se aplica sobre un área de 14 mm<sup>2</sup>, utilizando un estimulador controlado por ordenador (Cibertec), durante 10 segundos, con una intensidad de 200 mN por encima del umbral para cada UMA. Se considera como el umbral la intensidad mínima que se necesita para que la unidad produzca un disparo estable durante por lo menos 10

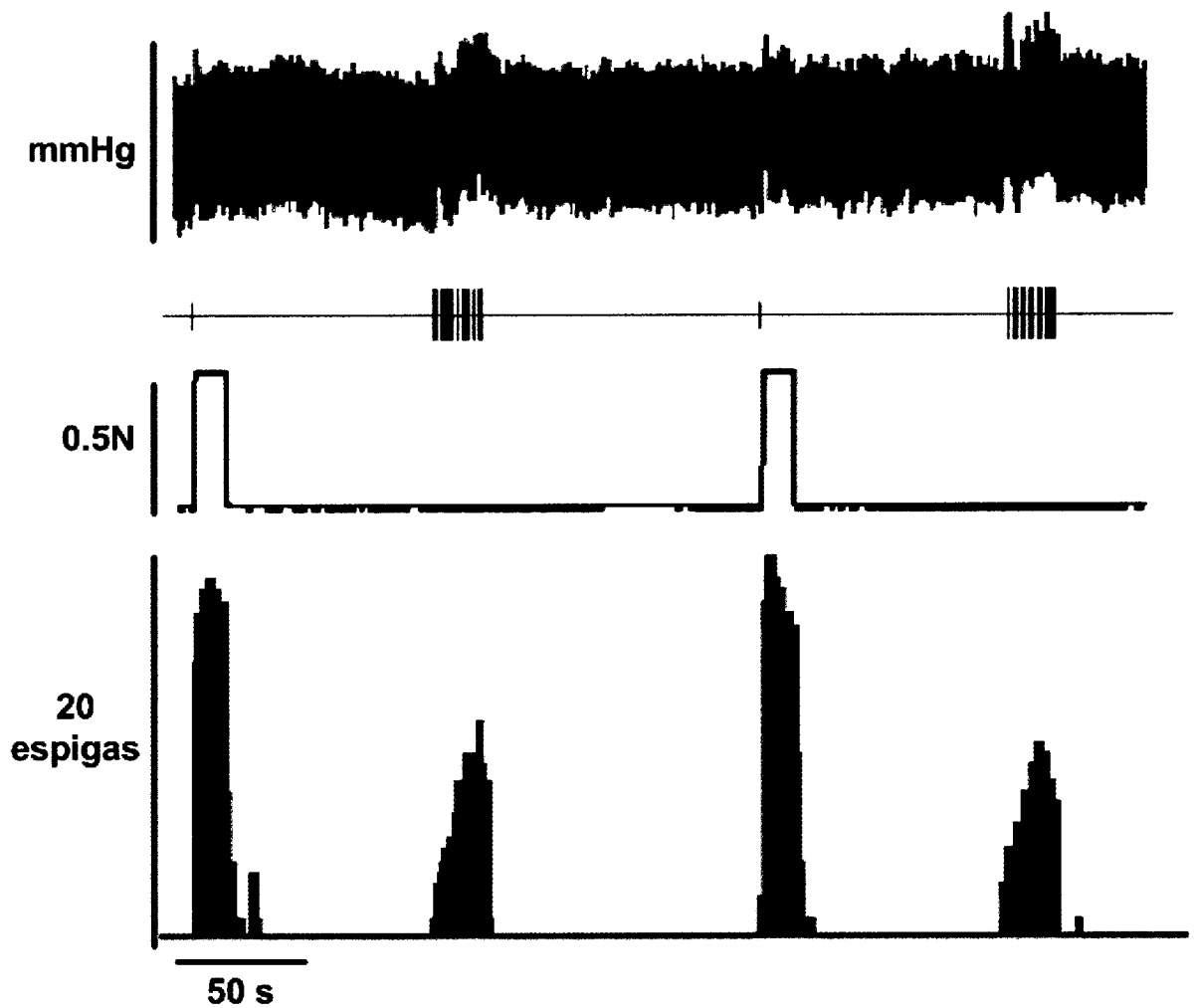
segundos. El umbral se determina mediante la aplicación de una rampa de presión ascendente.

La estimulación eléctrica es aplicada por medio de dos agujas de 0.2 mm de diámetro en el área más sensible del campo receptor cutáneo. Se aplican 16 pulsos de 2 ms de duración y a una frecuencia de 1Hz. La intensidad es el doble del umbral para fibras C, siendo el umbral la intensidad mínima que se necesita para que se produzcan respuestas con una latencia superior a los 150 ms después de cada pulso (Respuestas de fibras C, Herrero y Cerveró, 1996a). Este tipo de estimulación, aplicada de esta manera, genera el fenómeno conocido como *wind-up* (Figura M.4; Herrero et al, 2000) que es un fenómeno mediado a nivel central en el que intervienen los receptores NMDA y NK1. Se caracteriza por el aumento progresivo de sus respuestas después de cada pulso de estimulación eléctrica. En las figuras M.3 y M.4 podemos observar registros originales de una UMA.

A partir de esto, se tomarán únicamente para el registro unidades con una frecuencia de disparo estable a estimulación mecánica y que generen con la estimulación eléctrica repetitiva de alta intensidad el fenómeno de *wind-up*. El experimento sólo se inició si las respuestas fueron estables durante al menos tres ciclos de estimulación

### 1.6 Inducción de la inflamación

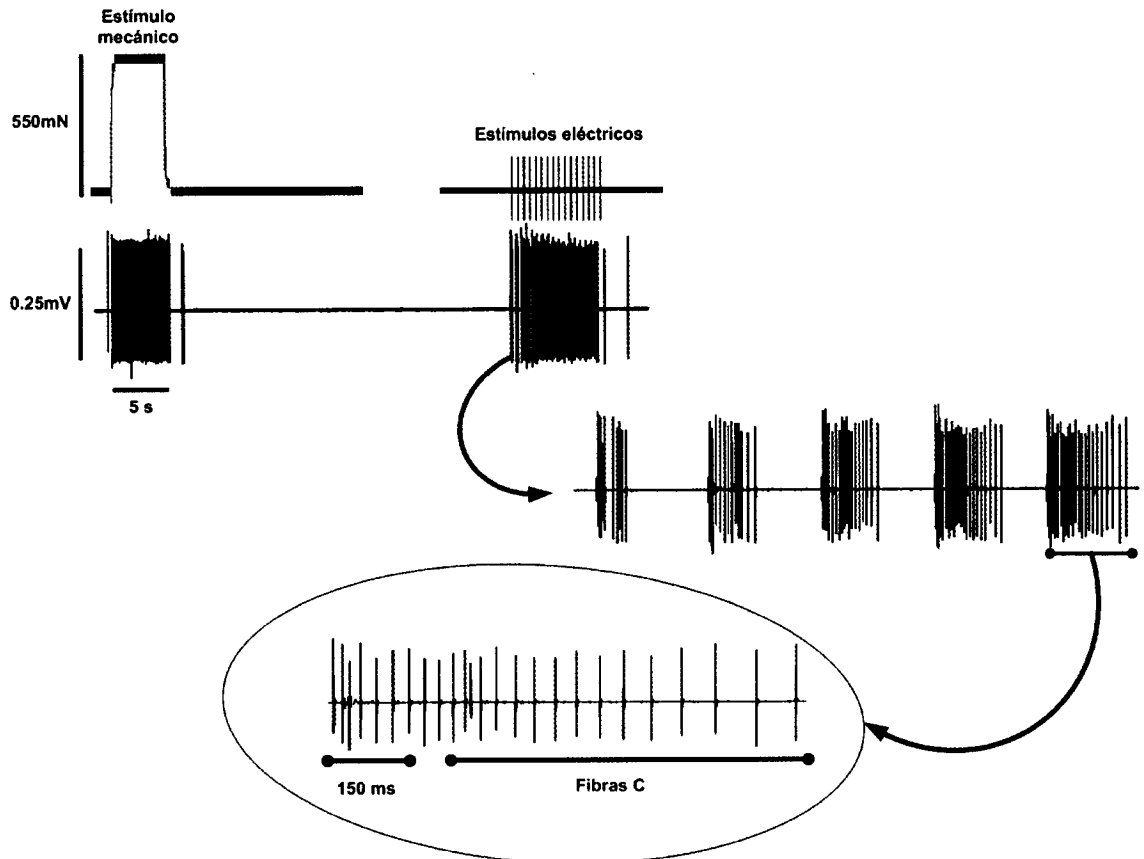
La inflamación se indujo 16 horas antes del experimento por medio de la administración de 100  $\mu$ l de carragenina- $\lambda$  (10 mg/ml, Sigma) por vía intraplantar en la pata trasera derecha del animal. El proceso se realizó, bajo anestesia con halotano en oxígeno con una dosis de inicio al 5 % y 2-3 % de mantenimiento. El nivel de inflamación se determinó mediante la medición del volumen plantar utilizando un pletismómetro digital (Letica). Se realizó una medición antes de la administración de carragenina, al comienzo del experimento y después del experimento.



**Figura M.3.** Representación de un registro original de una UMA. En el canal superior observamos el registro de la presión arterial, en el segundo canal los pulsos de estimulación eléctrica repetitiva, en el tercer canal la estimulación mecánica nociva y en el último el registro las respuestas de la UMA en forma de histograma.

### 1.7 Fármacos utilizados

Los fármacos utilizados en estos experimentos fueron: N-Ciclopentil adenosina (CPA, Sigma), 8-Ciclopentil 1,3-dimetilxantina (CPT, Sigma), naloxona (Sigma), fentanilo (Sigma), nor-binaltorfimina (Nor-BNI, Sigma) y U-50,488H (Tocris).



**Figura M.4.** Registro original de una UMA. Podemos observar las respuestas a una estimulación mecánica nociva y el fenómeno de *wind-up* que se produce tras la aplicación de estímulos eléctricos repetitivos de alta intensidad. En el recuadro podemos observar la sumación de las respuestas en el fenómeno de *wind-up* dependiente de las fibras de latencia tardía o fibras C (al menos 150ms después del estímulo).

La CPA es un agonista selectivo del receptor  $A_1$  de adenosina (Karlsten et al., 1991; Fredholm y Linden, 2001). Para su administración se disolvió en Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), a una concentración de  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  y posteriormente se diluyó en solución salina hasta un volumen de 0.3 ml por dosis. Se administró por vía intravenosa en dosis acumulativas en régimen logarítmico de base dos, iniciando con una dosis de  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  y terminando con una dosis de  $320 \mu\text{g}/\text{kg}$  cada 6 minutos (dos ciclos de estimulación).

El CPT es un antagonista selectivo del receptor  $A_1$  de adenosina (Fredholm y Linden, 2001). Para su preparación se disolvió en hidróxido de sodio (NaOH) 0.1M, a una concentración de  $1 \text{ mg}/50\mu\text{l}$  y posteriormente se

diluyó en solución salina hasta un volumen de 0.3 ml por dosis. Se administró por vía intravenosa en dosis acumulativas en régimen logarítmico de base dos, iniciando con una dosis de 10 mg/kg hasta 20 mg/kg cada 6 minutos.

Para descartar que el posible efecto antinociceptivo de los fármacos fuera un efecto mediado por receptores opioides, se utilizó un antagonista no selectivo de dichos receptores, la naloxona (Sigma). En un grupo de experimentos se estudio una sola dosis de 1 mg/kg, que es una dosis 10 veces superior a la dosis que provoca un bloqueo de los receptores opioides  $\mu$  y  $\kappa$  en experimentos similares (Herrero y Headley, 1991), pero no lo suficientemente alta para producir efectos por sí misma; y en otro grupo de experimentos se utilizó una dosis de 100  $\mu$ g/kg, que es una dosis suficiente para provocar un bloqueo sobre los receptores  $\mu$  y así descartar si la CPA estaba actuando sobre este tipo de receptores. Se disolvió en suero salino hasta conseguir un volumen total de 0.3 ml.

La CPA se combinó con los agonistas de los receptores opioides  $\mu$  y  $\kappa$ , fentanilo y U-50,488H respectivamente, para evaluar una posible potenciación del efecto tras la administración conjunta de los fármacos. Se administró una dosis subefectiva de CPA y luego se administró el fentanilo y el U-50,488H en dosis acumulativas en régimen logarítmico de base dos iniciando con una dosis de 1 mg/kg cada 6 minutos hasta provocar una inhibición total de las respuestas.

### **1.8 Registro y análisis de los datos**

El registro y el análisis de datos, así como los protocolos de estimulación fueron realizados por medio de ordenador, utilizando el programa comercial Spike 2 3.18 para Windows. Para el análisis de los datos se promedió el número de respuestas de los últimos dos ciclos de estimulación de cada una de las dosis y se comparó con la respuesta control. El control fue el promedio de las respuestas de los tres ciclos previos a la administración de la primera dosis del fármaco estudiado. En el análisis de las respuestas a estimulación eléctrica, se contaron únicamente las respuestas de fibras C. Fibras que producen respuestas de latencia tardía,

## ***Material y Métodos***

cuyas aferencias se cuentan entre los 150 y 650 ms después de cada pulso de estimulación (Respuestas de fibras C, Herrero y Cerveró, 1996).

Los análisis estadísticos se realizaron sobre los datos no formalizados mediante los programas comerciales GraphPad InStat y GraphPad Prism para Windows. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media.

Al final del experimento los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (Euta-Lender, Normon).



## **CAPÍTULO I**

**I. Actividad antinociceptiva espinal vs. supraespinal del agonista del receptor A1 de adenosina, ciclopentil adenosina, en ratas con inflamación.**

## **I.1 OBJETIVOS**

1. Determinar si la administración sistémica de la CPA tiene algún efecto sobre el sistema antinociceptivo en animales adultos y neonatales con inflamación.
2. Determinar si el efecto antinociceptivo de la CPA se ejerce únicamente sobre la médula espinal o si posee algún efecto en áreas supraespinales.
3. Conocer si la cirugía espinal tiene alguna implicación en el efecto antinociceptivo de la CPA.
4. Determinar si existe alguna relación entre el efecto hipotensor de la CPA y su efecto antinociceptivo.

## I.2 INTRODUCCIÓN

Como ya hemos referido con más detalle en la introducción general de esta tesis, la adenosina es considerada como un modulador neuronal inhibitorio y esta relacionada con una gran diversidad de acciones reguladoras en el sistema nervioso, incluido un papel en el control de la función cardiovascular, la regulación del sueño, la neuroprotección, en el sistema locomotor y la nocicepción (Dunwiddie y Masino, 2001). Los agonistas del receptor A1 de la médula espinal han sido implicados como mediadores de su efecto antinociceptivo (Karlsten et al., 1991; Reeve y Dickenson, 1995; Lee y Yaksh, 1996; Sawynok y Liu, 2003), especialmente en situaciones de sensibilización, ya que la adenosina por sí misma produce solo una débil acción analgésica en roedores con nocicepción aguda (Keil y Delander, 1992). Los receptores A1 están concentrados en su mayoría en las neuronas del asta dorsal (Geiger et al., 1984; Choca et al., 1988), y tras la administración de agonistas del receptor A1 se ha observado un potente efecto antinociceptivo, (Lee y Yaksh, 1996; Sawynok, 1998), incluyendo una importante inhibición del fenómeno de *wind-up* (Reeve y Dickenson, 1995; Suzuki et al., 2000). También, los agonistas del receptor A1 deprimen las corrientes postsinápticas excitadoras en miniatura en las neuronas de la sustancia gelatinosa de rodajas de la médula espinal de ratas adultas (Lao et al., 2001). Todos estos estudios apoyan un efecto antinociceptivo de los receptores A1 dentro de la médula espinal y la actividad antinociceptiva de los sistemas de adenosina se ha asociado principalmente a acciones localizadas en la médula espinal y lugares periféricos (Sawynok, 1998; Sawynok y Liu, 2003). De hecho, la acción antinociceptiva de los agonistas A1 administrados en la médula espinal es mediada por receptores A1 pre- y postsinápticos (Li y Perl, 1994) y la activación de receptores presinápticos A1 reduce la liberación de transmisores de las terminales aferentes primarias debido a la inhibición de canales de  $Ca^{2+}$  voltaje dependientes mediados por la proteína  $G_{i/o}$  (Santicioli et al., 1993; Lao et al., 2001). También la activación postsináptica de los receptores A1 disminuye la transmisión sináptica por la

hiperpolarización de las neuronas de segundo orden debido al incremento de la conductancia de  $K^+$  (para revisión ver Haas y Selbach, 2000).

Los receptores A1, sin embargo, están presentes en la mayor parte de las áreas del cerebro (ver revisión Ribeiro et al., 2003) y una actividad inhibitoria supraespinal del sistema A1 de adenosina ha sido demostrada por electroencefalografía (Fulga y Stone, 1998) y por otras técnicas (Phillis et al., 1975; Uchimura y North, 1991). Las acciones antinociceptivas supraespinales de los receptores A1 apenas se conocen y aunque algunos estudios mostraron que los agonistas del receptor A1 inhiben las corrientes postsinápticas de las neuronas de la sustancia gris periacueductal en cortes de cerebro (Bagley et al., 1999), el grado relativo en el que los efectos sistémicos de los agonistas del receptor A1, son producidos directamente a nivel supraespinal antes que espinal no es claro. Es por tanto importante aclarar esta situación y por lo que nos propusimos realizar comparaciones directas de la potencia antinociceptiva y la eficacia de un agonista selectivo del receptor A1 en animales intactos y espinalizados con sensibilización producida por la inflamación por carragenina. También, se ha demostrado que la cirugía de la columna vertebral potencia el efecto espinal de algunos analgésicos sobre los reflejos nociceptivos (Herrero y Headley, 1991), por eso, hemos evaluado el efecto del sistema A1 de adenosina en animales *sham-espinalizados*. También algunos agonistas del receptor A1 han mostrado ser efectivos en el bloqueo de la transmisión en segmentos de la médula espinal en preparaciones *in vitro*, especialmente en ratas inmaduras (Nakamura et al., 1997). Es por eso posible que las acciones inhibitorias de los agonistas A1 dependan del tipo de preparación, el nivel de desarrollo del animal experimental y aún la situación de la sensibilización de la médula espinal. Por ello, sería ideal comparar la efectividad del mismo agonista y antagonista en un animal adulto *in vivo* y en una preparación *in vitro* de un animal inmaduro. Nosotros intentamos resolver esta pregunta haciendo, en la segunda parte del estudio, algunos experimentos en preparaciones aisladas de hemimédula de ratas inmaduras con y sin inflamación inducida por carragenina.

### I.3 MATERIAL Y MÉTODOS

#### I.3.a Experimentos *in vivo* en ratas adultas

La actividad antinociceptiva del agonista selectivo del receptor A1 de adenosina, N<sup>6</sup>-ciclopentil adenosina (CPA), fue estudiada en experimentos de electrofisiología en ratas macho de la cepa Wistar con peso entre 250-330g, que se dividieron en 3 grupos: Intactos (n=16), espinalizados (n=6) y *sham-espinalizados* (n=6).

##### I.3.a.1 Protocolo de estimulación y sistema de registro

La técnica de UMAs ha sido descrita con detalle en el capítulo de métodos. La actividad de las UMAs se evocó en ciclos de tres minutos (10 segundos de estimulación mecánica 0.2N por encima del umbral sobre un área de 14 mm<sup>2</sup>; y 16 estímulos eléctricos 2 ms de duración, 1 Hz, 2 veces la intensidad del umbral para el reclutamiento de respuestas de larga duración; Herrero y Cerveró, 1996a y b) aplicados sobre el área más sensitiva del campo receptivo cutáneo de la unidad. La estimulación eléctrica fue usada para el estudio del fenómeno de *wind-up* (ver Herrero et al., 2000). La media de las fuerzas usadas para la estimulación mecánica en los tres grupos experimentales fue de 0.86±0.1 N en animales intactos, 1.26±0.1 N en animales espinalizados y 1.07±0.1 N en animales *sham-espinalizados*. La media para la intensidad de estimulación eléctrica fue 4±0.6 mA en animales intactos, 5±0.7 mA en animales espinalizados y 3.6±1 mA en animales *sham-espinalizados*.

##### I.3.a.2 Fármacos y análisis de datos

El agonista selectivo del receptor A1 de adenosina, N-ciclopentil adenosina (CPA, Sigma) se disolvió en DMSO (Sigma) 0.5 µg/µl y posteriormente se diluyó en salino para su administración intravenosa. Los fármacos fueron preparados todos los días, inmediatamente antes de la administración, y fueron inyectados en régimen de base log<sub>2</sub> cada 2 ciclos de

estimulación (6 min) en un volumen total y constante de 0.3 ml. La dosis usada inicialmente fue de 10 µg/kg y la dosis más alta fue de 320 µg/kg. La administración de cada dosis de CPA fue de forma lenta, y en un mínimo de tres minutos para minimizar el efecto sobre la presión arterial. El efecto de la mayor dosis acumulativa fue estudiado durante un mínimo de 30 min y la reversión de su efecto fue estudiada con CPT en 12 experimentos a dosis de 10 y 20 mg/kg. Los datos fueron expresados como porcentaje del control, tomando como control la media de tres ciclos previos a la administración de la primera dosis. El análisis cuantitativo se basó en las espigas evocadas durante los dos ciclos de estimulación entre cada dosis. Estas respuestas fueron promediadas y la media comparada con la respuesta control. Los datos de la estimulación eléctrica fueron analizados contando el número de espigas evocadas entre 150 y 650 ms después de cada estímulo (respuestas de fibras C, Herrero y Cerveró, 1996a y b). El protocolo para la estimulación y el registro de datos se realizó con ordenador, usando un programa comercial (CED, UK; Spike 2 3.18). Se realizaron comparaciones estadísticas en datos agrupados usando el programa comercial GraphPad-Prism y GraphPad-Instat para Windows. Se usaron las pruebas para análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un post-test de Dunnett para la comparación entre la estimulación mecánica y el control, para el análisis de las curvas del *wind-up* y para el análisis de la presión arterial. La comparación entre el efecto de CPA en los diferentes grupos experimentales fue realizada con la prueba no paramétrica U-test de Mann-Whitney. Para el análisis del nivel de inflamación de la pata T-test de dos vías. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  e.e.m.

### **I.3.b Experimentos *in vitro* en ratas inmaduras**

#### **I.3.b.1 Preparación del animal**

Los presentes experimentos fueron realizados en Alemania por el grupo de Wolfgang Schröder de los laboratorios Grünenthal GMBH. Se llevaron a cabo en médulas espinales aisladas, en las raíces espinales lumbares, dorsales y ventrales fijadas usando la técnica de puente de grasa,

como fue descrita por Faber et al. (1997). Se utilizaron ratas inmaduras de ambos sexos (de 2-6 días, entre 8 y 20 g) que fueron anestesiadas con uretano (1.5 g/kg, i.p.), y luego decapitadas y extraída la médula, hemiseccionada a lo largo de la línea media y colocada dentro de una cámara de registro. La raíz dorsal L4 o L5 y su correspondiente raíz ventral ipsilateral se pusieron en contacto con un electrodo de estimulación y registro, respectivamente. El aislamiento eléctrico se realizó con puentes de grasa usando una mezcla de vaselina y aceite de parafina. La preparación fue perfundida a una tasa de 2 ml/min con líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) compuesto de (en mM) NaCl (118), KCl (3), CaCl<sub>2</sub> (1.5), MgSO<sub>4</sub> (1.25) y glucosa (12). Al LCR se le aplicó continuamente gas con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95%/5%) y mantenido a temperatura ambiente a un pH de 7.4. La preparación se dejó equilibrar al menos 60 min antes de comenzar cualquier prueba.

### **I.3.b.2 Registro electrofisiológico**

Se aplicaron estímulos eléctricos cuadrados (0.5 ms duración) a la raíz dorsal para determinar el umbral (T) capaz de provocar la primera onda discernible, registrada en la correspondiente raíz ventral ipsilateral. Se usaron tres protocolos diferentes de estimulación eléctrica: estimulación de baja intensidad (pulsos únicos a intensidad 3T), estimulación de alta intensidad (pulsos únicos a intensidad 16T) y estimulación repetitiva de alta intensidad (16 pulsos a intensidad 16T, con frecuencia de 1 Hz). Además, se realizaron experimentos de control en preparaciones de raíces dorsales del nervio espinal aisladas como se describió en estudios previos (Faber et al., 1997) para asegurarse que la estimulación de baja intensidad activaba sólo fibras A, y las de alta intensidad ambas fibras A y C, en el nervio periférico (no se muestran los datos). Se observaron diferentes componentes en los potenciales evocados de raíces ventrales por estimulación de la raíz dorsal. La estimulación de baja intensidad produjo un potencial de acción monosináptico (reflejo monosináptico, MSR, Figura I.6), con una duración máxima de 200 ms (Faber et al., 1997) más un potencial tardío excitador polisináptico (potencial lento de la raíz ventral, SVRP) de duración



aproximada de 4 s (ver ejemplo en Figura I.6). Los estímulos únicos de alta intensidad provocan un potencial excitador polisináptico mediado por fibras A y C (potencial lento de la raíz ventral, SVRP, Figura I.7) con una duración aproximada de 40 s. Los trenes de estímulos de alta intensidad provocan una respuesta del *wind-up* mediado por fibras C de alrededor de 50 s de duración (Figura I.7). Se obtuvo la media de las primeras 5 repeticiones de baja intensidad (intervalo entre pulsos de 6 s) seguido de la media de 5 pulsos consecutivos (intervalo de 18 s entre pulsos) y la media de repeticiones de alta estimulación (intervalo de 22 s entre pulsos). Esta secuencia de estimulación fue aplicada 20 min después de la perfusión del fármaco a su respectiva concentración. Las señales fueron digitalizadas, almacenadas y analizadas utilizando el programa comercial (DASYLAB, Synotech, Germany). Los parámetros analizados en las respuestas evocadas fueron el pico de la amplitud de MSR y el área bajo las curvas de baja intensidad SVRP, alta intensidad SVRP y *wind-up*. Los fármacos fueron administrados únicamente si las respuestas en tres ciclos control mostraban una variabilidad menor del 20 %. Los fármacos fueron disueltos en cremóforo, diluido en LCR. Varias concentraciones fueron administradas en la misma preparación en forma acumulativa, con períodos equilibrados lo suficiente para que alcanzaran su efecto máximo (típicamente 20 min).

### I.3.b.3 Experimentos de comportamiento

Se indujo hiperalgesia mecánica 16 h antes del experimento mediante la inyección de carragenina intraarticular (30 mg/ml, 20  $\mu$ l, bajo anestesia con halotano) dentro del tobillo de la pata trasera izquierda. Se realizaron experimentos de control inyectando una cantidad similar de salino. Los umbrales del reflejo de retirada a estimulación mecánica fueron medidos antes de la administración de carragenina y previo al experimento usando un filamento electrónico de Von Frey (diámetro de la punta de 0.76 mm, Model 1601, IITIC Inc./ Life Science Instruments). Cinco pruebas, con una fuerza de 45 g, fueron realizadas en cada pata con al menos 30 segundos de intervalo entre ellas.

**I.3.b.4 Fármacos y análisis de datos**

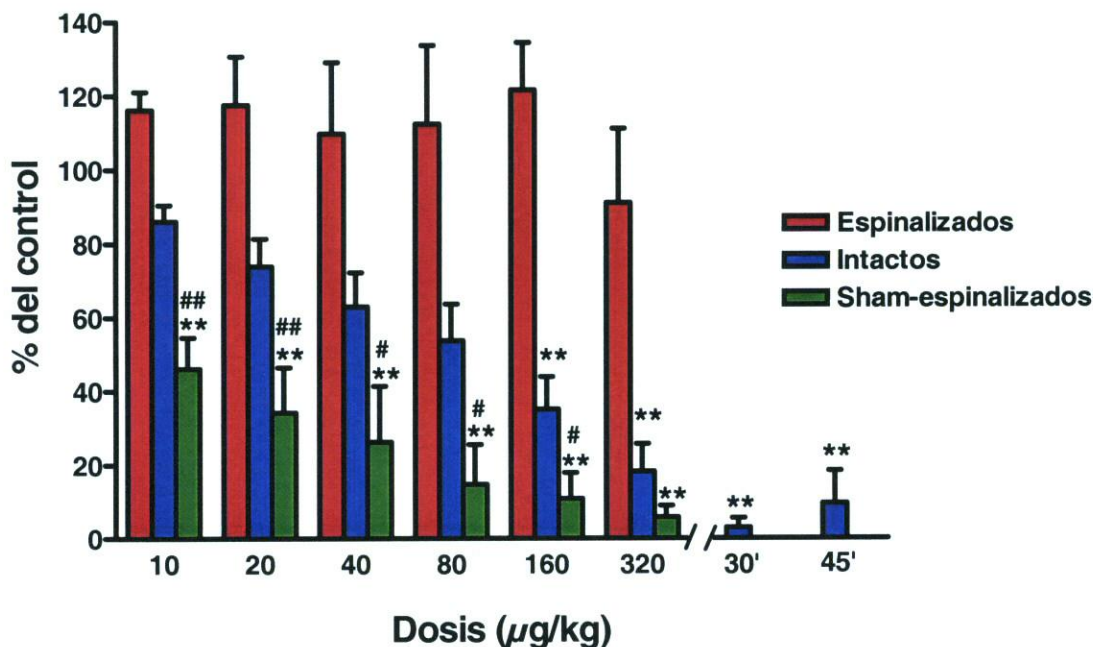
El efecto de los fármacos fue calculado como porcentaje del control, siendo el control el promedio de las tres últimas respuestas antes de la administración del fármaco. Para las comparaciones estadísticas se utilizó el test ANOVA con un post test de Dunnett. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media.

