



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

PARTICIPACIÓN DE LAS ENZIMAS PRODUCTORAS DE  
SULFURO DE HIDRÓGENO, CISTATIONIN- $\beta$ -SINTASA Y  
CISTATIONIN- $\gamma$ -LIASA, EN EL DOLOR INFLAMATORIO  
Y NEUROPÁTICO EN RATAS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

**MARIO EMMANUEL VELASCO XOLALPA**



DIRECTOR: DR. HÉCTOR ISAAC ROCHA  
GONZÁLEZ

ASESORA: M. en F. MA. MARTHA UGALDE  
HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno VELASCO XOLALPA MARIO EMMANUEL con número de cuenta 302105306 de la carrera de Q. F. B., se le ha fijado el día 13 del mes de Febrero de 2012 a las 11:00 hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

Table with 2 columns: Position (PRESIDENTE, VOCAL\*, SECRETARIO, SUPLENTE) and Name (Q.F.I. ESTELA VALENCIA PLATA, DR. HÉCTOR ISAAC ROCHA GONZÁLEZ, M. en F. MA. MARTHA UGALDE HERNÁNDEZ, Q.F.B. MIRIAM HINOJOSA MORALES, M. en C. JUANA ROSADO PÉREZ). Includes handwritten signatures on the right.

El título de la tesis que se presenta es : Participación de las enzimas productoras de sulfuro de hidrógeno, cistationin-β-sintasa y cistationin-γ-liasa, en el dolor inflamatorio y neuropático en ratas

Opción de titulación: Tesis Experimental

ATENTAMENTE "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU" México, D.F. a, 23 de noviembre de 2011.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA" DIRECCIÓN

RECIBÍ:

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES Y DE GRADO

Vo.Bo.

DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

La parte experimental de esta tesis se realizó en la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional y el Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados - Sede sur, bajo la supervisión de los Doctores Héctor Isaac Rocha González y Vinicio Granados Soto. El presente proyecto contó con el apoyo de los proyectos Conacyt 154880 y SIP 20113892.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los investigadores Dr. Héctor Rocha y Dr. Vinicio Granados por la confianza, asesoría, apoyo y conocimientos brindados durante la realización del presente proyecto.

Al laboratorio No. 12 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAVIPN), Sede Sur.

A la M. en F. Ma. Martha Ugalde Hernández por la asesoría además de haber aceptado ser Directora Interna de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Mario e Isabel y a mi hermana Maritzel.

A mis abuelos Vicenta, Esteban, Pedro y Alicia.

## Tabla de contenido

1. RESUMEN.....	12
2. INTRODUCCIÓN.....	14
3. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	16
3.1. Diabetes Mellitus.....	16
3.1.1. Diabetes tipo 1.....	16
3.1.2. Diabetes tipo 2.....	16
3.2. Dolor.....	17
3.2.1. Clasificación del dolor:.....	17
3.2.2. Fisiología del dolor.....	18
3.3. Dolor Inflamatorio.....	26
3.3.1. Iones Hidrógeno ( $H^+$ ).....	26
3.3.2. Metabolitos del ácido araquidónico.....	26
3.3.3. Cininas.....	27
3.3.4. Óxido nítrico.....	27
3.4. Neuropatía diabética.....	28
3.5. Formalina.....	29
3.6. Alodinia táctil.....	30
3.7. Up and Down.....	31
3.8. Sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ).....	31
3.9. Enzimas CSE y CBS.....	33
3.10. Inhibidores enzimáticos selectivos.....	34
3.10.1. Hidroxilamina.....	34
3.10.2. Propargilglicina (PPG).....	34
3.11. Donadores de $H_2S$ .....	36
3.11.1. NaHS.....	36

3.11.2. L-Cisteína.....	36
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	37
5. HIPÓTESIS.....	39
6. OBJETIVOS.....	40
6.1. Objetivo general.....	40
6.2. Objetivos particulares.....	40
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
7.1. Ratas normoglicémicas.....	41
7.2. Ratas hiperglicémicas.....	41
7.3. Fármacos.....	42
7.3.1. Preparación de la formalina.....	42
7.3.2. Preparación de la estreptozotocina.....	42
7.4. Prueba de la formalina.....	42
7.4.1. Grupos controles.....	43
7.5. Evaluación de la hiperalgesia.....	43
7.6. Medición de la alodinia táctil.....	44
7.7. Medición del H <sub>2</sub> S.....	44
7.8. Análisis de datos y estadística.....	45
8. RESULTADOS.....	46
8.1. Estandarización de la prueba de la formalina.....	46
8.2. Evaluación periférica del H <sub>2</sub> S y las enzimas principales que lo sintetizan en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas de 2 semanas en el dolor inflamatorio inducido por formalina.....	47
8.2.1. Inhibidores Enzimáticos.....	50
8.2.2. Donadores de H <sub>2</sub> S.....	55

8.3. Efecto de la coadministración de los inhibidores enzimáticos de H <sub>2</sub> S con Cisteína, sustrato endógeno en la síntesis de H <sub>2</sub> S a nivel periférico local en el modelo de la formalina.....	60
8.4. Medición de la alodinia táctil .....	66
8.5. Medición de H <sub>2</sub> S.....	67
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	69
9.1. Prueba de Formalina.....	69
9.2. Efecto de los inhibidores enzimáticos. ....	70
9.3. Donadores de H <sub>2</sub> S .....	71
9.4. Coadministración de los inhibidores enzimáticos de H <sub>2</sub> S con L-cisteína, a nivel periférico local en el dolor inducido por formalina.....	73
9.5. Medición de alodinia táctil. ....	74
9.6. Medición de H <sub>2</sub> S.....	74
10. CONCLUSIONES.....	76
10.1. Conclusiones particulares. ....	76
10.2. Conclusión General.....	77
11. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES.....	78
12. REFERENCIAS.....	79

## Índice de tablas

<b>Tabla</b>		<b>Pág.</b>
Tabla 1.	Características de los diferentes tipos de fibras nociceptivas	20
Tabla 2.	Valores del área bajo la curva (ABC) obtenidos de la fase I y II de la prueba de formalina a partir de los cursos temporales de número de sacudidas vs tiempo.	47
Tabla 3.	Valores del ABC de las fases I y II del modelo de formalina, obtenidos con los diferentes tratamientos farmacológicos en ratas normoglicémicas.	65
Tabla 4.	Valores del ABC de las fases I y II del modelo de formalina, obtenidos con los diferentes tratamientos farmacológicos en ratas hiperglicémicas.	66

## Índice de figuras

<b>Figura</b>		<b>Pág.</b>
Figura 1.	Mecanismos neuronales por los cuales se detectan los estímulos nocivos.	19
Figura 2.	Síntesis del H <sub>2</sub> S a partir de cisteína	32
Figura 3.	Estructura química de PPG	34
Figura 4.	Inhibición de cistationin- $\gamma$ -liasa (CSE) por PPG.	35
Figura 5.	Efecto de la concentración de formalina sobre la conducta nociceptiva a nivel periférico local en ratas normoglicémicas.	48
Figura 6.	Efecto de la concentración de formalina sobre la conducta nociceptiva a nivel periférico local en ratas hiperglicémicas de 2 semanas.	49
Figura 7.	Efecto antinociceptivo del inhibidor de la enzima cistationin- $\gamma$ -liasa, propargilglicina (PPG), sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina al 1% en ratas normoglicémicas a nivel periférico local.	51
Figura 8.	Efecto antihiperalgésico del inhibidor de la enzima cistationin- $\gamma$ -liasa, propargilglicina (PPG), sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina al 1% en ratas hiperglicémicas de 2 semanas a nivel periférico local.	52
Figura 9.	Efecto antinociceptivo del inhibidor de la enzima cistationin- $\beta$ -sintasa, hidroxilamina (HA), sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina al 1% en ratas normoglicémicas a nivel periférico	53

	local.	
Figura 10.	Efecto antihiperalgésico del inhibidor de la enzima cistationin- $\beta$ -sintasa, hidroxilamina (HA), sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina al 1% en ratas hiperglicémicas de 2 semanas a nivel periférico local.	54
Figura 11.	Efecto pronociceptivo del donador exógeno de ácido sulfhídrico, NaHS, sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina 0.5% en ratas normoglicémicas a nivel periférico local.	56
Figura 12.	Efecto hiperalgésico del donador exógeno de ácido sulfhídrico, NaHS, sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina al 0.5% en ratas hiperglicémicas de 2 semanas a nivel periférico local.	57
Figura 13.	Efecto pronociceptivo del donador endógeno de ácido sulfhídrico, L-cisteína, sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina al 0.5% en ratas normoglicémicas a nivel periférico local.	58
Figura 14.	Efecto hiperalgésico del donador endógeno de ácido sulfhídrico, L-cisteína, sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina al 0.5% en ratas hiperglicémicas de 2 semanas a nivel periférico local.	59
Figura 15.	Efecto resultante de la administración del inhibidor de la enzima cistationin- $\gamma$ -liasa, PPG (-10 min), sobre el efecto pronociceptivo inducido por el donador endógeno de H <sub>2</sub> S, L-cisteína (-20min) a nivel periférico local en el modelo de formalina al 0.5% en ratas normoglicémicas.	61

- Figura 16. Efecto resultante de la administración del inhibidor de la enzima cistationin- $\gamma$ -liasa, PPG (-10 min), sobre el efecto hiperalgésico inducido por el donador endógeno de H<sub>2</sub>S, L-cisteína (-20min) a nivel periférico local en el modelo de formalina al 0.5% en ratas hiperglicémicas. 62
- Figura 17. Efecto resultante de la administración del inhibidor de la enzima cistationin- $\beta$ -sintasa, HA (-10 min), sobre el efecto pronociceptivo inducido por el donador endógeno de H<sub>2</sub>S, L-cisteína (-20min) a nivel periférico local en el modelo de formalina al 0.5% en ratas normoglicémicas. 63
- Figura 18. Efecto resultante de la administración del inhibidor de la enzima cistationin- $\beta$ -sintasa, HA (-10 min), sobre el efecto hiperalgésico inducido por el donador endógeno de H<sub>2</sub>S, L-cisteína (-20min) a nivel periférico local en el modelo de formalina al 0.5% en ratas hiperglicémicas de 2 semanas. 64
- Figura 19. Curso temporal del efecto antialodínico del inhibidor selectivo de la cistationin- $\gamma$ -liasa, PPG (50mg/Kg) en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas de 9-11 semanas de haberles administrado estreptozotocina. 67
- Figura 20. Concentración de H<sub>2</sub>S en suero, ganglios de la raíz dorsal (GRD, L4-L6), nervio ciático y médula espinal de ratas Wistar normoglicémicas e hiperglicémicas de 2 y de 9-11 semanas de haberles administrado estreptozotocina. 68

## 1. RESUMEN

El ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) es una molécula que se encuentra en los mamíferos, tanto en el sistema nervioso periférico como en el sistema nervioso central (Moore et al., 2003). Este gas se sintetiza por dos enzimas dependientes de piridoxal-5'-fosfato (cistationin- $\beta$ -liasa, CBS y cistationin- $\gamma$ -liasa, CSE) y son responsables de metabolizar L-cisteína en  $H_2S$ . El sustrato de CBS y CSE, L-cisteína, puede ser obtenido de fuentes alimenticias o puede ser producido por proteínas endógenas. El  $H_2S$  juega un papel importante en el dolor inflamatorio en una variedad de situaciones experimentales, incluyendo el modelo de formalina (Moore et al., 2003), en donde, evoca un efecto pronociceptivo. No obstante, la evidencia que señala un papel pronociceptivo del  $H_2S$  en ratas normoglicémicas, no se tiene conocimiento de estudios conductuales que demuestren el papel que desempeña este gas y sus enzimas que lo sintetizan en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina.

Con base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el papel que juegan el  $H_2S$  y las enzimas principales que lo sintetizan en el procesamiento del dolor de ratas normoglicémicas e hiperglicémicas de 2 y 9-11 semanas de haberles inducido diabetes experimental. Para cumplir con este objetivo, se administraron los inhibidores de las enzimas, CBS y CSE; y los donadores de  $H_2S$  en la pata posterior derecha de las ratas. La conducta nociceptiva se evaluó mediante el modelo de formalina. Para inducir la diabetes experimental se administró estreptozotocina, este fármaco produjo hiperglucemia, pérdida de peso, hiperalgesia (2 semanas) y alodinia táctil a largo plazo (9-11 semanas).

La administración de los inhibidores de las enzimas productoras de  $H_2S$ , propargilglicina (PPG) e hidroxilamina (HA), disminuyeron la conducta nociceptiva de sacudidas inducida por formalina al 1% en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas de 2 semanas. Consecuentemente, PPG por vía sistémica, redujo significativamente la alodinia táctil en ratas hiperglicémicas de 9-11 semanas. Estos inhibidores fueron de 100 a 1000 veces más potentes para producir su efecto antinociceptivo en ratas hiperglicémicas. De acuerdo con esto, tanto NaHS

(donador exógeno de H<sub>2</sub>S), como L-cisteína (sustrato enzimático para producir H<sub>2</sub>S) aumentaron la conducta de sacudidas inducida por formalina al 0.5% en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas de 2 semanas. De nuevo, los donadores fueron más potentes en ratas hiperglicémicas que en ratas normoglicémicas. Además, el efecto pronociceptivo producido por L-cisteína se bloqueó mediante la administración de PPG o hidroxilamina.

Finalmente, en la determinación de los niveles de H<sub>2</sub>S a los largo de la vía nociceptiva, las mediciones en el ganglio de la raíz dorsal (GRD, L4-L6), nervio ciático y médula espinal, pero no en suero, mostraron una disminución de las concentraciones de H<sub>2</sub>S conforme se desarrolla la neuropatía periférica asociada a la diabetes.

Los datos indican que el H<sub>2</sub>S juega un papel importante en el dolor en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas (hiperalgesia y alodinia). Sin embargo, su participación en el dolor neuropático inducido por esteptozotocina parece ser más grande, lo que sugiere que este gas puede funcionar como un mecanismo de sensibilización nociceptivo durante el desarrollo de la neuropatía periférica asociada a la diabetes. Estos datos sugieren que los inhibidores de las enzimas productoras de H<sub>2</sub>S, como la PPG o la HA, podrían ser fármacos útiles en el tratamiento del dolor neuropático en pacientes diabéticos.

## 2. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. En el año 2000 el 8.1% de la población de la Ciudad de México padecía diabetes (Olaiz-Fernández et al., 2007) y se prevé que para el año 2025 existan más de 11 millones de mexicanos con esta enfermedad. Dentro de los padecimientos asociados a la diabetes, la neuropatía periférica es altamente debilitante y se desarrollará en el 20% de los pacientes, siendo la complicación más común (Calcutt, 2002). Desafortunadamente, los antidepresivos tricíclicos y los anticonvulsivantes que representan la primera línea de tratamiento de la neuropatía diabética. A menudo resultan ineficaces y presentan efectos adversos nada despreciables (Edwards et al., 2008). La falta de un tratamiento adecuado, así como el descontrol metabólico y la alta incidencia de complicaciones que se presentan son evidencia del poco entendimiento que se tiene de esta enfermedad. En este sentido, resalta la necesidad de buscar nuevos blancos terapéuticos que nos permitan comprender mejor la enfermedad para el desarrollo de mejores tratamientos.

El  $H_2S$  se sintetiza en los mamíferos a partir de L-cisteína por la CBS y CSE (Qu et al., 2008). A concentraciones fisiológicas el  $H_2S$  parece tener un efecto citoprotector, sin embargo, a concentraciones más elevadas tiende a ser citotóxico (Mitsuhashi et al., 2005; Szabó, 2007; Lowicka y Beltowski, 2007). En dolor, la mayoría de la evidencia apunta que el  $H_2S$  produce un efecto pronociceptivo (Lee et al., 2008; Matsunami et al., 2009) a través de la estimulación de fibras nociceptivas sensibles a capsaicina (Patacchini et al., 2005), induciendo la liberación de neuropéptidos (Patacchini et al., 2004; Trevisani et al., 2005) y activando canales de  $Ca^{2+}$  tipo T (Kawabata et al., 2007; Matsunami et al., 2009). Asimismo, se ha sugerido que la activación de canales N-metil-D-aspartato (NMDA) y de la familia de receptores de potencial transitorio (TRP) (Kimura, 2000; Macpherson et al., 2007) podrían contribuir al efecto pronociceptivo observado con  $H_2S$ . Por otro lado, se cree que el  $H_2S$  juega un papel importante en la resistencia a insulina que se presenta durante la diabetes debido a que activa canales de  $K^+$  dependientes de ATP (Yang et al., 2005).

De hecho, se sabe que la concentración plasmática de L-cisteína, la síntesis enzimática de H<sub>2</sub>S y la expresión de las enzimas productoras de H<sub>2</sub>S se encuentran incrementadas en ratas hiperglicémicas (Jacobs et al., 1998; Yusuf et al., 2005). Sin embargo, no existen estudios que relacionen el efecto del H<sub>2</sub>S en la neuropatía periférica asociada a la diabetes, ni que demuestren el potencial terapéutico de las enzimas que lo producen en dicho padecimiento.

### **3. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

#### **3.1. Diabetes Mellitus**

La diabetes mellitus se define como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizado por hiperglucemia que resulta de defectos en la secreción de insulina o en su acción, o en ambos. Los tipos de diabetes son muy diversos. Sin embargo, el comité de expertos en el diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus (American Diabetes Association, 2009) divide los casos de diabetes en dos grandes categorías que son la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2.

