

## Artículos

- [Efecto de la indometacina sobre la expresión de proteínas y del canal de sodio Na<sub>v</sub>1.3 en el asta dorsal medular de ratas, inducidos por una inflamación periférica aguda](#)

- [Introducción](#)
- [Materiales y métodos](#)
- [Resultados](#)
- [Discusión](#)
- [Referencias](#)

### **Rossana Bosco-Bruno**

[rbosco@uc.edu.ve](mailto:rbosco@uc.edu.ve)

Médico, doctorando en Ciencias Médicas  
Laboratorio de Neurofisiología,  
Departamento de Ciencias Fisiológicas.  
Facultad de Ciencias de la Salud,  
Universidad de Carabobo.

### **Emilia E. Barrios**

Dra. en Ciencias (mención zoología)  
Instituto de Biología Molecular de  
Parásitos (BioMolP), Facultad de  
Ciencias de la Salud, Universidad de  
Carabobo. Valencia, Venezuela.

### **Antonio Eblen-Zajjur**

Dr. en Ciencias Médicas  
Laboratorio de Neurofisiología,  
Departamento de Ciencias Fisiológicas.  
Facultad de Ciencias de la Salud,  
Universidad de Carabobo. P.O. Box 3798,  
El Trigal, Valencia, Venezuela.

### Neurociencia

## Efecto de la indometacina sobre la expresión de proteínas y del canal de sodio Na<sub>v</sub>1.3 en el asta dorsal medular de ratas, inducidos por una inflamación periférica aguda

Fecha de recepción: 30/09/2011

Fecha de aceptación: 15/12/2012

En el presente estudio se caracterizó, mediante electroforesis, la expresión de proteínas y del canal de sodio Na<sub>v</sub>1.3, en ambas astas dorsales medulares (ADM) de rata, en condiciones controles y de inflamación periférica aguda unilateral, tratada o no con indometacina. En ratas Sprague-Dawley, (n=15), anestesiadas (Tiobarbital) se sumergió la pata posterior izquierda en agua a temperatura ambiente (26°C) por 60s (controles; n=5); 60°C (inflamado; n=5) o 60°C pretratadas con indometacina (pretratado; n=5). Luego de 15 horas, se determinaron, proteínas totales (Bradford y electroforesis) y proteína Na<sub>v</sub>1.3 (Western Blot) en ambas ADM. La inflamación incrementó las proteínas totales del ADM ipsilateral (+39.8%) y la redujo en la contralateral (-15%). La indometacina disminuyó la expresión de proteínas en inflamación e inhibió aquellas constitutivas ipsilaterales del grupo control con incremento (+14%) contralateral. El canal Na<sub>v</sub>1.3 no se expresó luego de 15 horas de inflamación. Estos resultados sugieren la respuesta diferencial de cada ADM ante un estímulo nocivo y la participación constitutiva como inducida de las cicloxigenasas en este proceso de expresión proteica.

**Palabras Claves:** Asta dorsal medular, Canal de sodio Na<sub>v</sub>1.3, Electroforesis, Inflamación, Proteínas, Western Blot.

### Title

Effect of indomethacin on the expression of proteins and sodium channel Na<sub>v</sub>1.3 in the dorsal horn of the spinal cord of rats, induced by an acute peripheral inflammation

### Abstract

In the present study, the expression of proteins and sodium channel Na<sub>v</sub>1.3, was characterized by electrophoresis in both spinal dorsal horns (ADM) of rats in control conditions and after an acute unilateral peripheral inflammation, and treated or not with indomethacin. Sprague Dawley rats (n=15) were anesthetized (Tiobarbital) and the left hindpaw was immersed in water at room temperature (26°C) for 60s (control; n=5); at 60°C (inflamed, n=5) or 60°C pretreated with indomethacin (pretreated, n=5). After 15 hours, total proteins (Bradford and electrophoresis) and Na<sub>v</sub>1.3 channel (Western-blotting) determinations were performed. Inflammation increased the ADM proteins ipsilaterally (+39.8%) and reduced it contralaterally (-15%). Indomethacin decreased expression of proteins in inflammation, inhibiting those constitutively expressed in the control group and increasing (+14%) those contralaterally. The channel Na<sub>v</sub>1.3 was not expressed after 15 hours of inflammation. The inflammation suppressed the protein expression in the contralateral ADM. Indomethacin reduced the ipsilateral protein expression and increased the contralateral. These results suggest the differential response of each dorsal horn to noxious stimuli.

### Key Word

Spinal dorsal horn, Sodium channel Na<sub>v</sub>1.3, Electrophoresis, Inflammation, Proteins, Western

Blot.

## **Efecto de la indometacina sobre la expresión de proteínas y del canal de sodio Na<sub>v</sub>1.3 en el asta dorsal medular de ratas, inducidos por una inflamación periférica aguda**

### **Introducción**

La estimulación nociceptiva inevitablemente activa una secuencia de fenómenos, genómicos o no, que conllevan a la expresión o supresión de un mosaico de sustancias neuroactivas y de receptores en las astas dorsales de la médula espinal (ADM) <sup>(1)</sup>. En la mayoría de los estudios llevados a cabo en este sentido, el efecto ha sido más pronunciado en el lado ipsilateral a la inflamación <sup>(2, 3)</sup>. Estos cambios pueden ser dependientes tanto del modelo de inflamación utilizado como del tiempo transcurrido al momento de evaluarlos después de la inducción de la inflamación <sup>(4)</sup>.

En modelos de dolor neuropático se han reportado cambios significativos en la expresión de 2 genes relacionados con nocicepción a nivel de médula espinal: el gen para el receptor bradikina-1 se sobreexpresó mientras que el correspondiente al receptor vaniloide-1 (TRPV-1) fue reprimido en los animales que exhibieron hiperalgesia luego de la lesión medular <sup>(4)</sup>. La actividad de la fosfatasa ácida fluoruro-resistente (FRAP), fue significativamente mayor en el ADM ipsilateral en un grupo de ratas con inflamación periférica unilateral <sup>(5)</sup>. Estudios previos han demostrado que procesos inflamatorios periféricos pueden incrementar los niveles de ciertas proteínas sin modificar los niveles de ARNm, tal es el caso del mismo TRPV-1 en el ganglio de la raíz dorsal <sup>(6)</sup>. Así mismo, las evidencias de respuestas contralaterales a la inflamación vienen demostradas por la expresión de sustancias como ARNm de prodinorfina, el cual ha sido reportado como de menor magnitud con respecto al lado ipsilateral del ADM <sup>(7)</sup>.