**I.4 RESULTADOS****I.4.a Experimentos *in vivo* en ratas adultas****I.4.a.1 Efecto de CPA sobre las respuestas a estimulación mecánica**

La figura I.1 muestra los efectos observados después de la administración intravenosa de CPA en las respuestas de estimulación mecánica nociva en animales espinalizados, intactos y *sham-espinalizados*. En la tabla I.1 resumimos el efecto de la CPA sobre los tres grupos de animales en experimentos *in vivo*. La administración de CPA en animales espinalizados no modificó las respuestas de UMAs a la estimulación mecánica nociva. De hecho, dosis de 10 a 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$  produjeron un aumento no significativo de las respuestas hasta un máximo de  $121\pm 12\%$  de la respuesta control con las dosis de 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

La CPA produjo una disminución significativa de las respuestas a estimulación mecánica de forma dosis dependiente en animales intactos con la dosis de 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $p < 0.01$ ) y una  $\text{DE}_{50}$  de  $92\pm 1.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ . El máximo efecto observado fue de  $23\pm 12\%$  de la respuesta control. El efecto fue estudiado en un período de por lo menos 45 min en cuatro experimentos y no se observó recuperación de la inhibición de las respuestas durante este tiempo ( $9.5\pm 8\%$ ,  $p < 0.01$ ). La administración de dosis equivalentes de vehículo, usando el mismo protocolo que para CPA ( $n=3$ ), no provocó ningún

cambio significativo de las respuestas a estimulación mecánica ( $107 \pm 13$  % de la respuesta control con la dosis máxima; Figura I.3A).



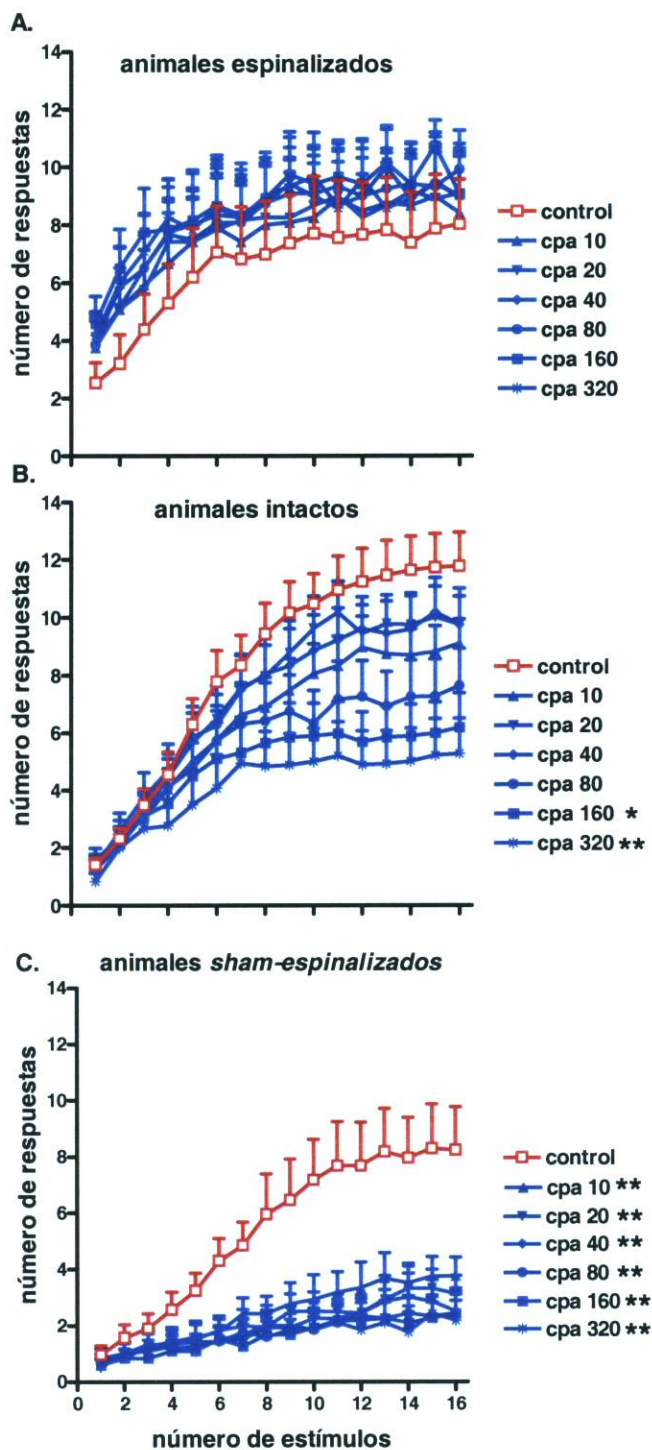
**Figura I.1.** Respuestas a estimulación mecánica nociva en los tres grupos de animales estudiados después de la administración de la CPA. En animales espinalizados la CPA produjo un incremento no significativo de las respuestas, en animales intactos observamos una reducción dosis dependiente de las respuestas, sin embargo el máximo efecto lo observamos en animales *sham-espinalizados*. (\*\* $p < 0.01$ , comparación estadística utilizando la prueba para análisis de varianza de una vía ANOVA, con un post test de Dunnett; # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ , animales intactos vs. *sham-espinalizados* usando la prueba no paramétrica U-test de Mann-Whitney).

En animales *sham-espinalizados*, la administración de CPA produjo una disminución de las respuestas a estimulación mecánica de forma dosis dependiente, que fue más intensa que la observada en animales intactos (Figura I.1). En este caso, el efecto fue significativo desde la dosis de 10 µg/kg ( $p < 0.01$ ) con un efecto de  $46 \pm 8$  % del control. La  $DE_{50}$  se pudo calcular únicamente por aproximación, dando un valor de  $8.3 \pm 1$  µg/kg, 10 veces más potente que el observado en animales intactos ( $p < 0.001$ ). La reducción de las respuestas observada fue significativamente más potente que la observada en el grupo de animales intactos desde la dosis de 10 a

160  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Figura I.1). El máximo efecto observado fue de  $6\pm 3$  % con la dosis más alta estudiada.

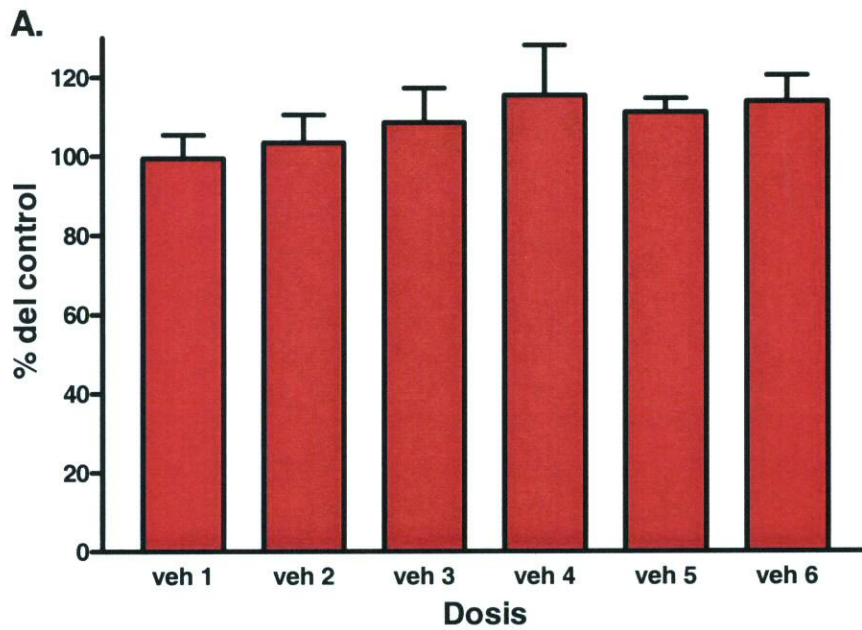
#### **I.4.a.2 Efecto de CPA sobre las respuestas a estimulación eléctrica (*wind-up*)**

Como en estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Herrero y Cerveró, 1996a y 1996b), la frecuencia máxima de disparo observada en animales espinalizados ( $8\pm 1$ ) fue más baja que la observada en animales intactos ( $11\pm 1$ ). En animales *sham-espinalizados*, esta frecuencia de disparo se encontró entre aquellos dos valores ( $9\pm 2$ ). Estas diferencias, no fueron estadísticamente significativas. La administración de CPA fue efectiva en la reducción de las respuestas del *wind-up* en animales intactos y *sham-espinalizados*, pero no en animales espinalizados (Figura I.2). Al igual que en las respuestas a estimulación mecánica, la administración de CPA en animales espinalizados provocó un aumento no significativo y no dosis dependiente de las respuestas del *wind-up* con todas las dosis estudiadas (Figura I.2A). En animales intactos, la CPA provocó una reducción del *wind-up* significativa y dosis dependiente. La DME observada fue de 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $p < 0.05$ ) y el máximo efecto fue observado con la dosis máxima estudiada:  $58\pm 13$  % de la respuesta control ( $p < 0.01$ ; Figura I.2B). En animales *sham-espinalizados* (Figura I.2C), la administración de CPA provocó una potente disminución de la curva del *wind-up*, observándose un efecto desde la primera dosis utilizada de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $p < 0.01$ ). El máximo efecto observado fue con las dosis de 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $36\pm 11$  % del control,  $p < 0.01$ ) y no fue significativamente diferente de la observada con la dosis de 320  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $41\pm 15$  %,  $p < 0.01$ ). La administración de dosis equivalentes de vehículo indujo un aumento no dosis dependiente del *wind-up*, con un máximo de  $152\pm 83$  % de la respuesta control (Figura I.3B).

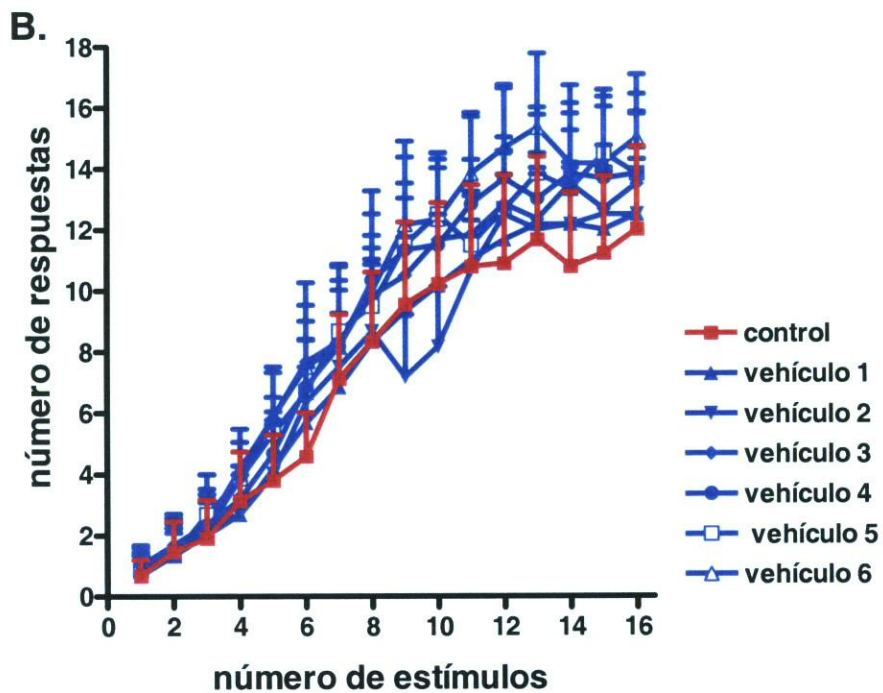


**Figura I.2.** Efecto de la CPA sobre el *wind-up*. En animales espinalizados no se observó reducción de las respuestas, en animales intactos observamos una reducción dosis dependiente del *wind-up*. El efecto en animales *sham-espinalizados* fue más intenso que en animales intactos (comparación estadística entre las respuestas observadas con cada dosis utilizando la prueba para análisis de varianza de una vía, ANOVA, con un post-test de Dunnett, (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )).

Efecto del vehículo sobre la estimulación mecánica



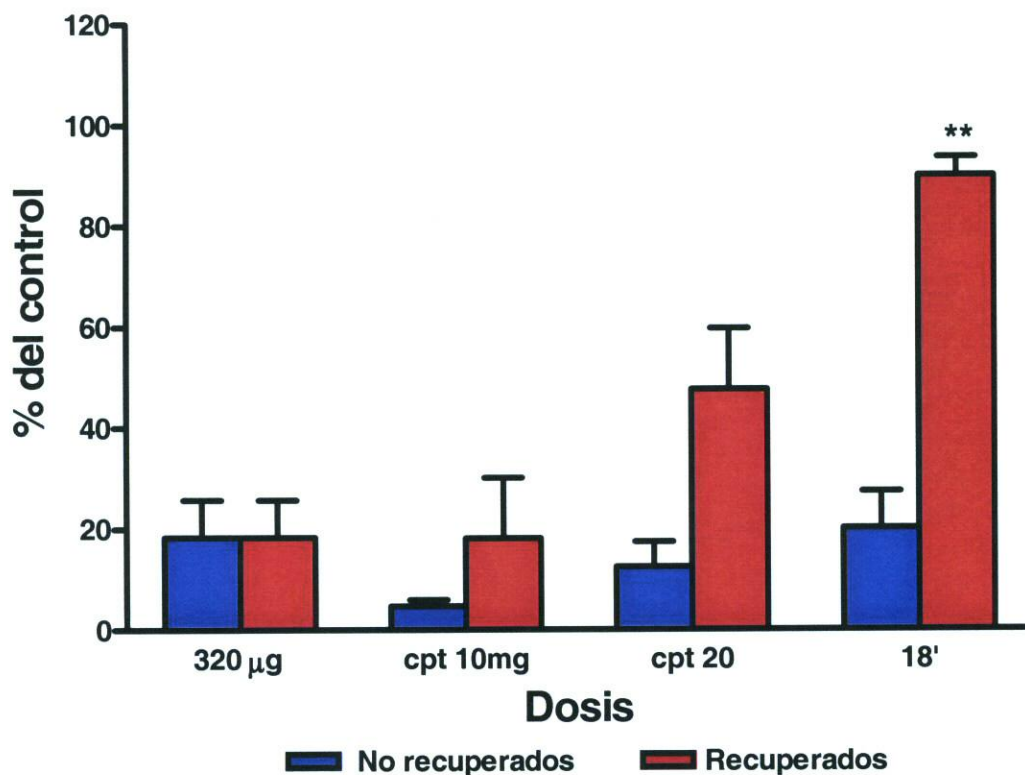
Efecto del vehículo sobre el *wind-up*



**Figura I.3.** La administración del vehículo no provocó cambio significativo alguno en las respuestas a estimulación mecánica nociva (A). En las respuestas al *wind-up* se observó un aumento no dosis dependiente de las respuestas (B).

**I.4.a.3 Reversión del efecto antinociceptivo de CPA por CPT**

La actividad antinociceptiva observada por la administración de CPA en animales intactos y *sham-espinalizados*, se intentó revertir por medio de la administración intravenosa del antagonista selectivo del receptor A1, CPT, en dos dosis de 10 mg/kg (dosis acumulativa total de 20 mg/kg). El CPT fue inyectado 6 y 12 minutos después de CPA y su efecto fue estudiado durante 18 min, tiempo para el cual el efecto de la CPA seguía completo en la ausencia del antagonista (Figura I.1). En animales intactos (n=12), la reversión del efecto de CPA fue variable. En un grupo de unidades (n=6) el efecto inhibitor de CPA no fue revertido por la administración de CPT, en respuestas a estimulación mecánica nociva ( $20 \pm 7$  % del control,  $p < 0.01$  vs. control, Figura I.4) y revirtió sólo parcialmente las respuestas a estimulación eléctrica ( $74 \pm 4$  % del control,  $p < 0.05$  vs. la respuesta control).



**Figura I.4.** Reversión del efecto de la CPA por CPT en respuestas a estimulación mecánica nociva. La administración de CPT indujo la recuperación completa del efecto de la CPA en el 50% de las unidades estudiadas. En el otro 50% de unidades no se observó una recuperación.

M	Intactos	Espinalizados	Sham-espinalizados
DE <sub>50</sub>	92±1.3 µg/kg	-----	8.3±1 µg/kg
Máximo efecto	23±12%	121±12%	6±3%
W-U			
Máximo efecto	58±13%	162±30%	36±11%

**Tabla I.1.** Efecto de la CPA en animales intactos, espinalizados y *sham-espinalizados*. M= estimulación mecánica, W-U= *wind-up*, DE<sub>50</sub>= dosis efectiva 50.

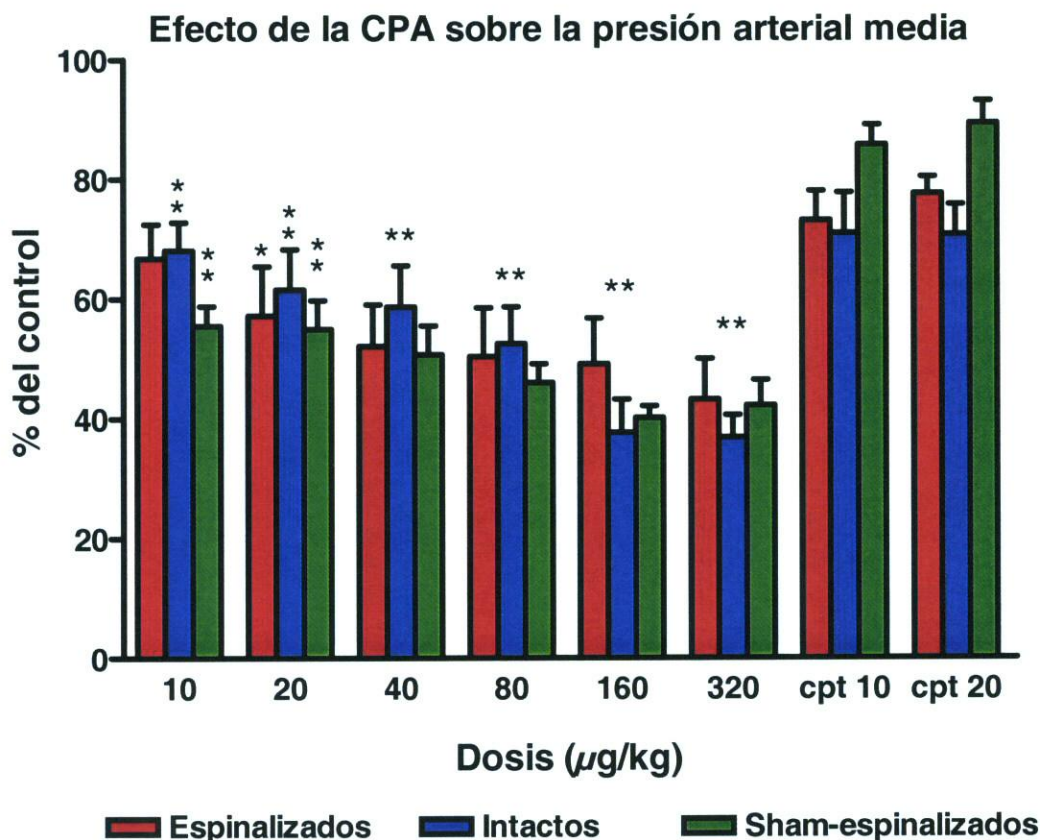
En un segundo grupo de unidades (n=6), se observó una recuperación completa del efecto de CPA 18 minutos después de la administración de 20 mg/kg de CPT, tanto en respuestas a estimulación mecánica nociva (90±3 % del control, Figura I.4) como en el *wind-up* (102±6 % del control). En animales *sham-espinalizados*, la administración de CPT a una dosis similar revirtió sólo parcialmente la inhibición de las respuestas a la estimulación mecánica y el *wind-up* (32±11 % y 50±12 % del control, respectivamente).

#### 1.4.a.4 Efecto de CPA sobre la presión arterial

Aún cuando la administración de CPA fue muy lenta, se observó una importante caída de la presión arterial después de la inyección de cada dosis. Esta caída de la presión fue dosis dependiente y muy similar en los tres grupos experimentales (Figura I.5). Su máximo descenso en animales espinalizados fue de 43±5 %, en intactos de 37±4 % y en *sham-espinalizados* de 42±4 % (p<0.01 vs. la respuesta control, en todos los casos). La presión arterial media fue monitorizada durante por lo menos 45 minutos en tres animales intactos y solo se observó una leve pero no significativa recuperación en este tiempo (54±10 %). La administración de CPT a una dosis de 10 mg/kg, 6 min después de la última dosis de CPA, revirtió el descenso de la presión arterial casi por completo: 73±5 % en animales espinalizados, 71±6 % en animales intactos y 83±2 % en *sham-*



espinalizados. Una segunda dosis de 10 mg/kg de CPT (dosis acumulativa de 20 mg/kg) no produjo un mayor aumento de la presión arterial (Figura I.5).



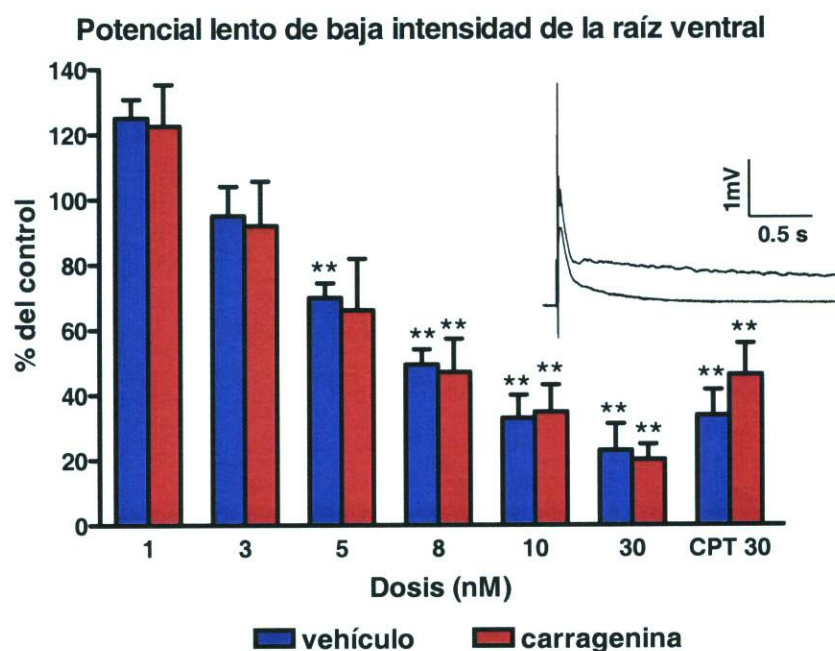
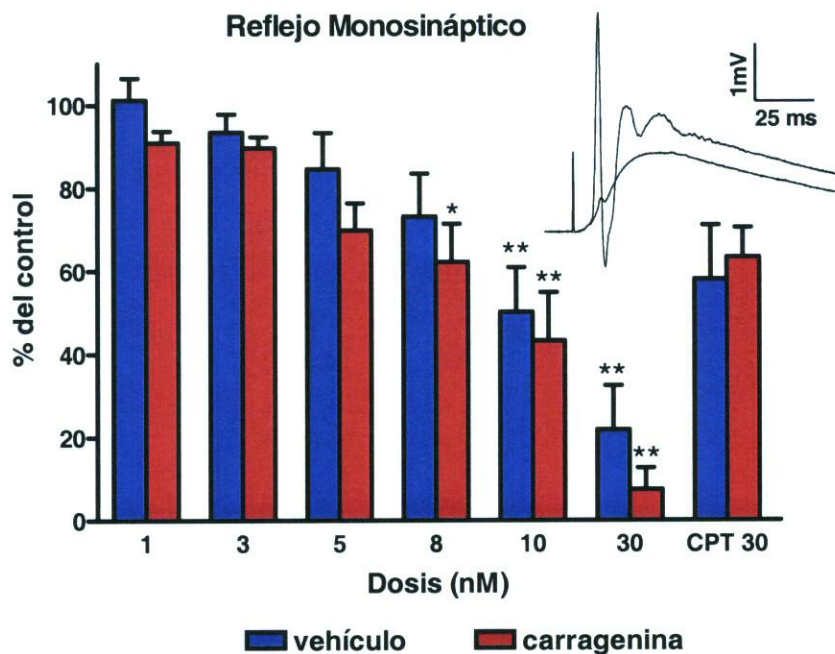
**Figura I.5.** Efecto de la CPA sobre la presión arterial media. La CPA provocó una caída dosis dependiente e intensa de la presión arterial en los tres grupos y el CPT provocó una reversión completa de la disminución de la presión arterial

#### I.4.b Experimentos *in vitro* en ratas inmaduras

##### I.4.b.1 Efecto de CPA sobre el reflejo monosináptico (MSR) y el potencial lento de baja intensidad de la raíz ventral (SVRP)

En la tabla I.2 se resume el efecto de la CPA en los experimentos *in vitro*. Los animales tratados con carragenina mostraron una intensa hiperalgesia 16 h después de la inducción de la inflamación. El umbral de retirada para la estimulación mecánica previo a la inducción de la inflamación fue  $18 \pm 2$  g, mientras que fue de sólo  $9 \pm 3$  g ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) 16 h después de la administración de carragenina. No se observaron cambios en

el umbral de la pata contralateral, ni tampoco en los animales tratados con salino ( $19.4 \pm 3.9$  g vs.  $19.5 \pm 5.2$  g,  $n=6$ ).



**Figura I.6.** Efecto de la CPA sobre respuestas a estimulación eléctrica de baja intensidad: reflejo monosináptico y potencial lento de baja intensidad de la raíz ventral, en la preparación de hemimédula. La CPA provocó una disminución dosis dependiente de ambos en animales con o sin inflamación. La administración de 30 nM de CPT provocó una recuperación parcial de la inhibición en el reflejo monosináptico, no así en el potencial lento de baja intensidad de la raíz ventral. Podemos ver insertados además trazos de curvas de control y el efecto de 30nM de CPA (comparación estadística como en la fig. I.1).