##### **3.1.1. Diabetes tipo 1**

Este tipo de diabetes involucra de manera importante al sistema inmune y era llamada anteriormente diabetes juvenil o insulino dependiente. Se caracteriza principalmente por deficiencia absoluta de insulina en el organismo como resultado de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas. El 85-90% de los pacientes diagnosticados con diabetes tipo 1 presenta la expresión de autoanticuerpos para la insulina, la descarboxilasa de ácido glutámico o para las fosfatasa de tirosina (IA-2 y IA-2 $\beta$ ). La velocidad de destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas es variable. La destrucción autoinmune es rápida en pacientes jóvenes y lenta en adultos. Las personas hiperglicémicas tipo 1 requieren la administración de insulina para sobrevivir. Particularmente, los niños y adolescentes afectados con este tipo de diabetes presentan cetoacidosis como primer síntoma de la enfermedad. La diabetes tipo 1 representa el 5-10% de los casos totales de diabetes y su incidencia es de 25 por cada 100,000 personas (American Diabetes Association, 2009).

##### **3.1.2. Diabetes tipo 2**

Se caracteriza principalmente por resistencia a insulina (una respuesta biológica atenuada ante niveles normales o incluso elevados de esta hormona). En etapas iniciales se presenta la secreción deficiente de insulina, mientras que en etapas avanzadas existe baja sensibilidad a esta hormona, incluso a niveles plasmáticos elevados. Los pacientes que padecen este tipo de diabetes no

necesitan la administración continua de insulina para sobrevivir y la cetoacidosis es una condición poco frecuente. El tratamiento principal para este tipo de diabetes son los hipoglucemiantes. La diabetes tipo 2 se presenta predominantemente en adultos mayores de 40 años, generalmente obesos y representa el 90-95% de todos los casos de diabetes. La incidencia es de 540 por cada 100,000 personas (Davis y Granner, 2001; American Diabetes Association, 2009).

La hiperglucemia crónica que se presenta en la diabetes se asocia fuertemente con daño o disfunción a largo plazo de varios órganos, principalmente; los riñones, el corazón, los nervios y los vasos sanguíneos (Boulton, 2006). El enfoque del presente trabajo se dirige específicamente a una de las complicaciones diabéticas más debilitante y que ocurre a nivel del sistema nervioso, la neuropatía diabética.

### **3.2. Dolor**

La Organización Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, International Association for the Study of Pain) define al dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociado a un daño tisular real o potencial, que puede ser descrito en términos de la magnitud del daño (Merskey, 1979).

El dolor es un mecanismo de defensa, tiene una función biológica protectora hacia un daño real para factores de índole destructiva, sin embargo; cuando se sobrepasa esta función, el dolor se vuelve patológico. El dolor se caracteriza por 4 componentes: la nocicepción, la percepción del dolor, el sufrimiento (amenaza de integridad física y psicológica del individuo) y las conductas evocadas por éste (expresiones del organismo ante la presencia de un estímulo nocivo). Tales componentes son dependientes de factores anatómicos, psicológicos y fisiológicos (Turk y Okifuji, 1999).

#### **3.2.1. Clasificación del dolor:**

La clasificación entre tipos de dolor es un tema de debate entre investigadores y clínicos, ya que suelen clasificar al dolor de acuerdo a su origen anatómico y características clínicas o etiológicas (Bonica, 1990)

La clasificación dada por Loeser y Melzack (1999) es una de las más aceptadas y está basada en la duración y características fisiológicas y patológicas que lo originan. En esta clasificación el dolor se divide en tres tipos principales:

**Dolor transitorio:** Se activa por nociceptores cutáneos o de otros tejidos del cuerpo en ausencia de daño tisular, su función es proteger al individuo de un posible daño físico provocado por el medio ambiente o el estrés excesivo sobre algún tejido, dura pocos segundos.

**Dolor agudo:** Funciona como señal de alarma por lo que posee una función biológica protectora. Las secuelas psicológicas no son importantes y el dolor desaparece con la lesión que lo originó (Cervero y Laird, 1995). El dolor agudo usualmente dura unos pocos días o algunas semanas. Se produce por la estimulación de nociceptores presentes en el tejido dañado

**Dolor crónico:** Más que asociarse con una función protectora, es síntoma de alguna enfermedad como neuralgia o fibromialgia. En los síndromes de dolor crónico la intensidad del dolor sobrepasa la magnitud del daño y el dolor puede presentarse aún en ausencia de estímulos. Este tipo de dolor, no es un proceso autolimitado por lo que puede persistir por meses o incluso años (Cervero y Laird, 1995). En él se asocian múltiples comportamientos frustrantes denominados frecuentemente conductas del dolor, como la ansiedad, la depresión, el insomnio, el miedo y la histeria como factores psicológicos.

### 3.2.2. Fisiología del dolor

#### 3.2.2.1. Nocicepción

Es un término neurofisiológico que se refiere a los mecanismos neurales por los cuales se detectan los estímulos nocivos. Consiste de 4 procesos fisiológicos distintos:

**Transducción.** Describe la conversión de estímulos nocivos en señales eléctricas por las terminaciones nerviosas periféricas.

**Transmisión.** Es la propagación de las señales eléctricas a lo largo de las vías nociceptivas.

**Modulación.** Describe la alteración de las señales nociceptivas a lo largo de la vía. En ella se entrecruzan terminaciones nerviosas de diversos tipos que liberan neurotransmisores que inhiben, amplifican o alteran la señal sensorial.

**Percepción.** Es el proceso por el cual se integran los impulsos nociceptivos con factores cognoscitivos y emocionales para crear la experiencia subjetiva de dolor.

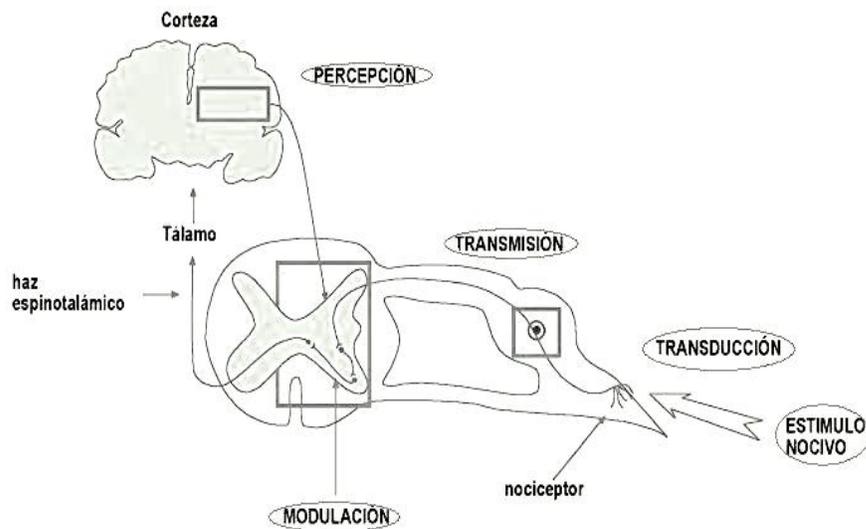


Figura 1. Mecanismos neurales por los cuales se detectan los estímulos nocivos.

Para transmitir la información nociceptiva, la neurona debe ser selectiva, es decir, debe ser capaz de distinguir entre estímulos inocuos y nocivos (Hyman y Cassem, 1995). En este sentido, los nociceptores poseen dos características importantes que ayudan a realizar esta distinción: un umbral alto de estimulación y la capacidad de relacionar de manera directa la frecuencia de la descarga con la intensidad del estímulo (Besson, 1969).

El axón periférico pertenece a una neurona monopolar que tiene la peculiaridad de emitir una proyección periférica y otra central. Su rama central penetra en las astas posteriores medulares estableciendo la primera sinapsis y la rama periférica inerva piel, músculos y vísceras (Rexet, 1952; Sorkina et al., 1997).

El proceso comienza con la detección de estímulos nocivos para el organismo y su conversión a potenciales de acción (*transducción*) mediante

nociceptores aferentes primarios. Los nociceptores son fibras sensoriales de diámetro pequeño desmielinizadas (fibras C) o ligeramente mielinizadas (fibras A $\delta$ ) (Tabla 1). Estas neuronas contienen sus cuerpos celulares en los ganglios de la raíz dorsal (que inervan tronco, extremidades y vísceras), el ganglio trigeminal (que inerva cabeza y cuello), y el ganglio nodoso (que inerva vísceras). Las fibras C con su cuerpo celular en el ganglio de la raíz dorsal hacen sinapsis principalmente en la lámina II del asta dorsal de la médula espinal, mientras que las fibras A $\delta$  lo hacen en las láminas II y V (Sawynok y Liu, 2003).

Tabla 1. Características de los diferentes tipos de fibras nociceptivas.

Tipo de nociceptor	Tipo de fibra	Tipo de estímulos	Campo receptivo
Mecanociceptores de alto umbral	A $\delta$ tipo 1	Térmicos (> 52 <sup>0</sup> C) Mecánicos	<1 mm <sup>2</sup>
Mecanotermonociceptores	A $\delta$ tipo II	Térmicos (> 43 <sup>0</sup> C) Mecánicos	< 5 mm <sup>2</sup>
Nociceptores polimodales C	C	Térmicos (> 43 <sup>0</sup> C) Mecánicos (> 1 g) Químicos (ácidos, histamina o KCl)	17 mm <sup>2</sup>
Nociceptores al frío	A $\delta$ o C	Frío (< 15 <sup>0</sup> C)	1-145 mm <sup>2</sup>

Las fibras C suelen clasificarse anatómicamente en dos grupos principales dependiendo de la presencia de neuropéptidos, de su regulación por factores de crecimiento y de su patrón de inervación en el asta dorsal de la médula espinal.

Las fibras C peptidérgicas contienen sustancia P y el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP), expresan el receptor tirosincinasa A (TrkA), responden al factor de crecimiento neural (NGF) e inervan la lámina I y II externa. Por su parte, las fibras C no peptidérgicas expresan sitios de unión a isolectina B4 (IB4) y receptores P2X3, responden al factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) y terminan en la lámina II interna del asta dorsal de la médula espinal. Ambas poblaciones expresan receptores vanilloides (TrpV-1) y son sensibles a capsaicina (Snider y McMahon, 1998; Sawynok y Liu, 2003). Por otro lado, las

fibras A $\delta$  suelen clasificarse funcionalmente en dos categorías que responden a estímulos mecánicos (Caterina y Julius, 2001): Las fibras A $\delta$  tipo I se activan a temperaturas  $> 52^{\circ}\text{C}$ , mientras que las fibras A $\delta$  tipo II se activan a temperaturas  $> 43^{\circ}\text{C}$ .

Además de las fibras C y A $\delta$ , existen en la periferia fibras mielinizadas A $\beta$ , que en condiciones normales participan como mecanorreceptores de bajo umbral en la percepción táctil, pero ante un proceso inflamatorio modifican su fenotipo convirtiéndose en fibras tipo A $\delta$  de alto umbral (Costigan y Woolf, 2000). Aunado a esto, dichas fibras presentan cambios en su patrón de inervación en el asta dorsal de la médula espinal inervando ahora láminas más superficiales (lámina II), lo que les permite contribuir en el dolor inflamatorio pero especialmente en la alodinia (Sawynok y Liu, 2003).

### 3.2.2.2. Vías Ascendentes

Las vías ascendentes principales se agrupan en dos sistemas generales. El sistema de columnas dorsales-lemnisco interno y el sistema anterolateral (García y Herrero, 1998).

El sistema de las columnas dorsales-lemnisco interno se encuentra integrado por grandes fibras mielinizadas que transmiten información táctil no nociceptiva y de orientación espacial (Guyton y Hall, 1996). Por otro lado, las fibras del sistema anterolateral se originan principalmente en las láminas I, IV-VII y X del asta dorsal, las cuales reciben aferencias de fibras A $\delta$  y C (García y Herrero, 1998). Estas últimas fibras, al salir del asta dorsal cruzan al lado opuesto y ascienden por las columnas laterales de la médula para terminar a distintas alturas del tronco encefálico. Se dividen filogenéticamente en dos sistemas:

**Sistema neoespinotalámico.** Ocupa la región lateral del tallo cerebral y comprende los tractos espinotalámico ventral, espinocervical y la vía postsináptica de la columna dorsal.

**Sistema paleoespinotalámico.** Ocupa la región media del tallo cerebral e integra los tractos espinotalámico medio, espinoreticular, espinomesencefálico, espinoparabraquioamigdalóide, espinoparabraquihipotálamico y espinohipotálamico (para una revisión más detallada de todas las vías

ascendentes involucradas en el dolor revisar Almeida et al., 2004). A continuación se describen las dos vías más importantes:

**Tracto espinotalámico.** Se origina principalmente de las láminas I y V, aunque también salen fibras de las láminas II, IV, VI-VIII y X. Con base en su origen y la proyección de sus fibras, algunos autores describen tres vías de aferenciación para el tracto espinotalámico. La primera es la vía neoespinotalámica monosináptica o tracto espinotalámico ventral que proyecta directamente a los núcleos del complejo ventral del tálamo, involucrados en el componente sensorial discriminativo del dolor (Dubner y Bennett, 1983). La segunda es la vía multisináptica paleoespinotalámica o tracto espinotalámico medio que hace conexión con los núcleos intralaminar y posterior medial del tálamo, involucrados en el componente afectivo motivacional del dolor. Por último, la vía espinotalámica monosináptica proyecta directamente al núcleo central medial del tálamo involucrado en la parte afectiva de la experiencia dolorosa (Millan, 1999; Almeida et al., 2004).

**Tracto espinoparabraquial.** Se origina de neuronas nociceptivas específicas que parten de las láminas I y II de la médula espinal y proyectan al núcleo parabraquial donde se forman dos sistemas de aferencias hacia la amígdala y hacia el hipotálamo. Además, el núcleo parabraquial recibe colateralizaciones de los tractos espinoreticular y espinomesencefálico y del núcleo parasimpático sacral. Este tracto se asocia con la regulación neuroendócrina, autónoma, afectiva y motivacional del dolor (Bester et al., 1997; Willis y Westlund, 1997; Almeida et al., 2004).

### 3.2.2.3. Tálamo y proyecciones corticales

Una vez que las vías aferentes nociceptivas transmiten el impulso a estructuras supraespinales, la experiencia dolorosa se integra y adquiere su carácter desagradable (*percepción*). Diversos estudios indican que el cerebro medio, el tálamo, el hipotálamo, el núcleo lentiforme, la corteza somatosensorial primaria y secundaria, así como los cíngulos insular, prefrontal, anterior y parietal son estructuras básicas en la percepción del dolor (Millan, 1999). De estas estructuras, el tálamo es el principal centro de relevo de la información sensorial

destinada a la corteza y son sus núcleos los que definen el procesamiento de esta información (Almeida et al., 2004).

El complejo nuclear lateral se integra por los núcleos ventroposterolateral, ventroposteromedial y ventroposteroinferior. Este complejo recibe aferencias de los tractos espinotalámico, espinorreticular, espinocervical y espinoparabraquial (Almeida et al., 2004), sus neuronas presentan una organización somatotópica, proyectan a la corteza somatosensorial secundaria y responden a estímulos térmicos y mecánicos. En este sentido, el núcleo ventroposterolateral se reconoce como el centro somatosensorial de relevo principal ya que tiene conexiones con la corteza somatosensorial primaria, responsable de la localización e intensidad del dolor (Willis et al., 2001). Al igual que el núcleo ventroposterolateral, el núcleo ventroposteromedial participa en el aspecto sensorial discriminativo del dolor. Asimismo, se relaciona con aspectos emocionales, autónomos y psicomotores en virtud de que sus fibras proyectan a la corteza prefrontal y se encuentran interconectadas con la amígdala, el hipotálamo y la sustancia gris periacueductal. Además, en este núcleo convergen fibras provenientes de la región parabraquial y del núcleo paratrigeminal (Li et al., 1997; Gauriau y Bernard, 2002; Almeida et al., 2004).

El complejo posterior del tálamo está integrado por el núcleo pulvinar oralis, el núcleo posterior y la división del núcleo ventromedial posterior. Este complejo recibe aferencias de los tractos espinotalámico, espinohipotalámico, espinoparabraquial y la vía postsináptica de la columna dorsal. El complejo establece un circuito reverberante con la corteza, reforzando la activación de las neuronas talámicas y corticales ante estímulos nocivos (Roberts et al., 1992; Millan, 1999). El núcleo posterior y el núcleo ventromedial posterior forman parte integral del sistema nociceptivo medial estableciendo conexiones con la corteza insular y cingular; involucradas en el componente afectivo emocional del dolor. Estos núcleos responden a información térmica nociva y a estímulos mecánicos inocuos y nocivos (Yeziarsk, 1990; Treede et al., 1999)

Por su parte, el complejo medial del tálamo se conforma por el núcleo medial dorsal y el núcleo intralaminar; recibe aferencias de los tractos espinotalámico, espinomescencefálico y espinohipotalámico, y proyecta a la corteza del cíngulo, sugiriendo una contribución en el aspecto afectivo

motivacional del dolor. Además, este complejo se interconecta con estructuras responsables de la atención y respuestas motoras como el estriado y el cerebelo, con lo que probablemente participa en la conducta de escape ante un estímulo nocivo (Willis y Westlund, 1996; Millan, 1999).