De modo similar, existen cambios electrofisiológicos susceptibles de ser medidos en los minutos sucesivos a la inducción de un proceso inflamatorio que además, sugiere una respuesta asimétrica de las redes neuronales que componen ambas ADM <sup>(8)</sup>. Estos estudios funcionales han demostrado que la comunicación cruzada entre ambas astas puede producir respuestas contralaterales, las cuales son usualmente menores en magnitud y tienen un curso temporal más breve <sup>(8, 9)</sup>. Es probable que, la asimetría observada en las respuestas electrofisiológicas tenga además una expresión bioquímica similar en dichas ADM.

Ciertos estados fisiopatológicos como la inflamación nociceptiva o el dolor neuropático, pueden inducir también cambios en la expresión de canales iónicos <sup>(10)</sup>. Los canales de sodio voltaje dependientes (CSVD) son proteínas integrales de membrana, que permiten un flujo rápido de Na<sup>+</sup> al interior celular en respuesta a la despolarización de la membrana, siendo de vital importancia en la conducción del impulso nervioso y muscular. Las distintas isoformas de los CSVD tienen diferentes patrones de desarrollo y localización (sistema nervioso central y periférico, músculo esquelético y cardíaco) <sup>(11)</sup>. Hasta el momento han sido identificados en mamíferos, 10 genes diferentes que codifican las subunidades CSVDα: Na<sub>v</sub>1.1-Na<sub>v</sub>1.9 y Na<sub>x</sub>. Cada una de ellas exhibe una secuencia de aminoácidos homóloga en un 85-95%, no obstante presentan características electrofisiológicas y farmacológicas diferentes <sup>(11, 12)</sup>.

La expresión y actividad del Na<sub>v</sub>1.3 en el sistema nervioso es altamente dinámica, con una plasticidad significativa <sup>(11)</sup>. Tales cambios pueden ocurrir en estadios distintos: transcripción, pretransducción y post-transducción, de forma que estos mecanismos pueden modular la densidad efectiva de proteínas Na<sub>v</sub>1.3, sus propiedades electrofisiológicas, su localización a nivel celular y la adaptación cualitativa y/o cuantitativa de la actividad del canal <sup>(12)</sup>. Varios estudios han determinado la distribución de Na<sub>v</sub>1.3 ó de su ARNm en el sistema nervioso central (SNC) a través de técnicas como la hibridación o Western blot demostrando, en condiciones normales, su poca abundancia en el SNC de la rata adulta y su amplia expresión en el sistema nervioso embrionario de roedores y en el cerebro humano <sup>(13)</sup>. El aumento en la expresión del Na<sub>v</sub>1.3 se ha hecho manifiesta en modelos experimentales crónicos como el de la ligadura laxa del nervio ciático, donde la expresión del canal aumenta entre los días 7 y 14 posteriores a la ligadura <sup>(14)</sup>. A pesar de los numerosos reportes que afirman que el Na<sub>v</sub>1.3 es fuertemente sobreexpresado luego de una lesión en el SNC de mamíferos adultos, Lindia y Abbadie <sup>(11)</sup>, determinaron inmunohistoquímicamente su normal distribución tanto en el SNC como periférico de ratas; en la corteza cerebral, en la sustancia gris de la médula espinal y en fibras que terminan en las láminas profundas del ADM y asta ventral, entre otros.

Un mecanismo de acción común de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) es la inhibición de la enzima ciclooxigenasa en sus distintas isoformas (COX<sub>1</sub> y COX<sub>2</sub>), la cual se encuentra constitutivamente en la médula espinal; particularmente la COX<sub>2</sub>.<sup>(15)</sup> Los niveles de COX<sub>2</sub> pueden aumentar durante los procesos inflamatorios agudos o crónicos por acción de ciertas citocinas y factores de crecimiento<sup>(16)</sup>. Su sobreexpresión conduce a su vez a un incremento en las concentraciones de prostaglandinas (PG) las cuales juegan un rol importante en la fisiopatología de la inflamación y el dolor, bien modulando la actividad neuronal a través de la liberación de aminoácidos excitatorios<sup>(16)</sup>, o a través de la disminución del umbral de excitación neuronal y aumento de las descargas neuronales por incremento de las corrientes de Na<sup>+</sup> e inhibición de las corrientes de K<sup>+</sup><sup>(17)</sup>. La indometacina inhibe fuertemente la síntesis de PG no solo en el tejido periférico inflamado sino también a nivel espinal, efecto este que puede contribuir con su acción antinociceptiva<sup>(17)</sup> a través de la modulación de la expresión de macromoléculas.

El objetivo de esta investigación es caracterizar la expresión de las diferentes proteínas y del canal de sodio voltaje dependiente Na<sub>v</sub>1.3 en ambas ADM de rata, en condiciones controles y durante una inflamación periférica aguda unilateral, tratada o no con indometacina.

## Materiales y métodos

Los experimentos se llevaron a cabo en 15 ratas macho adultas, Sprague Dawley (350-400g), con alimentación *ad libitum*, mantenidas bajo un esquema de luz/oscuridad de 12:12 horas y tratadas de acuerdo a los lineamientos del National Institute of Health (NIH, 1996). Se constituyeron 3 grupos experimentales de 5 ratas cada uno, identificados como: control, inflamación (A) e inflamación pretratado con indometacina (B).

### Inflamación

Los animales fueron anestesiados con tiopental sódico (60mg.kg<sup>-1</sup>, intraperitonealmente), luego se administró 0,05mg de atropina diluidos en 0,5ml de solución fisiológica, por vía subcutánea para reducir las secreciones respiratorias. La temperatura se mantuvo constante (37,5±0,5°C; media±DE) gracias a una manta eléctrica colocada en la superficie ventral del animal, regulada mediante retroalimentación.

A los animales del grupo A se les introdujo la pata trasera izquierda en agua a 60°C/60 segundos para inducir una inflamación periférica local<sup>(18)</sup>; 15 horas después, se realizó una laminectomía de los segmentos T11-L3 para exponer el engrosamiento lumbar, bajo las mismas condiciones de anestesia descritas previamente. Al grupo B, una vez anestesiado el animal, se administró indometacina (4mg.k<sup>-1</sup>, por vía intraperitoneal)<sup>(19)</sup>, pasados 30 minutos, se procedió a tratar el animal de la misma manera que al grupo A. Los animales del grupo control se sometieron a la misma manipulación pero sumergiendo la pata en agua a temperatura ambiente (26°C).

Posterior a la laminectomía, el engrosamiento lumbar de la médula fue resecado y crioprotegido a -4°C en solución buffer Tris HCl, pH 8.0 (Tris base 50mM; EDTA 10mM; Triton X-100 1%; NaF 50mM) y se administró 0,1cc de succinilcolina intracardíaco, para sacrificar al animal.