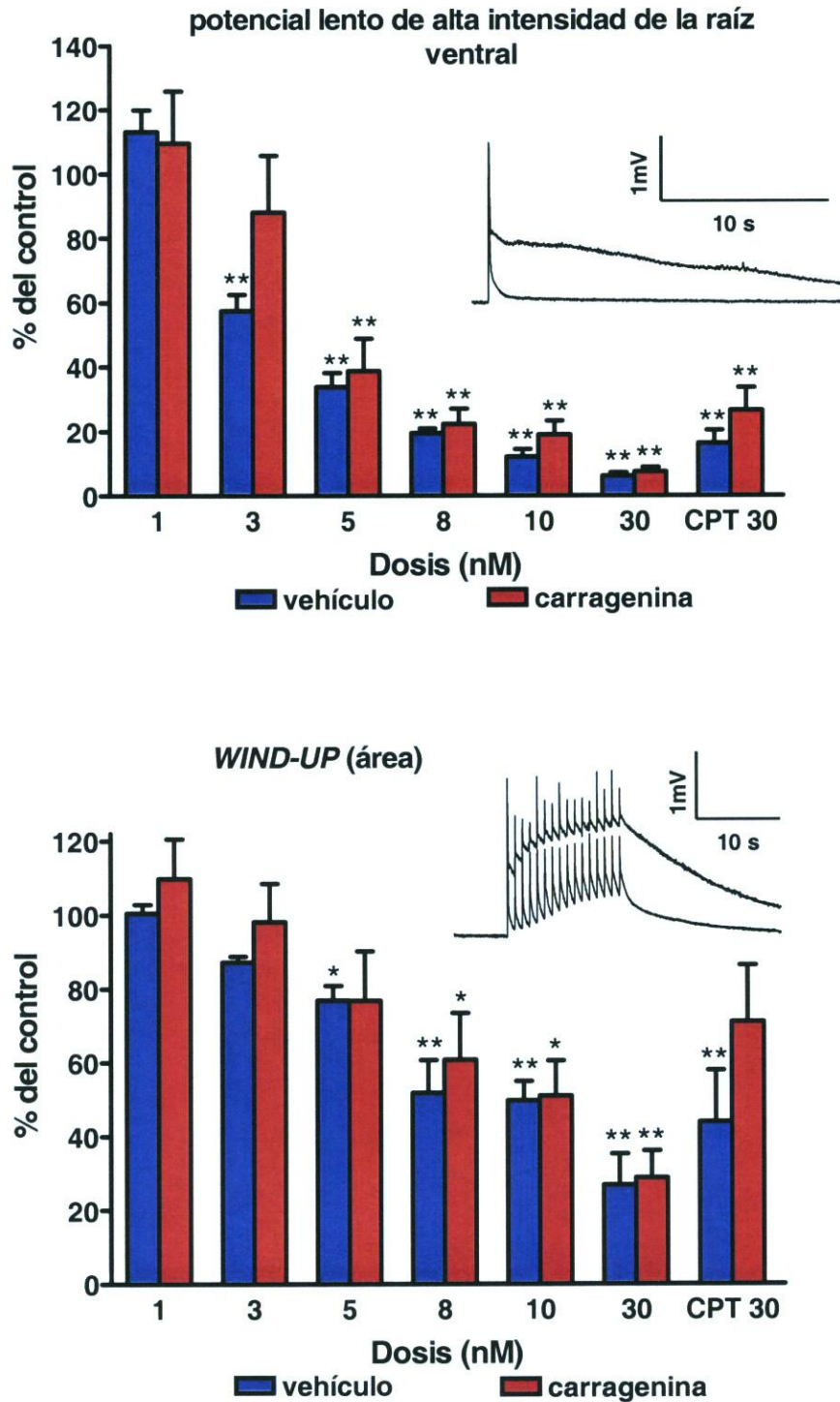
La CPA provocó una inhibición dosis dependiente del MSR y del SVRP de baja intensidad (Figura I.6), tanto en animales con inflamación, como en animales sin inflamación (n=6, en ambos). La  $CI_{50}$  en animales tratados con carragenina fue de  $9\pm 0.7$  nM (MSR) y  $7.7\pm 1.3$  nM (SVRP), con un efecto máximo de  $7\pm 5$  % ( $p<0.01$ ) y  $20\pm 4$  % de la respuesta control ( $p<0.01$ , Figura I.6), respectivamente. En animales tratados con vehículo, la  $CI_{50}$  fue de  $12.3\pm 1.2$  nM en MSR y  $7.9\pm 1.5$  nM en SVRP, con un efecto máximo de  $21\pm 10$  % del control en MSR ( $p<0.01$ ) y de  $23\pm 8$  % en SVRP ( $p<0.01$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales. La administración de 30 nM del antagonista CPT produjo una reversión parcial de la inhibición de MSR, pero no del efecto observado en el SVRP de baja intensidad (Figura I.6).

#### 1.4.b.2 Efecto de CPA sobre el potencial lento de la raíz ventral de alta intensidad (SVRP) y en el *wind-up*

La administración de CPA provocó una inhibición dosis dependiente del SVRP evocado por estimulación de alta intensidad y del *wind-up* (Figura I.7) similar a las respuestas con estimulación de baja intensidad. El máximo efecto observado en animales con inflamación fue de  $7\pm 1$  % para SVRP y  $28\pm 7$  % para el *wind-up*, con una  $CI_{50}$  de  $4.9\pm 0.5$  nM y  $12\pm 2$  nM, respectivamente. En animales sin inflamación la máxima reducción de las respuestas fue  $6\pm 1$  % para SVRP y  $27\pm 8$  % para el *wind-up*, con una  $CI_{50}$  similar a los valores observados en animales con inflamación:  $3.8\pm 0.5$  nM para SVRP y  $10.7\pm 2$  nM para el *wind-up*. La administración de CPT no fue efectiva en la reversión de la inhibición (Figura I.7).

Inflamados	MSR	SVRP(baja intensidad)	SVRP(alta intensidad)	W-U
$CI_{50}$	$9\pm 0.7$ nM	$7.7\pm 1.3$ nM	$4.9\pm 0.5$ nM	$12\pm 2$ nM
Efecto máximo	$7\pm 5\%$	$20\pm 4\%$	$7\pm 1\%$	$28\pm 7\%$
No inflamados				
$CI_{50}$	$12.3\pm 1.2$ nM	$7.9\pm 1.5$ nM	$3.8\pm 0.5$ nM	$10.7\pm 2$ nM
Efecto máximo	$21\pm 10\%$	$23\pm 8\%$	$6\pm 1\%$	$27\pm 8\%$

**Tabla I.2.** Efecto de la CPA sobre el reflejo monosináptico (MSR), potencial lento de baja y alta intensidad (SVRP) y *wind-up* (W-U), en animales inflamados y sin inflamación.  $CI_{50}$ = concentración inhibitoria 50.



**Figura I.7.** Efecto de la CPA en respuestas a estimulación eléctrica de alta intensidad: potencial lento de la raíz ventral y *wind-up*, en la preparación de hemimédula. Como en las respuestas a estimulación de baja intensidad, la CPA fue muy efectiva, inhibiendo la transmisión local en la médula espinal con diferencias no significativas entre los animales con y sin inflamación. El CPT no fue efectivo en la reversión del efecto de la CPA. Podemos ver insertados además trazos de curvas de control y el efecto de 30nM de CPA (comparación estadística como en la fig. I.1).

**I.5 DISCUSIÓN**

La principal observación realizada en estos experimentos fue la inhibición intensa y dosis dependiente de las respuestas tanto a estimulación mecánica como a estimulación eléctrica repetitiva de alta intensidad por la administración sistémica de CPA en animales adultos intactos. Un efecto de larga duración en el que no se observó recuperación significativa en 45 minutos. En animales espinalizados, la administración de CPA no modificó las respuestas de UMAs, lo que indica que la CPA es un agente antinociceptivo muy efectivo en el animal adulto completo pero, también, que la integridad de la médula espinal es crucial para observar el efecto cuando es inyectado de forma sistémica. Así, la actividad antinociceptiva de la CPA en las presentes condiciones experimentales, es al menos en parte, localizada a nivel supraespinal. Esto es apoyado por estudios previos que demuestran efectos supraespinales de los sistemas de adenosina. La administración de agonistas del receptor A1 dentro de la formación reticular pontina media, por ejemplo, induce un potente efecto antinociceptivo (Tanase et al., 2002). La adenosina es liberada activamente en el núcleo supraóptico (Oliet and Poulain, 1999), inhibe la transmisión excitadora en el tegmento laterodorsal (Arrigoni et al., 2001) y es un fármaco analgésico muy efectivo tras la administración i.c.v. (Zarate et al., 1999).

Estas observaciones no necesariamente excluyen una acción directa de CPA sobre la médula espinal. De hecho, también se ha observado una antinocicepción mediada por el receptor A1 en experimentos de comportamiento tras la administración intratecal (Sosnowski y Yaksh, 1989; Sosnowski et al., 1989), y el asta dorsal y las aferentes primarias contienen receptores A1 (ver Sawynok, 1989; Ackley et al., 2003; Sawynok y Liu, 2003 para revisión). Una actividad supraespinal similar ha sido demostrada con la administración sistémica de opioides (Yeung y Rudy, 1980a y b) y aunque la actividad opioide en la médula espinal fue evidente, se observó una interacción sinérgica entre las acciones supraespinal y espinal cuando se administraron opioides por separado en los dos compartimentos (Yeung y Rudy, 1980b). Una misma sinergia supraespinal/espinal fue observada con

acetaminofén (Raffa et al., 2000) y los resultados observados en nuestros experimentos quizás sean también el resultado de una interacción de la CPA en zonas espinales y supraespinales. También es posible que la anestesia usada en los presentes experimentos contribuya a esta posible acción sinérgica o al aumento de la actividad de la CPA. Aunque se necesitan otros experimentos para dilucidar esta posibilidad, es cierto que la CPA no tuvo efecto alguno en animales espinalizados, lo cual sugiere una falta de interacción con el anestésico empleado en las presentes condiciones experimentales.

La CPA provocó una reducción significativa del *wind-up*, un efecto que ha sido descrito en neuronas del asta dorsal después de la administración intratecal de la CPA (Reeve y Dickenson, 1995). Este efecto sobre el *wind-up* apoya una acción sobre la médula espinal (ver Herrero et al., 2000 para revisión). De cualquier modo, el *wind-up* es también fuertemente modulado por influencias supraespinales (Herrero y Cerveró, 1996a y b), como lo son las respuestas de neuronas convergentes a la estimulación mecánica (Dugast et al., 2003; Almeida et al., 2000). La depresión observada, quizás como resultado de la activación de un control inhibitorio descendente, se apoya por el fuerte aumento de la actividad antinociceptiva de la CPA observada en animales *sham-espinalizados*. Un aumento similar del efecto de algunos fármacos ha sido observado en experimentos similares realizados con opiáceos agonistas de los receptores mu y kappa (Herrero y Headley, 1991, 1993) pero no con otros compuestos (Romero-Sandoval et al., 2003). Una explicación para esta observación es que la cirugía sensibiliza algunos sitios supraespinales a la acción de CPA o, dicho de otra forma, la cirugía activa algunos sistemas supraespinales que aumentan la potencia de la CPA. En cualquier caso, la sección de la médula espinal elimina esta acción y todos los efectos antinociceptivos observados de la CPA, indicando que el principal, sino exclusivo, efecto de la CPA administrado de forma sistémica es supraespinal.

Experimentos previos realizados en preparaciones *in vitro* de médulas espinales aisladas, mostraron un efecto inhibitorio de algunos agonistas A1

sobre la transmisión local de la médula espinal (Nakamura et al., 1997), indicando que, bajo estas condiciones, la influencia supraespinal no es necesaria para algunas de las acciones inhibitoras mediadas por el receptor A1. Una apropiada comparación de nuestros datos con esos estudios no fue posible ya que el tipo de inflamación y los agonistas usados fueron distintos. Por esta razón realizamos los experimentos en preparaciones aisladas *in vitro* de ratas recién nacidas comparando el efecto de los mismos fármacos, CPA y CPT, en una situación similar de inflamación. Estos experimentos mostraron que la CPA inhibe la transmisión local de baja y alta intensidad en preparaciones de médula espinal hemiseccionada de una forma dosis dependiente. Estos datos están de acuerdo con los efectos inhibidores observados con otros dos agonistas del receptor A1 (ciclohexil adenosina, CHA y R-fenil isopropil adenosina, R-PIA) en experimentos previos (Nakamura et al., 1997).

Nuestros experimentos, por lo tanto, sugieren que la CPA es un fármaco inhibitor efectivo en la preparación aislada de médula espinal inmadura, la cual no está aún influenciada por un control supraespinal completamente desarrollado. En contraste, en animales adultos en los cuales la modulación del proceso somatosensorial de la médula espinal está bien desarrollado, las influencias supraespinales determinan el efecto de la CPA.

En la preparación de médula espinal inmadura, no observamos ningún cambio en la curva dosis-respuesta de la inhibición de la transmisión en la médula espinal mediada por la CPA en ratas con inflamación inducida con carragenina, comparada con el control. Esto va de acuerdo con datos de experimentos similares, y en contraste con observaciones previas en animales adultos (Poon y Sawynok, 1998), donde el agonista del receptor A1 de adenosina era más potente inhibiendo las respuestas sobre el lado inflamado. La expresión del ARNm del receptor A1 se ha demostrado que es regulado en preparaciones tanto neuronales como no neuronales por diferentes factores, tales como glucocorticoides, cisplatino, tirotropina y por el propio agonista del receptor A1 CPA (Svenningsson y Fredholm, 1997; Hettinger et al., 1998; Bhat et al., 1999; Vainio et al., 2000). Sin embargo, a

parte de la observación de que los receptores espinales A1 son regulados por la administración crónica intracerebroventricular de morfina (Tao et al., 1995), no se ha observado si su expresión cambia bajo situaciones de inflamación. Suzuki et al. (2000) describió un aumento de la efectividad de la CPA intratecal después de la lesión del nervio espinal, confirmando así una expresión funcional alterada de los receptores espinales A1, asociada con neuropatía. Pero, de acuerdo con nuestros resultados, una falta de regulación del RNAm del receptor A1 en los segmentos lumbares L4-L6, ha sido observada dos días después de la inducción de inflamación plantar por la administración del adyuvante completo de Freund (Clemens Gillen, Grünenthal GmbH, observación no publicada). Por todo ello, una posible explicación para esta disparidad es que los cambios en el receptor A1, y su sensibilidad para los ligandos, ocurren en situaciones de neuropatía pero no en inflamación inducida por carragenina. No obstante, se necesitan otros experimentos para confirmar esta posibilidad.

La reversión del efecto antinociceptivo de la CPA después de la administración del CPT no se observó en todos los casos en animales adultos, y sólo parcialmente en ratas inmaduras. El CPT es un antagonista selectivo de los receptores A1 (Bruns, 1981) y ha demostrado ser un bloqueador activo y selectivo de las acciones antinociceptivas mediadas por receptores A1 cuando es administrado por vía intratecal (Lee y Yaksh, 1996). En una preparación *in vitro* Oliet y Poulain (1999), demostraron que la adenosina puede ser liberada dentro del núcleo supraóptico a una concentración suficiente para inhibir la liberación del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y del glutamato, y que este efecto era revertido por la administración de dosis bajas de CPT. También, la inhibición de la transmisión excitadora en el tegmento laterodorsal por adenosina es antagonizada por el CPT (arrigoni et al., 2001). Todo esto sugiere que la falta o el efecto parcial del CPT en nuestros experimentos no se deben a una falta de selectividad del antagonista. Es posible que el CPT no tuviera un acceso completo a los sitios centrales, de cualquier forma, aunque es posible que la habilidad para cruzar la barrera hematoencefálica dependa del estado de desarrollo del cerebro, esto no parece probable al observar la reversión parcial en la



preparación *in vitro*. También es posible que el efecto de la CPA no sea mediado únicamente por el receptor A1, sino también por otros sistemas. La reducción de la excitabilidad espinal por la activación de los receptores A1, se ha sugerido que sea secundario a la modulación de la transmisión del glutamato (Patel et al., 2001; Ackley et al., 2003). Una interacción con la transmisión del glutamato es apoyada por la intensa reducción del *wind-up* observada en todos los experimentos realizados en nuestro estudio, un fenómeno mediado por el receptor del N-metil-D-aspartato (NMDA; ver Herrero et al., 2000 para revisión). También hay datos que apoyan una vía de señalización común para receptores  $\mu$ -opioides,  $\alpha_2$ -adrenérgicos y A1 de adenosina en la periferia, implicando a la proteína cinasa C como sistema de segundo mensajero (ver Aley y Levine, 1997; Sawynok y Liu, 2003). Existen otras evidencias de interacción de adenosina con opioides. En áreas centrales, los receptores A1 parecen mediar la antinocicepción inducida por la administración supraespinal de  $\beta$ -endorfina, pero no de morfina en roedores (Suh et al., 1997). También, la actividad antinociceptiva en la médula espinal de la morfina fue aumentada en forma aditiva por la administración de adenosina en el modelo de dolor neuropático en ratas, y la inyección espinal de adenosina desaminasa o inhibidores de la recaptación de adenosina potenciaron fuertemente el efecto de la morfina (Lavand'homme y Eisenach, 1999). En resumen, bajo las presentes condiciones experimentales, la actividad antinociceptiva de la CPA fue posiblemente debida, no sólo a la acción primaria de los receptores A1, sino también a la activación secundaria de otro sistema o incluso a una variación en el acceso a su sitio de acción.

Los efectos cardiovasculares de la adenosina son bien conocidos y han sido descritos con detalle en muchos estudios. La acción de la adenosina sobre el control cardiovascular parece ser ejercida sobre el tronco del encéfalo (Thomas y Spyer, 1999), aunque también ha sido demostrada una acción simpática sobre la médula espinal (Deuchars et al., 2001). En los presentes experimentos, la administración de la CPA provocó una intensa hipotensión en los tres grupos experimentales. El efecto fue dosis dependiente y la intensidad fue muy similar en todos los casos, demostrando

la falta de influencia de los sistemas supraespinales en el efecto de la CPA sobre el sistema cardiovascular. La administración de dosis bajas de CPT provocó una reversión del efecto hipotensor mediado por la CPA, sugiriendo que la acción selectiva sobre los receptores A1 de adenosina es la responsable de este efecto. También es importante señalar que el efecto cardiovascular no fue paralelo al efecto antinociceptivo observado tras la administración de la CPA. Mientras que la hipotensión observada fue similar en los tres grupos experimentales, las acciones antinociceptivas fueron muy diferentes, partiendo de no observarse ningún efecto en animales espinalizados, a observar una potente inhibición de las respuestas nociceptivas en animales *sham-espinalizados*. Esto descarta la posibilidad que los efectos antinociceptivos de la CPA, fueran el resultado de una depresión del sistema nervioso central como consecuencia de la hipotensión. Esto es también apoyado por la observación de que el CPT fue muy efectivo revirtiendo los efectos cardiovasculares producidos por la CPA, y no así la inhibición de las respuestas nociceptivas. Por otro lado, esta inhibición de las respuestas nociceptivas se observó varios minutos después de la recuperación de la presión arterial. Los resultados sugieren que el efecto cardiovascular y antinociceptivo observado con la CPA es debido a diferentes mecanismos de acción, así mientras que la integridad de la médula espinal es crucial para observar el efecto antinociceptivo mediado por la CPA, las acciones cardiovasculares no son influenciadas por la espinalización o la cirugía espinal y por lo tanto se puede concluir que tienen un efecto supraespinal independiente.

En conclusión, este estudio parece ser el primero que demuestra que el efecto antinociceptivo sistémico de la CPA depende de la integridad de la médula espinal en el animal adulto, pero no en ratas inmaduras, y varía con la cirugía espinal. Esto es apoyado por el intenso aumento de la actividad antinociceptiva inducido por el trauma quirúrgico de la columna espinal. La variabilidad observada en el efecto de CPT sobre la transmisión de la médula espinal, sugiere la participación de otro sistema independiente del receptor A1 en la antinocicepción observada.

## **I.6 CONCLUSIONES**

1. La administración sistémica de CPA provoca una disminución dosis dependiente de las respuestas en animales adultos intactos y *sham-espinalizados* con inflamación, pero no en animales espinalizados lo que sugiere un efecto en áreas supraespinales.
2. La administración de la CPA fue efectiva en la preparación de hemimédula en animales neonatales con y sin inflamación.
3. La cirugía espinal provoca un aumento del efecto de la CPA, indicando que existe una activación de un sistema descendente inhibitor mediado por adenosina.
4. La CPA provoca una caída intensa de la presión arterial en los tres grupos experimentales, la cual es independiente de su efecto antinociceptivo.

## **CAPÍTULO II**

**II. Interacción del agonista del receptor A1 de adenosina CPA  
y los receptores opioides en la modulación de los reflejos  
nociceptivos de la médula espinal y del *wind-up*.**

**II.1 OBJETIVOS**

1. Determinar si el CPT es capaz de prevenir y revertir el efecto antinociceptivo de la CPA.
2. Determinar si la naloxona es capaz de prevenir y revertir el efecto antinociceptivo de la CPA.
3. Estudiar si existe una implicación de los receptores opioides en la actividad antinociceptiva de la CPA.

## II.2 INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior observamos que el agonista selectivo del receptor A1, N6-ciclopentil adenosina (CPA), fue un fármaco antinociceptivo muy efectivo en ratas adultas con la médula espinal intacta, pero no así en animales espinalizados (Ramos-Zepeda y Herrero, 2004). Esta observación nos indicaba que la principal actividad antinociceptiva de la CPA estaba localizada en áreas supraespinales en ratas adultas, o que la presencia de la modulación supraespinal es esencial para las acciones antinociceptivas mediadas por el sistema A1 de adenosina en el animal adulto. Además, el efecto antinociceptivo producido por la CPA fue más potente en animales *sham-espinalizados*, indicando un aumento producido por la cirugía de los sistemas inhibidores descendentes, implicando al receptor A1 de adenosina.

Además observamos que el efecto de la CPA fue revertido parcialmente por el antagonista selectivo del receptor A1 CPT en el 50 % de los animales intactos. En animales *sham-espinalizados*, la actividad antinociceptiva de la CPA no fue revertida por el CPT. La falta de reversión por el antagonista selectivo del receptor A1 sugiere que la CPA puede no estar actuando solamente sobre receptores de adenosina sino que también sobre otros sistemas. De hecho, en estudios previos se ha demostrado que el sistema de adenosina puede estar acoplado con los receptores opioides y  $\alpha_2$ -adrenérgicos en la periferia, trabajando como un receptor complejo con mecanismos de acción intracelulares comunes (Aley y Levine, 1997). Además, se sabe que la morfina incrementa la liberación endógena de adenosina *in vivo* e *in vitro* (Sweeney y Sawynok, 1987a y b). Sin embargo, una posible interacción entre CPA y los receptores opioides, y una reversión del efecto de CPA por naloxona no se ha estudiado en el sistema nervioso central. Por eso nos preguntamos si la actividad antinociceptiva de la CPA observada en nuestros experimentos era dependiente de la activación de los receptores opioides localizados en la médula espinal o en áreas supraespinales del sistema nervioso central. Para evaluar esta posibilidad, nos propusimos realizar experimentos en ratas adultas, por medio del registro de reflejos nociceptivos con la técnica de unidades motoras aisladas (UMAs), comparando la inhibición de la actividad de CPA por CPT con el

antagonista no selectivo de los receptores opioides naloxona. Obviamente, la posible reversión de la actividad de la CPA por naloxona podría indicar una interacción entre los dos sistemas, pero también podría ser consecuencia de una actividad facilitadora del antagonista por sí mismo, que podría enmascarar una acción opuesta de la CPA. Para descartar esa posibilidad estudiamos el efecto de CPT y naloxona por sí mismos y la posible prevención del efecto de CPA por ambos antagonistas. Los experimentos fueron realizados en animales intactos, espinalizados y *sham-espinalizados*, usando estimulación mecánica nociva y eléctrica repetitiva.

### II.3 MATERIAL Y MÉTODOS

#### II.3.a Protocolo de estimulación, sistema de registro y grupos experimentales

El registro de unidades motoras aisladas activadas por estímulos nocivos y registradas como reflejo de retirada, ha sido descrito con detalle en el capítulo de métodos. Tal y como allí se describe, se alternaron estímulos mecánicos y eléctricos en ciclos de tres minutos de duración.

Se estudiaron diferentes combinaciones del agonista selectivo del receptor A1, CPA, el antagonista selectivo CPT y el antagonista no selectivo de los receptores opioides naloxona (Tabla II.1), en experimentos de electrofisiología realizados en ratas macho adultas con un peso entre 250-330 g. La inhibición de la antinocicepción mediada por CPA, por el CPT y la naloxona se estudio únicamente en animales intactos y *sham-espinalizados*, debido a que no se observó disminución de las respuestas en animales espinalizados tras la administración de CPA (Ramos-Zepeda et al., 2004). No obstante, el efecto antinociceptivo de CPA se estudió también en animales espinalizados para confirmar nuestros resultados previos (no se muestra el grupo en la Tabla).

En primer lugar, estudiamos la reversión de la actividad nociceptiva de la CPA en dosis acumulativas en base  $\log_2$  (10 a 320  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) por el CPT en dos dosis acumulativas de 10  $\text{mg}/\text{kg}$  (dosis total de 20  $\text{mg}/\text{kg}$ ) inyectado 6 minutos después de la CPA a un intervalo de 6 minutos (2 ciclos de 3



minutos de estimulación, ver debajo). En un grupo diferente de experimentos, se intentó revertir el efecto de CPA con una dosis de 1 mg/kg de naloxona usando un protocolo similar. El efecto de los antagonistas se estudió durante al menos 30 minutos. El pico de reversión del efecto de la CPA por el CPT se observó entre los 24 y 30 minutos después de su administración y en el caso de la naloxona entre 18 y 24 minutos después de su administración. También se estudió el posible efecto del vehículo utilizado en tres experimentos independientes, utilizando una cantidad equivalente a la empleada para disolver la CPA y usando el mismo protocolo (grupo no incluido en la Tabla).

En una segunda serie de experimentos, estudiamos la prevención del efecto antinociceptivo mediado por la CPA con el CPT y la naloxona. El CPT o la naloxona se administraron en animales intactos y *sham-espinalizados* siguiendo el mismo protocolo que en experimentos previos (Tabla II.1), y su administración fue seguida de una sola dosis de 160 µg/kg de CPA. La CPA fue inyectada tomando en cuenta el pico de efecto de los antagonistas observado en la primera serie de experimentos, es decir 30 minutos después de la administración de CPT y 24 minutos después de la naloxona (Tabla II.1). Experimentos preliminares demostraron que una sola dosis de 160 µg/kg de CPA era suficiente para inducir una inhibición completa de las respuestas de UMAs, evitando un descenso exagerado de la presión arterial provocado por dosis más altas. Esta fue también la dosis más alta inyectada en experimentos previos (dosis acumulativa total de 320 µg/kg).

### II.3.b Cirugía preparatoria, fármacos y análisis de datos

El proceso quirúrgico de la preparación y la evolución de inflamación se realizaron según la descripción detallada en el capítulo de métodos. Como en los experimentos anteriores, los animales se mantuvieron anestesiados con  $\alpha$ -cloralosa (Sigma; 50 mg/kg para inducción y 20 mg/kg/h por bomba de perfusión para mantenimiento). La temperatura central se mantuvo  $37\pm 0.5^\circ$  C por medio de una manta termorreguladora durante todo el experimento. Después de la preparación se dejó a los animales intactos y *sham-espinalizados* descansar durante al menos una hora y dos horas a los

animales espinalizados antes de iniciarse el experimento. La presión arterial se monitorizó constantemente durante todo el experimento y se mantuvo por encima de 100 mmHg antes de la administración de los fármacos.

**Tabla II.1.** Grupos experimentales y protocolos de administración de los fármacos.

Grupos	n	1er fármaco	Tiempo (min)	2do fármaco	Tiempo (min)	Estimulación (ciclos 3 min)
I	6	CPA (10-320 µg/kg)	6	CPT (10-20 mg/kg)	30	M-WU
SH	6					
I	6	CPA (10-320 µg/kg)	6	NAL (1 mg/kg)	30	M-WU
SH	6					
I	6	CPT (10-20 mg/kg)	30	CPA (160 µg/kg)	30	M-WU
SH	6					
I	3	NAL (1 mg/kg)	24	CPA (160 µg/kg)	30	M-WU
SH	4					

**Tabla II.1.** El efecto antinociceptivo de CPA se intentó revertir con CPT y el antagonista opioide naloxona en ratas macho Wistar con inflamación inducida por carragenina, en animales intactos (I) y *sham-espinalizados* (SH). Además, se estudió el efecto por sí mismo del CPT y la naloxona y la posible prevención del efecto de la CPA. En todos los grupos experimentales las UMAs fueron activadas por estimulación mecánica nociva (M) y estimulación eléctrica repetitiva (*Wind-up*, WU).

Los fármacos estudiados fueron preparados todos los días inmediatamente antes de su administración, y fueron inyectados por vía intravenosa en dosis acumulativas en régimen de log<sub>2</sub> cada dos ciclos de estimulación (6 min) en un volumen total de 0.3 ml. La CPA (Sigma) se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) en una concentración de 0.5 µg/µl, diluido posteriormente en un volumen total de 0.3 ml de solución salina y se

administró en dosis de 10 hasta 320  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . La CPA se administró de forma muy lenta, en un mínimo de 3 min, para minimizar el efecto sobre la presión arterial. El CPT se disolvió en hidróxido de sodio (NaOH, 0.1M) a una concentración de 1 mg/50 $\mu\text{l}$  y luego se diluyó en un volumen total de 0.3 ml en salino para su administración intravenosa. Los datos fueron expresados como porcentaje del control, siendo el control la media de tres respuestas previas a la administración de la primera dosis. El análisis cuantitativo se basó en el conteo de las espigas evocadas durante los dos ciclos de estimulación entre cada dosis. Los datos de la estimulación eléctrica se analizaron contando el número de espigas evocadas entre 150 y 650 ms después de cada estímulo (respuestas de fibras C, Herrero y Cerveró, 1996a y b). El protocolo de estimulación y recolección de datos se realizó por medio de un ordenador, usando un programa comercial (CED, UK; Spike 2).

Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en datos agrupados usando programas comerciales (GraphPad-Prism and GraphPad-Instat for Windows). Se utilizaron las pruebas para el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) con un post-test de Dunnett para la comparación entre la estimulación mecánica y el control, y para el análisis de las curvas de *wind-up*. Los datos se presentan como la media  $\pm$  e.e.m.

## **II.4 RESULTADOS**

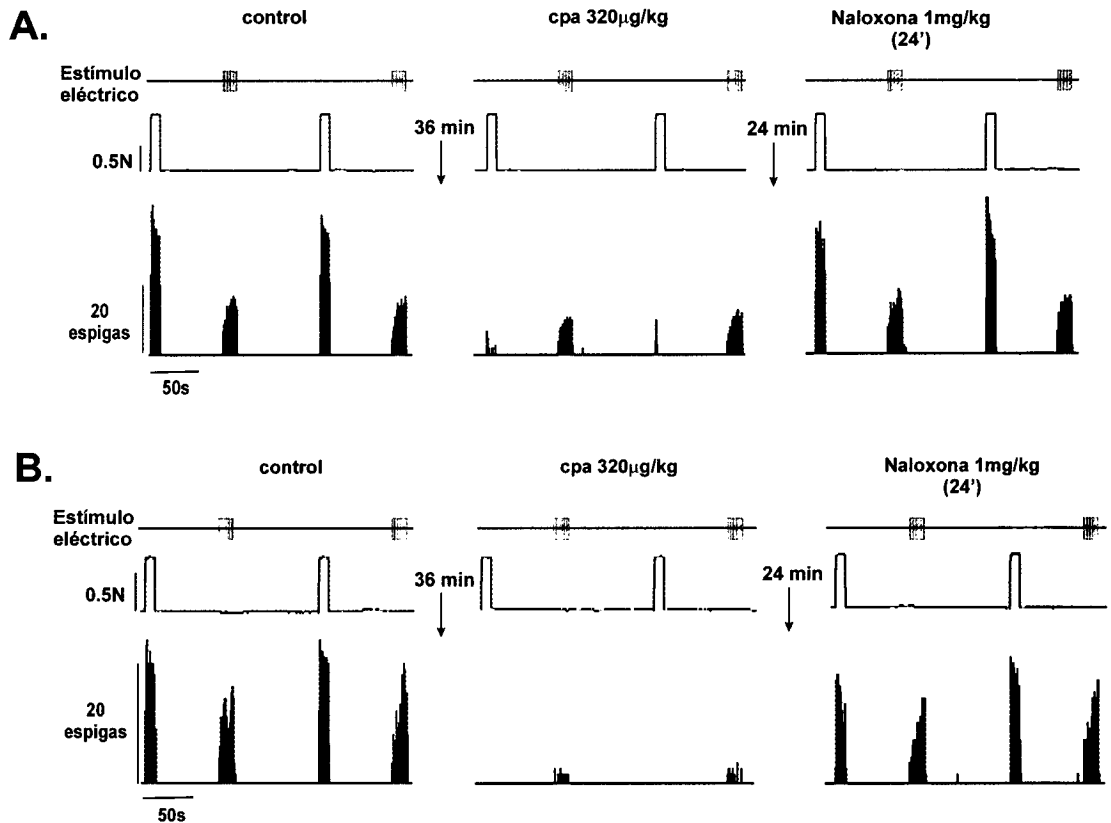
### **II.4.a Respuestas a la estimulación mecánica nociva. Recuperación del efecto de CPA después de la administración de CPT o naloxona.**

Como observamos previamente en nuestro laboratorio (Ramos-Zepeda y Herrero, 2004), la CPA fue muy efectiva inhibiendo las respuestas a la estimulación mecánica de UMAs tanto en animales intactos ( $18\pm 7\%$ ,  $p<0.01$ , Figuras II.1 y II.2) como en animales *sham-espinalizados* ( $4\pm 2\%$ ,  $p<0.01$ , Figuras II.1 y II.2) pero no fue así en animales espinalizados ( $91\pm 20\%$ ; los datos no se muestran en las Figuras), demostrado que la actividad antinociceptiva de la CPA administrada por vía sistémica en reflejos nociceptivos mediados por la médula espinal requiere las conexiones supraespinales. Debido a que la CPA no fue efectiva en animales

espinalizados, decidimos estudiar la reversión del efecto de CPA por el CPT y la naloxona en animales intactos y *sham-espinalizados*. La acción inhibitoria de la CPA duró al menos 45 min (ver capítulo I para más detalles). La administración de dosis equivalentes de vehículo, usando el mismo protocolo que para CPA (n=3), no causó ningún cambio significativo en las respuestas a estimulación mecánica nociva ( $107\pm 13$  % de la respuesta control, con la dosis más alta, los datos no se muestran en las Figuras). Como en estudios previos, la administración del antagonista de los receptores A1 CPT en animales intactos produjo una completa reversión de la inhibición de las respuestas aproximadamente en el 50 % de las unidades estudiadas, con un efecto máximo entre 24 a 30 min después de su administración. En el otro 50 % de unidades fue menos efectivo observándose únicamente una recuperación de las respuestas a los 24 y 30 min de  $20\pm 7$  y  $37\pm 17$  % de la respuesta control respectivamente (Figura II.2). Sin embargo, en animales *sham-espinalizados*, no se observó ninguna reversión significativa del efecto de CPA (Figura II.2) y el máximo número de respuestas ( $32\pm 11$  %) se observó 24 min después de la administración de CPT.

El antagonista no selectivo de los receptores opioides naloxona, a dosis de 1 mg/kg, produjo una reversión completa de la inhibición de las respuestas mediadas por CPA en animales intactos y *sham-espinalizados*. Los datos de estos experimentos se muestran en la figura II.2, mientras que un registro original se muestra en la figura II.1. Una recuperación significativa fue observada en animales intactos 18 min después de la administración de naloxona ( $75\pm 15$  %,  $p<0.01$  vs. el efecto de CPA) y una reversión completa se observó 24 min después de su administración en animales intactos ( $95\pm 18$  %,  $p<0.01$ ; y en *sham-espinalizados*  $82\pm 13$  %,  $p<0.01$  vs. el efecto

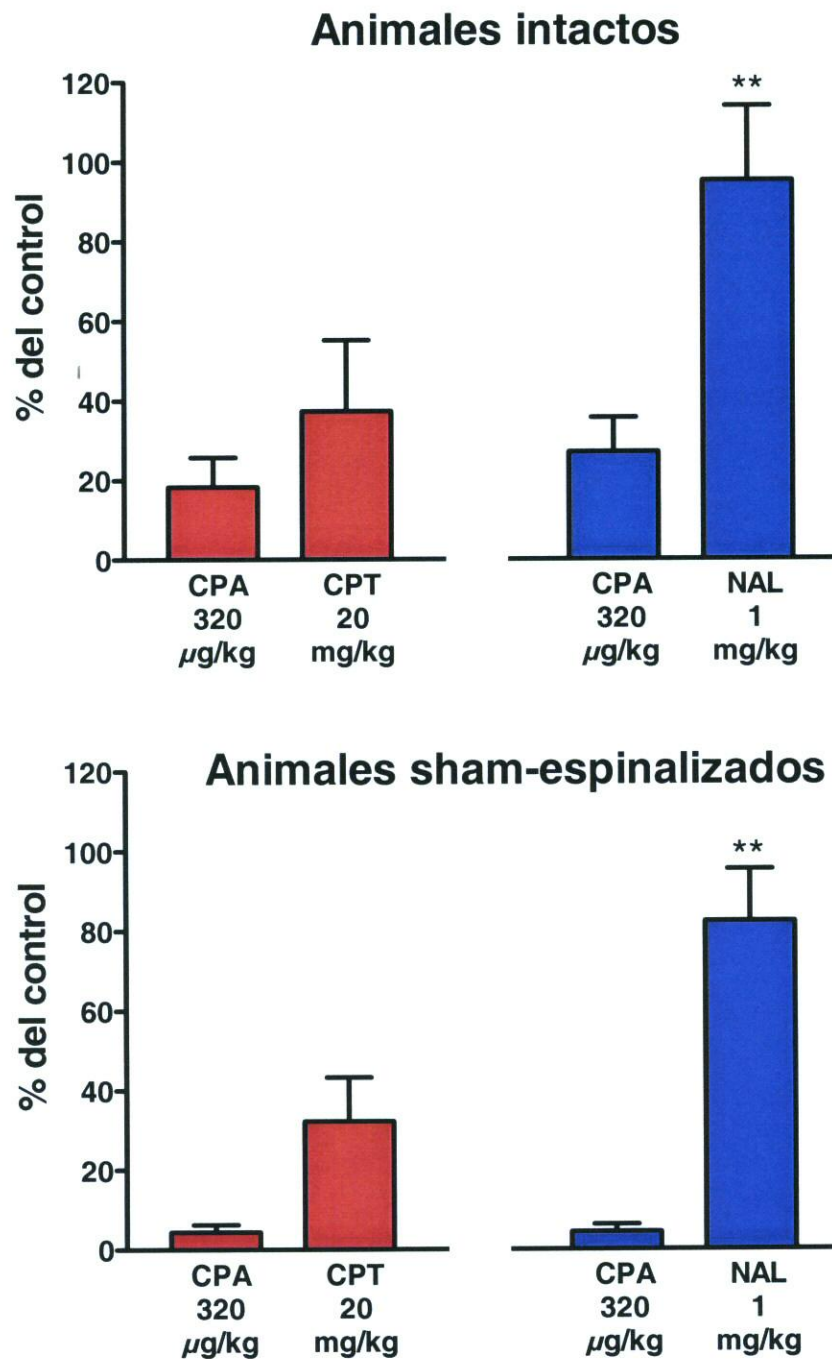
## Recuperación del efecto de la CPA con naloxona



**Figura II.1.** La figura representa un registro original de una UMA, y la recuperación del efecto de la CPA con naloxona. (A) animales intactos, (B) animales *sham-espinalizados* con inflamación.

de CPA). El efecto no fue inmediato, en contraste con el efecto inmediato observado por naloxona en la inhibición de las respuestas nociceptivas mediadas por opiáceos en experimentos similares (Herrero y Headley, 1991). Sin embargo, el tiempo que tardó en recuperarse fue similar al observado en aquellas unidades en las que fue efectivo el CPT (Ramos-Zepeda et al., 2004).

Reversión del efecto de la CPA por CPT y naloxona  
(estimulación mecánica)



**Figura II.2.** Recuperación del efecto de la CPA por el CPT y naloxona en respuestas a estimulación mecánica nociva, en animales intactos y *sham-espinalizados* con inflamación. \*\*  $p < 0.01$ , comparación estadística con el análisis de la varianza de una vía ANOVA y post test de Dunnett.

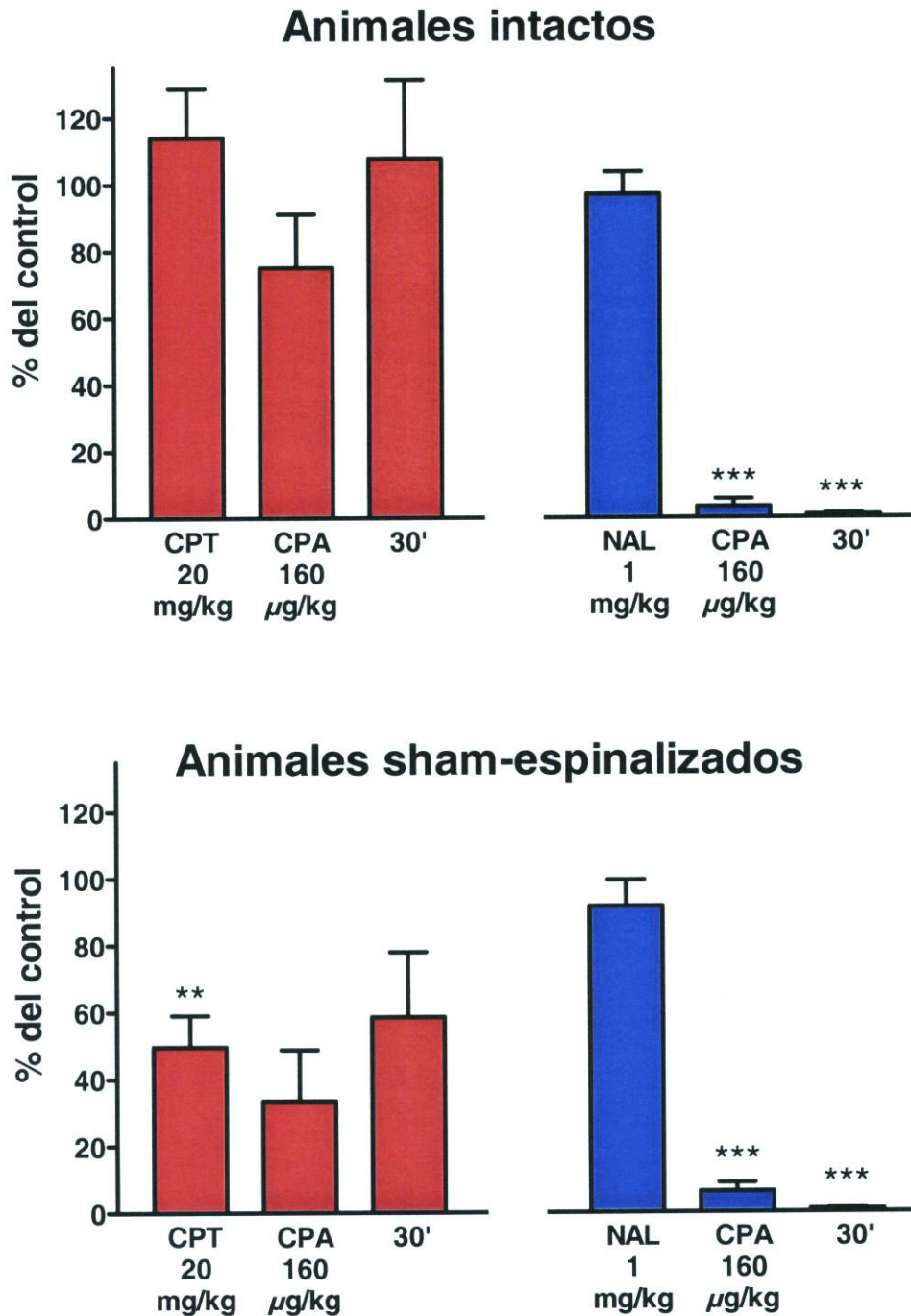
#### II.4.b Respuestas a la estimulación mecánica nociva. Prevención del efecto de la CPA por la administración previa de CPT o naloxona.

La reversión del efecto de la CPA por naloxona puede ser resultado de una actividad directa de la CPA sobre los receptores opioides. Pero hay sin embargo otras posibilidades, como por ejemplo un mecanismo de acción común compartido por los receptores de adenosina y opioides (como lo sugirió Aley y Levine en 1997), o incluso una actividad excitadora provocada por la naloxona debido a la liberación de un control endógeno mediado por opioides (como lo sugirió Hartell y Headley en 1991). Para descartar una posible interacción directa de los antagonistas con el receptor A1 de adenosina, así como también para descartar un efecto de la naloxona por sí misma sobre las respuestas nociceptivas de la médula espinal, es decir, un control tónico opioide endógeno, estudiamos la actividad de CPT y naloxona previo a la administración de una sola dosis de 160 µg/kg de CPA.

El CPT en dosis acumulativa de 20 mg/kg y tras 30 min de observación, no modificó significativamente las respuestas de UMAs a estimulación mecánica nociva en animales intactos ( $114 \pm 14$  %, Figura II.3). Sin embargo, redujo significativamente las respuestas en animales *sham-espinalizados* ( $58 \pm 11$  % con la dosis de 10 mg/kg,  $p < 0.01$  y  $49 \pm 9$  % con la dosis acumulativa de 20 mg/kg,  $p < 0.01$ , Figura II.3), sugiriendo un control tónico endógeno supraespinal mediado por el receptor A1 de adenosina y activado por la cirugía relacionada con la médula espinal.

En animales intactos y *sham-espinalizados* la administración de CPA 30 min después de CPT no modificó significativamente las respuestas de las

Efecto de la CPA en presencia de CPT o naloxona (estimulación mecánica)



**Figura II.3.** Prevención del efecto de la CPA por el CPT y la naloxona en respuestas a estimulación mecánica nociva, en animales intactos y *sham-espinalizados*. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  comparación estadística con el análisis de la varianza de una vía ANOVA y post test de Dunnett.



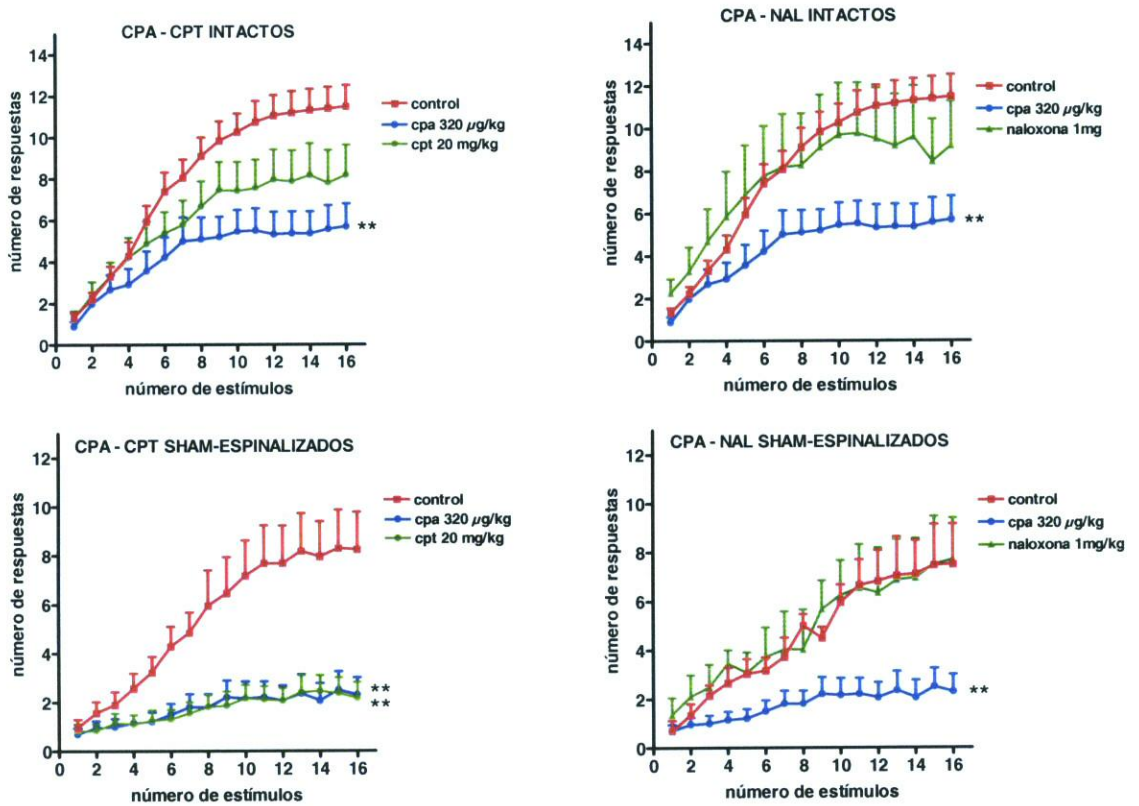
UMAs tras la administración del CPT (Figura II.3). Sólo una pequeña reducción no significativa fue observada en animales intactos ( $75 \pm 15$  % de las respuestas control), y esa pequeña reducción remitió a los 30 min de la administración de la CPA (Figura II.3). Estos datos muestran un esperado antagonismo del efecto antinociceptivo mediado por la CPA por CPT.

El antagonista opioide naloxona, cuando se inyectó a una dosis de 1 mg/kg no modificó las respuestas de las UMAs a estimulación mecánica nociva tanto en animales intactos como en *sham-espinalizados* (Figura II.3). Sin embargo, la administración de una sola dosis de 160  $\mu$ g/kg de CPA en presencia de la naloxona inhibió completamente la actividad de las UMAs en ambos grupos de animales: animales intactos  $3 \pm 2$  %,  $p < 0.001$ ; *sham-espinalizados*  $6 \pm 2$  %,  $p < 0.001$  (Figura II.3), demostrando una falta de interacción directa entre la CPA y el receptor opioide. La inhibición de las respuestas se mantuvo durante al menos 30 minutos (Figura II.3).

#### **II.4.c Respuestas a estimulación eléctrica repetitiva (*wind-up*). Recuperación del efecto de CPA tras la administración de CPT o naloxona.**

De forma similar al efecto sobre las respuestas a estimulación mecánica, se observó una reducción dosis dependiente del *wind-up* tras la administración intravenosa de CPA en animales intactos y *sham-espinalizados* (Figuras II.2 y II.4) pero no en animales espinalizados (Ramos-Zepeda et al., 2004; los datos no se muestran en las Figuras). Asimismo, la administración de dosis equivalentes de vehículo ( $n=3$ ) no provocó ningún cambio significativo en las respuestas evocadas por estimulación eléctrica (los datos no se muestran).

## Reversión del efecto de la CPA por CPT y naloxona (Wind-up)



**Figura II.4.** Reversión del efecto de la CPA por la administración del CPT y la naloxona, en respuestas a estimulación eléctrica repetitiva de alta intensidad (*wind-up*), en animales intactos y *sham-espinalizados*. \*\*  $p < 0.01$  comparación estadística con el análisis de la varianza de una vía ANOVA y post test de Dunnett.

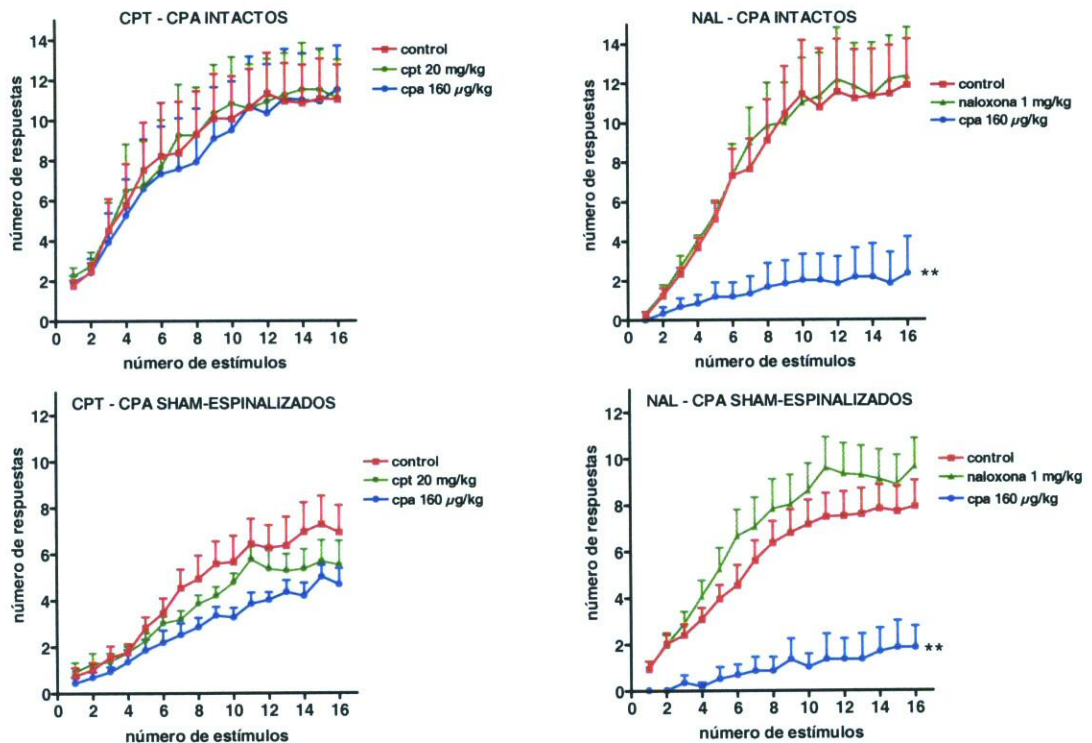
La administración del antagonista del receptor A1 de adenosina CPT no produjo ninguna reversión del efecto de CPA en animales intactos y *sham-espinalizados* (Figura II.4). El antagonista del receptor opioide naloxona, sin embargo, indujo una completa reversión del efecto de CPA sobre el *wind-up* en animales intactos y *sham-espinalizados* (Figuras II.2 y II.4). Como en las respuestas a estimulación mecánica nociva, la reversión del efecto fue progresiva y el pico para una recuperación completa fue de 24 min después de la administración del antagonista, un tiempo en el cual la

inhibición del *wind-up* permanecía totalmente inhibido después de la administración de la CPA sola (Ramos-Zepeda et al., 2004).

#### II.4.d Respuestas a estimulación eléctrica o *wind-up*. Prevención del efecto de CPA por la administración previa de CPT o naloxona.

El CPT por sí mismo no modificó significativamente el fenómeno de *wind-up* en animales intactos y *sham-espinalizados* (Figura II.5). En presencia de CPT, la CPA no fue capaz de suprimir el *wind-up* tanto en animales intactos como en *sham-espinalizados*, sugiriendo que el CPT antagonizó directamente el sistema del receptor A1 de adenosina (Figura II.5).

#### Efecto de la CPA en presencia de CPT y naloxona (Wind-up)



**Figura II.5.** Prevención del efecto de la CPA por la administración del CPT y la naloxona, en respuestas a estimulación eléctrica repetitiva de alta intensidad (*wind-up*), en animales intactos y *sham-espinalizados*. \*\* p < 0.01 comparación estadística con el análisis de la varianza de una vía ANOVA y post test de Dunnett.

El antagonista del receptor opioide naloxona, no indujo por sí mismo ninguna variación sobre el *wind-up*, tanto en animales intactos como en *sham-espinalizados* (Figura II.5). De forma similar a lo observado en la estimulación mecánica nociva, la CPA inhibió completamente el *wind-up* en presencia de naloxona (Figura II.5), sugiriendo una falta de interacción directa de la CPA con el receptor opioide bajo las presentes condiciones experimentales.

### II.5 DISCUSIÓN

Hemos observado en nuestro primer estudio que el agonista del receptor A1 de la adenosina, CPA, era un agente antinociceptivo muy potente en la preparación *in vitro* de médula espinal hemiseccionada de ratas recién nacidas (Ramos-Zepeda et al., 2004). En animales adultos, sin embargo, la CPA fue efectiva sólo en animales con la médula espinal intacta, indicando que la modulación supraespinal es esencial para que la CPA induzca una actividad analgésica en el animal completamente desarrollado. La actividad antinociceptiva de CPA en los presentes experimentos fue muy similar a la observada en nuestros estudios previos (Ramos-Zepeda et al., 2004). La CPA fue un potente y efectivo agente antinociceptivo en animales intactos y *sham-espinalizados*, pero no en animales espinalizados. Asimismo, el antagonista selectivo del receptor A1 de adenosina CPT fue sólo capaz de antagonizar el efecto de la CPA en la mitad de las unidades estudiadas en animales intactos, y solo en respuestas a estimulación mecánica nociva, pero no en el *wind-up*. En animales *sham-espinalizados*, el CPT no revirtió ninguno de los efectos inducidos por la administración de CPA. Esto sugiere que la CPA no es un agente selectivo de los receptores A1 de adenosina o que la activación de estos receptores provoca la activación de otros sistemas independientes de la acción del CPT.

La principal observación hecha en el presente estudio es que la administración de naloxona, revirtió completamente la actividad de CPA en respuestas a estimulación mecánica nociva y sobre el *wind-up*, y que este efecto fue observado tanto en animales intactos como en *sham-espinalizados*. Esto indica que la CPA está interactuando con el sistema

opioide y que su efecto antinociceptivo quizás sea el resultado de la activación de los receptores opioides. Para apoyar esta observación se han sugerido interacciones entre el sistema de adenosina y el opioide en muchos estudios. La adenosina y sus análogos por ejemplo, aumentan la actividad antinociceptiva de la morfina (Ahlijanian y Takemori, 1985; Contreras et al., 1990). Opiáceos como la morfina aumentan la liberación endógena de adenosina tanto en preparaciones *in vivo* como *in vitro* (Sweeney et al., 1987a y b) implicando a los receptores  $\mu$ -opioides (Cahill et al., 1995; Sawynok y Liu 2003). Hay, sin embargo, dos cuestiones que deben ser tomadas en consideración. La primera, que existe la posibilidad de que la CPA no esté interactuando únicamente con los receptores A1 de adenosina, sino que también lo haga con otros sistemas, como los receptores opioides. Esto no parece probable de acuerdo con el gran número de referencias que existen en la literatura que indican una gran selectividad de la CPA por los receptores A1 de adenosina (Jacobson et al., 1992; Ralevic y Burnstock, 1998). Segundo, la reversión de naloxona suele ser muy rápida, la reversión completa del efecto de la morfina o de los agonistas de los receptores  $\kappa$  puede ser observada en los registros de UMAs en tres a seis minutos, siguiendo un protocolo similar al observado en los presentes experimentos (Herrero y Headley, 1991). La acción antagonista inducida por la naloxona en este estudio tuvo un pico de 18 a 24 minutos después de su administración y aunque este tiempo es similar al observado con CPT en aquellas unidades en las cuales fue activo, esto no corresponde al comienzo rápido de la acción de la naloxona observado en otros experimentos.