#### **3.2.2.4. Vías descendentes**

En 1965, Melzack y Wall, como parte de su teoría de la compuerta, propusieron la existencia de un sistema específico capaz de modular el dolor. Hoy en día, se sabe que incluso los centros supraespinales más altos influyen en el procesamiento nociceptivo llevado a cabo en el asta dorsal a través de vías descendentes mono y polisinápticas (Millan, 2002). En este sentido, las cortezas frontal, somatosensorial y parietal proyectan terminales directas al asta dorsal de la médula espinal produciendo antinocicepción (Miller, 1987).

La corteza insular y ventral orbital producen inhibición descendente vía relevos con otras estructuras supraespinales como la sustancia gris periacueductal (Zhang et al., 1997; Millan, 2002). Asimismo, la corteza frontal participa en la inhibición descendente vía su relevo con el núcleo del rafé magno, en tanto que la estimulación de la corteza del cíngulo anterior produce respuestas aversivas al dolor que facilitan la información nociceptiva (Miller, 1987; Calejesan et al., 2000). El hipotálamo se encuentra ampliamente interconectado con el núcleo del tracto solitario, la sustancia gris periacueductal, el bulbo raquídeo rostralventromedial y estructuras corticolímbicas, por lo que está implicado en la dimensión afectiva y cognitiva del dolor (Millan, 1999). El sistema hipotálamo-espinal se origina de los núcleos hipotalámicos paraventricular, arqueado, tuberomamilar y posterior periventricular. Este sistema participa produciendo tanto facilitación como inhibición descendente (Bonica, 1987; Millan, 2002). En lo que se refiere a las vías polisinápticas, el núcleo preóptico medial del hipotálamo proyecta intensamente a la sustancia gris periacueductal y al bulbo raquídeo rostralventromedial, participando en la respuesta motora al dolor y la inhibición descendente (Murphy et al., 1999).

La sustancia gris periacueductal se encuentra recíprocamente interconectada con el hipotálamo, el núcleo parabraquial, el núcleo del tracto solitario y las estructuras corticolímbicas incluyendo la corteza frontal y la

amígdala por lo que participa en el control emocional (Gray y Magnuson, 1992; Odeh y Antal, 2001). Por un lado, el sistema de la sustancia gris periacueductalespinal participa en la facilitación descendente, debido a que la mayoría de sus neuronas contienen péptidos excitatorios que descienden por el funículo dorsolateral proyectándose directamente hasta el asta dorsal de la médula espinal (Skirboll et al., 1983). Por el otro lado, las vías polisinápticas de la sustancia gris periacueductal proyectan neuronas serotoninérgicas y glutamatérgicas al bulbo raquídeo rostralventromedial y noradrenérgicas al núcleo A7, aunque también se sabe que existen proyecciones de neuronas GABAérgicas y encefalinérgicas a estos núcleos. Todas estas proyecciones traen como consecuencia un efecto antinociceptivo sobre el asta dorsal (Wiklund et al., 1988; Millan, 2002).

El bulbo raquídeo rostralventromedial es una región heterogénea que recibe proyecciones de las vías descendentes que se originan en la sustancia gris periacueductal, en el núcleo parabraquial, en el núcleo del tracto solitario y en otras estructuras involucradas en recibir y procesar información nociceptiva. Esta región manda proyecciones inhibitorias y excitatorias a láminas superficiales y profundas del asta dorsal (Fields y Basbaum, 1994; Millan, 2002), y es en el bulbo raquídeo rostralventromedial donde se localiza el núcleo del rafé magno rico en neuronas serotoninérgicas (Feldman et al., 1997).

El núcleo del tracto solitario, al igual que el núcleo parabraquial, funciona como una interface entre el sistema sensorial y autónomo; está recíprocamente conectado con el hipotálamo y regiones corticolímbicas, su estimulación produce antinocicepción vía la sustancia gris periacueductal o directamente en el asta dorsal de la médula espinal (Mtui et al., 1993 y Millan, 2002). También participa en la facilitación descendente a través del bulbo raquídeo rostralventromedial (Morgan et al., 1989; Wiertelak et al., 1997). Por otro lado, el núcleo parabraquial, participa suprimiendo la respuesta nociceptiva vía el núcleo del tracto solitario, el bulbo raquídeo rostralventromedial o directamente en el asta dorsal (Yoshida et al., 1997).

Finalmente, el núcleo reticular dorsal recibe y proyecta directamente a láminas profundas y superficiales de la médula espinal manteniendo un circuito reverberante que al estimularse produce estados de hiperalgesia (Almeida et al.,

1996; 1999), aunque algunos autores señalan la existencia de controles inhibitorios a través de este circuito (Bouhassira et al., 1992).

### **3.3. Dolor Inflamatorio**

La respuesta inflamatoria generalmente está asociada con dolor (Stimmel et al., 1983). Los mediadores químicos de la nocicepción surgen no sólo de los tejidos dañados y de las células que intervienen en la inflamación, sino también de las neuronas nociceptivas. Las terminaciones nerviosas libres, liberan sustancias algésicas en los tejidos, activando así; nociceptores adyacentes que contribuyen al dolor e inflamación. Después de una lesión tisular, se libera potasio, serotonina e histamina desde las células dañadas y vasos lesionados, originando una respuesta triple (activación de nociceptor, enrojecimiento y edema). Al comienzo de esta respuesta, la bradicinina promueve la liberación de prostaglandinas (PG), lo que origina la activación de los nociceptores y un aumento de la permeabilidad vascular y la hiperalgesia. La transmisión del estímulo a las fibras aferentes originan la liberación de sustancia P (SP) y CGRP en el sitio de lesión, así como; bradicinina e histamina. Estas sustancias activan a los nociceptores restantes que originan la respuesta inflamatoria y el dolor (Wolf, 1991).

#### **3.3.1. Iones Hidrógeno (H<sup>+</sup>)**

Se producen en condiciones tisulares ácidas como en la inflamación, isquemia, hipoxia e inflamación, producen dolor, espasmo muscular y en estados de enfermedad, hiperalgesia, debido a que aumentan la permeabilidad de la membrana.

#### **3.3.2. Metabolitos de ácido araquidónico**

Los fosfolípidos son componentes importantes de las membranas celulares y se ven sometidos a la degradación por fosfolipasas bajo ciertas condiciones, como la exposición de las células a estímulos inflamatorios o nocivos (Ferreira et al., 1972). La segmentación de los fosfolípidos causa la liberación del ácido araquidónico, que puede metabolizarse para formar mediadores y reguladores de

la inflamación como los leucotrienos, tromboxanos y las prostaglandinas ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGE}_{2\alpha}$ ), todos pertenecientes al grupo de los prostanoides

Las prostaglandinas son moléculas lipofílicas que se sintetizan a partir del ácido araquidónico después del efecto de la enzima ciclooxigenasa. La  $\text{PGE}_2$  modula varios fenómenos inflamatorios, incrementa la permeabilidad vascular e incrementa la sensibilidad al dolor, también estimula la formación del AMPc (segundo mensajero) en muchos tipos de células inflamatorias, suprimiendo varias respuestas inmunitarias, como son la liberación de mediadores de las células cebadas y reacciones citotóxicas mediadas por linfocitos. Los receptores de prostaglandinas se encuentran acoplados a proteínas G y al ser activados inhiben canales de potasio y activan canales de sodio provocando la despolarización e incrementado de la velocidad de disparo de las fibras nociceptivas, además inducen la liberación de sustancia P y óxido nítrico (ON) que contribuyen a la hiperalgesia (Vanegas y Schaible, 2001).

### **3.3.3. Cinas**

Las cininas actúan como mediadores de la inflamación, afectando la liberación de prostaglandinas, citocinas y radicales libres. Asimismo, estimulan neuronas posganglionares para inducir hiperalgesia. La bradicinina es uno de los compuestos liberados inicialmente en lesiones tisulares, esta sustancia es la responsable de la activación prolongada de nociceptores. Esta activación induce la extravasación de plasma originando el edema. Además, recluta células del sistema inmune y sensibiliza nociceptores en el músculo, articulaciones y piel (Calixto et al., 2000). Otra cinina es la calicreína, la cual afecta a los receptores  $\text{B}_2$  de la neuronas sensoriales, alterando la función de fosfolípidos de la membrana, así como; la activación de los canales de sodio y calcio, haciéndola más permeable, lo que permite una repetición más frecuente de los disparos neuronales y el desarrollo de la hiperalgesia.

### **3.3.4. Óxido nítrico.**

El ON es un mediador biológico que se produce endógenamente a partir del aminoácido L-arginina, en una reacción catalizada por la sintasa de óxido nítrico; dicha reacción requiere de NADPH y  $\text{O}_2$  como cofactores (Elliot y Elliot, 1997). La biosíntesis del óxido nítrico ocurre en tejidos que incluyen células del

endotelio vascular, plaquetas, leucocitos, fibroblastos, en células de la corteza adrenal y pulmón. Además, el óxido nítrico puede servir como mensajero neuronal a nivel periférico (Bult et al., 1990; Gibson et al., 1990; Tucker et al., 1990) y central (Garthwaite et al., 1991), y está implicado en eventos fisiológicos como la fiebre, neurotoxicidad, neuroplasticidad y nocicepción (Vincent y Hope, 1992; Bredt y Snyder, 1992; Aley et al., 1998).

Esto ocurre por que el óxido nítrico es un radical libre soluble tanto en medios lipídicos como en acuosos, lo que le permite difundir rápidamente desde su lugar de síntesis hasta otros sitios como el músculo liso de diversos órganos (Schuman y Madison, 1994), por lo cual se ha sugerido que está relacionado en la transmisión del sistema nervioso central y periférico (Sousa y Prado, 2001).

### **3.4. Neuropatía diabética**

La neuropatía diabética se define como la presencia de síntomas y/o signos de disfunción nerviosa periférica en personas con diabetes, después de la exclusión de otras causas (Boulton et al., 2005). También es considerada como la complicación más común y debilitante de la diabetes a largo plazo. La neuropatía diabética es un desorden que puede ocasionar dolor, decremento de la motilidad y amputación de las extremidades distales (Archer, 1983; Boulton, 2007; Edwards et al., 2008). La neuropatía diabética más común es la polineuropatía distal simétrica (Way, 2001). Ésta se caracteriza por el daño en nervios autonómicos, motores y sensitivos y tiene tendencia a presentarse primero en la parte distal de manos y pies (Thomas, 1995; Woolf, 2004). El dolor asociado a la neuropatía diabética puede aparecer espontáneamente o como resultado de la exposición a estímulos medianamente dolorosos (hiperalgesia) o por exposición a estímulos inocuos que no son percibidos normalmente como dolorosos (alodinia) (Brown y Asbury, 1984; Clark y Lee, 1995). Estas últimas condiciones dolorosas están presentes en la progresión de la neuropatía diabética, pero en diferente orden. La hiperalgesia aparece en estados tempranos, mientras que la alodinia táctil aparece en estados avanzados o tardíos de la enfermedad. La alodinia se presenta justo antes de la aparición de alteraciones severas como el entumecimiento, insensibilidad, úlceras en los pies y la necrosis tisular (Boulton et al., 2004).

Cabe mencionar que la alodinia táctil es una condición dolorosa que se considera como un indicador de neuropatía periférica, tanto a nivel clínico como experimental. En los pacientes diabéticos se realiza la prueba de alodinia táctil para diagnosticar neuropatía (Boulton et al., 2005). Incluso, en los pacientes en quienes ya se diagnosticó la neuropatía diabética, la detección de insensibilidad a la estimulación con los filamentos de von Frey, se considera como un factor de riesgo elevado que puede provocar ulceraciones en los pies (Kruse y Edelman, 2006).

Los mecanismos que subyacen al dolor persistente en los pacientes con neuropatía diabética son pobremente entendidos. El 50% de los pacientes que presentan dolor neuropático diabético no responden a la terapia farmacológica convencional. Además los fármacos comúnmente utilizados presentan efectos limitados o adversos que pueden llegar a ser intolerables.

A nivel experimental existen evidencias conductuales que soportan la presencia de un procesamiento sensorial alterado en animales diabéticos (Courteix et al., 1993, 1996, 1998; Fox et al., 1999; Malcangio, 1998; Khan et al., 2002; Chen y Pan, 2002). En este sentido, la inyección con estreptozotocina es un modelo experimental de diabetes utilizado en estudios de dolor. Este modelo produce conductas nociceptivas como la hiperalgesia (dolor inflamatorio, a corto plazo) y la alodinia táctil (dolor neuropático, a largo plazo) (Courteix et al., 1993; Calcutt et al., 1996; 1997; Fox et al., 1999; Pertovara et al., 2001; Chen y Pan, 2002, Chen y Levine, 2003). Sin embargo, en la actualidad no existen estudios que describan el efecto del H<sub>2</sub>S o las enzimas productoras de este gas en el desarrollo de la neuropatía periférica asociada a la diabetes. En este sentido, el entendimiento adecuado de los mecanismos involucrados en la neuropatía diabética nos permitirá prevenir su aparición, optimizar su tratamiento farmacológico y aliviar con más eficiencia los síntomas de este padecimiento.

### **3.5. Formalina**

La prueba de la formalina sirve para evaluar la forma en la que un animal responde a estímulos nociceptivos continuos y moderados, generados por una lesión tisular (Abbott y Teng, 1998). Esta prueba consiste en la administración de una solución de formaldehído en el espacio subcutáneo de la cara dorsal de la

pata trasera de la pata de la rata. Los volúmenes que más a menudo han sido administrados son 30-100  $\mu$ L en ratas y se sugiere que las concentraciones empleadas de formalina sean del 1-5% (Dubuisson y Dennis, 1977). En esta prueba la conducta evocada por la inyección de formalina consiste en lamer, morder, elevar, sacudir y/o proteger la pata administrada (Abbott y Teng, 1998). De entre estas conductas, la de sacudidas es la más utilizada para cuantificar la conducta nociceptiva en ratas. La prueba dura alrededor de 60 min y las características más importantes que se presentan con ratas, es que los animales muestran dos fases de comportamiento nociceptivo que parecen implicar dos procesos diferentes. La primera fase (aguda) inicia inmediatamente después de la inyección de formalina y finaliza aproximadamente entre 5-10 min, esta se debe a la estimulación química directa de los nociceptores, predominantemente de las fibras C. La segunda fase (tónica o fase tardía) se produce tras un tiempo de latencia e inicia entre los 10-15 min, dicha fase se prolonga hasta los 60 min después de la inyección de formalina (Rosland, 1991), aunque puede extenderse más de 60 min y se debe al desarrollo de un proceso inflamatorio local con liberación de sustancias nociceptivas, así como; a la puesta en marcha de mecanismos a nivel de la médula espinal inducidos en la primera fase (González-Darder, 2000).

Esta prueba resulta ser particularmente influenciada y alterada por factores como olores, sonidos, intensidad de la luz, presión atmosférica elevada y temperatura, la cual debe permanecer constante a lo largo de todos los experimentos (Rosland, 1991). Por lo tanto, estos factores tienen que estar sumamente controlados y estandarizados en el laboratorio.

### **3.6. Alodinia táctil**

Es una técnica aplicada y validada para la evaluación cuantitativa del umbral de retiro mecánico de la pata. En este modelo, el umbral de retiro mecánico se evalúa mediante la estimulación mecánica de la pata con filamentos de von Frey calibrados de 0.41 g a 15.1 g siguiendo el paradigma arriba-abajo descrito por Chaplan et al. (1994). Este método es ampliamente utilizado y representa una herramienta poderosa para analizar cambios en el umbral de retiro mecánico de ratas con dolor neuropático.

### **3.7. Up and Down.**

Es una técnica aplicada y validada para la evaluación cuantitativa de alodinia, se han desarrollado neuropatías quirúrgicas utilizando una rata como modelo en donde los comportamientos nocid defensivos son evocados por un toque ligero en la pata empleando Filamentos de von Frey desde 0,41 hasta 15,1 g. Se observa una relación fluida log-lineal, con una media de 50% umbral de 1,97 g (95% límites de confianza, 1,12-3,57 g). Se puede observar cierta variabilidad en ratas normales ya que esto es atribuible a pruebas exhaustivas.

Los umbrales en un grupo importante de ratas neuropáticas mostraron variabilidad insignificante durante 20 días. Después de 50 días, el 61% cumplían estrictamente con los criterios de neuropatía, utilizando el análisis de supervivencia. El umbral de medición utilizando el método de arriba-abajo (Up and Down), en combinación con el modelo de dolor neuropático, representa una poderosa herramienta para analizar los efectos de las manipulaciones del estado de dolor neuropático.

### **3.8. H<sub>2</sub>S**

El sulfuro de Hidrógeno (H<sub>2</sub>S) es conocido como un mediador gaseoso altamente difusible, que puede detectarse en concentraciones cercanas a 50  $\mu$ M, en suero y en la mayoría de los tejidos, mientras que rangos mayores de producción se han observado en cerebro, sistema cardiovascular, hígado y riñón (Li et. al., 2005; Doeller et. al., 2005). Es metabolizado por diversos mecanismos, como oxidación mitocondrial, metilación en el citoplasma, oxidación por glutatión o reacción por meta-hemoglobina antes de ser excretada por el riñón (Kasperek et al., 2008).