Muestras ipsi y contralaterales de cada ADM (1mm<sup>3</sup>) fueron obtenidas mediante punches de 1mm de diámetro, a partir de cortes transversales medulares colocados en una lámina de aluminio sobre una cama de hielo seco. Los fragmentos tisulares fueron almacenados por separado en viales de acuerdo al grupo respectivo, y homogeneizados en solución buffer Tris HCl, pH 8,0 (1mg.mL<sup>-1</sup>). La concentración de proteínas totales en los homogeneizados se determinó mediante lectura espectrofotométrica a 595 nm.

### Electroforesis

Los homogenatos de ADM y un marcador de PM comercial de rango variable (Blue Rangers, Promega) se migraron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10% (p/v), en condiciones reductoras, en una cámara vertical; se cargaron 20µg de proteínas totales/pozo de cada una de las muestras, previamente tratadas con Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8; dodecilsulfato de sodio (SDS) al 20%; glicerol bidestilado 1mL; azul de bromofenol 10mg; 2-βmercaptoetanol 500µL y calentadas a 70°C por 10 minutos. La migración se hizo en una mini-cámara (Bio-Rad modelo1000/500) a corriente constante de 200V por 45 minutos a 4°C en buffer Tris-glicina pH 8,3 (Tris 20 mM; glicina 192 mM, SDS al 1% v/v). Las proteínas totales fueron reveladas en los geles mediante la tinción con Coomassie blue combinado<sup>(20)</sup>.

### Expresión de Anti Na<sub>v</sub>1.3 mediante Western Blot

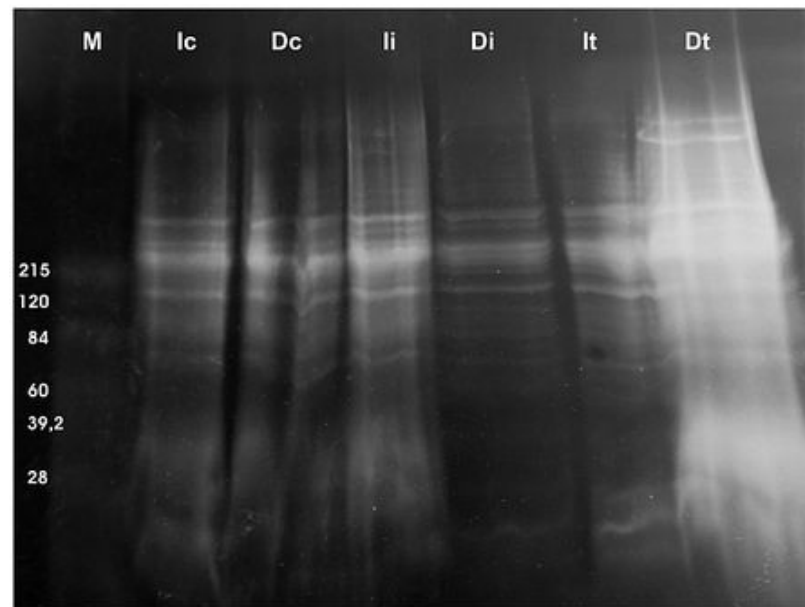
Las proteínas migradas, se electrotransfirieron a papel de nitrocelulosa (0,45  $\mu\text{m}$ , Pierce) a 100V por 1h. Luego, se incubaron por 1 hora con el anticuerpo anti  $\text{Na}_v1.3$  <sup>(11)</sup>, dirigido a un péptido purificado (aminoácidos 511-524) de la subunidad  $\alpha$  del  $\text{Na}_v1.3$  de rata (Chemicon International), diluido 1:200 con agua destilada. Se empleó un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa, diluido 1:20000 en solución de bloqueo buffer TBS-Tween (Tris-HCL 20mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,05% v/v) y posterior revelado por luminografía. El revelado de los inmunocomplejos se hizo empleando luminol y peróxido de hidrógeno diluido 1:1 (Supersignal, Pierce, USA). Con la quimioluminiscencia se impresionó una película de rayos X (Pierce, USA), seguido de revelado fotográfico <sup>(21)</sup>.

#### *Análisis cuantitativo de las imágenes*

Los geles de electroforesis fueron digitalizados y sus bandas medidas mediante perfiles densitométricos a través del software de procesamiento digital de imágenes Image Tool®. Los valores de densidades relativas obtenidos en las bandas correspondientes al ADM contralateral se sustrajeron de los correspondientes al ADM ipsilateral (D-I), posteriormente se graficaron y se trataron mediante promediación móvil de 10 términos estableciéndose los intervalos de confianza con los percentiles 5 y 95. Con el mismo software, se calculó el área bajo la curva para determinar las diferencias relativas (%) en la expresión de proteínas totales de las ADM ipsi y contralaterales a la inflamación periférica de todos los grupos experimentales.

## Resultados

Las bandas de migración electroforética de las muestras de proteínas obtenidas de cada ADM: izquierda (I) o derecha (D) de cada condición: control (c), inflamado (i) o inflamado y pretratado con indometacina (t) de animales, así como una muestra de calibración de pesos moleculares referenciales, se presentan en la figura 1. A pesar de que la corrida electroforética no fue totalmente homogénea, se puede observar como en Ic y Dc se revelaron 4 bandas ubicadas entre 250-120KDa y 3 bandas ubicadas entre 84-28KDa; en Ii se revelaron 5 bandas entre 250-120KDa y 3 bandas entre 84-28KDa. En Di e It se revelaron 7 bandas entre 250-120KDa y 3 bandas ubicadas entre 84-28KDa; por el contrario, en Dt se observaron 5 bandas por encima de 215 KDa y 4 bandas entre 84-28 KDa.