Una posible explicación para esta observación es que la recuperación del efecto antinociceptivo mediado por CPA, observado por la administración de naloxona, no fuera debida a una acción directa de la CPA sobre los receptores opioides, ni a una acción del antagonista sobre los receptores A1 de adenosina. Es posible especular que la reversión del efecto de la CPA por la naloxona, sea debida a que hubo una activación secundaria de los receptores opioides desencadenada por la acción de la CPA sobre los receptores A1 de adenosina, o incluso a una inhibición del mecanismo de acción que desencadena el receptor A1 de adenosina y que es compartida con el receptor opioide (ver debajo). Esto también explicaría la falta de

reversión del efecto de la CPA por el CPT. Si cualquiera de estas posibilidades fuera correcta, la naloxona no sería capaz de prevenir el efecto de la CPA, mientras que la inactivación del receptor A1 de adenosina por CPT prevendría de cualquier efecto mediado por la CPA. Nosotros intentamos confirmar esta hipótesis con una segunda serie de experimentos, estudiando la posible prevención del efecto de CPA por el CPT y la naloxona. Los resultados observados parecen confirmar la hipótesis.

La administración de CPT no aumentó las respuestas nociceptivas de las UMAs por sí sólo, tanto en animales intactos como animales espinalizados, mostrando que cualquier posible reversión de la inhibición de la CPA no fue confundida con un efecto excitador inducido por el CPT por sí mismo. Sin embargo, en animales *sham-espinalizados* produjo una significativa e inexplicable depresión de las respuestas a estimulación mecánica, que no se observó en el *wind-up*. No obstante, el efecto observado con CPT fue una reducción de las respuestas y, si cabe, esto habría potenciado una depresión de las respuestas mediado por la CPA. Sin embargo, nunca observamos un efecto de la CPA en presencia del CPT, y desde luego una depresión adicional de las respuestas no se observó en animales *sham-espinalizados*. Los resultados están de acuerdo con una interacción específica del CPT con el receptor A1 de adenosina, dando como resultado una prevención del efecto de CPA. También de acuerdo con nuestra hipótesis está la observación de que la naloxona no previno el efecto de CPA, indicando una falta de interacción directa de la CPA con los receptores opioides. Una falta de efecto similar ha sido observada cuando los antagonistas del receptor opioide eran inyectados previo o junto con la CPA u otros agonistas del receptor A1 de adenosina (DeLander y Hopkins, 1986; Aley y Levine, 1997; Borghi et al., 2002). Por lo tanto, nuestros resultados ofrecen la primera evidencia *in vivo* de que los sistemas opioides y de adenosina están ligados en la generación de la antinocicepción mediada a nivel central y que esta conexión puede ser debida quizás a un mecanismo de acción intracelular común.

El *wind-up* es un fenómeno mediado por el sistema nervioso central y se define como una progresiva facilitación dependiente de la frecuencia de las respuestas de la médula espinal observada con la aplicación de

estímulos eléctricos constantes y repetitivos (ver Herrero et al., 2000). Los resultados observados en nuestros experimentos sugieren una clara acción central de la CPA y la naloxona, ya que sus efectos fueron similares en las respuestas a estimulación mecánica nociva y en el fenómeno de *wind-up*. Se ha sugerido una interacción entre receptores opioides  $\mu$ ,  $\alpha_2$ -adrenoceptores y receptores A1 de adenosina en lugares periféricos (Aley y Levine, 1997). En ese estudio, el efecto intradérmico de CPA no fue antagonizado por la administración previa de naloxona. Esto concuerda con nuestras observaciones, aunque en este y otros estudios una reversión del efecto de CPA por la administración subsecuente de naloxona no fue estudiado. También es posible que la interacción de los receptores opioides  $\mu$  y receptores A1 de adenosina ligados a los  $\alpha_2$ -adrenoceptores (Aley y Levine, 1997) sólo ocurra en la periferia, mientras que la configuración que tienen los receptores en el sistema nervioso central no necesitan la presencia del receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico. De hecho, en estudios de comportamiento, las metilxantinas por vía intratecal inhiben la analgesia inducida por la morfina vía i.c.v. (DeLander y Hopkins, 1986; Suh et al., 1997) sin que aparentemente este implicado el sistema  $\alpha_2$ -adrenérgico.

Los resultados obtenidos en el presente estudio dan lugar a las siguientes conclusiones:

## **II.6 CONCLUSIONES**

1. La actividad antinociceptiva de la CPA es prevenida pero no revertida por el antagonista del receptor A1 de la adenosina CPT.
2. La actividad de la CPA es revertida pero no prevenida por el antagonista opioide naloxona.
3. La actividad antinociceptiva mediada por el receptor A1 de adenosina podría estar ligada a una activación secundaria de los receptores opioides en animales adultos con inflamación.



## **CAPÍTULO III**

**III. Aumento del *wind-up* por la administración combinada de los ligandos del receptor A1 en ratas con inflamación inducida por carragenina.**

### III.1 OBJETIVOS

1. Determinar si el sistema de adenosina está implicado en la modulación del *wind-up*.
2. Estudiar la relación del sistema de la adenosina con la depresión de las respuestas observada del *wind-up* tras la espinalización.
3. Conocer el efecto que provoca la administración del antagonista de los receptores A1 de adenosina al administrarlo en animales espinalizados sólo, combinado con su agonista, y su relación con el antagonista opiode naloxona.

### III.2 INTRODUCCIÓN

Como hemos visto, la adenosina es un agente antinociceptivo efectivo, cuyas acciones han sido localizadas en las neuronas de la médula espinal, principalmente a través del receptor A1 de adenosina (Lee y Yaksh, 2001; Reeve y Dickenson, 1995; Sawynok y Liu, 2003). Este receptor se encuentra altamente concentrado en neuronas de la médula espinal (Geiger et al., 1984) y está situado pre y post sinápticamente (Haas y Selbach, 2000; Lao et al., 2001; Li y Perl, 1994; Santicioli et al., 1993). Los receptores A1 de adenosina están presentes en la mayor parte de áreas del cerebro (Ribeiro et al., 2003) y la inhibición de la actividad supraespinal por el sistema A1 de la adenosina ha sido sugerida por electroencefalografía (Fulga y Stone, 1998) y otras técnicas (Uchimura y North, 1991). En los capítulos anteriores pudimos observar que el agonista selectivo del receptor A1 N6-ciclopentil adenosina (CPA) fue un fármaco antinociceptivo muy efectivo en ratas adultas con la médula espinal intacta, pero no en animales espinalizados. Esta observación nos indica que la principal acción de la CPA administrada en forma sistémica en ratas adultas está localizada a nivel supraespinal, o al menos, que la antinocicepción producida por la CPA administrada de forma sistémica, requiere la presencia de las modulaciones supraespinales en preparaciones en las que se usa el animal completo con inflamación inducida con carragenina. Además, nuestros experimentos demostraron que el efecto antinociceptivo era más intenso en animales *sham-espinalizados*, indicando un aumento mediado por la cirugía de los sistemas inhibidores descendentes en el que está implicado el receptor A1 de adenosina. Un fenómeno similar también está descrito tras la administración de algunos opiáceos (Herrero y Headley, 1991).

La CPA también fue efectiva reduciendo el *wind-up* (Ramos-Zepeda et al., 2004; Reeve y Dickenson, 1995; Suzuki et al., 2000), el cual es un fenómeno mediado a nivel central y que ha sido definido como una progresiva y frecuencia-dependiente facilitación de las respuestas de las neuronas de la médula espinal, observada tras la aplicación de estímulos eléctricos constantes y repetitivos. Este es un fenómeno que comparte algunos mecanismos comunes con la sensibilización central y es mediado

por los receptores de NMDA y NK1 (Davies y Lodge, 1987; Dickenson et al., 1987), aunque otros sistemas están implicados en su generación y mantenimiento (ver Herrero et al., 2000). Aunque el *wind-up* es un fenómeno mediado por la médula espinal, está muy influenciado por los sistemas moduladores descendentes, especialmente en situaciones de sensibilización (Herrero y Cerveró, 1996a y b), y el nivel de respuestas del *wind-up* es mucho menor en animales espinalizados que el observado en animales con la médula espinal intacta (Herrero y Cerveró, 1996a).

Debido a que no hay ningún dato sobre la posible implicación del sistema endógeno de adenosina A1 sobre el *wind-up*, decidimos estudiar el efecto del antagonista del receptor A1 de adenosina 8-ciclopentil-1,3-dimetil xantina (CPT) en presencia y ausencia del agonista del receptor A1 CPA, sobre la actividad de unidades motoras aisladas, en ratas espinalizadas con inflamación inducida por carragenina. Debido a la implicación de los opioides en el control endógeno y a la interacción sugerida entre el sistema opioide y de adenosina (Aley y Levine, 1997; Sweeney et al., 1987), también estudiamos el efecto de la administración combinada de naloxona y los ligandos de adenosina en la misma preparación.

### III.3 MATERIAL Y MÉTODOS

#### III.3.a Protocolo de estimulación, sistema de registro, grupos experimentales y cirugía preparatoria

En la tabla III.1 se muestran los distintos grupos experimentales y los protocolos de administración de los fármacos. En la primera serie de experimentos, estudiamos el efecto del agonista selectivo del receptor A1 de adenosina, CPA, seguido de la administración del antagonista selectivo CPT (n=6) y el efecto del CPT seguido de la administración de la CPA (n=6) en animales espinalizados. En una segunda serie de experimentos, estudiamos el efecto del antagonista no selectivo de los receptores opioides naloxona, seguido de la administración del CPT y la CPA, en animales intactos (n=6), *sham-espinalizados* (n=6) y animales espinalizados (n=7).

**Tabla III.1.** Grupos experimentales y protocolos de administración de los fármacos.

Grupos	n	1er fármaco	Tiempo (min)	2do fármaco	Tiempo (min)	3er fármaco	Tiempo (min)	Estimulación (ciclos 3min)
E	6	CPA	6	CPT	30	---	---	M-WU
E	6	CPT	30	CPA	30	---	---	M-WU
I	6	NAL	24	CPT	30	CPA	30	M-WU
SH	6							
E	7							

El efecto de la CPA combinado con CPT y el efecto del CPT seguido de la CPA fue estudiado en dos grupos de animales espinalizados (E); también se estudió el efecto del antagonista no selectivo de los opioides naloxona (NAL) seguido de la administración de la CPA y el CPT en animales intactos (I), *sham-espinalizados* (SH) y espinalizados.

Los experimentos fueron realizados en ratas macho Wistar de entre 250-330 g. La cirugía de preparación y la evolución de inflamación se realizaron según la descripción detallada en el capítulo de métodos. Como en los experimentos anteriores el nivel de anestesia se mantuvo con  $\alpha$ -clorosa (Sigma; 50 mg/kg para inducción y 20 mg/kg/h por bomba de perfusión para mantenimiento). Después de la preparación se dejó a los animales intactos y *sham-espinalizados* descansar durante al menos una hora, y dos horas a los animales espinalizados antes de iniciarse el experimento. La presión arterial se monitorizó constantemente durante todo el experimento y se mantuvo por encima de 100 mmHg antes de la administración de los fármacos.

El registro de unidades motoras aisladas activadas por estímulos nocivos y registradas como reflejo de retirada, ha sido descrito con detalle en el capítulo de métodos. Tal y como allí se describe, se alternaron estímulos mecánicos y eléctricos (generando el fenómeno de *wind-up*) en ciclos de tres minutos de duración.

### III.3.b Fármacos, protocolo de administración y análisis de datos

La CPA, el CPT y la naloxona se prepararon y administraron siguiendo el mismo protocolo descrito en el capítulo anterior.

Los datos fueron expresados como porcentaje del control, siendo el control la media de las respuestas de los tres ciclos previos a la administración de la primera dosis del fármaco. El análisis cuantitativo se basó en el conteo de las espigas evocadas durante los dos ciclos de administración entre cada dosis. Los datos de la estimulación eléctrica se analizaron contando el número de espigas evocadas entre 150 y 650 ms después de cada estímulo (respuestas de fibras C; Herrero y Cerveró, 1996a y b). El protocolo para la estimulación y la recolección de datos se realizó por medio de un ordenador usando el programa comercial (CED, UK; Spike 2).

Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en datos agrupados usando programas comerciales (GraphPad-Prism and GraphPad-Instat for Windows). Se usaron las pruebas para el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) con un post-test de Dunnett para la comparación entre la estimulación mecánica y el control, y para el análisis de las curvas de *wind-up*. Los datos se presentan como la media  $\pm$  e.e.m.

## III.4 RESULTADOS

### III.4.a Efecto de la administración combinada de CPA seguida de CPT en animales espinalizados

Como se indicó en el capítulo I, la CPA no inhibió las respuestas de UMAs en respuestas a estimulación mecánica nociva en animales espinalizados ( $91 \pm 20$  %; Figura III.1A), demostrando así que la actividad antinociceptiva de la CPA administrada de forma sistémica requiere conexiones supraespinales. El CPT en una dosis acumulativa de 20 mg/kg, no modificó significativamente las respuestas a estimulación mecánica nociva en animales espinalizados cuando se administró en presencia de la CPA ( $105 \pm 8$  %; Figura III.1A).

La administración de CPA produjo un ligero aumento de la curva del *wind up* en animales espinalizados que no fue significativo (Figura III.1B). La

administración de CPT en presencia de la CPA sin embargo, provocó un aumento significativo de las respuestas del *wind-up* con las dosis de 10 mg/kg ( $p < 0.01$ ) y 20 mg/kg ( $p < 0.01$ ; Figura III.B). El efecto excitador del CPT en presencia de la CPA aumentó el nivel de saturación de la curva del *wind-up* de los animales espinalizados al nivel observado en registros de control en animales intactos.

### **III.4.b Efecto de la administración combinada de CPT seguido de la administración de la CPA en animales espinalizados**

El CPT no tuvo efecto al ser administrado por sí mismo (Figura III.2A), ya que no se observó ninguna modificación de las respuestas a estimulación mecánica ( $94 \pm 7$  %, Figura III.2A). Sorpresivamente, observamos que la administración de la CPA en presencia del CPT provocó un aumento significativo de las respuestas de UMAs a estimulación mecánica ( $151 \pm 8$  % del control,  $p < 0.001$ ; Figura III.2A). Esto nos indica una actividad pronociceptiva de la CPA en presencia del CPT cuando las influencias supraespinales no están presentes en situación de sensibilización.

Como en las respuestas a estimulación mecánica, no observamos ningún efecto del CPT sobre el *wind-up* por sí mismo (Figura III.2B). Sin embargo, la CPA produjo un importante aumento de la curva del *wind-up* cuando se inyectó en presencia del CPT ( $p < 0.01$ ; Figura III.2B). El nivel de aumento de la curva de *wind-up* fue similar al observado por la administración del CPT en presencia de la CPA, y alcanzó un nivel de disparo similar al observado en registros realizados en animales intactos.

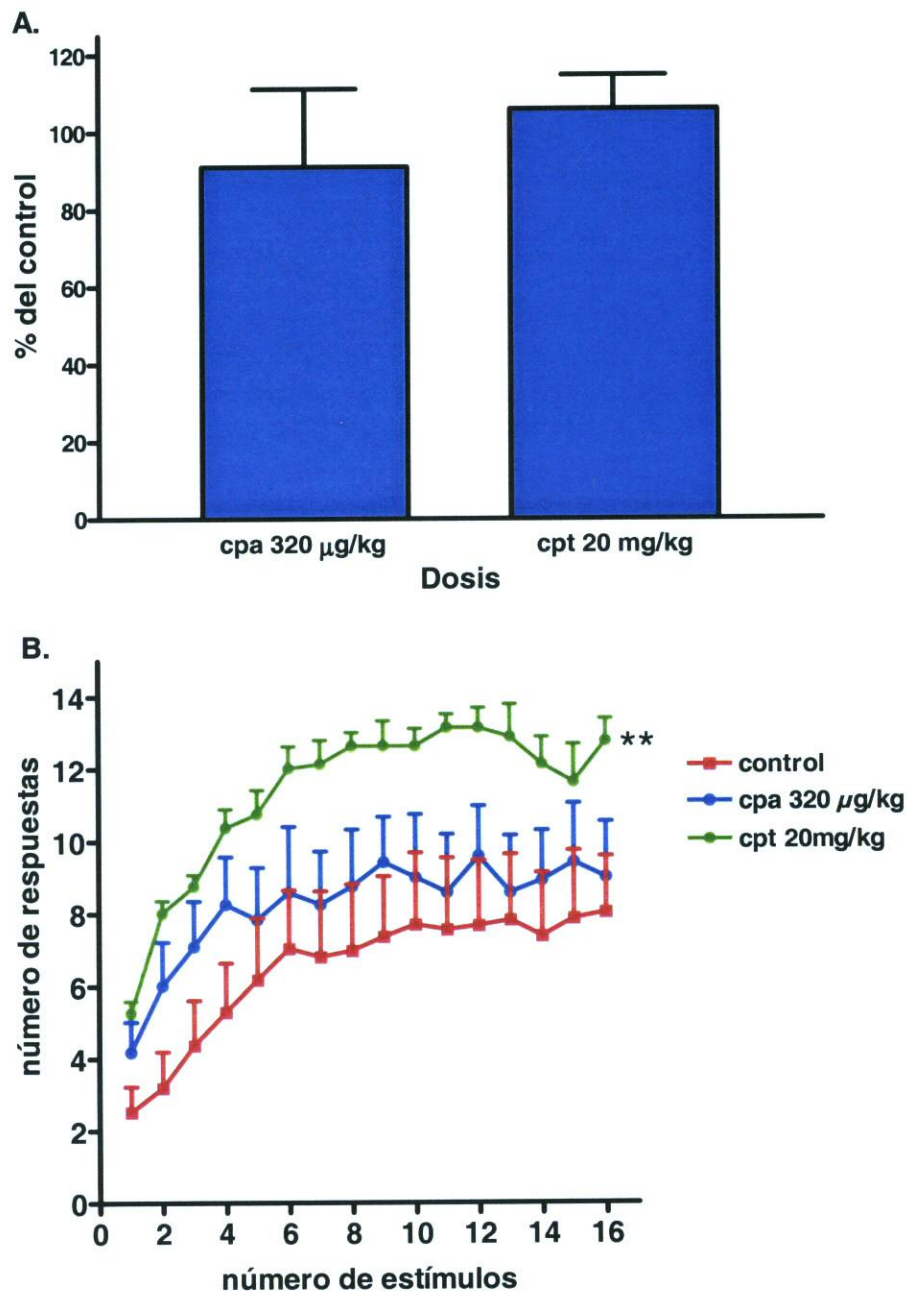
### **III.4.c Efecto de la administración combinada de naloxona, CPA y CPT**

Ha sido demostrado que la administración de naloxona aumenta la actividad nociceptiva de las UMAs en algunas preparaciones experimentales, como por ejemplo en animales espinalizados (Hartell y Headley, 1991), sugiriendo un control tónico endógeno mediado por los receptores opioides. Para evaluar si la administración de naloxona



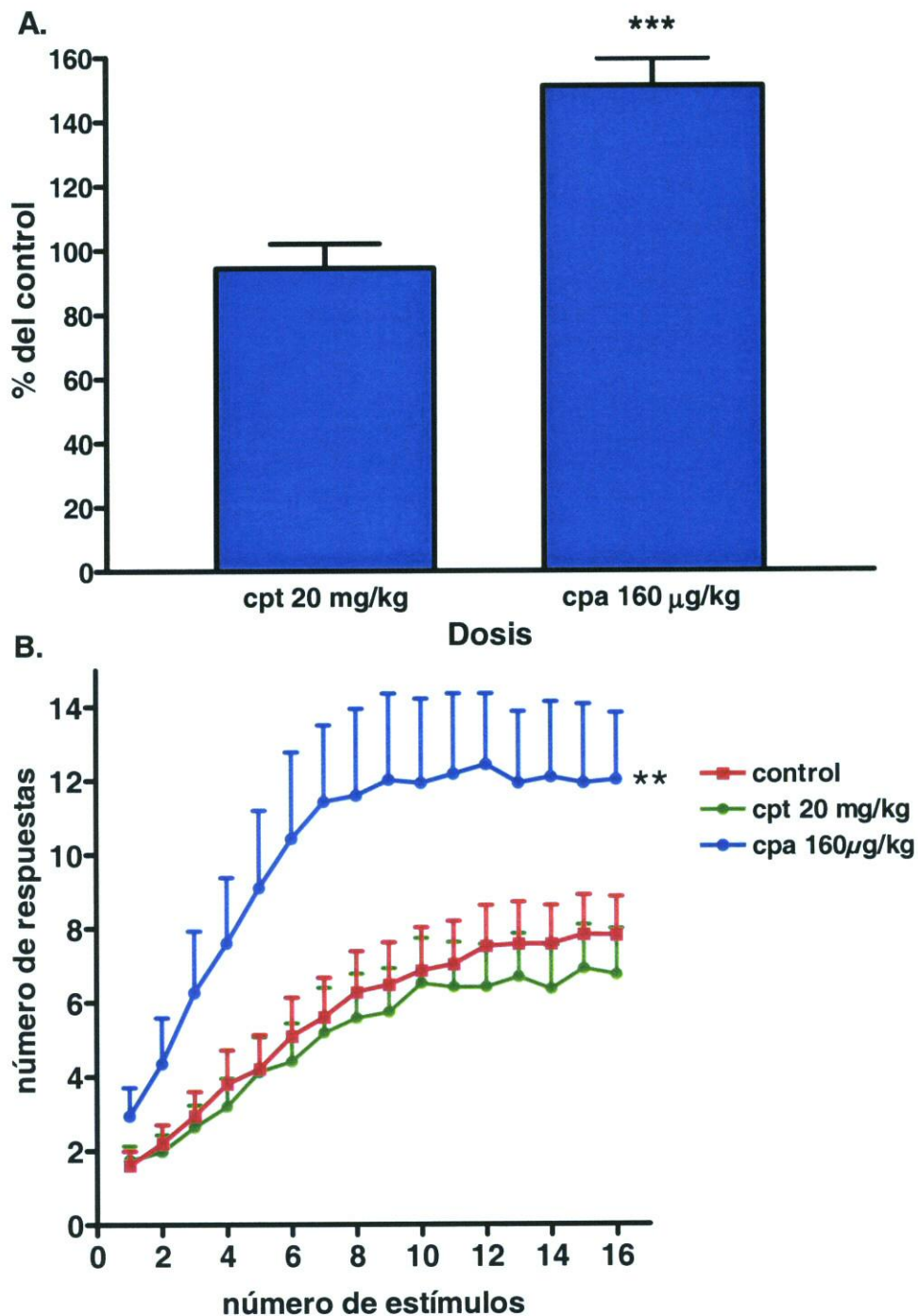
modificaría la actividad del CPT y la CPA, estudiamos la combinación de los tres fármacos en animales espinalizados, intactos y *sham-espinalizados*.

**Efecto de la administración combinada de CPA y CPT (animales espinalizados)**



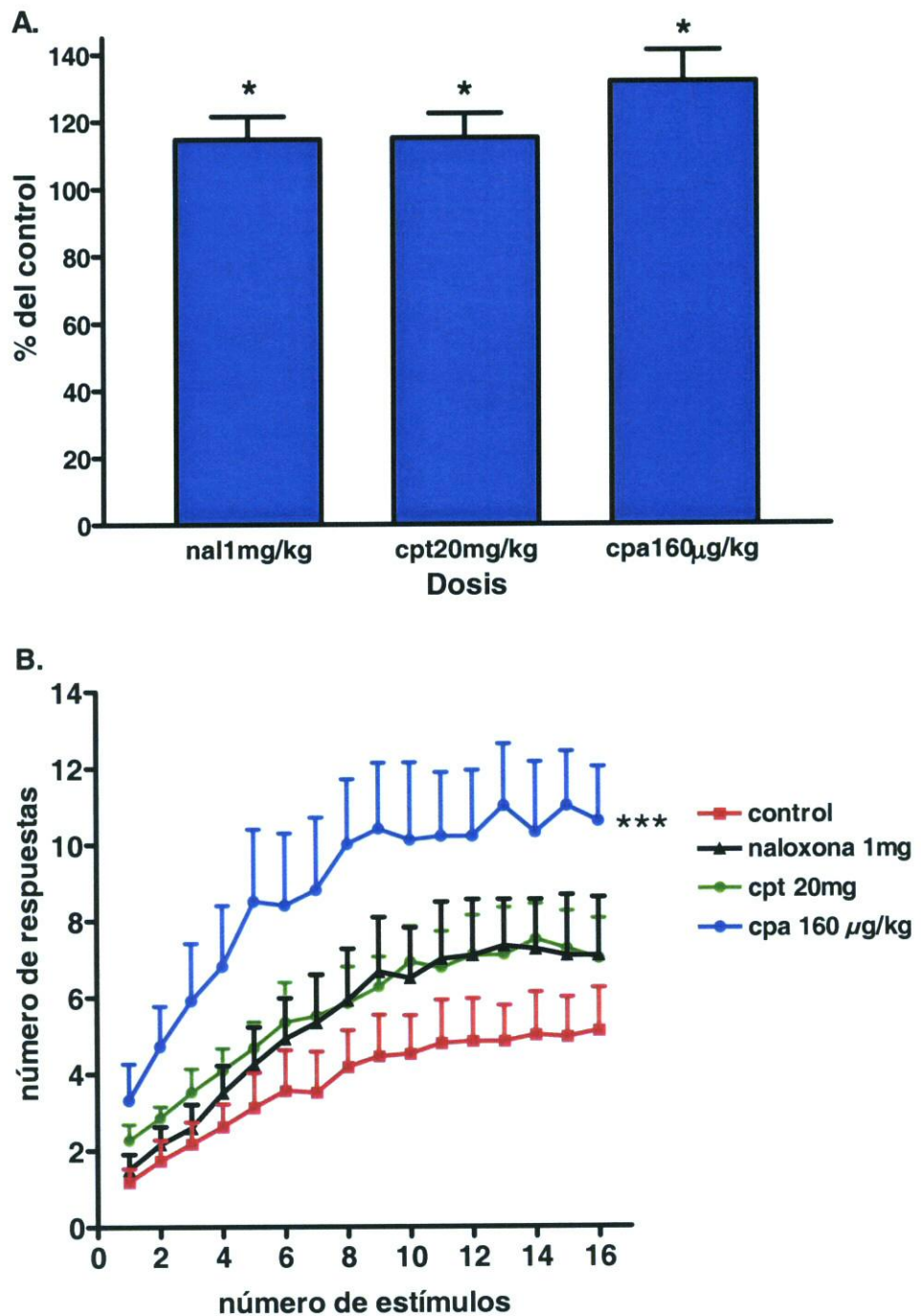
**Figura III.1.** Efecto de la administración sistémica de la CPA y el CPT en respuestas a estimulación mecánica (A) y *wind-up* (B) en animales espinalizados. La administración de CPT en presencia de la CPA no provocó ninguna modificación en las respuestas a estimulación mecánica (A), pero produjo un aumento del *wind-up* (B). \*\* p<0.01 vs. Control; comparación estadística con el análisis de la varianza de una vía ANOVA y post test de Dunnett.

Efecto de la administración combinada de CPT y CPA  
(animales espinalizados)



**Figura III.2.** Efecto de la administración sistémica del CPT y la CPA en respuestas a estimulación mecánica (A) y *wind-up* (B) en animales espinalizados. El CPT no tuvo efecto por sí mismo. Se observó un significativo aumento de las respuestas a estimulación mecánica (A) y del *wind-up* (B) cuando se administró la CPA en presencia del CPT. El nivel de saturación de la curva del *wind-up* aumentó a un nivel similar al observado en la figura 1 y en animales intactos. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Control; comparación estadística con el análisis de la varianza de una vía ANOVA y post test de Dunnett.

Efecto de la administración combinada de naloxona, CPT y CPA  
(animales espinalizados)



**Figura III.3.** Efecto de la administración sistémica de naloxona seguido de CPA y CPT en respuestas a estimulación mecánica (A) y *wind-up* (B) en animales espinalizados. La naloxona produjo un leve aumento de las respuestas a estimulación mecánica (A) y *wind-up* (B). La administración del CPT y la CPA no aumentó las respuestas a estimulación mecánica, pero sí aumentó el *wind-up* a un nivel similar al observado en las figuras 1 y 2. Comparación estadística como en la figura III.1; \* p<0.05, \*\*\*p<0.001 vs. control.