La producción endógena de H<sub>2</sub>S se encuentra alterada en diversas enfermedades, tales como: diabetes mellitus, colitis, hipoxia inducida por hipertensión pulmonar, cirrosis y la enfermedad de Alzheimer. Su producción excesiva puede favorecer la patogénesis de enfermedades inflamatorias, shock séptico, daño cerebral y retraso mental en pacientes con síndrome de Down (Lowicka y Beltowski, 2007).

La síntesis de H<sub>2</sub>S corresponde a una de las formas de catabolismo de cisteína en la llamada vía de desulfhidración, vía que ha demostrado ser responsable del metabolismo de más del 50% de la cisteína en estudios *in vitro* en algunos tejidos como las células tubulares renales (Stipanuk, et al., 1990).

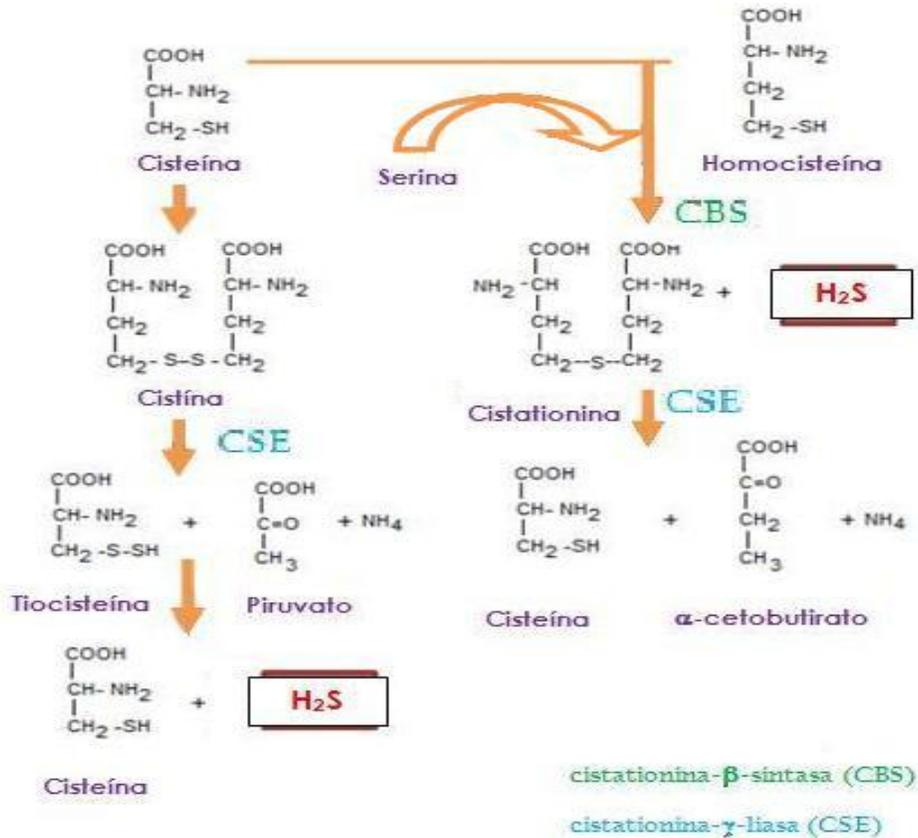


Figura 2. Síntesis del H<sub>2</sub>S a partir de cisteína.

La síntesis de H<sub>2</sub>S a partir de cisteína se lleva a cabo naturalmente en diversos tejidos de mamíferos. Especialmente por medio de la actividad de enzimas dependientes de 2-piridoxal-5'-fosfato: cistationina-γ-liasa (CSE) y cistationina-β-sintetasa (CBS), no obstante existen fuentes alternativas a través de la enzima cisteína aminotrasferasa o de la 3-mercaptosulfurotransferasa (Fiorucci et al., 2005).

El H<sub>2</sub>S es una molécula altamente reactiva que puede fácilmente reaccionar con especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, limitando sus efectos tóxicos y atenuando sus funciones fisiológicas. También tiene un efecto antioxidante a través de la estimulación del transporte de cisteína, la síntesis de glutatión, la expresión de la hemo oxigenasa (HO) y la producción de monóxido de carbono (CO) (Lowicka y Beltowski, 2007).

Este mediador es un agente reductor fuerte, lo que apunta que algunos de sus efectos podrían deberse a la protección de grupos tiol (-SH) proteicos de la oxidación (Abe y Kimura, 1996).

El H<sub>2</sub>S opera como un mediador pro inflamatorio en sepsis abdominal, endotoxemia y pancreatitis, en contraste con sus efectos antiinflamatorios en modelos animales de gastritis y colitis (Kasperek et al., 2008). Además se ha observado que el sulfuro de hidrógeno puede estimular o inhibir la proliferación celular, activar o bloquear apoptosis y sobre producir o disminuir la isquemia miocárdial (Lowicka y Beltowski, 2007). El principal mecanismo de su toxicidad es la potente inhibición de la citocromo oxidasa mitocondrial (Reiffenstein et al., 1992).

El sulfuro de hidrógeno estimula canales K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> en neuronas, cardiomiocitos y células pancreáticas; sin embargo, el H<sub>2</sub>S no estimula la guanilato ciclasa soluble como lo hacen el óxido nítrico y el monóxido de carbono (Kasperek et al., 2008)

### **3.9. Enzimas CSE y CBS.**

La enzima CSE cataliza la conversión de cistina a tiocisteína, piruvato y amoníaco; la tiocisteína se descompone de forma no enzimática a cisteína y sulfuro de hidrógeno.

Por otro lado el principal mecanismo de producción de H<sub>2</sub>S por la CBS involucra probablemente la condensación de homocisteína con cisteína para la formación de cistationina y la liberación de H<sub>2</sub>S (Chen et al., 2004).

El H<sub>2</sub>S derivado de la actividad de CBS es fisiológicamente relevante a nivel sistema nervioso, donde participa en la activación de canales de potasio

sensibles a adenosin trifosfato (canales  $K^+_{ATP}$ ). En el sistema cardiovascular el  $H_2S$ , en su mayoría derivado de la actividad de CSE, modula la vasodilatación dependiente del endotelio (Fiorucci et al., 2005). Sin embargo la enzima CBS puede ser inducida en tejido cardiovascular bajo ciertas condiciones (Lowicka y Beltowski, 2007).

En roedores, la deficiencia de CBS/CSE se logra por delección genética o tratamiento crónico con el inhibidor D,L-propargilglicina (Fiorucci et al., 2005).

### 3.10. Inhibidores enzimáticos selectivos

#### 3.10.1. Hidroxilamina

La hidroxilamina u oxiamoníaco de fórmula ( $NH_2OH$ ), es un cuerpo que procede de sustituir un átomo de Hidrógeno del amoníaco por unhidroxilo. No se encuentra libre en la naturaleza. Es un cuerpo sólido, incoloro, inodoro, muy ávido del agua y se mezcla con ella en todas proporciones. Arde en el aire con llama de color amarillento. Cuando se calienta en estado anhidro (deshidratada), explota con gran violencia. Es de reacción básica, menos pronunciada que el amoníaco, aparte de ser un poderoso reductor.

#### 3.10.2. Propargilglicina (PPG)

La propargilglicina (PPG) o ácido 2-amino-4-pentinóico, actúa como inhibidor irreversible y selectivo de la enzima CSE.

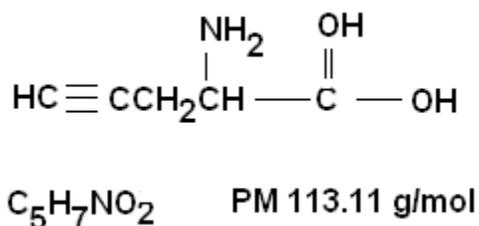


Figura 3. Estructura química de PPG.

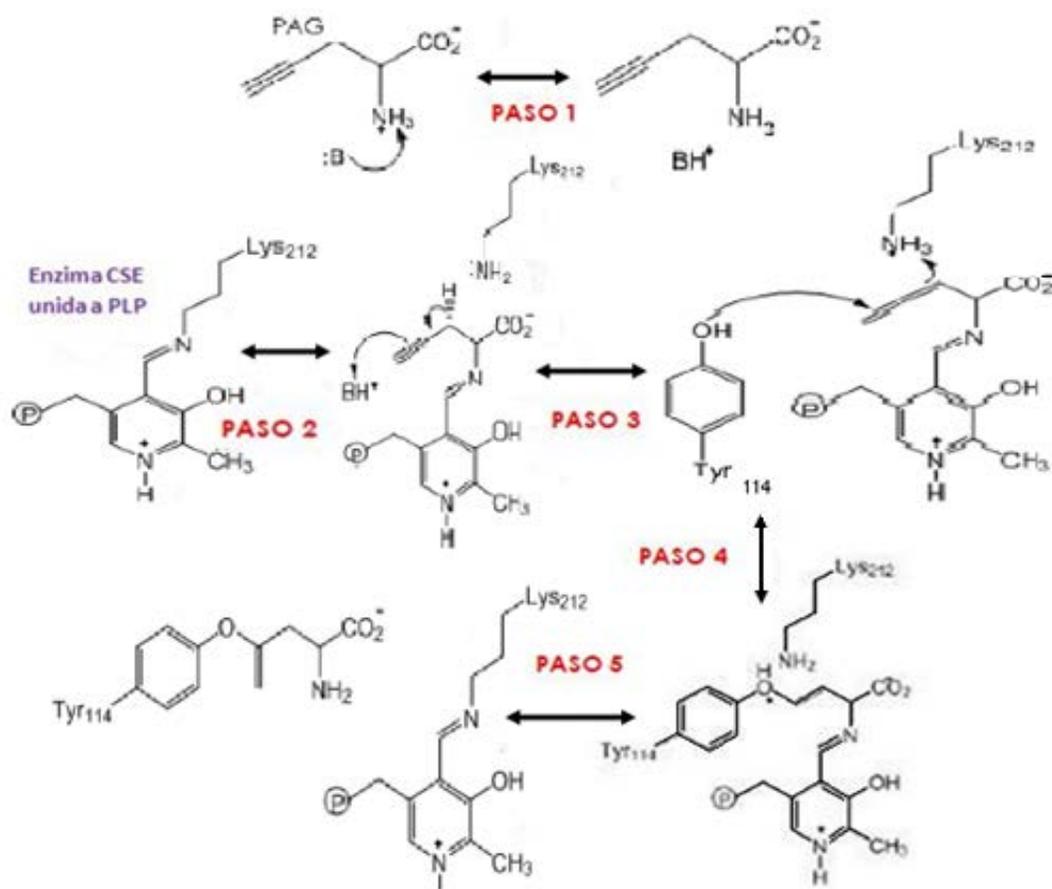


Figura 4. Inhibición de CSE por PPG.

Sun et al.(2009) proponen que la PPG inhibe a la enzima CSE al bloquear la accesibilidad del sustrato al sitio activo vía estérica, no uniéndose al pirodoxal 5'-fosfato (PLP); el grupo amino de PPG es desprotonado por un aminoácido del sitio activo en un primer paso, favoreciendo una transaldiminación, seguido por una desprotonación del aleno por el residuo Lys 212 generándose un aleno reactivo, que efectúa un ataque nucleofílico sobre el grupo oxhidrilo de la Tyr 114, para dar origen a un vinil éter.

La actividad de la enzima CSE se abate en tejidos de ratas administradas con D, L-propargilglicina 50 mg/Kg (i.p.) en el que después de 12 horas la actividad de esa enzima es de tan solo el 4.4%, respecto a un control sin el tratamiento (Kodama et al., 1983).

Dentro de los efectos farmacológicos de la PPG se encuentran la regulación del tono vascular en condiciones basales (Zhong et al., 2003); la

atenuación de la respuesta inflamatoria en pulmones e hígado en el modelo de sépsis en ratón (Zhang et al., 2003); la reducción del daño en hígado y músculo esquelético ocasionado por la inyección de LPS en ratas (Collin et al., 2005); disminución del daño celular pancreático ocasionado por caeruleína (Bhatia et al., 2005b); la prevención de la infiltración leucocitaria y de la formación de edema en el modelo inflamatorio con carragenina (Bhatia et al., 2005a).

Sin embargo, la administración de PPG reduce el efecto protector del H<sub>2</sub>S exógeno en el modelo de daño en miocardio inducido por un episodio de isquemia/perfusión (Bian et al., 2006) y que su administración favorece el edema plantar inducido por carragenina (Zanardo et al., 2006).

### **3.11. Donadores de H<sub>2</sub>S**

#### **3.11.1. NaHS.**

En estudios in vitro, el sulfhidrato de sodio (NaHS) es comúnmente empleado como un donador de H<sub>2</sub>S (Lowicka y Beltowski, 2007).

#### **3.11.2. L-Cisteína.**

La L-cisteína (abreviada como Cys o C) es un  $\alpha$ -aminoácido con la fórmula química HO<sub>2</sub>CCH(NH<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>SH. Se trata de un aminoácido no esencial, lo que significa que puede ser sintetizado por los humanos. La parte de la cadena donde se encuentra la cisteína es el tiol que es no polar y por esto la cisteína se clasifica normalmente como un aminoácido hidrofóbico. La parte tiol de la cadena suele participar en reacciones enzimáticas, actuando como nucleófilo. El tiol es susceptible a la oxidación para dar lugar a puentes disulfuros derivados de las cisteínas que tienen un importante papel estructural en muchas proteínas. La cisteína también es llamada cistina, pero esta última se trata de un dímero de dos cisteínas a través de un puente disulfuro.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El H<sub>2</sub>S es un gas maloliente que recientemente ha comenzado a estudiarse como neurotransmisor endógeno. El H<sub>2</sub>S se genera a partir del aminoácido L-cisteína a través de dos enzimas principales, la CBS y la CSE, así como de enterobacterias presentes en la flora normal (Wang, 2002, Boehning y Snyder, 2003). En este sentido, algunos estudios demostraron que existe una relación entre la concentración de H<sub>2</sub>S en el lumen del colon derivado de las enterobacterias y el desarrollo de la enfermedad del intestino irritable o el cáncer de colon (roediger et al., 1997, Huycke y gaskins, 2004). Con respecto a las enzimas productoras de H<sub>2</sub>S ambas se han identificado en cerebro, médula espinal y fibras aferentes primarias, aunque se le atribuye a la CBS un papel principal en la producción de H<sub>2</sub>S en el sistema nervioso (Awala et al., 1995), mientras que la CSE parece ser la principal vía a través de la cual se sintetiza H<sub>2</sub>S en el sistema vascular (Yang et al., 2008).

Con respecto a la participación del H<sub>2</sub>S en el proceso nociceptivo, se ha observado que la administración de PPG, un inhibidor de la enzima CSE, reduce la hiperalgesia producida por la administración intraplantar de lipopolisacáridos. Dicho efecto se revierte por la administración de un donador de H<sub>2</sub>S exógeno (NaHS) o endógeno (L-cisteína) de H<sub>2</sub>S. De igual manera, se sabe que el NaHS estimula las fibras aferentes primarias sensibles a capsaicina y activa canales de calcio tipo T (Patacchini et al., 2004; Kawabata et al., 2007). Asimismo se ha sugerido que el efecto pronociceptivo evocado por H<sub>2</sub>S en el modelo de formalina depende de la intensidad del estímulo nociceptivo aplicado.

Por otro lado, se piensa que el H<sub>2</sub>S podría contribuir a la resistencia a insulina que se presenta durante la diabetes debido a que este gas inhibe la secreción de la hormona pancreática activando canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP, inhibiendo el metabolismo de glucosa y disminuyendo la producción de ATP de células pancreáticas (Yang et al., 2005; Kaneko et al., 2006). Además, se ha observado que la concentración plasmática de L-cisteína, así como la expresión de las enzimas CBS y CSE se encuentra incrementada en el hígado y el riñón de ratas hiperglicémicas (Jacobs et al., 1998). Yusuf et al. (2005) demostraron que

aunque la concentración plasmática de H<sub>2</sub>S no cambia en ratas hiperglicémicas, su producción por homogenados pancreáticos y hepáticos se encuentra incrementada. Además, la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la CBS en el páncreas se reguló a la alza y dichos efectos se revirtieron mediante la administración de insulina.

A pesar de la evidencia que sugiere que el H<sub>2</sub>S tiene un papel pronociceptivo en el procesamiento del dolor y que este gas parece contribuir al padecimiento de la diabetes, hasta la fecha no existen estudios que demuestren el papel que juegan el H<sub>2</sub>S y las enzimas principales que lo sintetizan en la neuropatía periférica asociada a la diabetes. Los resultados nos permitirán valorar si la inhibición de las enzimas productoras de H<sub>2</sub>S ejercen un efecto antinociceptivo y si son potenciales blancos terapéuticos en el tratamiento de la neuropatía periférica asociada a la diabetes.

## 5. HIPÓTESIS.

Si el incremento en la síntesis de H<sub>2</sub>S a lo largo de la vía nociceptiva tiene un papel pronociceptivo, entonces; la inhibición de las enzimas productoras de H<sub>2</sub>S, reducirá la intensidad del dolor inflamatorio y la neuropatía diabética de ratas, permitiendo sugerir como blanco terapéutico para estos dos padecimientos, la inhibición de las enzimas cistationin- $\beta$ -sintasa (CBS) y cistationin- $\gamma$ -liasa (CSE).