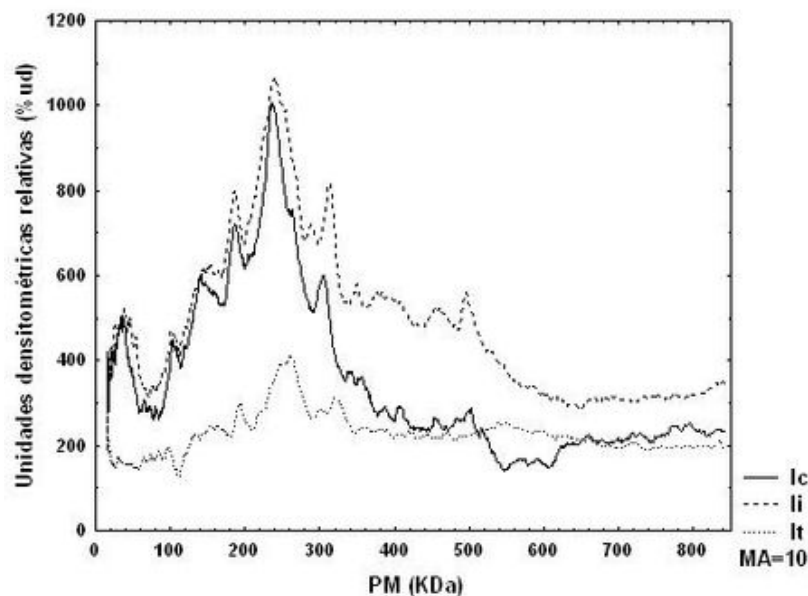


**Figura 1:** Electroforesis de proteínas totales de las ADM de las ratas controles y de los grupos A y B. Marcador de pesos moleculares (M), con sus respectivas bandas (215, 120, 84, 60, 39.2 y 28KDa); muestras del ADM ipsilateral (Ic) o contralateral (Dc) de ratas no inflamadas o controles; muestra del ADM ipsilateral (Ii) o contralateral (Di), posterior a la inflamación; muestra del ADM ipsilateral (It) o contralateral (Dt), posterior a la inflamación y pretratadas con indometacina.

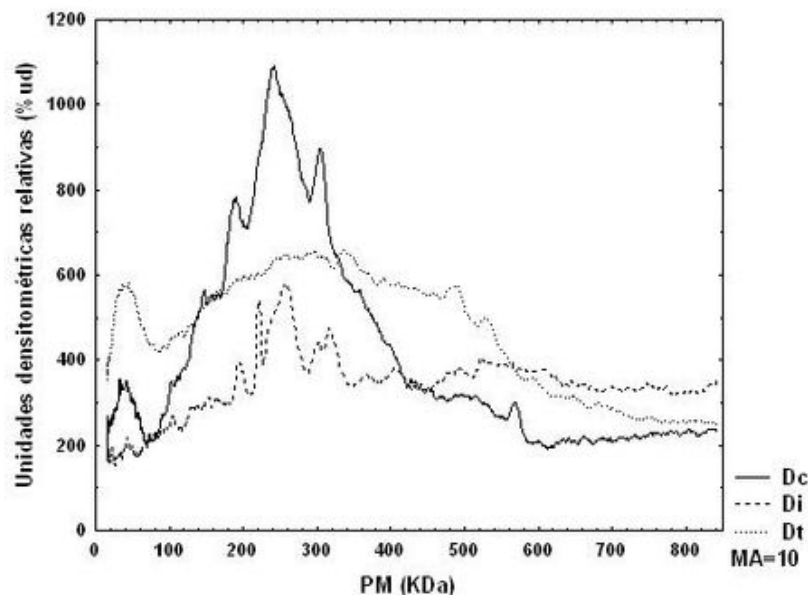
#### *Expresión de proteínas en las ADM*

En la figura 2 se observan los cambios de la expresión proteica en el ADM ipsilateral a la inflamación. El proceso inflamatorio indujo un incremento generalizado de las mismas de

+39,82%, en relación con el grupo control, manteniéndose los picos en los PM predominantes, pero más intensamente en las proteínas de PM>200. Llama la atención que el pretratamiento con indometacina, no solo produjo disminución de la expresión de las proteínas postinflamación (-33,57%), sino que además inhibió las proteínas constitutivamente expresadas en el grupo control, siendo este efecto más intenso para proteínas de PM<350. Por el contrario, en el ADM contralateral, el proceso inflamatorio redujo la expresión de proteínas totales en -15%, suprimió las proteínas que estaban presentes en el grupo control en los picos de PM 160-320KDa, suprimió la expresión constitutiva de proteínas con PM de 20-80KDa e incrementó la expresión de aquellas con PM  $\geq$ 450KDa. La administración de indometacina favoreció el incremento de la expresión proteica de bajo PM (20-80KDa), mientras que en el resto de la curva se evidenció un incremento de la expresión en comparación al grupo inflamado e inclusive, un aumento en la densidad proteica total de +14,2% con respecto del grupo control (Figura 3).



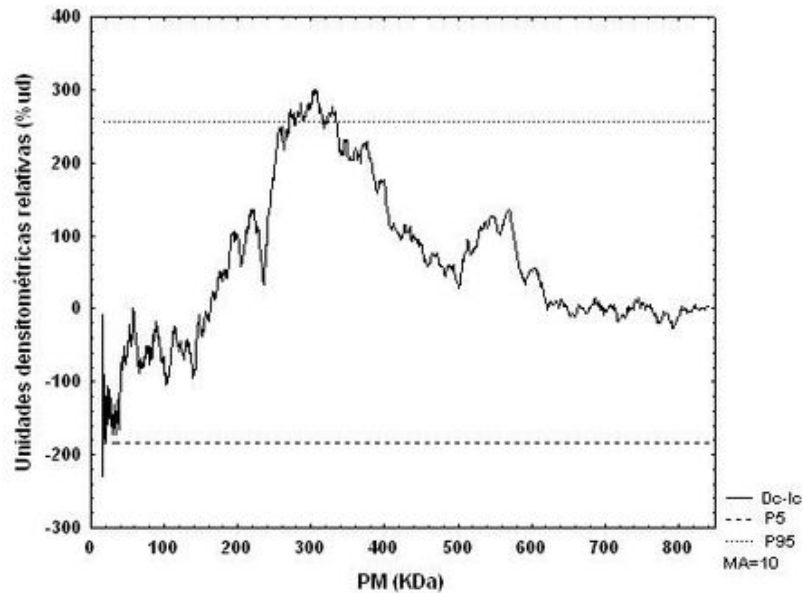
**Figura 2:** Diferencias en la expresión de proteínas totales de las ADM ipsilaterales a la inflamación periférica de todos los grupos experimentales (Ic, li, It). n=5; PM= peso molecular; MA= average móvil de 10 términos.



**Figura 3:** Diferencias en la expresión de proteínas totales de las ADM contralaterales a la inflamación periférica de todos los grupos experimentales (Dc, Di, Dt). n=5; PM= peso molecular; MA= average móvil de 10 términos.