La naloxona administrada en dosis de 1 mg/kg, produjo un significativo aumento de las UMAs en respuestas a la estimulación mecánica en animales espinalizados ( $120 \pm 7$  %,  $p < 0.05$ ; Figura III.3A). La administración subsiguiente de CPT y CPA no aumentó estas respuestas (Figura III.3A). En animales intactos y *sham-espinalizados* no observamos ningún cambio significativo tras la administración de naloxona ( $83 \pm 7$  % y  $91 \pm 8$  % respectivamente). La administración de CPT y CPA en presencia de naloxona no modificó significativamente las respuestas en estos dos grupos de animales (los datos no se muestran).

En animales espinalizados, la administración de naloxona produjo un leve aumento de las respuestas (Figura III.3B), y aunque este aumento no fue significativo, se mantuvo al menos 24 minutos. El CPT administrado en presencia de la naloxona no modificó las respuestas. Sin embargo, la CPA administrada en presencia de la naloxona y el CPT produjo un aumento significativo del *wind-up* ( $p < 0.001$ ), similar al observado en la primera serie de experimentos en ausencia de naloxona (Figura III.3B). Como en respuestas a estimulación mecánica, la combinación de naloxona, CPT y CPA no modificó la curva del *wind-up* en animales intactos y *sham-espinalizados* (los datos no se muestran).

### III.5 DISCUSIÓN

La observación principal en este estudio es que mientras que la CPA y el CPT no fueron capaces de producir aumento del *wind-up* cuando se administraron solos, la combinación de los dos fármacos, en cualquier orden, provocó un importante aumento del *wind-up*. Este aumento no fue siempre paralelo al aumento de las respuestas a estimulación mecánica, indicando que es debido a una acción central, y no fue aumentado en forma adicional por la administración del antagonista opioide naloxona.

Como se ha indicado anteriormente, el *wind-up* es un fenómeno central claramente modulado por influencias supraespinales (Herrero y Cerveró, 1996a y b; Herrero et al., 2000). La saturación del *wind-up* en los presentes experimentos fue menor en animales espinalizados que en animales intactos, lo cual va de acuerdo con observaciones previas (Herrero

y Cerveró, 1996a, Ramos-Zepeda et al., 2004). Sin embargo, la administración de CPT después de la CPA sorpresivamente aumentó el *wind-up* a un nivel similar al observado en animales intactos. Esto sugiere que la espinalización reduce las influencias facilitadoras supraespinales (Herrero y Cerveró, 1996a), las cuales están mediadas por el sistema A1 de adenosina. De hecho, ha sido previamente demostrado que el CPT produce excitación de las respuestas presinápticas y postsinápticas, lo cual es compatible con una eliminación del tono endógeno de adenosina en las neuronas del hipocampo (Haas y Greene, 1988) y el tegmento laterodorsal (Arrigoni et al., 2001) En este último estudio se observó que el efecto del CPT resultaba de la modulación de la transmisión por glutamato. Esto apoya estudios previos que han demostrado una interacción entre la adenosina y el glutamato (Corradetti et al., 1984). Se sabe que el glutamato, ejerciendo su acción sobre los receptores NMDA (Davies y Lodge, 1987; Dickenson y Sullivan, 1987), es el principal sistema implicado en la generación del *wind-up* (Herrero et al., 2000), por lo que nos parece razonable deducir que el sistema de adenosina también modula la transmisión de glutamato en la médula espinal *in vivo*. Esta interacción ha sido sugerida también en preparaciones de médula espinal *in vitro* (Lao et al., 2001).

Cuando estudiamos el efecto del CPT por sí mismo, no observamos cambios en el *wind-up*, lo que indica una falta de control tónico específico mediado por adenosina del *wind-up*. Sin embargo, cuando la CPA se inyectó después del CPT observamos de nuevo el aumento del *wind-up*, y en este caso, también de las respuestas a estimulación mecánica, confirmando que es la combinación de los fármacos la responsable de la acción facilitadora, en vez de cualquiera de ellas administrada por separado. Es difícil evaluar por medio de los presentes experimentos el mecanismo de acción implicado en este aumento de la actividad. Se sabe que la hiperalgesia producto de la inflamación induce cambios en los nociceptores periféricos y también en la excitabilidad de las neuronas de la médula espinal, como consecuencia de la activación nociceptiva continua de las neuronas de la médula espinal. Durante estos estados hiperalgésicos, la excitabilidad de la médula espinal es controlada por mecanismos espinales y supraespinales (Besson y Chaouch, 1987; Herrero y Cerveró, 1996a). El aumento de la actividad de la

médula espinal por los ligandos de la adenosina observada en el presente estudio quizás refleje una compensación de la alteración en los sistemas descendentes provocada por la espinalización. Esta compensación podría ser el resultado de una acción de los ligandos como agonistas parciales sobre los receptores de adenosina, o incluso una interacción con los receptores de glutamato. Sin embargo, se requieren otros experimentos para asegurar esta hipótesis.

Otra posibilidad es que la facilitación observada quizás sea dependiente de una actividad combinada de la adenosina y los receptores opioides, como se ha demostrado en otros estudios (DeLander et al., 1986; Suh et al., 1997). De hecho, aunque muchos estudios han demostrado un aumento de la actividad de las neuronas de la médula espinal, especialmente del asta dorsal, en la espinalización reversible y en animales descerebrados, también se puede observar depresión o cambio de la actividad refleja como resultado de la espinalización aguda (Brenowitz y Pubols, 1981; Herrero y Cerveró, 1996a, Murray y Goldberger, 1974). Esta depresión de la excitabilidad de las neuronas de la médula espinal, como consecuencia de la reducción de la facilitación moduladora conduce al predominio de algunos sistemas inhibidores como los opioides, especialmente en situaciones de sensibilización central (Besson y Chaouch, 1987, Herrero y Cerveró, 1996a y b), como en los presentes experimentos. Esto es apoyado también por el aumento de la actividad observado después de la administración de naloxona en animales espinalizados (Hartell y Headley, 1991). Asimismo, la combinación de la CPA y CPT puede ser resultado de la facilitación de un sistema inhibido, que implica a los receptores de adenosina en combinación con los receptores opioides. Esta última fue nuestra primera hipótesis desde que observamos que el efecto antinociceptivo de la CPA se revertía con naloxona (Ramos y Herrero, 2004). Intentamos averiguar esta cuestión administrando conjuntamente naloxona, CPT y CPA.

La naloxona no modificó por sí misma las respuestas nociceptivas estudiadas en animales intactos y *sham-espinalizados*. Sin embargo, produjo un leve aumento de las respuestas a estimulación mecánica nociva y del *wind-up* en animales espinalizados, lo cual concuerda con estudios previos

usando la misma preparación (Hartell y Headley, 1991) y sugiriendo un control tónico endógeno mediado por los opioides en animales espinalizados.

El aumento de la actividad observado por la combinación de naloxona, CPT y CPA fue, sin embargo, similar al observado en ausencia de naloxona, y mucho más alto que el inducido por la naloxona sola. Experimentos preliminares (no se muestran) también demostraron que el orden de la administración de los tres fármacos no varía las respuestas, indicando que el control tónico opioide no está implicado en el aumento de la actividad observada tras la administración de la CPA y el CPT. Una última posibilidad que hay que tener en consideración es que el sistema estuviera saturado y la presencia de la naloxona no pudiera elevar el nivel de la actividad por encima del nivel observado con la combinación de la CPA y el CPT.

En conclusión, el presente estudio nos provee la primera evidencia *in vivo* de que la depresión de los reflejos nociceptivos de la médula espinal observada en animales espinalizados, especialmente del fenómeno de *wind-up*, es dependiente del sistema de adenosina y que puede ser aliviado por la administración combinada de la CPA y el CPT.

### III.6 CONCLUSIONES

1. La administración combinada de la CPA y el CPT producen un aumento significativo del *wind-up* en animales espinalizados.
2. El orden de administración de la CPA y el CPT no interfiere en la producción de dicho aumento y estos no tienen ningún efecto cuando se administran por separado.
3. Al administrarse el CPT y la CPA en presencia de naloxona se observa un aumento de las respuestas mayor que el producido solo por naloxona.
4. La depresión de los reflejos nociceptivos observada en animales espinalizados es dependiente de la adenosina y puede ser recuperada con la administración conjunta de CPA y CPT.



## **CAPÍTULO IV**

**IV. Interacción entre CPA y ligandos de los receptores  
opioides  $\mu$  y  $\kappa$ .**

## **IV.1 OBJETIVOS**

1. Determinar si la interacción observada en los estudios previos entre los receptores opioides y el receptor A1 de adenosina está mediada por receptores  $\mu$  o  $\kappa$ .
2. Estudiar si existe una potenciación del efecto analgésico al combinar dosis subefectivas de CPA con el agonista de los receptores  $\mu$ , fentanilo.
3. Estudiar si existe una potenciación del efecto analgésico al combinar dosis subefectivas de CPA con el agonista de los receptores  $\kappa$ , U-50488H.

## IV.2 INTRODUCCIÓN

En los trabajos anteriores hemos observado una interacción clara entre el sistema del receptor A1 de adenosina y los sistemas opioides. El antagonista no selectivo de los receptores opioides naloxona fue capaz de revertir la inhibición de las respuestas mediada por la CPA, lo cual nos demuestra que existe una interacción entre ambos sistemas. Sin embargo, la dosis de naloxona utilizada en estos experimentos fue de 1 mg/kg, una dosis no selectiva y capaz de revertir el efecto tanto de los receptores opioides  $\mu$  como de los  $\kappa$  (Herrero y Headley, 1991). Por tanto, nos propusimos averiguar si la interacción que estábamos observando se debía a la implicación específica de uno de estos subtipos de receptores opioides. Para ello, intentamos revertir el efecto de la CPA administrando dosis bajas de naloxona, selectivas para los receptores  $\mu$  (100  $\mu$ g/kg; Herrero y Headley, 1991) y administrando también el antagonista selectivo del receptor opioide  $\kappa$ , Nor-binaltorfimina (nor-BNI; Portoghese et al 1994).

Asimismo, si existiese una interacción de los receptores A1 con los receptores opioides, la administración conjunta de agonistas de ambos receptores debería provocar un efecto analgésico superior al producido por la suma de los efectos independientes de ambos. De hecho, existen numerosos estudios que han demostrado que la administración sistémica de adenosina y sus análogos potencian la antinocicepción inducida por la morfina (Ahlijanian y Takemori, 1985; Contreras et al., 1990; Malec y Michalska, 1990). Además, la administración de morfina produce la liberación de adenosina en preparaciones de médula espinal *in vivo* e *in vitro* (Sweeney et al., 1987 y Sweeney et al., 1989). En esta interacción entre la adenosina y los sistemas opioides, parece evidente una potenciación del efecto de opiáceos  $\mu$  y adenosina, o viceversa. La interacción con receptores  $\kappa$ , sin embargo, no parece concluyente.

Por ello investigamos la posible potenciación del efecto analgésico al administrar dosis subefectivas de CPA combinadas con la administración de agonistas selectivos de los receptores  $\mu$  y  $\kappa$ , fentanilo y U-50,488H respectivamente.

### IV.3 MATERIAL Y MÉTODOS

#### IV.3.a Protocolo de estimulación, sistema de registro y grupos experimentales

El registro de unidades motoras aisladas activadas por estímulos nocivos y registradas como reflejo de retirada, ha sido descrito con detalle en el capítulo de métodos.

Como en los trabajos previos, se realizó el estudio en ratas Wistar macho, con un peso de 250 a 330 g sin espinalización y con inflamación inducida por carragenina siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de métodos. En un primer grupo de animales, se administró el agonista del receptor A1 de la adenosina, CPA, por vía intravenosa en dosis acumulativas en base  $\log_2$  (10 a 320  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), seguido de la administración de una dosis de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  del antagonista de los receptores opioides naloxona. Se ha demostrado previamente en experimentos similares que esta dosis de naloxona inhibe preferentemente los receptores  $\mu$  pero apenas interfiere con los receptores  $\kappa$  (Herrero y Headley, 1991; Tabla IV.1). En un segundo grupo de animales se administró el antagonista selectivo de los receptores  $\kappa$ , nor-BNI, en dosis de 2.5 mg/kg (Tabla IV.1), después de la administración de CPA.

En la segunda serie de experimentos estudiamos la posible potenciación del efecto analgésico del fentanilo y del U-50,488H por dosis subefectivas de 5 a 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de CPA. El agonista de los receptores  $\mu$ , fentanilo, se administró en dosis acumulativas en base  $\log_2$  de 1 a 32  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y se estudió su efecto antinociceptivo tanto en ausencia como en presencia de la CPA (Tabla IV.1). En otros grupos de animales se estudió el efecto antinociceptivo del agonista de los receptores  $\kappa$ , U-50,488H, en dosis acumulativas en base  $\log_2$  de 1 a 16 mg/kg, comparando su efecto en ausencia y en presencia de la CPA (Tabla IV.1).

Grupos	n	1er fármaco	Tiempo (min)	2do fármaco	Estimulación (ciclos 3 min)
I	6	CPA (10-320 µg/kg)	6	NAL (100 µg/kg)	M-WU
I	7	CPA (10-320 µg/kg)	6	Nor-BNI (2.5 mg/kg)	M-WU
I	22	Fentanilo (1-16 µg/kg)	6	---	M-WU
I	7	U-50,488H (1-16 mg/kg)	6	---	M-WU
I	4	CPA (5-10 µg/kg)	6	Fentanilo (1-16 µg/kg)	M-WU
I	6	CPA (5-10 µg/kg)	6	U-50,488H (1-16 mg/kg)	M-WU

**Tabla IV.1.** Grupos experimentales. El efecto antinociceptivo de CPA se intentó revertir con dosis bajas de naloxona y con nor-BNI en ratas macho Wistar, intactas (I), con inflamación inducida por carragenina. Además, se estudió el efecto antinociceptivo del fentanilo y del U-50,488H en ausencia y en presencia de dosis subefectivas de CPA. En todos los grupos experimentales las UMAs fueron activadas por estimulación mecánica nociva (M) y estimulación eléctrica repetitiva (*Wind-up*, WU).

### IV.3.b Cirugía preparatoria, fármacos y análisis de datos

El proceso quirúrgico de la preparación y la evolución de inflamación se realizaron según la descripción detallada en el capítulo de métodos. Como en los experimentos anteriores, los animales se mantuvieron anestesiados con  $\alpha$ -cloralosa (Sigma; 50 mg/kg para inducción y 20 mg/kg/h por bomba de perfusión para mantenimiento). La temperatura central se mantuvo  $37 \pm 0.5^\circ$  C por medio de una manta termorreguladora durante todo el experimento. Después de la preparación se dejó a los animales descansar durante al menos una hora antes de iniciarse el experimento. La presión arterial se monitorizó constantemente durante todo el experimento y se

mantuvo por encima de 100 mmHg antes de la administración de los fármacos.

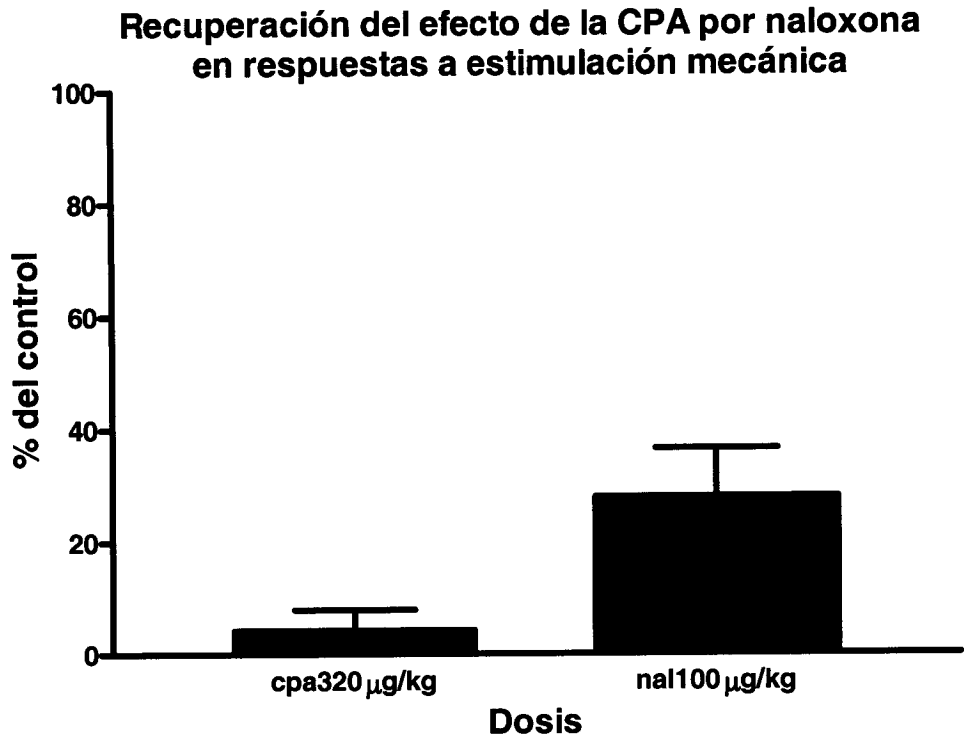
Los fármacos estudiados fueron preparados todos los días inmediatamente antes de su administración, la CPA se preparó y administró de la forma descrita en capítulos anteriores. El nor-BNI se disolvió en salino a una concentración de 1 mg/100µl, el fentanilo se disolvió en salino a una concentración de 50 µg/µl y por último, el U-50,488H se disolvió también en salino a una concentración de 1 mg/100µl. En todos los casos, el volumen final de cada dosis fue de 0.3 ml

Los datos se analizaron y expresaron de la forma descrita en capítulos anteriores.

#### **IV.4 RESULTADOS**

##### **IV.4.a Recuperación del efecto de la CPA con la administración de naloxona o nor-BNI en respuestas a estimulación mecánica**

Al igual que en estudios previos, la CPA fue efectiva en la inhibición de las respuestas a estimulación mecánica en animales intactos con inflamación. En este caso, sin embargo, la administración de naloxona a dosis de 100 µg/kg no revirtió el efecto de la CPA:  $18 \pm 8$  % de la respuesta control a los 24 minutos de su administración (Figura IV.1). A este mismo tiempo, la dosis de naloxona de 1 mg/kg había provocado una recuperación completa del efecto, demostrándonos así claramente que la reversión del efecto no está mediada por los receptores  $\mu$ .

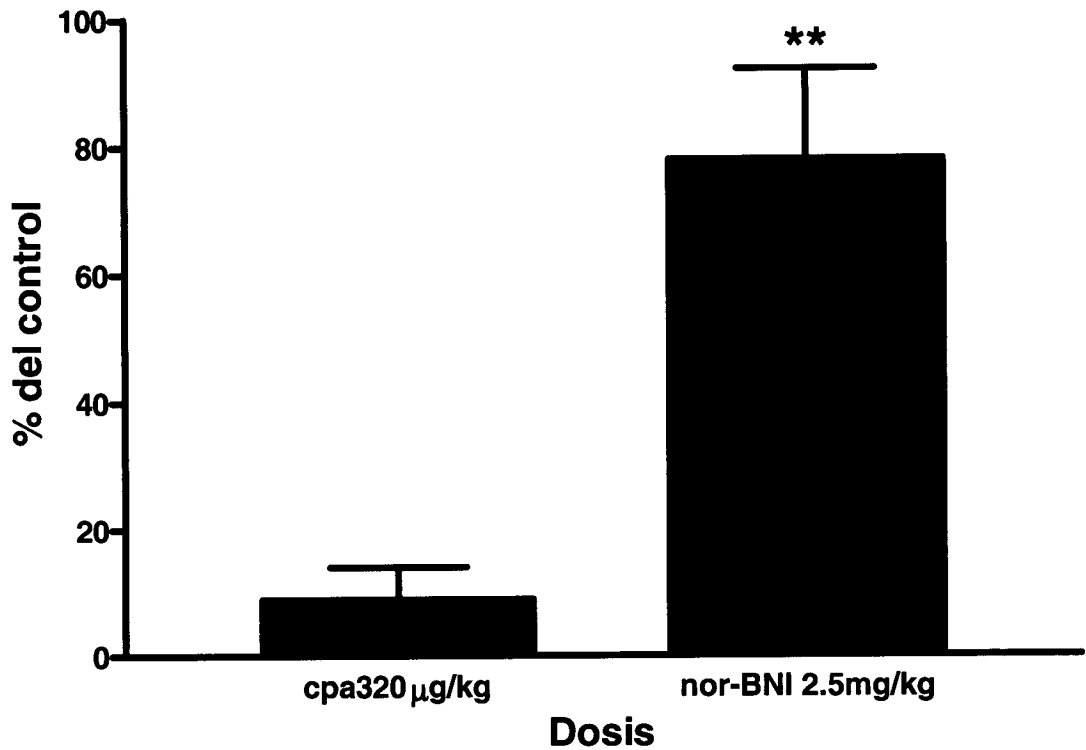


**Figura IV.1.** Falta de recuperación del efecto de la CPA tras la administración de una dosis de 100µg/kg del antagonista opioide naloxona, en respuestas a estimulación mecánica en animales intactos con inflamación.

El antagonista selectivo de los receptores  $\kappa$ , nor-BNI, a dosis de 2.5 mg/kg, provocó una recuperación progresiva y completa del efecto de la CPA. El efecto observado fue del  $77 \pm 14$  % a los 30 minutos de su administración ( $p < 0.01$  vs. el efecto de la CPA; Figura IV.2). Esta reversión del efecto de la CPA sugiere una interacción con los receptores  $\kappa$ .



**Recuperación del efecto de la CPA por nor-BNI en respuestas a estimulación mecánica**

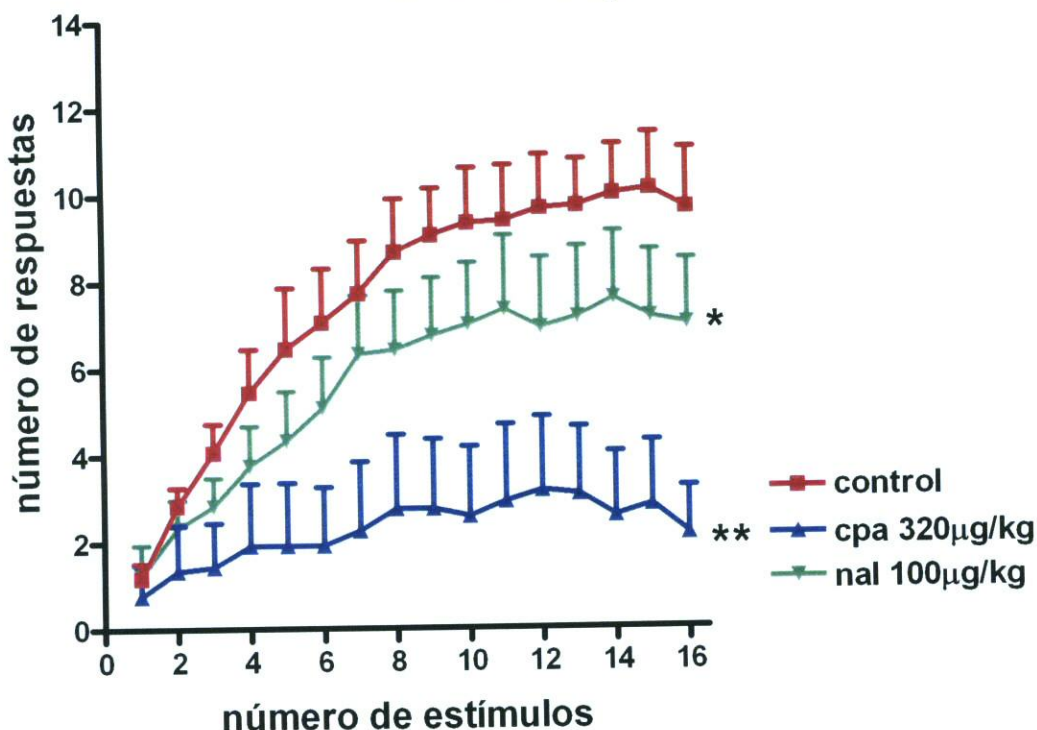


**Figura IV.2.** Recuperación del efecto de la CPA tras la administración de una dosis del antagonista opioide  $\kappa$ , nor-BNI, en respuestas a estimulación mecánica en animales intactos con inflamación. \*\*  $p < 0.01$ , comparación estadística con el análisis de la varianza de una vía ANOVA y post test de Dunnett.

**IV.4.b Recuperación del efecto de la CPA por la administración de naloxona y nor-BNI en respuestas a estimulación eléctrica repetitiva (*wind-up*)**

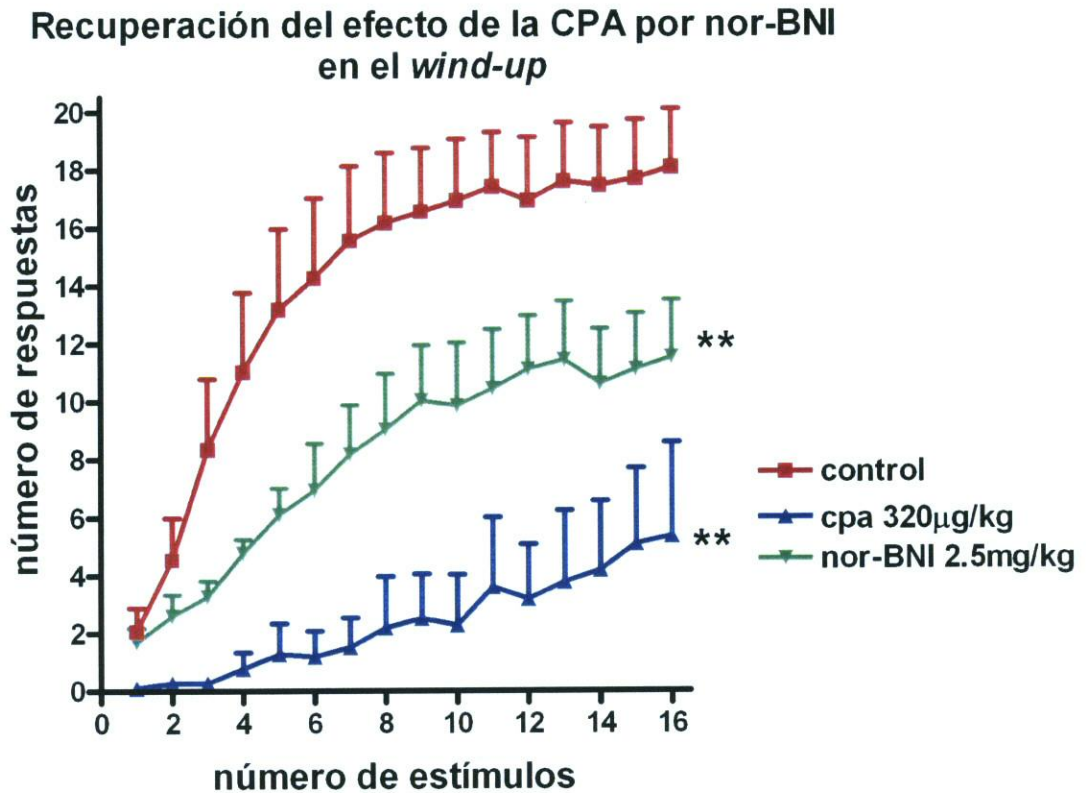
A diferencia de los observado en respuestas a la estimulación mecánica nociva, en las respuestas a estimulación eléctrica repetitiva, la administración de la naloxona a dosis de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  produjo una reversión importante del efecto de la CPA:  $72.6 \pm 14$  %del control, aunque el efecto aún fue significativamente diferente del control ( $p < 0.05$ ; Figura IV.3).

**Recuperación del efecto de la CPA por naloxona en el *wind-up***



**Figura IV.3.** Recuperación del efecto de la CPA sobre el *wind-up* tras la administración de una dosis del antagonista opioide naloxona, en animales intactos con inflamación. \*\*  $p < 0.01$ , comparación estadística con el análisis de la varianza de una vía ANOVA y post test de Dunnett.

La administración del antagonista nor-BNI produjo una recuperación parcial del  $66\pm 8\%$  ( $p < 0.01$  vs. el efecto de la CPA), en contraste con la recuperación completa que habíamos observado en respuestas a estimulación mecánica nociva.