## 6. OBJETIVOS.

### 6.1. Objetivo general.

- Evaluar la participación de las enzimas productoras de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), cistationin- $\beta$ -sintasa (CBS) y cistationin- $\gamma$ -liasa (CSE), en el dolor inflamatorio y neuropático en ratas.

### 6.2. Objetivos particulares.

- Obtener las curvas dosis respuesta de los inhibidores enzimáticos de las enzimas CSE (PPG) y CBS (HA), a nivel periférico local, empleando el modelo de formalina en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas.
- Obtener las curvas dosis respuesta de los donadores exógeno (NaHS) y endógeno (L-cisteína) de  $H_2S$ , a nivel periférico local empleando el modelo de formalina en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas.
- Administrar en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas, una dosis no efectiva de los inhibidores enzimáticos, con una dosis efectiva del donador endógeno, con la finalidad de prevenir el efecto pronociceptivo evocado por L-cisteína.
- Determinar el efecto antialodínico del inhibidor enzimático PPG en ratas hiperglicémicas de 9 a 11 semanas de haberles inducido diabetes.
- Medir la concentración de  $H_2S$  en suero, ganglios de la raíz dorsal (L4-L6), nervio ciático y médula espinal en ratas normoglicémicas y con 2 y 9-11 semanas de haber inducido la hiperglicemia con estreptozotocina.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1. Ratas normoglicémicas**

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar de 9 a 11 semanas de edad con un peso corporal entre 180 y 200 g provenientes del bioterio del CINVESTAV (Sede sur). Las ratas se mantuvieron con libre acceso al agua y alimento, y su nivel de glucosa estuvo alrededor de 80 a 110 mg/dL en todas las ratas. Estas ratas son consideradas normoglicémicas. El cuidado y manejo de los animales se llevó a cabo siguiendo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Además, se siguieron las guías para el cuidado y uso de los animales de laboratorio publicado por el National Research y todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las guías sobre aspectos éticos para la investigación del dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983). Este proyecto fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. Cada rata fue utilizada solamente una vez y se sacrificó al término del experimento en una cámara saturada con CO<sub>2</sub>.

### **7.2. Ratas hiperglicémicas**

La hiperglicemia en las ratas se indujo por la administración intraperitoneal (i.p.) de una dosis única de estreptozotocina (50 mg/kg) en un volumen de 2 mL/kg, previo ayuno de 12 h. La estreptozotocina se preparó el mismo día de su administración. Se disolvió en agua destilada y desionizada, sin exponerla a la luz. Al día siguiente después de la inyección de estreptozotocina y antes de llevar a cabo el experimento, se determinaron los niveles de glucosa mediante el siguiente procedimiento. Se insertó una tira reactiva en un glucómetro (Bayer) previamente calibrado. Se cortó lo mínimo posible del final de la cola de la rata, obteniendo una gota de sangre que se puso en contacto con el capilar de la tira reactiva. La condición diabética se consideró establecida al presentarse niveles de glucosa  $\geq$  300 mg/dL en ambas mediciones (Chen et al., 2001; Chen y Pan,

2002). Las ratas que obtuvieron un nivel de glucosa < 300 mg/dL fueron descartadas del estudio. Por su parte, las ratas que sólo recibieron una inyección i.p. de agua destilada y desionizada (vehículo) dieron niveles de glucosa entre 80 y 110 mg/dL. Además, las ratas tratadas con estreptozotocina mostraron un decremento considerable de peso corporal (aproximadamente del 30%), en comparación con el grupo control tratado con agua destilada y desionizada, ya que estas últimas incrementaron su peso y tamaño corporal. Asimismo, las ratas hiperglicémicas incrementaron de manera significativa el volumen de orina excretado (poliuria), así como; el consumo de agua (polidipsia) y alimento (polifagia).

### **7.3. Fármacos**

El formaldehído, estreptozotocina, propargilglicina (PPG), hidroxilamina (HA), L-cisteína y NaHS fueron comprados de Sigma Aldrich. Todos los fármacos, excepto estreptozotocina, se disolvieron en solución salina a las dosis empleadas. La estreptozotocina fue disuelta en agua destilada y desionizada. Los fármacos se utilizaron el mismo día que fueron preparados.

#### **7.3.1. Preparación de la formalina**

La formalina es una solución diluida de formaldehido comercial (37% w/v). El formaldehido al 37% se considera como formalina al 100% y de éste se realizaron las diluciones adecuadas para obtener formalina al 0.5% y 1%.

#### **7.3.2. Preparación de la estreptozotocina**

La estreptozotocina fue administrada a una dosis de 50mg/Kg por vía i.p. a razón 2 mL/Kg de peso. El fármaco se preparó justo antes de ser administrado debido a que se hidroliza en agua y se descompone por exposición a la luz.

### **7.4. Prueba de la formalina**

La participación a nivel periférico local de las enzimas productoras del H<sub>2</sub>S se evaluó mediante la prueba de la formalina (Dubuisson y Dennis 1977). Los animales se colocaron en un cilindro de observación de acrílico transparente de 20 centímetros de diámetro con espejos en la parte posterior durante 30 minutos

con el propósito de permitirles adaptarse a su entorno. En seguida, se retiró a la rata de la cámara de observación para realizar la administración periférica local de los fármacos. De 10 a 20 minutos después dependiendo del fármaco administrado, la rata fue nuevamente retirada para llevar a cabo la administración subcutánea de 50  $\mu$ L de formalina al 0.5% ó 1% en el dorso de la pata posterior derecha con una aguja calibre 30. Inmediatamente, las ratas fueron colocadas en el cilindro de acrílico y se cuantificó la conducta nociceptiva como el número de sacudidas de la pata inyectada en intervalos de 1 minuto cada 5 minutos por 60 minutos, ya que se ha descrito que esta conducta es la más consistente (Wheeler-Aceto y Cowan, 1991). En este modelo la disminución en el número de sacudidas se traduce como antinocicepción mientras que el aumento se considera pronociceptivo. Los experimentos fueron realizados entre 25 y 27°C (Tjølsen et al., 1992).

#### **7.4.1. Grupos controles**

Con el objetivo de determinar si la solución salina isotónica administrada por vía periferia local modificaba la conducta nociceptiva inducida por formalina al 0.5 ó 1%, o si era capaz de evocar la conducta de sacudidas por si sola, es decir, sin formalina, se realizaron tres grupos experimentales: En los dos primeros, se administró solución salina, en lugar de los fármacos, de manera subcutánea 10 minutos antes de la administración de formalina al 0.5 ó 1%. Mientras que en el tercer grupo, las ratas recibieron solución salina subcutánea en vez de formalina. Los controles se realizaron tanto en ratas normoglicémicas, como en hiperglicémicas.

#### **7.5. Evaluación de la hiperalgesia**

Para medir la hiperalgesia en ratas hiperglicémicas se utilizó el modelo de formalina descrito anteriormente. Para esta evaluación, las ratas fueron administradas con 50 mg/Kg de estreptozotocina y dos semanas después las ratas desarrollaron una respuesta nociceptiva aumentada a la administración de formalina al 0.5%, la cual es aproximadamente dos veces mayor a la respuesta que se obtiene con formalina al 0.5% en ratas normoglicémicas en la fase II. .

### **7.6. Medición de la alodinia táctil.**

Entre las 9 y 11 semanas después de haber inducido diabetes con estreptozotocina, las ratas desarrollaron alodinia táctil, por lo que la evaluación del efecto antialodínico de PPG se llevó a cabo utilizando filamentos de von Frey mediante el método arriba-abajo (Dixon, 1980, Chaplan et al., 1994). La metodología consiste en ir ascendiendo o descendiendo el grosor de los filamentos de estimulación con base a la respuesta del animal iniciando con un filamento de 2 g fuerza. En este modelo, las ratas se colocaron en cajas de observación sobre un fondo de malla metálica y se ambientarán durante 30 min. Inmediatamente después, el umbral mecánico de retiro de la pata se midió y se llevó a cabo la administración sistémica de PPG. Posteriormente, el umbral mecánico de retiro se midió a las 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 horas. En este modelo, el aumento en el umbral de retiro se considera antialodínico (antineuropático). Asimismo, el modelo tiene un valor de corte de 15 g.

### **7.7. Medición del H<sub>2</sub>S.**

Para medir los niveles de sulfuro de hidrógeno durante el desarrollo de la neuropatía periférica, ratas control e hiperglicémicas de 2 y 9-11 semanas de haberles inyectado estreptozotocina, se sacrificaron por decapitación y se extrajeron los GRD (L4-L6), la región lumbar de la médula espinal, un segmento de nervios ciático y muestras de sangre. Las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido hasta medir la cantidad de H<sub>2</sub>S presente en éstos.

Para cuantificar la concentración del H<sub>2</sub>S en la neuropatía diabética se llevó a cabo el protocolo experimental descrito previamente por Chávez-Piña et al., (2010). Básicamente, los tejidos fueron homogenizados en una solución de acetato de zinc al 0.5% disuelto en un amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 8). El homogenizado se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente fue centrifugado a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se mezcló con ácido tricloroacético (10%) y fue centrifugado una vez más a 14 000 rpm g durante 10 minutos a 4°C. El nuevo sobrenadante se mezcló con sulfato de 4-dimetilaminoanilina (20 mM) disuelto en una solución de HCl 7.2 M y FeCl<sub>3</sub> 30mM. Después de 20 minutos de incubación la absorbancia fue medida a 670 nm.

## 7.8. Análisis de datos y estadística

Para el análisis de datos en el modelo de formalina, se construyeron cursos temporales del número de sacudidas contra el tiempo. A partir de estas gráficas se obtuvo el área bajo la curva (ABC) del comportamiento nociceptivo contra el tiempo mediante el método de los trapezoides (Tallarida y Murray, 1981). El ABC se consideró como una expresión global de la intensidad y duración del efecto. A continuación el ABC de cada grupo experimental se graficó en barras como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media ( $n \geq 6$ ). En cuanto a la cuantificación de la concentración de  $H_2S$  a lo largo de la vía nociceptiva. Los valores obtenidos se promediaron y graficaron de barras como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media ( $n \geq 3$ ). Para determinar las diferencias entre los tratamientos, se realizó el análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Dunnett mediante el uso del programa estadístico Graphpad Prism 5.0 en donde una  $p < 0.05$  se consideró significativa.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Estandarización de la prueba de la formalina

La inyección subcutánea de formalina en la región dorsal de la pata posterior de la rata a nivel periférico local produjo un comportamiento de sacudidas típico (Tjolsen et al., 1992). El curso temporal mostró un comportamiento bifásico independiente de la concentración de formalina administrada al 0.5% y al 1.0%. La fase 1 inicio inmediatamente después de la administración de formalina y se prolongó por alrededor de 10 minutos (0-10 min), después de esta fase siguió un periodo corto en donde no se observó la manifestación de la conducta nociceptiva (10-15 min). Finalmente, después de 15 minutos de haber administrado formalina comenzó la fase dos de la prueba y la conducta de sacudidas se observó nuevamente (15-60 min). El número de sacudidas aumento gradualmente hasta llegar a un máximo entre los 25 y 40 minutos con una duración total de aproximadamente 60 minutos. A partir de los cursos temporales se hizo el cálculo para obtener el ABC para cada una de las fases. La intensidad y duración de la conducta nociceptiva fueron de forma dependientes de la concentración de formalina (Figura 5) y del estado glicémico del animal, es decir; la formalina incrementó el número de sacudidas de manera dependiente de su concentración y el número de sacudidas fue mayor en animales hiperglicémicos respecto a las ratas normoglicémicas a una misma concentración de formalina (Tabla 2; Figuras 5 y 6).

Tabla 2. Valores de área bajo la curva (ABC) obtenidos de la fase I y II de la prueba de formalina a partir de los cursos temporales de número de sacudidas vs tiempo. La conducta nociceptiva se indujo por la inyección de solución salina o formalina al 0.5% y 1%. Los datos se expresan como el ABC promedio  $\pm$  el error estándar de al menos 6 animales por grupo experimental.

Fármaco	Concentración	Normoglicémicas		Hiperglicémicas	
		Fase 1	Fase 2	Fase 1	Fase 2
Solución salina	0.9%	12.9 $\pm$ 1.6	30.4 $\pm$ 5.7	16.8 $\pm$ 5.4	36.8 $\pm$ 8.9
Formalina	0.5%	96.4 $\pm$ 7.4	305.2 $\pm$ 29.8	90.4 $\pm$ 8.5	499.2 $\pm$ 36.8
Formalina	1%	127.9 $\pm$ 14.2	533.4 $\pm$ 31.0	No realizado	No realizado

## 8.2. Evaluación periférica del H<sub>2</sub>S y las enzimas principales que lo sintetizan en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas de 2 semanas en el dolor inflamatorio inducido por formalina

Con la finalidad de evaluar la participación del H<sub>2</sub>S a nivel periférico local en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas de 2 semanas, se administraron los inhibidores PPG e HA, los cuales son inhibidores de las enzimas cistationin- $\gamma$ -liasa y cistationin- $\beta$ -sintasa, respectivamente. Ambas enzimas sintetizan este gas. En ratas normoglicémicas, la administración periférica local de los inhibidores enzimáticos de H<sub>2</sub>S se llevó a cabo con formalina al 1%, mientras que en ratas hiperglicémicas, se utilizó formalina al 0.5%. Asimismo, se utilizó el donador exógeno NaHS, y el sustrato endógeno, L-cisteína. Los experimentos con los donadores de H<sub>2</sub>S se realizaron con formalina al 0.5%, tanto en ratas normoglicémicas como en hiperglicémicas.

### Periférico local (normoglicémicas)

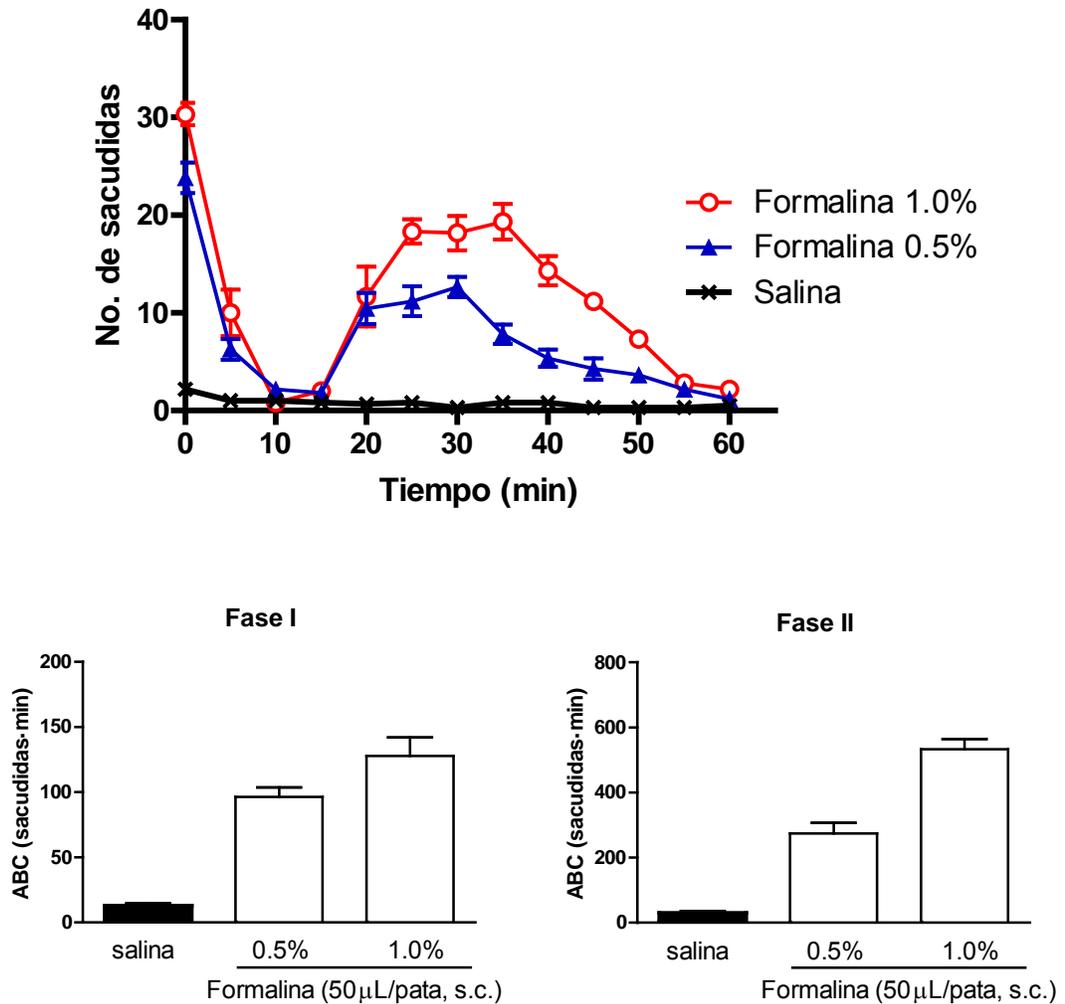


Figura 5. Efecto de la concentración de formalina sobre la conducta nociceptiva a nivel periférico local en ratas normoglicémicas. Arriba: Curso temporal de la conducta nociceptiva después de la inyección subcutánea (s.c.) de solución salina o formalina al 0.5% y 1% (50  $\mu$ L) en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata y previo pretratamiento (-10 min) con 50  $\mu$ L de solución salina s.c. en la misma región. La fase I abarca de 0-10 minutos, la fase II de 10-60 minutos. Abajo: Los datos son expresados en gráficas de barras como el ABC promedio de la fase I y II calculados a partir de los cursos temporales por el método de trapezoides  $\pm$  el error estándar de al menos 6 ratas en cada grupo experimental. Abreviaturas: subcutánea (s.c.),