#### *Expresión de proteínas de las ADM en condiciones controles*

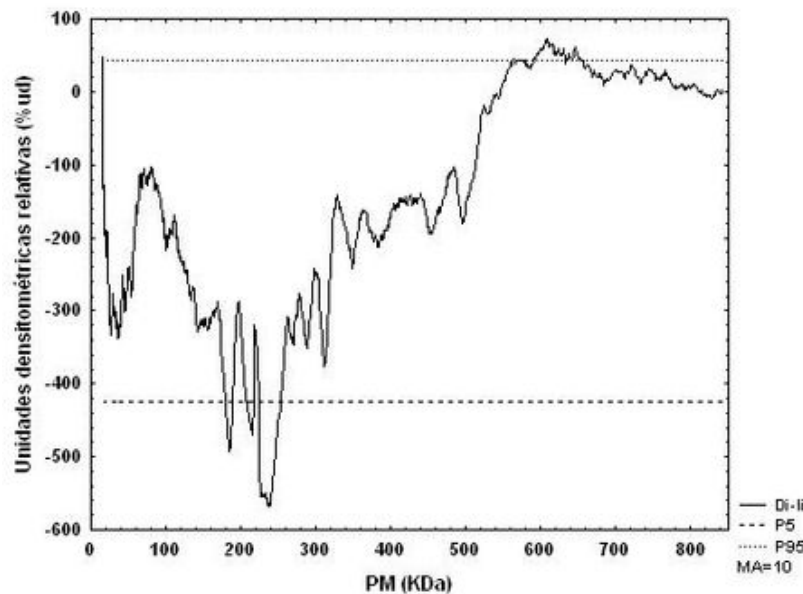
La diferencia de proteínas en el grupo control (Dc-Ic) muestra una mayor expresión de las mismas en las ADM contralaterales con PM entre 260-340KDa (Figura 4). A pesar de la magnitud de la expresión proteica hallada, esta no fue significativa.



**Figura 4:** Diferencias en la expresión de proteínas totales entre las ADM ipsi y contralaterales de ratas controles (Dc-Ic) expresadas como unidades densitométricas relativas (%ud), n=5; niveles de confiabilidad P5 y P95. PM: peso molecular; MA: average móvil de 10 términos.

*Expresión de proteínas de las ADM en condiciones de inflamación periférica unilateral*

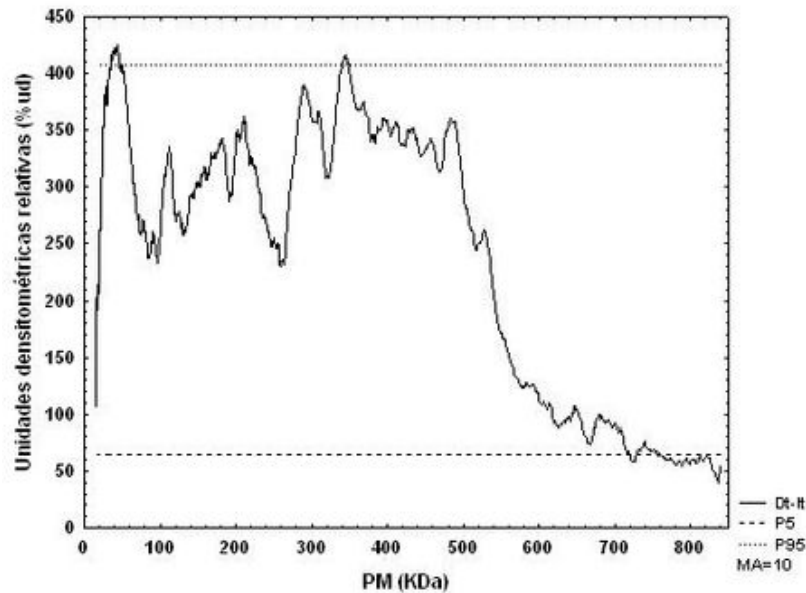
El proceso inflamatorio incrementó la expresión de proteínas con PM de 180-260KDa del ADM ipsilateral. Por el contrario, en el ADM contralateral aumentaron las proteínas con PM comprendidos entre 580-640KDa (Figura 5).



**Figura 5:** Diferencias en la expresión de proteínas totales entre las ADM ipsi y contralaterales en las ratas del grupo A (Di-Ii) expresadas como unidades densitométricas relativas (%ud), n=5; niveles de confiabilidad P5 y P95. PM: peso molecular; MA: average móvil de 10 términos.

*Expresión de proteínas de las ADM en condiciones de inflamación periférica unilateral pretratadas con indometacina*

En el grupo B, se registró una inhibición a nivel del ADM ipsilateral, de la expresión de proteínas con  $PM \geq 720KDa$ . Por el contrario, la expresión de las mismas en el ADM contralateral aumentó, particularmente en dos bandas de proteínas con PM 4 a 8KDa y de 340 a 360KDa (Figura 6).



**Figura 6:** Diferencias en la expresión de proteínas totales de las ADM ipsi y contralaterales previo tratamiento con indometacina (Dt-It) expresadas como unidades densitométricas relativas (%ud), n=5; niveles de confiabilidad P5 y P95. PM: peso molecular; MA: average móvil de 10 términos.

#### *Expresión de proteínas del canal $Na_v1.3$ en las ADM*

De acuerdo a los niveles de especificidad del Western blot y bajo las condiciones experimentales descritas, no se observó la presencia de bandas reactivas que sugirieran la expresión del canal  $Na_v1.3$ .

#### **Discusión**

En el presente estudio se determinó electroforéticamente la expresión proteica en ambas ADM en condiciones basales y durante la inflamación unilateral periférica sin y con pretratamiento con indometacina. Paralelamente se exploró en las mismas muestras, la expresión de  $Na_v1.3$  mediante Western Blot.

#### *Expresión proteica de las ADM inducidas por la inflamación*

Las conexiones tanto funcionales como anatómicas entre ambas ADM han sido extensamente estudiadas. Petko et al. <sup>(22)</sup> presentaron evidencias de una conexión comisural directa entre fibras de las láminas III-IV lumbares, demostrando además que esta vía puede transmitir señales tanto inhibitorias como excitatorias. Desde el punto de vista funcional, las respuestas contralaterales a una estimulación periférica son usualmente menores tanto en magnitud como en duración, con respecto de las ipsilaterales <sup>(8, 9)</sup>. De modo similar, se han registrado cambios bioquímicos como la expresión de ARNm dinorfina y el péptido de dinorfina, en respuesta a estímulos unilaterales, los cuales muestran cursos temporales distintos para cada ADM; con un 30% menos de expresión en el número de células marcadas, contralaterales a la inflamación <sup>(7)</sup>. Un modelo experimental similar al empleado en esta investigación, determinó un incremento de la actividad enzimática de la FRAP (289KDa) significativamente mayor (+62,6%) en el ADM ipsilateral en el grupo de ratas inflamadas unilateralmente <sup>(23)</sup>. Si bien el presente estudio concuerda con estos reportes en relación a que la inflamación incrementa la expresión proteica en el ADM ipsilateral, aporta un nuevo hecho como lo es, la intensa inhibición de la misma en el ADM contralateral.