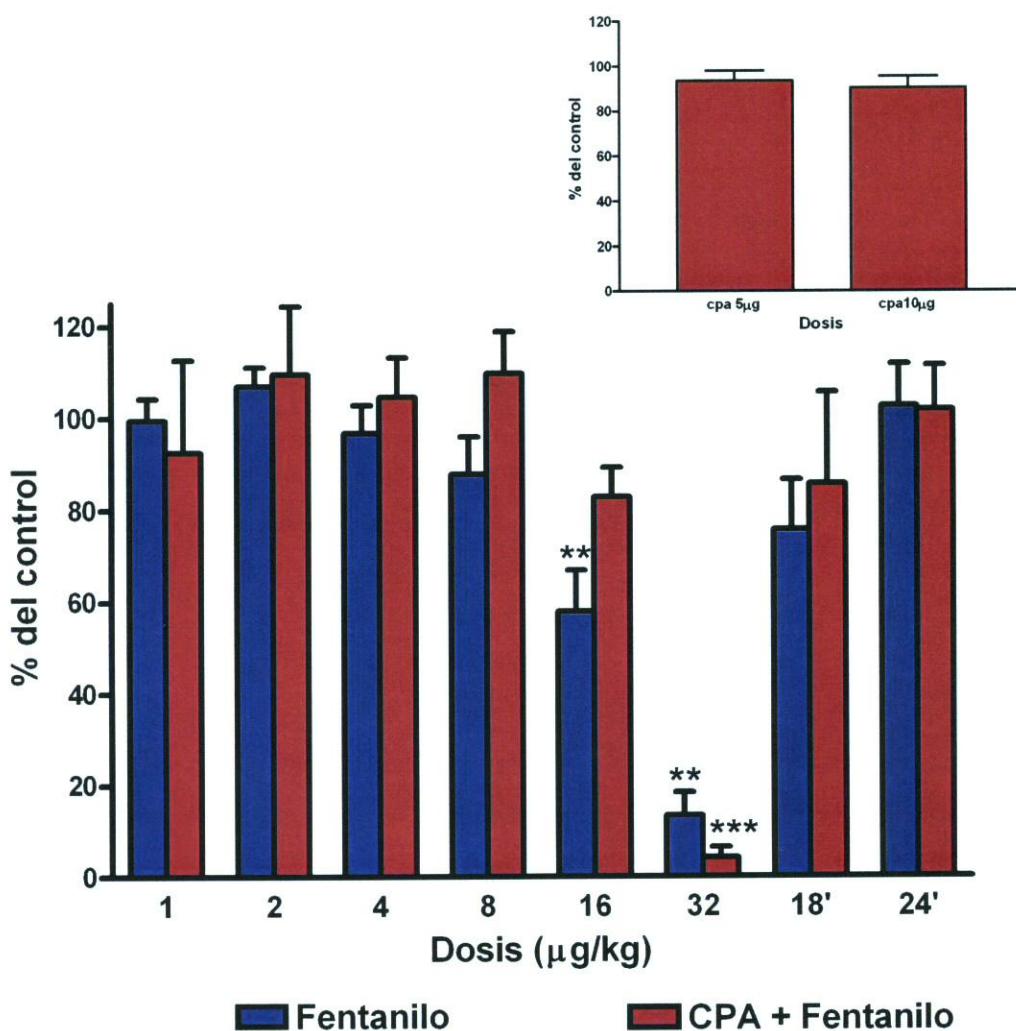
**Figura IV.4.** Recuperación del efecto de la CPA sobre el *wind-up* tras la administración del antagonista opioide  $\kappa$ , nor-BNI, en animales intactos con inflamación. \*\*  $p < 0.01$ , comparación estadística con el análisis de la varianza de una vía ANOVA y post test de Dunnett.

#### IV.4.c Comparación del efecto antinociceptivo del fentanilo y del U-50,488H en ausencia y en presencia de dosis subefectivas de CPA en respuestas a estimulación mecánica nociva

El agonista de los receptores opioides  $\mu$ , fentanilo, al administrarse en ausencia de CPA produjo una potente disminución dosis dependiente de las respuestas nociceptivas a la estimulación mecánica. La  $DE_{50}$  fue de  $17\pm 1\ \mu\text{g}/\text{kg}$  y el efecto máximo observado fue de  $13\pm 5\%$  del control. La recuperación completa del efecto se observó a los 24 min de la administración de la última dosis (Figura IV.5). La administración de 5 y 10

$\mu\text{g}/\text{kg}$  de CPA no provocó un descenso significativo de las respuestas ( $93\pm 4$  y  $90\pm 5$  % del control, respectivamente; Figura IV.5). El fentanilo en presencia de estas dosis de CPA provocó un efecto similar al observado en ausencia de CPA (Figura IV.5), con una  $DE_{50}$  de  $18.5\pm 2 \mu\text{g}/\text{kg}$  y un efecto máximo de  $4\pm 2$  % del control.

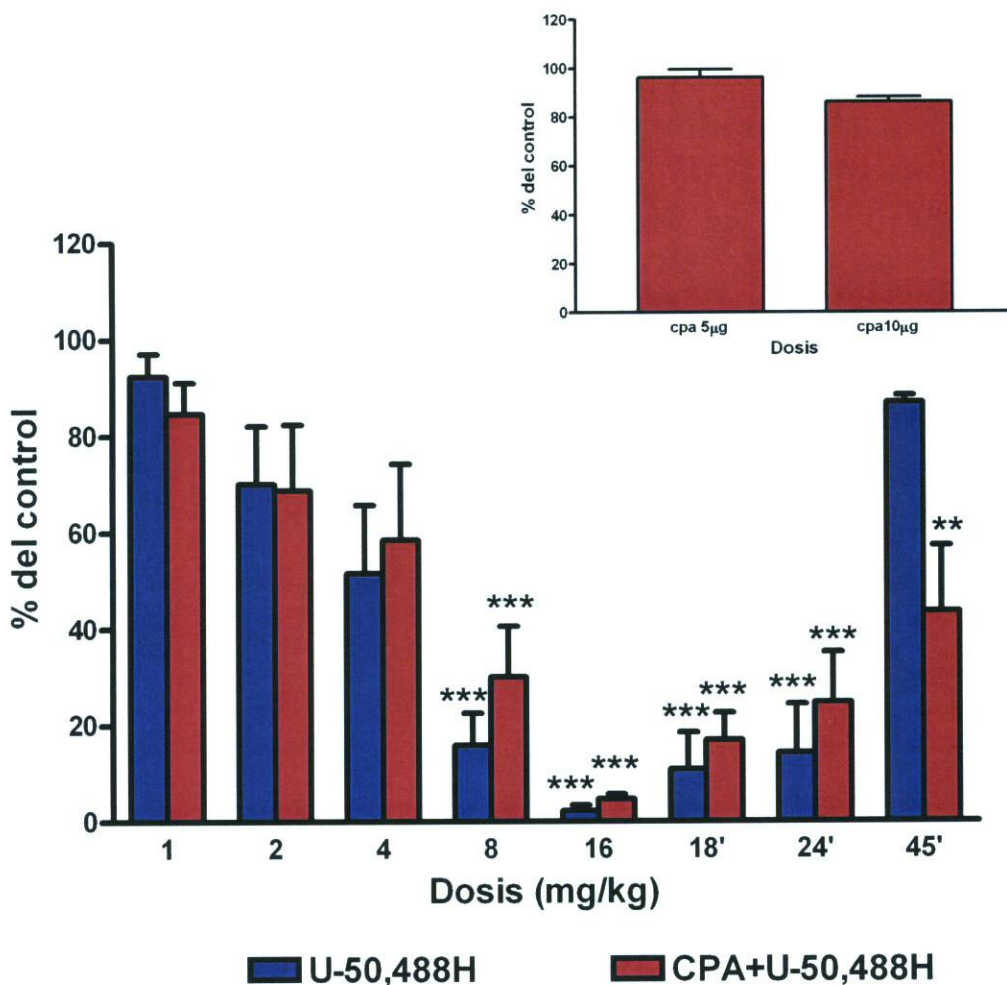
**Efecto del fentanilo en presencia y en ausencia de dosis subefectivas de CPA en respuestas a estimulación mecánica**



**Figura IV.5.** Comparación del efecto del fentanilo en ausencia y en presencia de dosis subefectivas de CPA (recuadro). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , comparación estadística con el análisis de la varianza de una vía ANOVA y post test de Dunnett.

El agonista de los receptores  $\kappa$ , U-50,488H, cuando se administró en ausencia de CPA, provocó una disminución dosis dependiente y efectiva de las respuestas a estimulación mecánica nociva. La  $DE_{50}$  fue de  $4.2 \pm 1.4$  mg/kg y el máximo efecto observado fue de  $2 \pm 1$  % del control. Se observó una recuperación completa a los 45 minutos de su administración ( $87 \pm 1$  %; Figura IV.6). La administración de 5 y 10  $\mu$ g/kg de CPA no provocó

**Efecto del U-50,488H en presencia y en ausencia de dosis subefectivas de CPA en respuestas a estimulación mecánica**



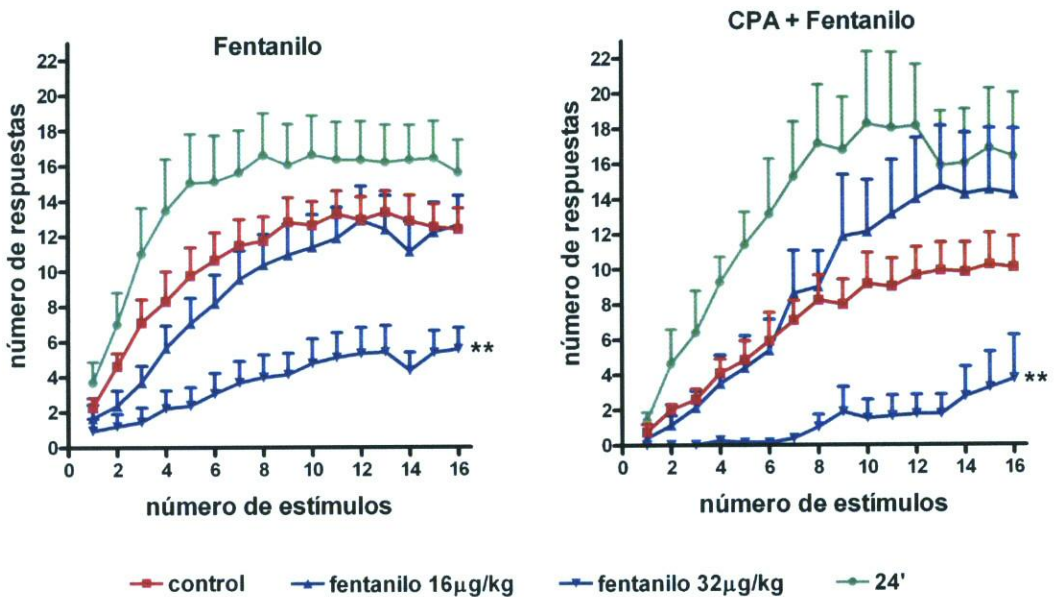
**Figura IV.6.** Comparación del efecto del U-50,488H en ausencia y en presencia de dosis subefectivas de CPA (recuadro). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , comparación estadística con el análisis de la varianza de una vía ANOVA y post test de Dunnett.

un descenso significativo de las respuestas ( $96\pm 3$  y  $86\pm 2$  % del control, respectivamente; Figura IV.6). Cuando se administró el U-50,488H en presencia de dosis subefectivas de CPA no observamos una potenciación del efecto:  $DE_{50}$  de  $5\pm 1$  mg/kg y máximo efecto de  $4\pm 1$  % del control (Figura IV.6). Sin embargo, sí observamos, un aumento en la duración del efecto antinociceptivo de tal forma que a los 45 minutos de su administración el nivel de respuestas fue todavía significativamente diferente del control  $43\pm 13$  % ( $p < 0.01$ ).

**IV.4.d Comparación del efecto antinociceptivo del fentanilo y del U-50,488H en ausencia y en presencia de dosis subefectivas de CPA en el *wind-up***

En las respuestas del *wind-up* la administración de fentanilo en ausencia de la CPA produjo una disminución dosis dependiente de las

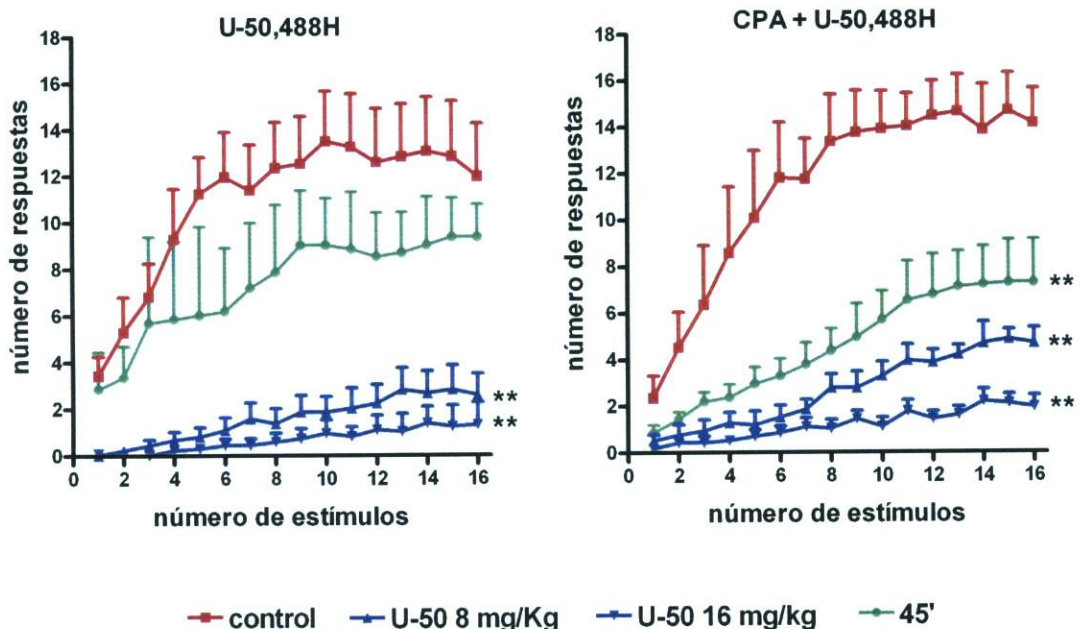
**Efecto del fentanilo en presencia y en ausencia de dosis subefectivas de CPA sobre el *wind-up***



**Figura IV.7.** Comparación del efecto del fentanilo en ausencia y en presencia de dosis subefectivas de CPA. \*\*  $p < 0.01$  comparación estadística con el análisis de la varianza de una vía ANOVA y post test de Dunnett.

respuestas (Figura IV.7) con una inhibición prácticamente completa con la dosis de 32  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $p < 0.01$ ). La recuperación del efecto fue completa a los 24 minutos de la administración de la última dosis (Figura IV.7). Cuando administramos de forma combinada dosis subefectivas de CPA y fentanilo observamos un efecto ligeramente más intenso (Figura IV.7), aunque esta diferencia no fue significativa. La recuperación completa también se observó a los 24 minutos.

**Efecto del U-50,488H en presencia y en ausencia de dosis subefectivas de CPA sobre el wind-up**



**Figura IV.8.** Comparación del efecto del U-50,488H en ausencia y en presencia de dosis subefectivas de CPA. \*\*  $p < 0.01$  comparación estadística con el análisis de la varianza de una vía ANOVA y post test de Dunnett.

La administración del agonista U-50,488H produjo una reducción dosis dependiente del *wind-up*, con una inhibición completa con dosis de 8 a 16 mg/kg (Figura IV.8). En presencia de dosis subefectivas de CPA no se observó una diferencia significativa en la intensidad del efecto a la observada en ausencia de la CPA (Figura IV.8). Sí se observó un efecto más prolongado de la inhibición ya que a los 45 minutos de su administración aún

se mantenía el efecto de forma significativa ( $45.8 \pm 10$  %,  $p < 0.02$ , Figura IV.8).

#### **IV.5 DISCUSIÓN**

La principal observación realizada en el presente estudio fue la reversión del efecto antinociceptivo de la CPA, en respuestas a la estimulación mecánica, por el antagonista selectivo de los receptores opioides  $\kappa$ , pero no por dosis bajas de naloxona, selectivas para el receptor opioide  $\mu$  en experimentos similares (Herrero y Headley, 1991). Esta observación es indicativa de que la interacción que hemos observado en experimentos previos entre la CPA y los receptores opioides se debería preferentemente a los receptores opioides  $\kappa$ .

Sin embargo, existen varios estudios que han sugerido la existencia de una posible interacción entre el sistema A1 de adenosina y el sistema opioide  $\mu$  (DeLander y Hopkins, 1986; Aley y Levine, 1997), así como también que la adenosina y sus análogos aumentan la actividad antinociceptiva de la morfina (Ahlijanian y Takemori, 1985; Contreras et al., 1990). Nuestros resultados muestran además una reversión completa por el nor-BNI de la inhibición de las respuestas a la estimulación mecánica pero no a la estimulación eléctrica. En este último caso, la inhibición del fenómeno de *wind-up* por la CPA se revirtió parcialmente (aunque no totalmente) tanto por dosis bajas de naloxona como por nor-BNI. Existe, por tanto, una discrepancia en los resultados difícil de explicar.

El fenómeno del *wind-up*, como se ha referido en capítulos anteriores, es característico de las neuronas de la médula espinal (Herrero et al 2000) y, excepto en el caso de los opiáceos, un descenso paralelo de su curva provocado por un fármaco es indicativo de una acción central, en la médula espinal. El efecto antinociceptivo de la CPA afecta tanto a respuestas a la estimulación mecánica nociva como al *wind-up*. En el primer caso no existe la posibilidad de determinar mediante los presentes experimentos si el efecto de la CPA se ejerce sobre los nociceptores o sobre la médula espinal. En el caso del *wind-up*, sin embargo, el efecto se puede interpretar como localizado en la médula espinal. Por tanto, una reversión del efecto de la



CPA sobre ambos tipos de respuestas sugeriría una acción preferentemente medular, aunque no se podría descartar también una interacción periférica. De esta manera, la reversión del efecto de la CPA por el nor-BNI, completa en las respuestas a la estimulación mecánica pero parcial para el *wind-up*, sugiere una acción preferentemente periférica, aunque no se puede descartar por completo una interacción central menos evidente. Sin embargo, una reversión específica del *wind-up*, pero no de las respuestas a la estimulación mecánica, como es lo observado con dosis bajas de naloxona (aunque no resultó completa), sugiere una interacción medular de la adenosina con los receptores opioides  $\mu$  e indica una falta de evidencia de interacción periférica.

Para intentar aclarar este punto decidimos realizar experimentos de interacción entre la CPA y agonistas opiáceos  $\mu$  y  $\kappa$ . Nos basamos en la hipótesis de que si existe una interacción entre el receptor A1 de la adenosina y uno de los receptores opioides, la activación conjunta de ambos provocaría un efecto sinérgico, como ocurre con otros sistemas implicados en el procesamiento de la información nociceptiva. En estos experimentos seguimos el protocolo experimental descrito en trabajos previos realizados en nuestro grupo (Gaitán y Herrero 2002, Gaitán et al. 2003) y estudiamos el efecto antinociceptivo de uno u otro opiáceo en presencia y en ausencia de dosis subefectivas de CPA. Sin embargo, no observamos una potenciación rotunda del efecto de ninguno de ellos. Claramente no existió una diferencia significativa en el caso del agonista opiáceo  $\mu$  selectivo fentanilo. En el caso del opiáceo selectivo para los receptores  $\kappa$ , tampoco observamos una potenciación clara de su efecto antinociceptivo, aunque sí observamos un incremento significativo en la duración de su efecto. De esta forma, la inhibición de las respuestas tanto a la estimulación mecánica como a la eléctrica provocada por el U-50,488H recuperó completamente a los 45 minutos de su administración. En presencia de dosis subefectivas de CPA sin embargo, el efecto aún persistía 45 minutos después de su administración. Esta observación fue característica de la potenciación antinociceptiva observada con otros sistemas (Gaitán y Herrero 2002, Gaitán et al. 2003). El aumento en la duración del efecto antinociceptivo del U-50,488H apunta hacia una interacción entre el sistema A1 de la adenosina y

los receptores opioides  $\kappa$ , aunque probablemente, las dosis necesarias de CPA para evidenciar más claramente el efecto deban ser mayores a las empleadas en el presente estudio.

Se requieren por tanto nuevos experimentos para determinar el tipo y lugar de interacción de ambos sistemas. Aunque nuestros resultados no son concluyentes, sí sugieren una interacción preferente con los receptores opioides  $\kappa$  tanto a nivel periférico como central. No podemos descartar, sin embargo, una interacción con los receptores  $\mu$ , aunque sería menos evidente y localizada preferentemente en zonas centrales.

## **IV.6 CONCLUSIONES**

1. Existe una interacción entre el sistema del receptor A1 de adenosina y los receptores opioides en lugares centrales y periféricos.
2. En zonas periféricas la interacción entre el receptor A1 de adenosina y el sistema opioide ocurre preferentemente con el receptor  $\kappa$ .
3. En zonas centrales parece haber una interacción de los receptores opioides  $\mu$  y  $\kappa$  con el receptor A1 de adenosina.

**CONCLUSIONES FINALES**

## **CONCLUSIONES FINALES**

1. El agonista selectivo de los receptores A1 de la adenosina CPA es un potente fármaco inhibidor de las respuestas nociceptivas en animales con inflamación intactos y *sham-espinalizados*, pero no en espinalizados, tras la administración sistémica, lo que sugiere un efecto preferentemente supraespinal.
2. La cirugía espinal provoca un aumento del efecto de la CPA, indicando la existencia de un sistema modulador descendente del sistema nociceptivo mediado por la adenosina.
3. El efecto de la administración sistémica de la CPA sobre la presión arterial es independiente del efecto antinociceptivo.
4. La actividad del receptor A1 de adenosina está ligada a una activación secundaria de los receptores opioides, preferentemente de los receptores K.
5. La administración combinada de la CPA y el CPT producen un aumento significativo del fenómeno de *wind-up* en animales espinalizados. Por tanto, la depresión del *wind-up* observada tras la espinalización es en gran parte dependiente de la adenosina y puede ser revertida por la administración conjunta de ambos fármacos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abbracchio M. P., Burnstock G. 1998. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol*, 78: 113-145.
- Ackley, M. A., Governo, R.J., Cass, C.E., Young, J.D., Baldwin, S.A., King, A.E. 2003. Control of glutamatergic neurotransmission in the rat spinal dorsal horn by the nucleoside transporter ENT1. *J. Physiol.* 548, 507-517.
- Ahlijanian, M. K., Takemori, A. E. 1985. Effects of (-)-N6-(R-phenylisopropyl)-adenosine (PIA) and caffeine on nociception and morphine-induced analgesia, tolerance and dependence in mice. *European Journal of Pharmacology.* 112 (2): 171-179.
- Aley, K. O., Levine, J. D. 1997. Multiple receptors involved in peripheral alpha 2, mu, and A1 antinociception, tolerance, and withdrawal. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience.* 17 (2): 735-744.
- Almeida, A., Tavares, I., Lima, D., 2000. Reciprocal connections between the medullary dorsal reticular nucleus and the spinal dorsal horn in the rat. *Eur. J. Pain* 4, 373-387.
- Almeida, A., Tjolsen, A., Lima, D., Coimbra, A., Hole, K. 1996. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates acute nociception in the rat. *Brain Research Bulletin.* 39 (1): 7-15.
- Anderson, C. M., Xiong, W., Geiger, J. D., Young, J. D., Cass, C. E., Baldwin, S. A., Parkinson. 1999a. Distribution of mRNA encoding a nitrobenzylthioinosine-insensitive nucleoside transporter (ENT2) in rat brain. *Molecular Brain Research.* 70 (2): 293-297.
- Anderson, C. M., Xiong, W., Geiger, J. D., Young, J. D., Cass, C. E., Baldwin, S. A., Parkinson. 1999b. Distribution of equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporters (ENT1) in brain. *Journal of Neurochemistry.* 73 (2): 867-873.
- Arrigoni, E., Rainnie, D.G., McCarley, R.W., Greene, R.W., 2001. Adenosine-mediated presynaptic modulation of glutamatergic transmission in the laterodorsal tegmentum. *J Neurosci.* 21, 1076-1085.
- Bagley, E. E., Vaughan, C. W., Christie, M. J. 1999. Inhibition by adenosine receptor agonists of synaptic transmission in rat periaqueductal grey neurons. *J. Physiol.* 516: 219-225.
- Barber, L. A., Vasko, M. R. 1996. Activation of protein kinase C augments peptide release from rat sensory neurons. *Journal of Neurochemistry.* 67 (1): 72-80.

- Bardin, L., Bardin, M., Lavarenne, J., Eschaliér, A. 1997. Effect of intrathecal serotonin on nociception in rats: influence of the pain test used. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation Cerebrale.* 113 (1): 81-87.
- Bassbaum, A.I., Jessell, T.M., 2000. The perception of Pain. En *Principles of Neural Science (4ª Edición)*. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. McGraw-Hill. 472-491.
- Belfrage, M., Segerdahl, M., Arnér, S., Sollevi, A. 1999. The safety and efficacy of intrathecal adenosine in patients with chronic neuropathic pain. *Anesthesia and Analgesia.* 89 (1): 136-142.
- Besson J. M., Chaouch A. 1987 Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev.* 67: 67-186.
- Bhat, S.G., Nie Z., Ramkumar V. 1999. Cisplatin up-regulates adenosine A(1) receptors in rat testes. *Eur.J.Pharmacol.* 382: 35-43.
- Borghi V., Przewlocka B., Labuz D., Maj M., Ilona O., Pavone F. 2002 Formalin-induced pain and mu-opioid receptor density in brain and spinal cord are modulated by A1 and A2a adenosine agonists in mice. *Brain Res.* 956: 339-348.
- Brenowitz G. L., Pubols L.M. 1981. Increased receptive field size of dorsal horn neurons following chronic spinal cord hemisections in cats. *Brain Res.* 216: 45-59.
- Brundage, J. M., Diao, L., Proctor, W. R., Dunwiddie, T. V. 1997. The role of cyclic AMP as a precursor of extracellular adenosine in the rat hippocampus. *Neuropharmacology.* 36 (9): 1201-1210.
- Bruns, R.F. 1981 Adenosine antagonism by purines, pteridines and benzopteridines in human fibroblasts. *Biochem. Pharmacol.* 30: 325-333.
- Burke, S. P., Nadler, J. V. 1988. Regulation of glutamate and aspartate release from slices of the hippocampal CA1 area: effects of adenosine and baclofen. *Journal of Neurochemistry.* 51 (5):1541-1551.
- Burnstock G. 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 24: 509-581.
- Cahill, C. M., White, T. D., Sawynok, J. 1995. Spinal opioid receptors and adenosine release: neurochemical and behavioral characterization of opioid subtypes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 275 (1): 84-93.
- Cahill, C. M., White, T. D., Sawynok, J. 1996. Synergy between mu/delta-opioid receptors mediates adenosine release from spinal cord synaptosomes. *European Journal of Pharmacology.* 298 (1): 45-49.
- Caterina, M. J., Julius, D. 1999. Sense and specificity: a molecular identity for nociceptors. *Current opinion in neurobiology.* 9: 525-530.



- Cervero, F., Laird, J. 1991. One pain or many pains? A new look at pain mechanisms. *News in Physiological Sciences*. 6: 268-273.
- Chang, A., Takemori, A., Ojala, W., Gleason, W. B., Portoghese, P. 1994.  $\mu$  opioid receptor selective affinity labels: electrophilic benzeneacetamides as  $\mu$ -selective opioide antagonists. *J. Med. Chem.* 37: 4490-4498.
- Childers, S. R. 1991. Opioid receptor-coupled second messenger systems. *Life Sciences*. 48 (21): 1991-2003.
- Choca J. I., Green R. D., Proudfit H. K. 1988. Adenosine A1 and A2 receptors in the substantia gelatinosa are located predominantly on intrinsic neurons: an autoradiography study. *J Pharmacol Exp Ther.* 247: 757-764.
- Contreras, E., Germany, A., Villar, M. 1990. Effects of some adenosine analogs on morphine-induced analgesia and tolerance. *General Pharmacology*. 21 (5): 763-767.
- Corradetti R, Lo Conte G, Moroni F, Passani M. B., Pepeu G. 1984. Adenosine decreases aspartate and glutamate release from rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol.* 104: 19-26.
- Davies, S.N., Lodge, D. 1987. Evidence for the involvement of N-methylaspartate receptors in 'wind-up' of class 2 neurons in the dorsal horn of the rat. *Brain Res.* 424: 402-406
- De Costa, B., Band, L., Rothman, R., Jacobson, A., Bykov, V., Pert, A., Rice, K. 1989. Synthesis of an affinity ligand ("UPHIT") for in vivo acylation of the  $\mu$ -opioid receptor. *FEBS Lett.* 249: 178-182.
- De Felipe, C., Herrero, J.F., O'Brieny, J.A., Palmery, J.A., Doyley, C.A., Smith, A.J.H., Laird, J.M.A., Belmonte, C., Cervero, F., Hunt, S.P. 1998 Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the substance P receptor. *Nature.* 392: 394-397.
- DeLander, G. E., Wahl, J. J. 1991. Descending systems activated by morphine (ICV) inhibit kainic acid (IT)-induced behavior. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior.* 39 (1): 155-159.
- DeLander, G. E., Hopkins, C. J. 1986. Spinal adenosine modulates descending antinociceptive pathways stimulated by morphine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 239 (1): 88-93.
- DeLander, G. E., Mosberg, H. I., Porreca, F. 1992. Involvement of adenosine in antinociception produced by spinal or supraspinal receptor-selective opioid agonists: dissociation from gastrointestinal effects in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263: 1097-1104.