### Periférico local (hiperglicémicas)

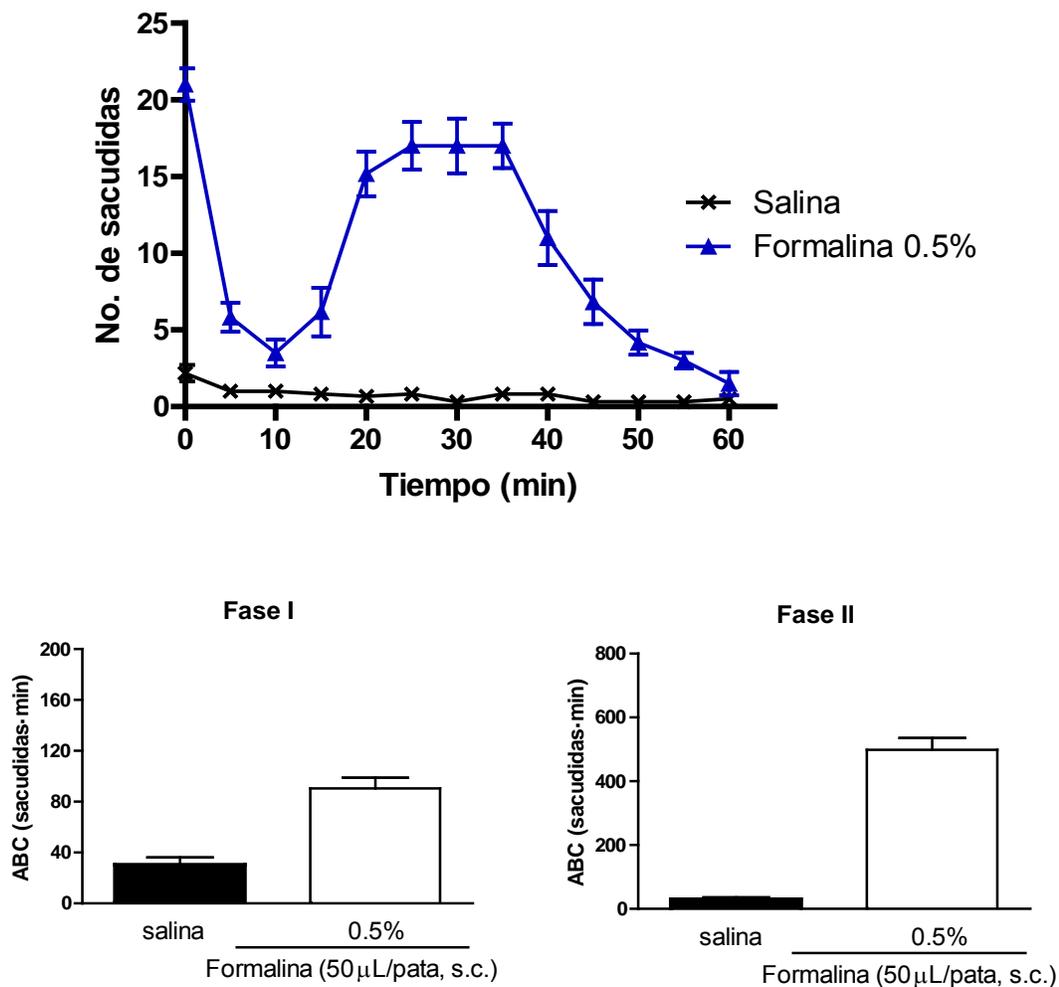


Figura 6. Efecto de la concentración de formalina sobre la conducta nociceptiva a nivel periférico local en ratas hiperglicémicas de 2 semanas. Arriba: Curso temporal de la conducta nociceptiva después de la inyección subcutánea (s.c.) de solución salina o formalina al 0.5% (50  $\mu$ L) en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata y previo pretratamiento (-10 min) con 50  $\mu$ L de solución salina s.c. en la misma región. La fase I abarca de 0-10 minutos, la fase II de 10-60 minutos. Abajo: Los datos son expresados en gráficas de barras como el ABC promedio de la fase I y II calculados a partir de los cursos temporales por el método de trapezoides  $\pm$  el error estándar de al menos 6 ratas en cada grupo experimental. Abreviaturas: subcutánea (s.c.)

### 8.2.1. Inhibidores Enzimáticos

En ratas normoglicémicas, PPG (inhibidor de la enzima cistationin- $\gamma$ -liasa) disminuyó el número de sacudidas de forma dependiente de la dosis administrada (30, 100 y 300  $\mu\text{g/pata}$ ) en la fase II, pero no en la fase I, de la prueba de formalina al 1%. En cuanto a la fase II sólo se observó una diferencia estadísticamente significativa en la dosis de 300  $\mu\text{g}$  (Figura 7). El efecto antinociceptivo observado en la fase II con PPG fue producido a nivel periférico local ya que la administración contralateral a formalina al 1% de PPG, no presentó diferencia estadística respecto al grupo control. Al igual que en las ratas normoglicémicas, el tratamiento de PPG en ratas hiperglicémicas redujo la conducta nociceptiva de sacudidas en la fase 2, pero no en la fase 1 de la prueba con formalina al 0.5% (Figura 8). Sin embargo, en las ratas hiperglicémicas la diferencia estadística observada en la fase II se presentó a las dosis de 0.3 y 30  $\mu\text{g/pata}$ , lo que representa una dosis 3 órdenes de magnitud menor en comparación con las ratas normoglicémicas.

Por otra parte, la administración de HA (inhibidor de la enzima cistationin- $\beta$ -sintasa) en ratas normoglicémicas, no redujo la conducta nociceptiva inducida por formalina al 1% en la fase I, en un rango de dosis de 1 a 100  $\mu\text{g/pata}$ ; no obstante, en la fase II se observaron respuestas estadísticamente significativas en las dosis de 10 y 100  $\mu\text{g/pata}$  (Figura 9). En cuanto a la administración de HA en el dorso de la pata izquierda (contralateral) y formalina al 1% en el dorso de la pata derecha (ipsilateral), no hubo una respuesta estadísticamente significativa respecto al grupo control, esto nos da a entender que el efecto antinociceptivo producido por HA en la pata posterior derecha es local y no sistémico. Por su parte, la administración periférica local de HA en ratas hiperglicémicas sólo mostró un efecto antihiperalgésico dependiente de la dosis en la fase II de la prueba de formalina al 1% a las dosis de 0.01 y 0.1  $\mu\text{g/pata}$  (Figura 10). Nuevamente, las ratas hiperglicémicas requirieron una dosis 1000 veces menor de HA respecto a las ratas normoglicémicas.

### PPG (normoglicémicas)

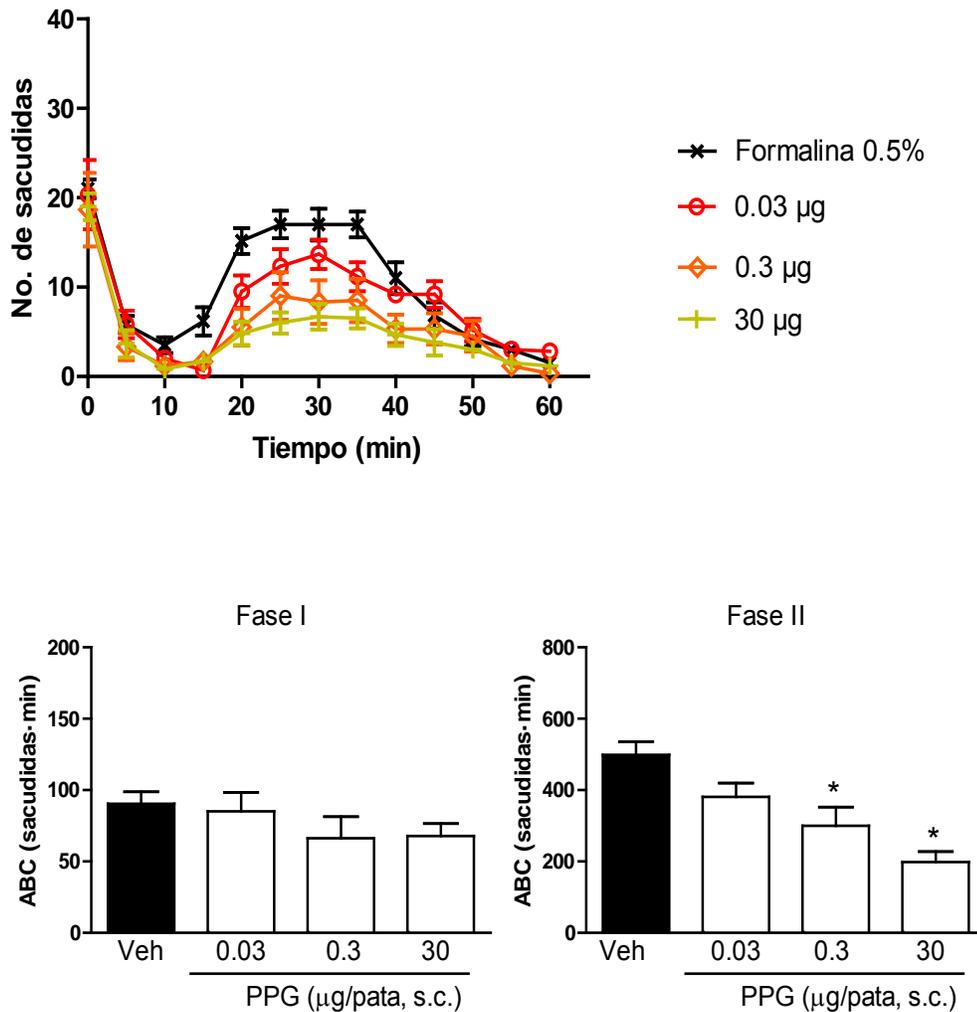


Figura 7. Efecto antinociceptivo del inhibidor de la enzima cistationin- $\gamma$ -liasa, propargilglicina (PPG), sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina al 1% en ratas normoglicémicas a nivel periférico local. Arriba: Curso temporal del efecto antinociceptivo producido por PPG, administrado en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata 10 min antes de la inyección de formalina al 1% (50 $\mu$ L) en la misma región. La fase I abarca de 0-10 min, mientras que la fase II va de los 10-60 min. Abajo: Los datos son expresados en gráficas de barras como el ABC promedio de la fase I y II calculadas a partir de los cursos temporales mediante el método de trapezoides  $\pm$  el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. \*Estadísticamente diferente al grupo control (Veh) con una  $p < 0.05$  por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Abreviaturas: Veh: vehículo, s.c.: subcutánea), PPG: propargilglicina.

### PPG (hiperglicémicas)

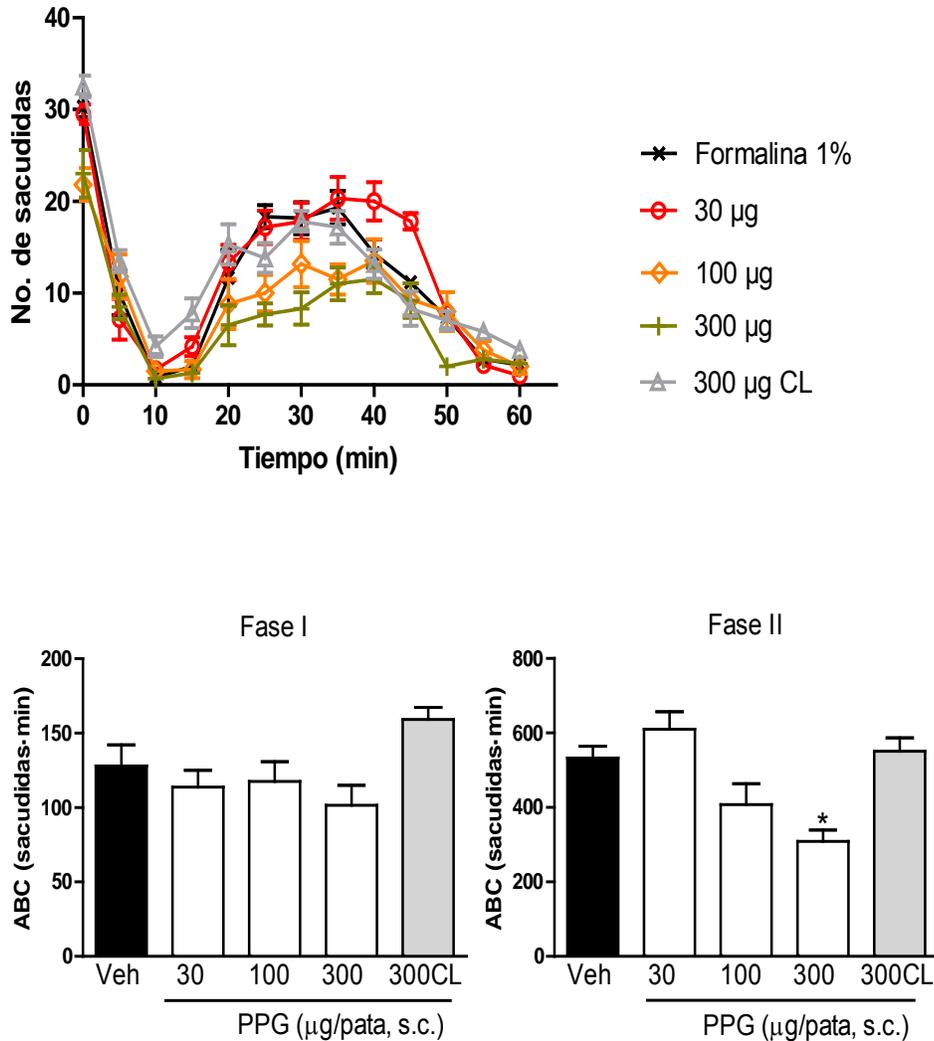


Figura 8. Efecto antinociceptivo del inhibidor de la enzima cistationin- $\gamma$ -liasa, propargilglicina (PPG), sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina al 1% en ratas normoglicémicas a nivel periférico local. Arriba: Curso temporal del efecto antinociceptivo producido por PPG, administrado en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata 10 min antes de la inyección de formalina al 1% (50 $\mu$ L) en la misma región. La fase I abarca de 0-10 min, mientras que la fase II va de los 10-60 min. Abajo: Los datos son expresados en gráficas de barras como el ABC promedio de la fase I y II calculadas a partir de los cursos temporales mediante el método de trapezoides  $\pm$  el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. \*Estadísticamente diferente al grupo control (Veh) con una  $p < 0.05$  por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Abreviaturas: Veh: vehículo, s.c.: subcutánea, PPG: propargilglicina, CL: contralateral.

### HA (normoglicémicas)

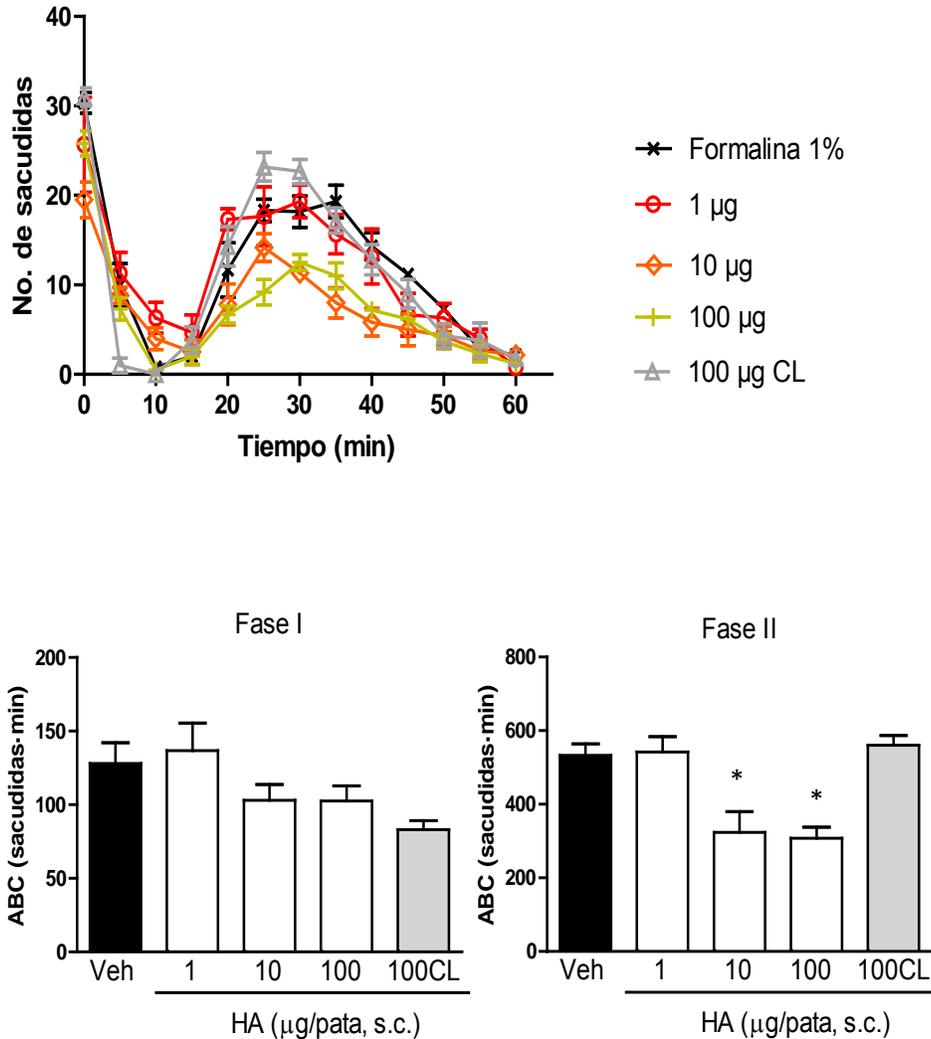


Figura 9. Efecto antinociceptivo del inhibidor de la enzima cistationin- $\beta$ -sintasa, hidroxilamina (HA), sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina al 1% en ratas normoglicémicas a nivel periférico local. Arriba: Curso temporal del efecto antinociceptivo producido por HA, administrada en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata 10 min antes de la inyección de formalina al 1% (50 $\mu$ L) en la misma región. La fase I abarca de 0-10 min, mientras que la fase II va de los 10-60 min. Abajo: Los datos son expresados en gráficas de barras como el ABC promedio de la fase I y II calculadas a partir de los cursos temporales mediante el método de trapezoides  $\pm$  el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. \*Estadísticamente diferente al grupo control (Veh) con una  $p < 0.05$  por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Abreviaturas: Veh: vehículo, s.c.: subcutánea, CL: contralateral, HA: hidroxilamina.