Las proteínas sobreexpresadas o reprimidas en este modelo experimental, son principalmente moléculas de alto peso molecular, muchas de ellas probablemente expresadas constitutivamente en el ADM. Los mecanismos moleculares que subyacen a esta plasticidad neuronal no han sido del todo bien explicados, la mayoría de los reportes relacionados con la sobreexpresión de macromoléculas se han descrito en modelos experimentales de dolor neuropático <sup>(24)</sup>, siendo escasos los estudios en modelos de inflamación aguda periférica.

En cuanto a las proteínas de bajo PM que pudieran participar de esta expresión tenemos las taquikinininas (sustancia P, neurokinina A, neurokinina B, hemokinina-1) <sup>(25)</sup>. En general, son péptidos de bajo peso molecular (~16 KDa) <sup>(26)</sup> que se encuentran ampliamente distribuidos en neuronas aferentes primarias dando lugar a un amplio rango de efectos biológicos mediados a

través de sus receptores NK1r, NK2r y NK3r. Los NK1r (58KDa), han sido descritos en neuronas de las láminas I-IV <sup>(25, 26)</sup>.

La activación de los genes de expresión inmediata c-fos y c-jun conduce a su vez a la síntesis de proteínas fos y jun, consideradas como terceros mensajeros; estas proteínas participan en la regulación de la transcripción de numerosos genes, entre los cuales se encuentra los de la proencefalina y prodinorfina <sup>(1)</sup>, cuyas proteínas son precursores moduladores de la transmisión del dolor. El fuerte efecto antinociceptivo y antialodínico de los péptidos opioides endógenos tiene lugar en una amplia zona del ADM, mediado por receptores opioides  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  (~40-66 KDa), hallados en neuronas del ADM <sup>(27)</sup>. Estos péptidos son las endomorfinas 1 y 2, las dinorfinas A y B (2, 4 y 6-8KDa), y las met- y leu-encefalinas (~1KDa) <sup>(26)</sup>. Tanto las encefalinas como las dinorfinas se encuentran en cantidades importantes en neuronas de las ADM superficiales <sup>(26)</sup>.

Las sinapsis excitatorias en el SNC están caracterizadas por un prominente engrosamiento de la membrana postsináptica llamada "densidad postsináptica" (DP), la cual contiene estrechos complejos proteicos formados por receptores de neurotransmisores para glutamato tipo NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato) de 650-850KDa, proteínas reguladoras como las Homer1 (46-48KDa), las PSD-95 (95KDa) o proteínas de densidad postsináptica, pertenecientes a la familia de las guanilato-cinasas asociadas a membranas (MAGUK) y proteínas relacionadas con el citoesqueleto <sup>(28)</sup>. Constitutivamente, el ARNm de los receptores NMDA tipo NR1 (24KDa) están presentes en la mayoría de las neuronas del ADM, mientras que el ARNm para los receptores AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato) tipo GluR1 (106KDa) y GluR2 (99KDa), se encuentran principalmente en las láminas I y II, aún cuando esta localización no es perfectamente simétrica en ambas ADM tal como lo muestran estudios inmunocitoquímicos <sup>(1)</sup>.

La inflamación inducida por agentes químicos como la formalina y coadjuvante de Freund produce un incremento sustancial en la expresión de precursores de SP y en la propia SP en el ADM ipsilateral a la inflamación <sup>(29)</sup>. Desde el punto de vista bioquímico, la inflamación induce un aumento de ARNm de dinorfina y prodinorfina, sin embargo esto contrasta con lo que ocurre con sus receptores, los cuales tienden a disminuir luego de una inflamación unilateral <sup>(1, 7)</sup>.

En la patogénesis del dolor participan neuronas sensoriales primarias, interneuronas y además, células gliales <sup>(30)</sup>. Durante los procesos inflamatorios ocurre la activación de proteinkinasa activadas por mitógeno (MAPK), entre las cuales se describe la P38 (38KDa). Esta MAPK se ha visto activada en modelos de dolor neuropático, observándose su incremento a partir de las 12 horas consecutivas a la inducción de la inflamación. Dicha activación se ve restringida a las microglías del ADM ipsilateral. La activación glial también promueve la expresión de citoquinas proinflamatorias como las interleukinas (IL) 1 $\alpha$  y 1 $\beta$  (~35KDa) durante las primeras horas de procesos inflamatorios agudos periféricos, como la inyección subcutánea de formalina en la pata de ratas <sup>(31)</sup>; del mismo modo, es probable la activación de la cascada del complemento, a través de los factores C3 (190KDa) principalmente, C1, C1q, C3d y C9 e incremento en los niveles de inmunoglobulina G endógena (160KDa) tal como se ha demostrado a través de estudios inmunocitoquímicos en modelos de inflamación periférica <sup>(32)</sup>.

Se sabe además que, la inducción de un proceso inflamatorio periférico promueve un remodelado actividad-dependiente de la terminal postsináptica, que conlleva a la formación de clusters proteicos entre las proteínas reguladoras y otras proteínas de la DP <sup>(28)</sup>, a fin de incrementar la eficacia sináptica. En modelos experimentales como la ligadura laxa del nervio ciático, se han registrado cambios tempranos (<4 horas) en la expresión genética de estos complejos proteicos en el ADM ipsilateral <sup>(28)</sup>.

Por su parte, la respuesta de los receptores de glutamato posterior a un proceso inflamatorio es compleja; luego de la sección del nervio ciático, se ha visto un incremento del 300% de los receptores NMDA bilateralmente en las ADM <sup>(33)</sup>, mientras que la inyección de lipopolisacáridos a nivel articular produce una disminución en aproximadamente un 25% de GluR1 en neuronas de la lámina II, sin cambios en la expresión de ARNm para GluR2 y NR1 <sup>(34)</sup>.

Durante la instauración de un proceso inflamatorio se establece además un balance relativo entre la actividad de los aminoácidos excitatorios (glutamato) e inhibitorios (GABA y glicina), lo cual parece determinar el nivel de transmisión del dolor. El receptor GABA es una glucoproteína heteropentamérica (275 KDa), por su parte el receptor de glicina es una glucoproteína de 246KDa <sup>(1)</sup>. En la médula espinal, muchas sinapsis colocalizan ambos neurotransmisores, por lo que la liberación de los mismos en las terminales presinápticas induce la coactivación de sus receptores <sup>(1)</sup>.