- Deuchars, S.A., Brooke, R.E., Deuchars, J., 2001. Adenosine A1 receptors reduce release from excitatory but not inhibitory synaptic inputs onto lateral horn neurons. *J. Neurosci.* 21: 6308-6320.
- Dhawan, B. N., Cesselin, F., Raghubir, R., Reisine, T., Bradley, P., Portuguese, P. S., Hamon, M. 1996. International union of pharmacology. XII. Classification of opioide receptors. *Pharmacological Reviews.* 48(4): 567-592.
- Dickenson, A. H., Sullivan, A. F. 1987. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurons following C fiber stimulation, *Neuropharmacol.* 26: 1235-1238.
- Dixon, A. K., Gubitza, A. K., Sirinathsinghji, D. J., Richardson, P. J., Freeman, T. C. 1996. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *British Journal of Pharmacology.* 118 (6): 1461-1468.
- Dmitrieva, N., McMahon, S. B. 1996. Sensitisation of visceral afferents by nerve growth factor in the adult rat. *Pain* 66: 87-97
- Doi, T., Kuzuna, S., Maki, Y. 1987. Spinal antinociceptive effects of adenosine compounds in mice. *European Journal of Pharmacology.* 137 (2-3): 227-231.
- Dubner R., Ruda M. A. 1992. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci.* 15: 96-103.
- Dugast, C., Almeida, A., Lima, D. 2003. The medullary dorsal reticular nucleus enhances the responsiveness of spinal nociceptive neurons to peripheral stimulation in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 18: 580-588.
- Dunwiddie, T. V., Fredholm, B. B. 1997. Adenosine neuromodulation. In: Jacobson, K. A., Jarvis, M. F. (Eds), *Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics.* Wiley, New York. 359-382.
- Dunwiddie, T. V., Masino, S. A. 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 31-55.
- Eisenach, James C., Hood, David D., Curry, Regina. 2002. Preliminary efficacy assessment of intrathecal injection of an American formulation of adenosine in humans. *Anesthesiology.* 96 (1): 29-34.
- Emmerson, P. J., Liu, M. R., Woods, J. H., Medzihradsky, F. 1994. Binding affinity and selectivity of opioids at mu, delta and kappa receptors in monkey brain membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271: 1630-1637.
- Faber, E. S, Chambers, J. P, Brugger, F., Evans, R. H. 1997. Depression of A and C fibre-evoked segmental reflexes by morphine and clonidine in the in vitro spinal cord of the neonatal rat. *Br. J. Pharmacol.* 120: 1390-1396.

- Fields, H. L., Basbaum, A. I. 1994. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: textbook of pain. Eds. P. D. Wall R. Melzack. Churchill-Livingstone, Edinburgh. 3<sup>rd</sup> edn. 243-257.
- Fredholm B. B., Abbracchio M. P., Burnstock G, Daly J. W., Harden T. K., Jacobson K. A., Leff P., Williams M. 1994. Nomenclature and classification of purinoreceptors. *Pharmacol Rev.* 46: 143-156.
- Fredholm B. B., Ijzerman A. P., Jacobson K. A., Klotz K. N., Linden J. 2001. International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews.* 53: 527-552.
- Fredholm, B. B. 1997. Adenosine and neuroprotection. *International Review of Neurobiology.* 40: 259-280.
- Fredholm, B. B., Vernet, L. 1978. Morphine increases depolarization induced purine release from rat cortical slices. *Acta Physiologica Scandinavica.* 104 (4): 502-504.
- Fulga, I., Stone, T.W. 1998. Comparison of an adenosine A1 receptor agonist and antagonist on the rat EEG. *Neurosci. Lett.* 244, 55-59.
- Gaitán G., Herrero J. F. 2002. Subeffective doses of dexketoprofen trometamol enhance the potency and duration of fentanyl antinociception. *Br. J. Pharmacol.* 135: 393-398.
- Gaitan, G., Del Soldato, P., Herrero, J. F., 2003. Subeffective doses of dexketoprofen trometamol or nitroparacetamol enhance the effectiveness of fentanyl in responses to noxious mechanical stimulation and wind-up. *Eur. J. Pharmacol.* 481: 181-188.
- Geiger, J. D., LaBella, F. S., Nagy, J. I. 1984. Characterization and localization of adenosine receptors in rat spinal cord. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience.* 4 (9): 2303-2310.
- Geiger, J. D., Parkinson, F. E., Kowaluk, E. A. 1997. Regulators of endogenous adenosine levels as therapeutic agents. In: Jacobson, K. A., Jarvis, M. F. (Eds.), *Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics.* Wiley, New York. 55-84.
- Goodman R. R., Snyder S. H. 1982. Autoradiographic localization of adenosine receptors in rat brain using (H)cyclohexyladenosine. *J Neurosci.* 2: 1230-1241.
- Haas H. L., Greene R. W. 1988. Endogenous adenosine inhibits hippocampal CA1 neurons: further evidence from extra- and intracellular recording. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 337: 561-565.
- Haas H. L., Selbach O. 2000. Functions of neuronal adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362: 375-381.

- Hansen, P. E., Morgan, B. A. 1984. Structure-activity relationship in enkephalin peptides. In *The Peptides*, ed. Por Meinhofer y Udenfried. Academic Press, New York. 6: 269-321.
- Hartell, N. A., Headley, P. M. 1991. The effect of naloxone on spinal reflexes to electrical and mechanical stimuli in the anaesthetized, spinalized rat. *J. Physiol.* 442: 513-526.
- He, X., Schepelmann, K., Schaible, H. G., Schmidt, R. F. 1990. Capsaicin inhibits responses of fine afferents from the knee joint of the cat to mechanical and chemical stimuli. *Brain Res.* 530: 147-150.
- Herrero, J. F., Headley, P. M. 1995. The dominant class of somatosensory neurone recorded in the spinal dorsal horn of awake sheep has wide dynamic range properties. *Pain.* 61:133-138.
- Herrero, J. F., Cervero, F. 1996a. Supraspinal influences on the facilitation of rat nociceptive reflexes induced by carrageenan monoarthritis. *Neurosci Lett.* 209: 21-24.
- Herrero, J. F., Cervero, F. 1996b. Changes in nociceptive reflex facilitation during carrageenan-induced arthritis. *Brain Res.* 717: 62-68.
- Herrero, J. F., Headley, P. M. 1991. The effects of sham and full spinalization on the systemic potency of  $\mu$ - and  $\kappa$ -opioids on spinal nociceptive reflexes in rats. *Br. J. Pharmacol.* 104, 166-170.
- Herrero, J. F., Headley, P. M. 1993. Functional evidence for two different kappa receptors mediating the inhibition of spinal nociceptive models. *Br. J. Pharmac.* 110: 303-309.
- Herrero, J. F., Laird, J. M. A., Lopez-Garcia, J. A. 2000. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog. Neurobiol.* 61: 169-203.
- Herrero, J. F., Parrado A., Cervero, F. 1997. Central and peripheral actions of the NSAID ketoprofen on spinal cord nociceptive reflexes. *Neuropharmacology* 36: 1425-1431.
- Hettlinger, B. D., Leid, M., Murray, T. F. 1998. Cyclopentyladenosine-induced homologous down-regulation of A1 adenosine receptors (A1AR) in intact neurons is accompanied by receptor sequestration but not a reduction in A1AR mRNA expression or G protein alpha-subunit content. *J. Neurochem.* 71: 221-230.
- Holmgren, M., Hedner, J., Mellstrand, T., Nordberg, G., Hedner, T. 1986. Characterization of the antinociceptive effects of some adenosine analogues in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 334 (3): 290-293.

- Holstege, J. C., Van Dijken, H., Buijs, R. M., Goedknecht, H., Gosens, T., Bongers, C. M. 1996. Distribution of dopamine immunoreactivity in the rat, cat and monkey spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*. 376 (4): 631-652.
- Hutchinson, M., Kosterlitz, H. W., Leslie, F. M., Waterfield, A. A. 1975. Assessment in the guinea-pig ileum and mouse vas deferens of benzomorphans which have strong antinociceptive activity but do not substitute for morphine in the dependent monkey. *British Journal of Pharmacology*. 55 (4): 541-546.
- IASP (1979). Pain terms: A list with definitions and notes on usage. *Pain*, 6:249-252.
- IASP (1986). A current list with definitions and notes on usage. *Pain (suppl.)* 3: S216-S221.
- Inoue, M., Ueda, H. 2000. Protein kinase C-mediated acute tolerance to peripheral mu-opioid analgesia in the bradykinin-nociception test in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 293 (2): 662-669.
- Jacobson K. A, van Galen P. J., Williams M. 1992 Adenosine receptors: pharmacology, structure-activity relationships, and therapeutic potential. *J Med Chem*. 35: 407-422.
- Kanjhan R. 1995. Opioids and pain. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 22: 397-403.
- Karlsten R., Gordh T. Jr., Hartvig P., Post C. 1990. Effects of intrathecal injection of the adenosine receptor agonists R-phenylisopropyl-adenosine and N-ethylcarboxamide-adenosine on nociception and motor function in the rat. *Anesth Analg*. 71: 60-64.
- Karlsten, R., Gordh, T., Post, C. 1992. Local antinociceptive and hyperalgesic effects in the formalin test after peripheral administration of adenosine analogues in mice. *Pharmacology & Toxicology*. 70 (6): 434-438.
- Karlsten, R., Post, C., Hide, I., Daly, J. W. 1991. The antinociceptive effect of intrathecally administered adenosine analogs in mice correlates with the affinity for the A1-adenosine receptor. *Neurosci. Lett*. 121: 267-270.
- Keil, G. J., DeLander, G. E. 1992. Spinally-mediated antinociception is induced in mice by an adenosine kinase, but not by an adenosine deaminase, inhibitor. *Life Sci*. 51: 171-176.
- Kenshalo, D. R., Jr., Isensee, O. 1983. Responses of primate SI cortical neurons to noxious stimuli. *J. Neurophysiol*. 50: 1479-1496.
- Khandwala, H., Zhang, Z., Loomis, C. W. 1998. Inhibition of strychnine-allodynia is mediated by spinal adenosine A1- but not A2-receptors in the rat. *Brain Research*. 808 (1): 106-109.

- Khasar, S. G., Wang, J. F., Taiwo, Y. O., Heller, P. H., Green, P. G., Levine, J. D. 1995. Mu-opioid agonist enhancement of prostaglandin-induced hyperalgesia in the rat: a G-protein beta gamma subunit-mediated effect? *Neuroscience*. 67 (1): 189-195.
- Lahti, R. A., Mickelson, M. M., McCall, J. M., Von Voigtlander, P. F. 1985. [<sup>3</sup>H] U-69593, a highly selective ligand for the opioide  $\mu$  receptor. *Eur. J. Pharm.* 109: 281-284.
- Lahti, R. A., Von Voigtlander, P. F., Barsuhn, C. 1982. Properties of a selective kappa agonist, U-50,488H. *Life Sci.* 31: 2257-2260.
- Lao, L. J., Kumamoto, E., Luo, C., Furue, H. 2001. Yoshimura M. Adenosine inhibits excitatory transmission to substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord through the activation of presynaptic A(1) adenosine receptor. *Pain* 94: 315-324.
- Latini, S., Pedata, F. 2001. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *Journal of Neurochemistry*. 79 (3): 463-484.
- Lavand'homme, P. M., Eisenach, J. C. 1999. Exogenous and endogenous adenosine enhance the spinal antiallodynic effects of morphine in a rat model of neuropathic pain. *Pain*. 80: 31-36.
- Lee Y. W., Yaksh T. L. 1996. Pharmacology of the spinal adenosine receptor wich mediates the antiallodynic action of intrathecal adenosine agonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 277: 1642-1648.
- Li J., Perl E. R. 1994. Adenosine inhibition of synaptic transmission in the substantia gelatinosa. *Journal of Neurophysiology*. 72 (4): 1611-1621.
- Lin Q., Peng Y., Willis, W. D. 1994. Glycine and GABAA antagonists reduce the inhibition of primate spinothalamic tract neurons produced by stimulation in periaqueductal gray. *Brain Research*. 654 (2): 286-302.
- López García, J. A., Herrero, J. F. 1998. Somestesia: mecanorrecepción, termorrecepción y nocicepción. *Manual de Neurociencia*. Delgado, J. M., Ferrus, A., Mora, F., Rubia, F. J. Editorial Síntesis. 457-482.
- Lopez-Garcia, J. A., King, A. E. 1996. A novel methodology for simultaneous assessment of the effects of 5-hydroxytryptamine on primary afferent polarisation and synaptic transmission in rat dorsal horn neurones in vitro. *Journal of Neuroscience Methods*. 68 (1): 1-6.
- Lord J., Waterfield A., Hughes J., Kosterlitz H. 1977. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature*. 267: 495-498.

- Magnan J., Paterson S. J., Tavani A., Kosterlitz H. W. 1982. The binding spectrum of narcotic analgesic drugs with different agonist properties. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 319: 197-205.
- Malec D., Michalska E. 1990. The effect of adenosine receptor agonists on analgesic effects of morphine. *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy.* 42 (1): 1-11.
- Mayne M., Fotheringham J., Yan H. J., Power C., Del Bigio M. R., Peeling J., Geiger J. D. 2001. Adenosine A2A receptor activation reduces proinflammatory events and decreases cell death following intracerebral hemorrhage. *Annals of Neurology.* 49 (6): 727-735.
- Millan M. J. 1999. The introduction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology.* 57: 1-164.
- Millan, M. J., Peglion, J. L., Vian, J., Rivet, J. M., Brocco, M., Gobert, A., Newman-Tancredi, A., Dacquet, C., Bervoets, K., Girardon et al. 1995. Functional correlates of dopamine D3 receptor activation in the rat in vivo and their modulation by the selective antagonist, (+)-S 14297: I. Activation of postsynaptic D3 receptors mediates hypothermia, whereas blockade of D2 receptors elicits prolactin secretion and catalepsy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 275 (2): 885-898.
- Monhemius, R., Li, H. S., Roberts, M. H. 1997. Descending influences differentially modulate superficial lamina I and deep multireceptive dorsal horn neurons in the rat. *J. Physiol.* 505-543.
- Murray M., Goldberger M. E. 1974 Restitution of function and collateral sprouting in the cat spinal cord: the partially hemisectioned animal. *J Comp Neurol.* 158: 19-36.
- Nakamura, I., Ohta, Y., Kemmotsu, O. 1997. Characterization of adenosine receptors mediating spinal sensory transmission related to nociceptive information in the rat. *Anesthesiology.* 87 (3): 577-584.
- Oliet, S. H., Poulain, D. A. 1999. Adenosine-induced presynaptic inhibition of IPSCs and EPSCs in rat hypothalamic supraoptic nucleus neurones. *J Physiol.* 520: 815-825.
- Paeile, C. 1999. Receptor opioide: aspecto clínico, pasado, presente y futuro. *Revista de la Sociedad Española del Dolor.* 6(II): 238-239.
- Pasternak G. W. 1993. Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. *Clinical Neuropharmacology.* 16: 1-18.
- Patel, M. K., Pinnock, R. D., Lee, K. 2001. Adenosine exerts multiple effects in dorsal horn neurones of the adult rat spinal cord. *Brain. Res.* 920: 19-26.

- Pelleg A., Porter S. 1990. The pharmacology of adenosine. 10: 157-174.
- Phillis, J. W., Kostopoulos, G. K., Limacher, J. J. 1975. A potent depressant action of adenine derivatives on cerebral cortical neurones. *Eur. J. Pharmacol.* 30: 125-129.
- Poon, A., Sawynok, J. 1998. Antinociception by adenosine analogs and inhibitors of adenosine metabolism in an inflammatory thermal hyperalgesia model in the rat. *Pain.* 74(2-3): 235-245.
- Portoghese P. S., Lin C. E., Farouz-Grant F., Takemori A. 1994. E. Structure-activity relationship of N17'-substituted norbinaltorphimine congeners. Role of the N17' basic group in the interaction with a putative address subsite on the kappa opioid receptor. *J Med Chem.* 37(10):1495-500.
- Portoghese, P., Lipkowski, A., Takemori, A. 1987. Binaltorphimine and norbinaltorphimine, potent and selective kappa-opioid receptor antagonists. *Life Sciences.* 40(13): 1287-1292.
- Portoghese, P., Sultana, M., Takemori, A. E. 1988. Naltridole, a highly selective and potent non-peptide delta opioide receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 146: 185-186.
- Post, C. 1984. Antinociceptive effects in mice after intrathecal injection of 5'-N-ethylcarboxamide adenosine. *Neuroscience Letters.* 51 (3): 325-330.
- Franco R., Casadó V., Ciruela F., Saura C., Mallol J., Canela E. I., Lluís C. 1997. Cell surface adenosine deaminase: Much more than an ectoenzyme. Review Article. *Progress in Neurobiology.* 52(4): 283-294.
- Raffa R. B., Stone D. J. Jr., Tallarida R. J. 2000. Discovery of "self-synergistic" spinal/supraspinal antinociception produced by acetaminophen (paracetamol). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295: 291-294.
- Rainnie D. G., Grunze H. C., McCarley R. W., Greene R. W. 1994. Adenosine inhibition of mesopontine cholinergic neurons: implications for EEG arousal. *Science.* 263: 689-692.
- Ralevic V., Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 50: 413-92.
- Ramos-Zepeda G., Schröder W., Rosenow S., Herrero J. F. 2004. Spinal vs. Supraspinal antinociceptive activity of the adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist cyclopentyl-adenosine (CPA) in rats with inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 499: 247-256.




- Ramos-Zepeda, G., Herrero, J. F. 2004. Supraspinal antinociceptive actions of the A1 adenosine receptor agonist CPA in rats with inflammation involves opioid receptor activation. 34th Annual Meeting, Society for Neuroscience, San Diego. 520.15.
- Reeve, A. J., Dickenson, A. H. 1995. The roles of spinal adenosine receptors in the control of acute and more persistent nociceptive responses of dorsal horn neurones in the anaesthetized rat. *British Journal of Pharmacology*. 116 (4): 2221-2228.
- Reisine, T. 1995. Opiate receptors. *Neuropharmacology*. 34 (5): 463-472.
- Ribeiro, J. A., Sebastião, A. M., de Mendonça, A. 2002. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Progress in Neurobiology*. 68 (6): 377-392.
- Ribeiro J. A., Sebastiao A. M., de Mendonca A. 2003. Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News & Perspectives*. 16 (2): 80-86.
- Romero-Sandoval, E. A., Del Soldato, P., Herrero, J. F. 2003. The effects of sham and full spinalization on the antinociceptive effects of NCX-701 (nitroparacetamol) in monoarthritic rats. *Neuropharmacology* 45: 412-419.
- Rosenberg, P. A., Li, Y. 1995. Adenylyl cyclase activation underlies intracellular cyclic AMP accumulation, cyclic AMP transport, and extracellular adenosine accumulation evoked by beta-adrenergic receptor stimulation in mixed cultures of neurons and astrocytes derived from rat cerebral cortex. *Brain Research*, 692 (1-2): 227-232.
- Salter, M. W., De Koninck, Y., Henry, J. L. 1993. Physiological roles for adenosine and ATP in synaptic transmission in the spinal dorsal horn. *Progress in Neurobiology*. 41 (2): 125-156.
- Santcioli, P., Del Bianco, E., Maggi, C. A. 1993. Adenosine A1 receptors mediate the presynaptic inhibition of calcitonin gene-related peptide release by adenosine in the rat spinal cord. *European Journal of Pharmacology*. 231 (1): 139-142.
- Sarne, Y., Fields, A., Keren, O., Gafni, M. 1996. Stimulatory effects of opioids on transmitter release and possible cellular mechanisms: overview and original results. *Neurochemical Research*. 21 (11): 1353-1361.
- Sawynok J. 1991. Adenosine and pain. In Phillis JE (Ed). *Adenosine and adenine nucleotides as regulators of cell function*. Boca Raton: CRC Press. 391-402.
- Sawynok, J. 1998. Adenosine receptor activation and nociception. *European Journal of Pharmacology*. 347 (1): 1-11.
- Sawynok, J., Liu, X.J., 2003. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog. Neurobiol*. 69: 313-340.

- Schaible, H. G., Grubb, B. D. 1993. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 55: 5-54.
- Schaible, H. G., Ebersberger, A. Von Banchet, G. S. 2002. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci*, 966: 343-54.
- Schmidt, R., Schmelz, M., Torebjork, H. E., Handwerker, H. O. 2000. Mechano-insensitive nociceptors encode pain evoked by tonic pressure to human skin. *Neuroscience*, 98: 793-800.
- Smart, D., Lambert, D. G. 1996. The stimulatory effects of opioids and their possible role in the development of tolerance. *Trends In Pharmacological Sciences*. 17 (7): 264-269.
- Solano R., Herrero J. F. 1997. Cutaneous responsiveness of rat single motor units activated by natural stimulation. *J Neurosci Methods*. 73: 135-140
- Sosnowski, M., Stevens, C.W., Yaksh, T.L. 1989. Assessment of the role of A1/A2 adenosine receptors mediating the purine antinociception, motor and autonomic function in the rat spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250: 915-922.
- Sosnowski, M., Yaksh, T.L. 1989. Role of spinal adenosine receptors in modulating the hyperesthesia produced by spinal glycine receptor antagonism. *Anesth Analg.* 69: 587-592.
- Stein C. 1993. Peripheral mechanisms of opioide analgesia. *Anesth. Analg.* 76: 182-191.
- Stein C. 1995. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *The New England Journal Of Medicine*. 332 (25): 1685-1690.
- Stone, T. W. 1981. The effects of morphine and methionine-enkephalin on the release of purines from cerebral cortex slices of rats and mice. *British Journal of Pharmacology*. 74 (1): 171-176.
- Suh, H. W., Song, D. K., Kim, Y. H. 1997. Differential effects of adenosine receptor antagonists injected intrathecally on antinociception induced by morphine and beta-endorphin administered intracerebroventricularly in the mouse. *Neuropeptides*. 31: 339-344.
- Suzuki R., Gale, A., Dickenson, A. H. 2000. Altered effects of an A1 adenosine receptor agonist on the evoked responses of spinal dorsal horn neurones in a rat model of mononeuropathy. *J. Pain*. 1: 99-110.
- Svenningsson, P., Fredholm, B. B. 1997. Glucocorticoids regulate the expression of adenosine A1 but not A(2A) receptors in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280: 1094-1101.

- Sweeney M. I., White T. D., Jhamandas K. H., Sawynok J. 1987. Morphine releases endogenous adenosine from the spinal cord in vivo. *Eur J Pharmacol.* 141: 169-70.
- Sweeney, M. I., White, T. D., Sawynok, J. 1987. Involvement of adenosine in the spinal antinociceptive effects of morphine and noradrenaline. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 243 (2): 657-665.
- Sweeney, M. I., White, T. D., Sawynok, J. 1989. Morphine, capsaicin and K<sup>+</sup> release purines from capsaicin-sensitive primary afferent nerve terminals in the spinal cord. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 248 (1): 447-454.
- Sweeney, M. I., White, T. D., Sawynok, J. 1993. Morphine-evoked release of adenosine from the spinal cord occurs via a nucleoside carrier with differential sensitivity to dipyridamole and nitrobenzylthioinosine. *Brain Research.* 614 (1-2): 301-307.
- Taiwo, Y O., Levine, J. D. 1990. Direct cutaneous hyperalgesia induced by adenosine. *Neuroscience.* 38 (3): 757-762.
- Taiwo, Y O., Levine, J. D. 1991. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience.* 44 (1): 131-135.
- Tanase, D., Baghdoyan, H.A., Lydic, R. 2002. Microinjection of an adenosine A1 agonist into the medial pontine reticular formation increases tail flick latency to thermal stimulation. *Anesthesiology.* 97: 1597-601.
- Tao, P. L., Liu, C. F., Tsai, H. C. 1995. Chronic intracerebroventricular administration of morphine down-regulates spinal adenosine A1 receptors in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 278: 233-237.
- Thomas, T., Spyer, K. M. 1999. A novel influence of adenosine on ongoing activity in rat rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience.* 88: 1213-1223.
- Thorn, J. A., Jarvis, S. M. 1996. Adenosine transporters. *General Pharmacology.* 27 (4): 613-620.
- Todd, A. J., Spike, R. C. 1993. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Prog. Neurobiol.* 41: 609-645.
- Travagli, R. A., Williams, J. T. 1996. Endogenous monoamines inhibit glutamate transmission in the spinal trigeminal nucleus of the guinea-pig. *The Journal of Physiology.* 491: 177-185.
- Treede, R. D., Meyer, R. A., Raja, S. N., Campbell, J. N. 1992. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog Neurobiol.* 38: 397-421.

- Uchimura, N., North, R. A. 1991. Baclofen and adenosine inhibit synaptic potentials mediated by gamma-aminobutyric acid and glutamate release in rat nucleus accumbens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: 663-668.
- Vainio, M., Fredholm, B. B., Tornquist, K. 2000. Thyrotropin regulates adenosine A(1) receptor expression in rat thyroid FRTL-5 cells. *Br. J. Pharmacol.* 130, 471-477.
- Villanueva L., Chitour D., Le Bars D. 1986. Involvement of the dorsolateral funiculus in the descending spinal projections responsible for diffuse noxious inhibitory controls in the rat. *J Neurophysiol.* 56: 1185-1195.
- Von Voigtlander, P. F., Lewis, R. A. 1988. Analgesic and mechanistic evaluation of spiradoline, a potent kappa opioide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 259-262.
- Von Voigtlander, P. F., Lahti, R. A., Ludens, J. H. 1983. U-50, 488H, a selective and structurally novel non-mu (kappa) opioide agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224: 7-12.
- Wu, P. H., Phillis, J. W., Yuen, H. 1982. Morphine enhances the release of 3H-purines from rat brain cerebral cortical prisms. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior.* 17 (4): 749-755.
- Yeung, J. C., Rudy, T. A. 1980a. Sites of antinociceptive action of systemically injected morphine: involvement of supraspinal loci as revealed by intracerebroventricular injection of naloxone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 215: 626-632.
- Yeung, J. C., Rudy, T. A. 1980b. Multiplicative interaction between narcotic agonisms expressed at spinal and supraspinal sites of antinociceptive action as revealed by concurrent intrathecal and intracerebroventricular injections of morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 215: 633-642.
- Zárate, E., Sá Rêgo, M. M., White, P. F., Duffy, L., Shearer, V. E., Griffin, J. D., Whitten, C. W. 1999. Comparison of adenosine and remifentanil infusions as adjuvants to desflurane anesthesia. *Anesthesiology.* 90 (4): 956-963.

Guillermo Ramos Zapata  
154  
29 de abril de 2005



Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la fecha acordó otorgar a la presente Tesis Doctoral la calificación de **SOBRESALIENTE**  
**CUM LAUDE**

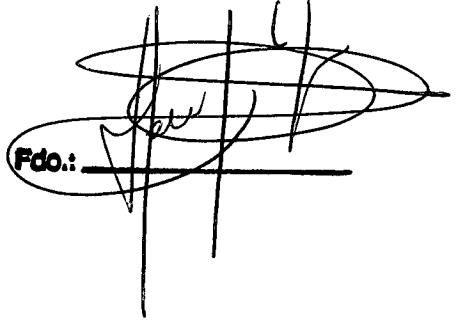
Alcalá de Henares, 01 de Julio de 2005

**EL PRESIDENTE**



Fdo.: \_\_\_\_\_

**EL SECRETARIO**



Fdo.: \_\_\_\_\_

**EL VOCAL**



Fdo.: \_\_\_\_\_

**EL VOCAL**



Fdo.: \_\_\_\_\_

**EL VOCAL**



Fdo.: \_\_\_\_\_