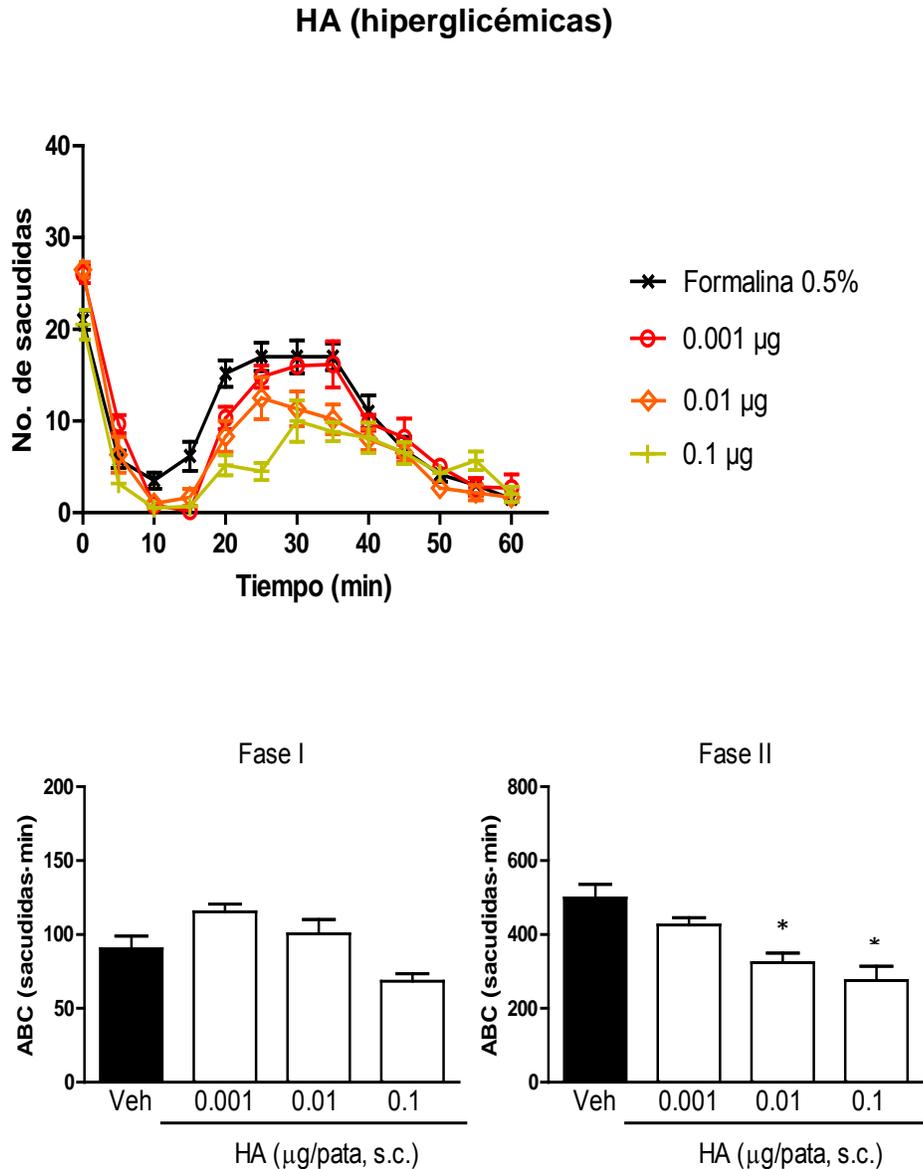


Figura 10. Efecto antihiperálgico del inhibidor de la enzima cistationin- $\beta$ -sintasa, hidroxilamina (HA), sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina (1%) en ratas hiperglicémicas de 2 semanas a nivel periférico local. Arriba: Curso temporal del efecto antihiperálgico producido por HA, administrada en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata 10 min antes de la inyección de formalina al 1% (50 $\mu$ L) en la misma región. La fase I abarca de 0-10 min, mientras que la fase II va de los 10-60 min. Abajo: Los datos son expresados en gráficas de barras como el ABC promedio de la fase I y II calculadas a partir de los cursos temporales mediante el método de trapezoides  $\pm$  el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. \*Estadísticamente diferente al grupo control (Veh) con una  $p < 0.05$  por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Abreviaturas: Veh: vehículo, s.c.: subcutánea, HA: hidroxilamina.

### 8.2.2. Donadores de H<sub>2</sub>S

En cuanto a los donadores de H<sub>2</sub>S, el NaHS (donador exógeno) se administró en ratas normoglicémicas a las dosis de 10, 100 y 300  $\mu$ g/pata, 10 minutos antes de utilizar formalina al 0.5%. NaHS aumentó el número de sacudidas de manera dependiente de la dosis en ambas fases de la prueba de formalina. El efecto pronociceptivo observado con NaHS fue local ya que la administración contralateral de este fármaco no produjo una respuesta nociceptiva estadísticamente diferente al grupo control (Figura 11). En este sentido, cabe mencionar que NaHS por sí mismo indujo conductas nociceptivas en el dorso de la pata derecha ya que en el intervalo de tiempo entre la previa administración del donador exógeno y la administración de formalina al 0.5% se observaron lamidas y sacudidas, sobretodo a la dosis de 300 $\mu$ g/pata. Con respecto a las ratas hiperglicémicas, NaHS produjo un efecto hiperalgésico estadísticamente diferente en ambas fases a la dosis de 10  $\mu$ g/pata (Figura 12). Esta dosis fue igual en la fase I y 30 veces menor en la fase II, a la que induce un efecto significativo en ratas normoglicémicas

Por su parte, L-cisteína (donador endógeno) fue administrado en ratas normoglicémicas 20 min antes de la administración de formalina al 0.5%. Las dosis administradas fueron 10, 30 y 100  $\mu$ g/pata, las cuales produjeron un aumento en el número de sacudidas de manera dependiente de la dosis en la fase II, pero no en la fase I de la prueba. La diferencia estadística observada en la fase II se presentó a las dosis de 30 y 100  $\mu$ g/pata (Figura 13). Dicho efecto fue local y no sistémico como lo demuestra el grupo contralateral de 100  $\mu$ g/pata (Figura 13). En el tratamiento a las ratas hiperglicémicas, se administraron las mismas dosis de L-cisteína a los mismos tiempos que con las ratas normoglicémicas, solo que aquí, el efecto hiperalgésico se observó en ambas fases de la prueba de formalina (Figura 14).

### NaHS (normoglicémicas)

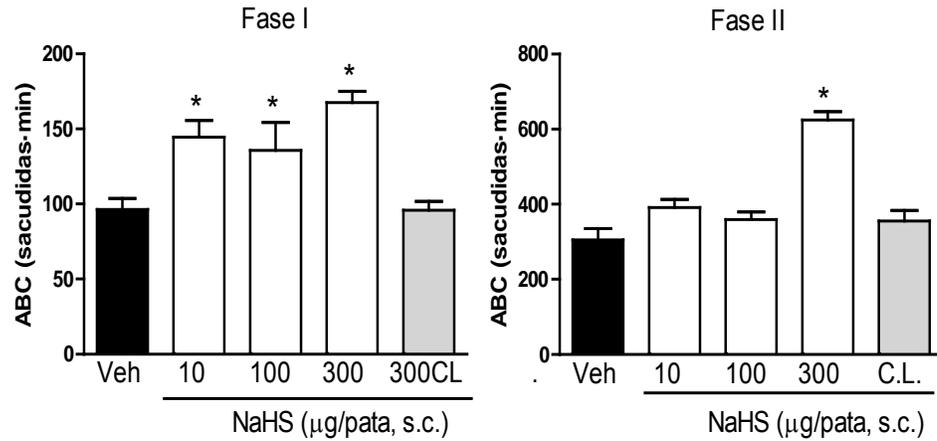
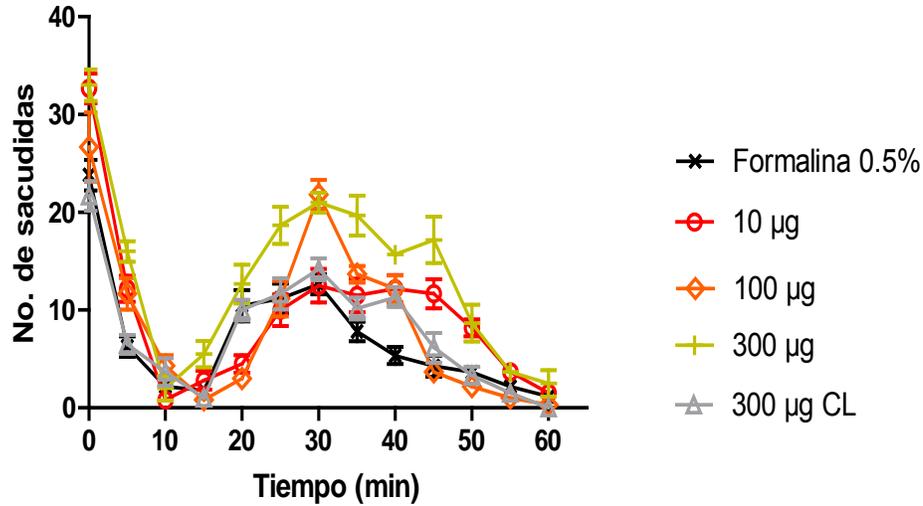


Figura 11. Efecto pronociceptivo del donador exógeno de ácido sulfhídrico, NaHS, sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina al 0.5% en ratas normoglicémicas a nivel periférico local. Arriba: Curso temporal del efecto pronociceptivo producido por NaHS, administrado en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata 10 min antes de la inyección de formalina al 0.5% (50 $\mu$ L) en la misma región. La fase I abarca de 0-10 min, mientras que la fase II va de los 10-60 min. Abajo: Los datos son expresados en gráficas de barras como el ABC promedio de la fase I y II calculadas a partir de los cursos temporales mediante el método de trapezoides  $\pm$  el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. \*Estadísticamente diferente al grupo control (Veh) con una  $p < 0.05$  por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Abreviaturas: Veh: vehículo, s.c.: subcutánea, CL: contralateral.

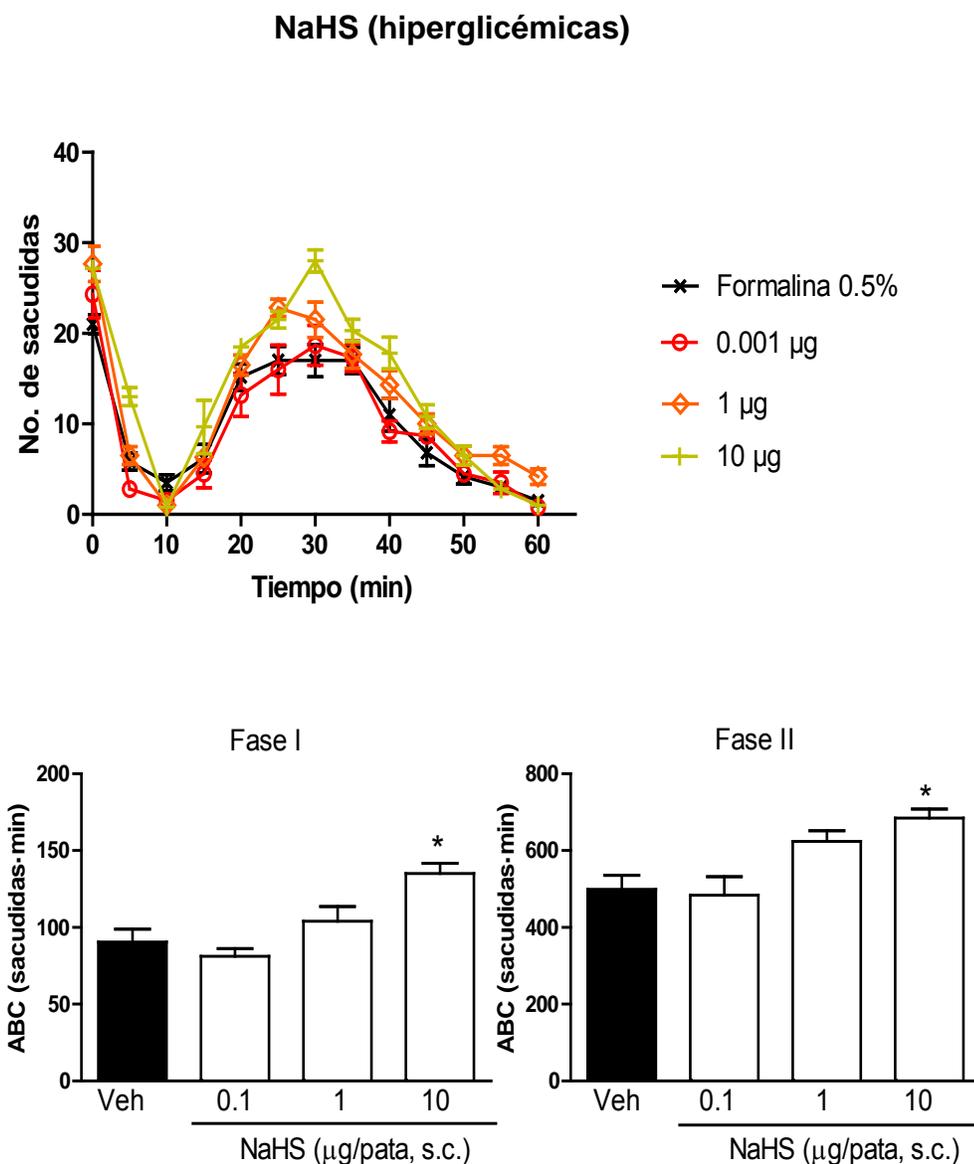


Figura 12. Efecto hiperalgésico del donador exógeno de ácido sulfhídrico, NaHS, sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina al 0.5% en ratas hiperglicémicas de 2 semanas a nivel periférico local. Arriba: Curso temporal del efecto hiperalgésico producido por NaHS, administrado en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata 10 min antes de la inyección de formalina al 0.5% (50 $\mu\text{L}$ ) en la misma región. La fase I abarca de 0-10 min, mientras que la fase II va de los 10-60 min. Abajo: Los datos son expresados en gráficas de barras como el ABC promedio de la fase I y II calculadas a partir de los cursos temporales mediante el método de trapezoides  $\pm$  el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. \*Estadísticamente diferente al grupo control (Veh) con una  $p < 0.05$  por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Abreviaturas: Veh: vehículo, s.c.: subcutánea.