Las neuronas de las láminas I-II, así como las células gliales expresan COX<sub>2</sub> (71KDa) sin embargo las IL, así como la propia inflamación aguda periférica, desempeñan un rol importante



en la sobreexpresión de esta enzima, la cual se hace manifiesta en ambas ADM en las primeras horas posteriores al proceso inflamatorio <sup>(16)</sup>. Por acción de la COX<sub>2</sub>, es inducida la síntesis de PG. Parece que algunos de los mecanismos que subyacen a los cambios plásticos inducidos por inflamación están mediados por el aumento en función del tiempo, de la concentración de PGE<sub>2</sub> y la activación de sus receptores (EP1, 40-61KDa) en el ADM. Coderre et al., <sup>(35)</sup> registraron un aumento de los niveles de PGE<sub>2</sub> en los 10 minutos sucesivos a la estimulación aguda nociceptiva periférica de ratas. Nakayama et al., <sup>(36)</sup> evaluaron el rol de estas sustancias en un modelo de inflamación química también en ratas, a las 3 y 15 horas postinflamación donde la concentración de PGE<sub>2</sub> aumentó a las 15 horas en el ADM ipsilateral a la inflamación.

La generación y posterior procesamiento de la información nociceptiva a nivel del ADM se debe en gran parte a canales iónicos activados entre otros, por mediadores inflamatorios como la PGE<sub>2</sub>. De los canales que pudieran estar implicados, tenemos los de calcio, los cuales incrementan los niveles de este ión intracelular, mediando así la liberación de neurotransmisores y activando cascadas intracelulares que modifican la excitabilidad neuronal e inician la transcripción proteica. En mecanismos de dolor neuropático se ha demostrado la sobreexpresión de las subunidades  $\alpha_2\delta$  (170 KDa) de los canales de calcio voltaje dependientes, en neuronas del ADM. Vale la pena mencionar también los canales iónicos sensibles a la concentración extracelular de protones (50-70 KDa) que se encuentran ampliamente distribuidos en neuronas sensoriales; estos canales se activan cuando disminuye el pH extracelular a nivel de la hendidura sináptica, que es uno de los principales estímulos nociceptivos en inflamación <sup>(37)</sup>.

#### *Efecto del pretratamiento con indometacina sobre la inflamación unilateral en la expresión proteica de las ADM*

La administración de fármacos antiinflamatorios no esteroideos como la indometacina, inhibe la síntesis de PG no solo a nivel del tejido inflamado sino también a nivel de la médula espinal, lo que sin duda influye en su acción antinociceptiva <sup>(16)</sup>. Desde el punto de vista funcional, la administración de indometacina antes y durante el desarrollo de una inflamación periférica atenúa la hiperexcitabilidad neuronal espinal inducida por la inflamación <sup>(19)</sup>. El pretratamiento con indometacina redujo la sobreexpresión de proteínas de choque térmico (72 kD), consecutiva a un trauma focal de la médula espinal <sup>(38)</sup>. Los resultados de esta investigación muestran que, la administración de indometacina sistémica, previa a la inducción de la inflamación produjo la supresión de la expresión de proteínas, aún por debajo de los niveles registrados en el grupo control, en ambas ADM.

#### *Ausencia de expresión basal y/o durante inflamación, de proteínas Na<sub>v</sub>1.3 en las ADM*

Unos de los principales canales iónicos responsables de las corrientes de despolarización son los canales de sodio, involucrados con la transmisión sináptica rápida y la generación de potenciales de acción. En relación a estos, es sabido que los procesos inflamatorios crónicos sobreexpresan Na<sub>v</sub>1.3 (~250KDa) en neuronas de primer y segundo orden; pero, este canal también se ha descrito a niveles proteicos constitutivos en la sustancia gris medular <sup>(11)</sup>. Los resultados de esta investigación no demostraron sobreexpresión del Na<sub>v</sub>1.3 por la técnica del Western blot, a pesar de la especificidad del anticuerpo utilizado. Ello podría atribuirse a que, de acuerdo con el modelo inflamatorio utilizado referido a una inflamación aguda, no se haya alcanzado el tiempo mínimo necesario para la expresión de una cantidad suficiente de proteínas Na<sub>v</sub>1.3, lo que contrastaría con los hallazgos de Linda y Abbadie <sup>(11)</sup> en relación a la expresión constitutiva del canal; sin embargo, no es posible descartar un incremento en los niveles de Na<sub>v</sub>1.3 ARNm, para lo cual sería necesario emplear técnicas como la hibridación in situ.

En conclusión, los resultados de esta investigación mostraron que la expresión de proteínas en las ADM de ratas, exhibe un patrón asimétrico, posterior a una inflamación aguda periférica, predominando la misma a nivel del asta ipsilateral a la inflamación. Llama la atención que el proceso inflamatorio periférico, suprimió la expresión de estas macromoléculas en el ADM contralateral. Las proteínas cumplen distintos roles en la transmisión de la información nociceptiva, por lo que estos cambios bioquímicos pudieran explicar, al menos en parte, por qué a pesar de las evidencias anátomo-fisiológicas de conexiones comisurales entre las ADM, el paciente no refiere dolor en el lado contralateral a la lesión. Así mismo, mediante el modelo experimental utilizado, no se logró demostrar la sobreexpresión de Na<sub>v</sub>1.3.

## **Referencias**

- 1.- Willis WD, Coggeshall RE: Sensory Mechanisms of the Spinal Cord. Kluwer

Academic/Plenum Publisher, New York, 2004.

- 2.- Zhang YQ, Gao X, Ji GC, Huang YL, Wu GC, Zhao ZQ: Expression of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA in rat lumbar spinal dorsal horn neurons after peripheral inflammation. *Pain*. 2002; 98: 287-95.
- 3.- Zacharova G, Sojka D, Palecek J. Changes of Parvalbumin Expression in the Spinal Cord after Peripheral Inflammation. *Physiol. Res*. 2009;58: 435-42.
- 4.- DomBourian MG, Turner NA, Gerovac TA, Vemuganti R, Miranpuri GS, Türeyen K, et al. B1 and TRPV-1 receptor genes and their relationship to hyperalgesia following spinal cord injury. *Spine*. 2006;31:2778-82.
- 5.- Glykys J,Guadama M,Marcano L,Ochoa E,Eblen-Zajjur A. Inflammation induced increase of fluoride resistant acid phosphatase (FRAP) activity in the spinal dorsal horn in rats. *Neurosci Lett*.2003;337:167-9.
- 6.- Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*. 2002;36:57–68.
- 7.- Ruda MA, Iadarola MJ, Cohen LV, Young WS 3rd. In situ hybridization histochemistry and immunocytochemistry reveal an increase in spinal dynorphin biosynthesis in a rat model of peripheral inflammation and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85: 622-26.
- 8.- Koltzenburg M, Wall PD, McMahon SB. Does the right side know what the left is doing? *Trends Neurosci*. 1999; 22: 122-7.
- 9.- Shenker N, Haigh R, Roberts E, Mapp P, Harris N, Blake D. A review of contralateral responses to a unilateral inflammatory lesion. *Rheumatology* 2003, 42:1279-86.
- 10.- Safronov BV, Wolff M, Vogel W. Functional distribution of three types of Na<sup>+</sup> channel on soma and processes of dorsal horn neurones of rat spinal cord. *J Physiol*. 1997;503:371-85.
- 11.- Lindia J, Abbadie C. Distribution of the voltage gated sodium channel Nav 1.3-like immunoreactivity in the adult rat central nervous system. *Brain Research*. 2003;960:132–41.
- 12.- Diss JKJ, Fraser SP, Djamgoz MBA. (2004). Voltage-gated Na<sup>+</sup> channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. *Eur Biophys*. 2004;33:180-93.
- 13.- Waxman SG, Kocsis JD, Black JA. Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol*. 1994; 72:466–71.
- 14.- Hains BC, Saab CY, Klein JP, Craner MJ, Waxman SG. Altered sodium channel expression in second-order spinal sensory neurons contributes to pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci*. 2004;24:4832–9.
- 15.- Willingale HL, Gardiner NJ, McLymont N, Giblett S, Grubb BD. Prostanoids synthesized by cyclo-oxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. *Br J Pharmacol*. 1997;122:1593-604.
- 16.- Vanegas H, Schaible HG. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog Neurobiol*. 2001;64:327-63.
- 17.- Matsumura K, Sharma HS, Cao C, Watanabe Yu, Yamagata K, Ozaki M, et al. Prostaglandin system in the spinal cord: a neuroanatomical study in the pathophysiological states. In Stålberg E, Sharma HS, Olsson Y, editores. New York: Springer; 1998. p. 108.
- 18.- Czaplinski M,Abad C,Eblen-Zajjur A. Normal expression and inflammation-induced changes of Na and Na/K ATPase activity in spinal dorsal horn of the rat. *Neurosci Lett*.2005;374:147-51.
- 19.- Vasquez E, Bar KJ, Ebersberger A, Klein B, Vanegas H, Schaible HG. Spinal prostaglandins are involved in the development but not the maintenance of inflammation-induced spinal hyperexcitability. *J Neurosci*. 2001;21:9001-8.
- 20.- De Moreno M, Smith J, Smith R. Silver Staining of proteins in polyacrylamide Gels. Increased Sensivity through a Combined Coomassie Blue-Silver procedure. *Annal Biochem*. 1985; 151:466-470.
- 21.- Towbin H, Staehelin T, Goeden J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some of immunodiagnosis in Schistosomiasis. *TDR/SCH/IMM-DIA*;1979;92: 3.

- 22.- Petko M, Veress G, Vereb G, Storm-Mathisen J, Antal M. Commissural propriospinal connections between the lateral aspects of laminae III–IV in the lumbar spinal cord of rats. *J Comp Neurol* 2004; 480:364–77.
- 23.- Chen J,Zheng XF,Brown EJ,Schreiber SL. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci USA*.1995; 92:4947-51.
- 24.- Miletic G, Driver AM, Miyabe-Nishiwaki T, Miletic V. Early changes in Homer1 proteins in the spinal dorsal horn are associated with loose ligation of the rat sciatic nerve. *Anesth Analg*. 2009;109:2000-7.
- 25.- Patak E,Pinto FM,Story ME,Pintado CO,Fleming A,Page NM,et al. Functional and molecular characterization of tachykinins and tachykinin receptors in the mouse uterus. *Biol Reprod*.2005, 72:1125-33.
- 26.- Ribeiro-daSilva A, De Koninck Y. Morphological and neurochemical organization of the spinal dorsal horn. In: Pain. Bushnell C and Basbaum AI ed. New York: Academic Press. 2008. p 279-310.
- 27.- Loh HH,Smith AP. Molecular characterization of opioid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.1990;30:123-47.
- 28.- Boeckers TM. The postsynaptic density. *Cell Tissue Res* 2006;326:409-22.
- 29.- McCarson KE, Krause JE. NK-1 and NK-3 type tachykinin receptor mRNA expression in the rat spinal cord dorsal horn is increased during adjuvant or formalin-induced nociception. *J Neurosci*. 1994;14:712-20.
- 30.- DeLeo JA, Yeziarski RP. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain*. 2001;90:1–6.
- 31.- Sweitzer SM, Colburn RW, Rutkowski M, DeLeo JA. Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1 $\beta$  expression that correlates with pain behavior in the rat. *Brain Res*. 1999;829:209-21.
- 32.- Winters M, Spellman D, Lambris J. Solvent accessibility of native and hydrolyzed human complement protein 3 analyzed by hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *J Immunol*. 2005;174: 3469–74.
- 33.- Croul S, Radziewsky A, Sverstiuk A, Murray M. NK1, NMDA, 5HT1a, and 5HT2 receptor binding sites in the rat lumbar spinal cord: modulation following sciatic nerve crush. *Exp Neurol*. 1998;154:66-79.
- 34.- Pellegrini-Giampietro DE, Fan S, Ault B, Miller BE, Zukin RS. Glutamate receptor gene expression in spinal cord of arthritic rats. *J Neurosci*. 1994;14:1576-83.
- 35.- Coderre TJ, Gonzales R, Goldyne ME, West ME, Levine JD. Noxious stimulus-induced increase in spinal prostaglandin E2 is noradrenergic terminal-dependent. *Neurosci Lett*.1990;115: 253-58.
- 36.- Nakayama Y, Omote K, Namiki A. Role of prostaglandin receptor EP1 in the spinal dorsal horn in carrageenan-induced inflammatory pain. *Anesthesiology*. 2002;97:1254-62.
- 37.- Lee Y, Lee CH, Oh U. Painful channels in sensory neurons. *Mol Cells*. 2005;20:315-24.
- 38.- Sharma HS,Westman J. Prostaglandins modulate constitutive isoform of heat shock protein (72 kD) response following trauma to the rat spinal cord. *Acta Neurochir Suppl*.1997;70:134-7.

**NOTA:** Toda la información que se brinda en este artículo es de carácter investigativo y con fines académicos y de actualización para estudiantes y profesionales de la salud. En ningún caso es de carácter general ni sustituye el asesoramiento de un médico. Ante cualquier duda que pueda tener sobre su estado de salud, consulte con su médico o especialista.