### L-cisteína (normoglicémicas)

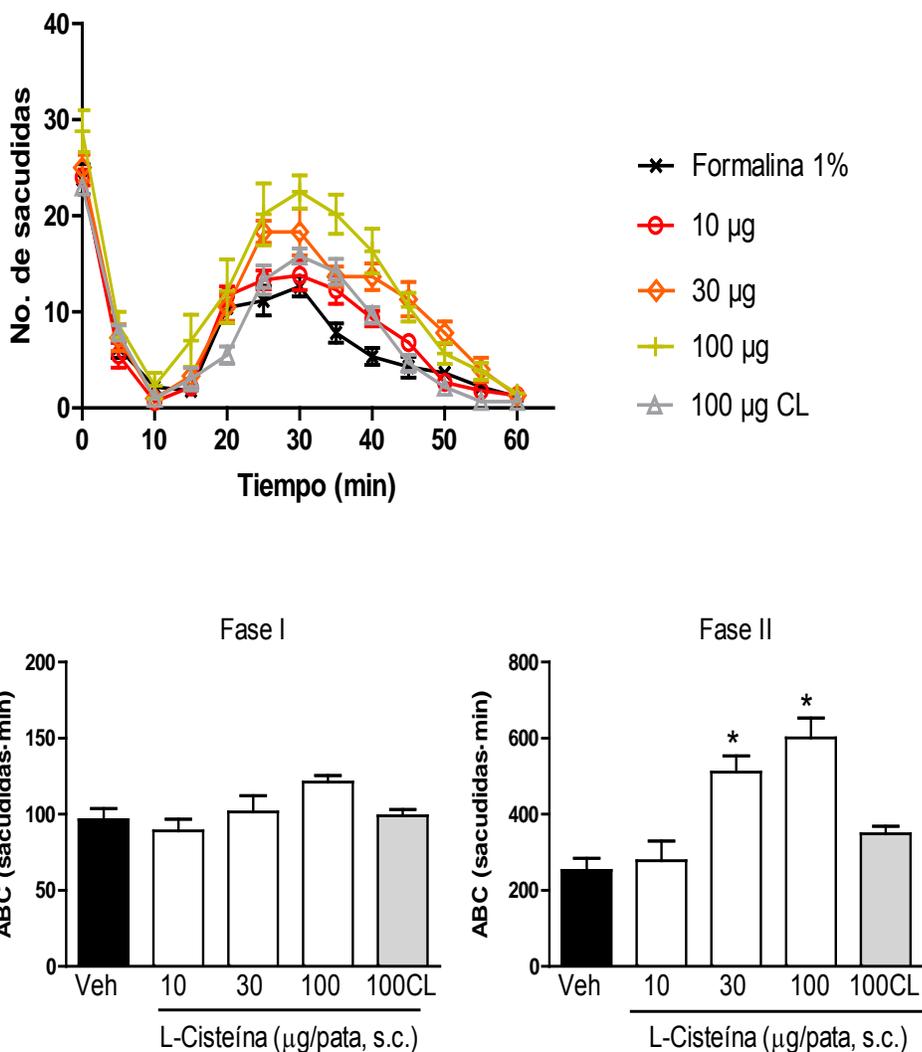


Figura 13. Efecto pronociceptivo del donador endógeno de ácido sulfhídrico, L-cisteína, sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina 0.5% en ratas normoglicémicas a nivel periférico local. Arriba: Curso temporal del efecto pronociceptivo producido por L-cisteína, administrada en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata 20 min antes de la inyección de formalina al 0.5% (50 $\mu$ L) en la misma región. La fase I abarca de 0-10 min, mientras que la fase II va de los 10-60 min. Abajo: Los datos son expresados en gráficas de barras como el ABC promedio de la fase I y II calculadas a partir de los cursos temporales mediante el método de trapezoides  $\pm$  el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. \*Estadísticamente diferente al grupo control (Veh) con una  $p < 0.05$  por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Abreviaturas: Veh: vehículo, s.c.: subcutánea, CL: contralateral.

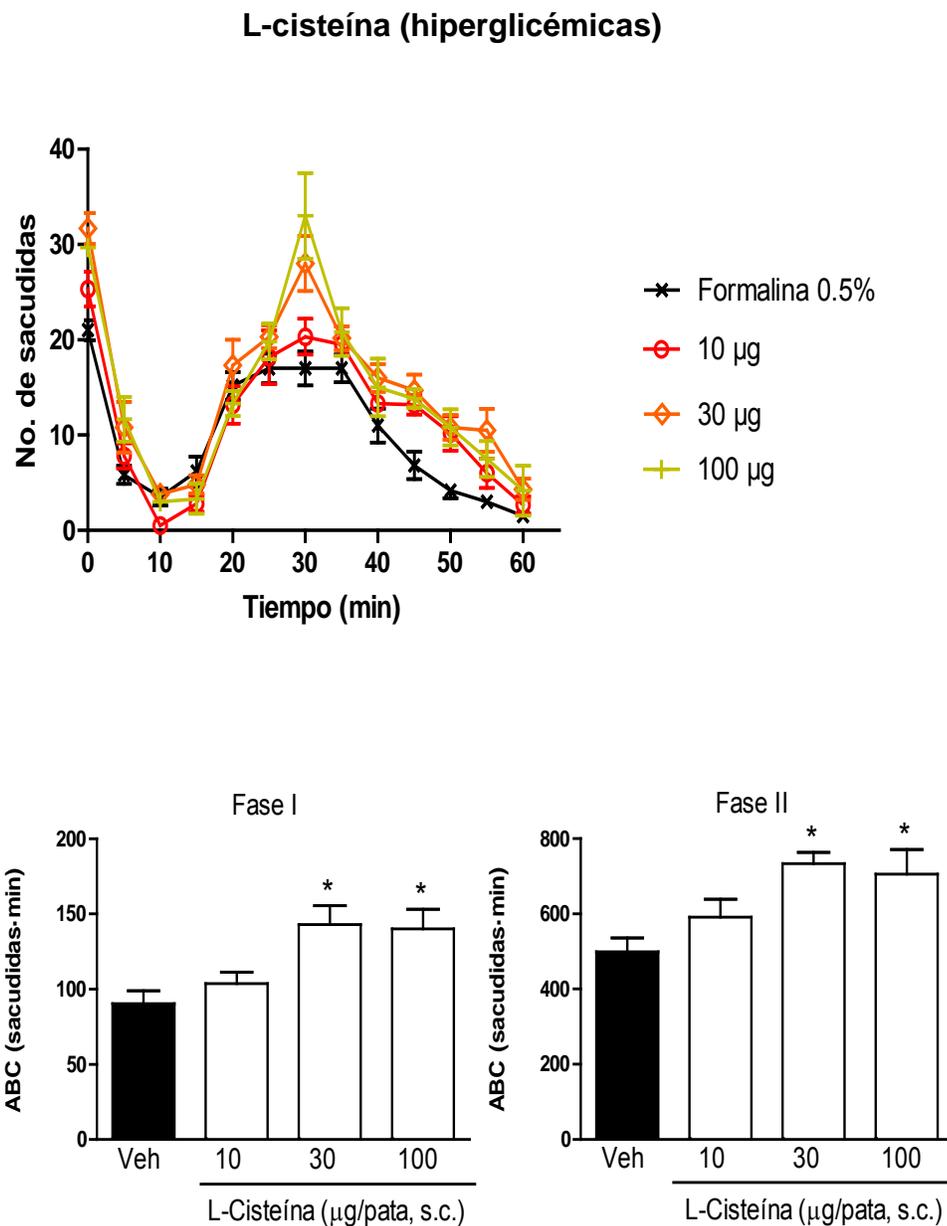


Figura 14. Efecto hiperalgésico del donador endógeno de ácido sulfhídrico, L-cisteína, sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina 0.5% en ratas hiperglicémicas de 2 semanas a nivel periférico local. Arriba: Curso temporal del efecto hiperalgésico producido por L-cisteína, administrada en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata 20 min antes de la inyección de formalina al 0.5% (50 $\mu$ L) en la misma región. La fase I abarca de 0-10 min, mientras que la fase II va de los 10-60 min. Abajo: Los datos son expresados en gráficas de barras como el ABC promedio de la fase I y II calculadas a partir de los cursos temporales mediante el método de trapezoides  $\pm$  el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. \*Estadísticamente diferente al grupo control (Veh) con una  $p < 0.05$  por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Abreviaturas: Veh: vehículo, s.c.: subcutánea.

### **8.3. Efecto de la coadministración de los inhibidores enzimáticos de H<sub>2</sub>S con L-Cisteína, sustrato endógeno en la síntesis de H<sub>2</sub>S a nivel periférico local en el modelo de la formalina**

El objetivo de llevar a cabo la administración a nivel periférico de una dosis inefectiva de los inhibidores PPG e HA (-10 min) con una dosis efectiva de L-cisteína (-20 min) fue con la finalidad de demostrar que el efecto pronociceptivo evocado por L-cisteína en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas se debía a la producción de H<sub>2</sub>S por las enzimas cistationin- $\gamma$ -liasa y cistationin- $\beta$ -sintasa. En ratas normoglicémicas, dosis inefectivas de PPG (30  $\mu$ g/pata) o HA (1  $\mu$ g/pata) previnieron de manera significativa el efecto pronociceptivo evocado por L-cisteína (100  $\mu$ g/pata) en la fase II del modelo de formalina al 0.5% (Figuras 15 y 17).

Con respecto a las ratas hiperglicémicas de 2 semanas, el efecto hiperalgésico inducido por L-cisteína (100  $\mu$ g/pata, -20min), en la pata posterior derecha de la rata, fue prevenido por la administración periférica local de los inhibidores PPG (0.03  $\mu$ g/pata, -10 min) e HA (1 ng/pata, -10 min) en ambas fases del modelo de formalina al 0.5% (Figuras 16 y 18).

En la tabla 3 se muestra el resumen de las ABC obtenidas con las diferentes dosis de los inhibidores enzimáticos de H<sub>2</sub>S y los donadores del mismo, así como; las administraciones de L-cisteína + PPG y L-cisteína + HA llevadas a cabo en ratas normoglicémicas en el modelo de formalina. Por su parte, la tabla 4, muestra el mismo resumen en ratas hiperglicémicas. Los experimentos con inhibidores se llevaron a cabo con formalina al 1%, mientras que los experimentos con los donadores y las administraciones donador + inhibidor se llevaron a cabo con formalina al 0.5%. Los datos en las tablas se muestran como el ABC promedio  $\pm$  el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. Los asteriscos representan una diferencia estadística significativa respecto a su respectivo grupo control (Formalina al 0.5% ó al 1%) con una  $p < 0.05$  por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunett.

### L-cisteína + PPG (normoglicémicas)

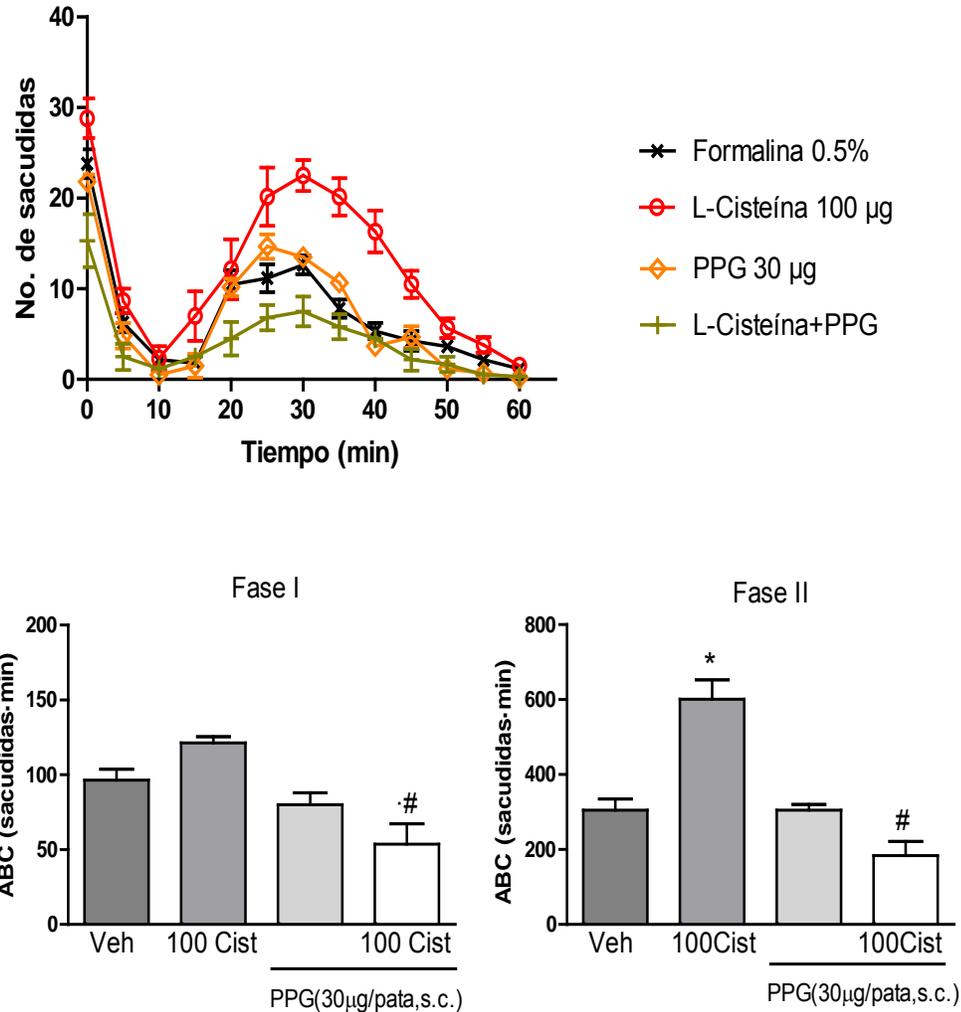


Figura 15. Efecto resultante de la administración del inhibidor de la enzima cistationin- $\gamma$ -liasa, PPG (-10 min), sobre el efecto pronociceptivo inducido por el donador endógeno de  $H_2S$ , L-cisteína (-20min) a nivel periférico local en el modelo de formalina al 0.5% en ratas normoglicémicas. Arriba: Curso temporal del efecto pronociceptivo producido por L-cisteína, administrada en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata y el efecto preventivo que tiene PPG cuando es administrado junto con L-cisteína en la misma región. La fase I abarca de 0-10 min, mientras que la fase II va de los 10-60 min. Abajo: Los datos son expresados en gráficas de barras como el ABC promedio de la fase I y II calculadas a partir de los cursos temporales mediante el método de trapezoides  $\pm$  el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. \*Estadísticamente diferente al grupo control (Veh) y #estadísticamente diferente del grupo de L-cisteína a 100  $\mu$ g/pata con una  $p < 0.05$  por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Abreviaturas: Veh: vehículo, s.c.: subcutánea, PPG: propargilglicina; Cist: L-cisteína.

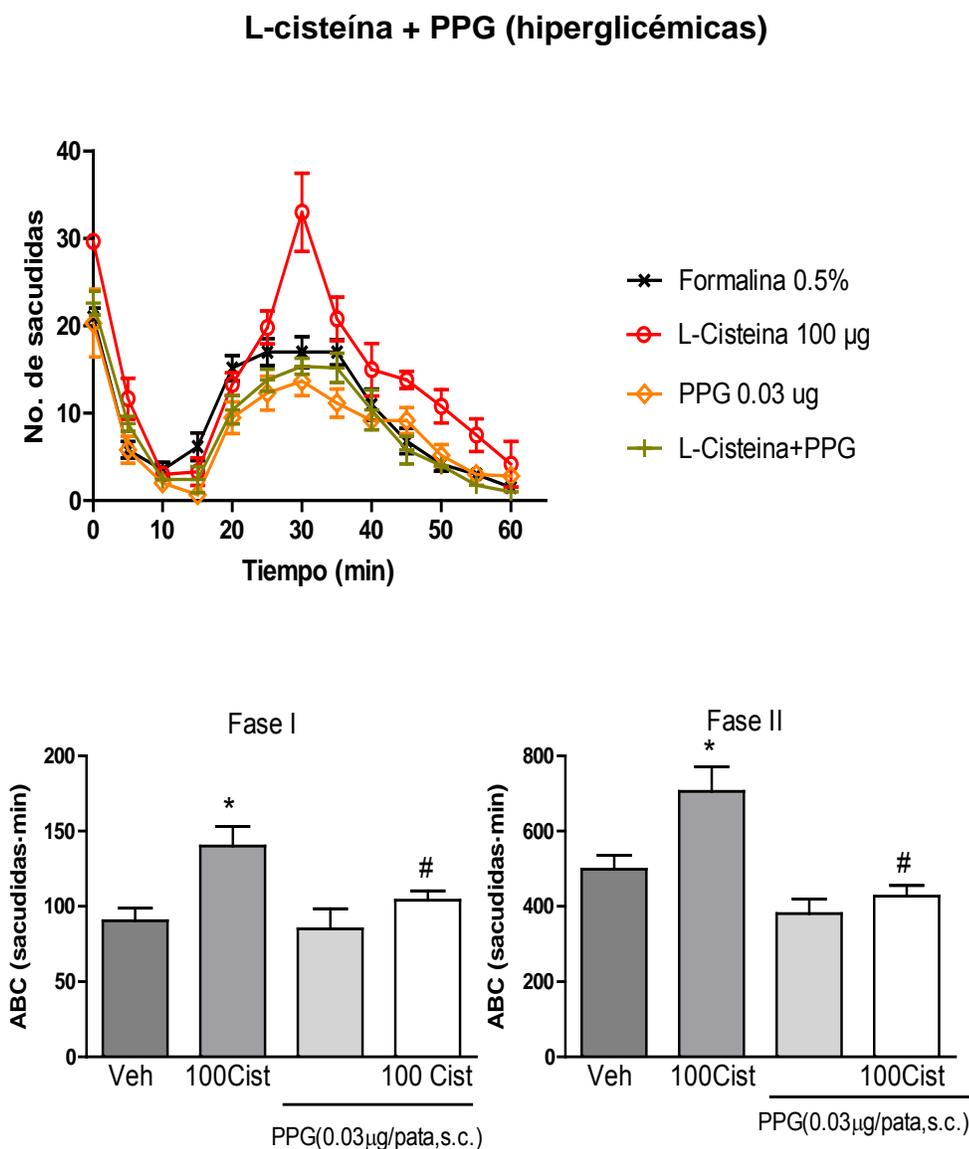


Figura 16. Efecto resultante de la administración del inhibidor de la enzima cistationin- $\gamma$ -liasa, PPG (-10 min), sobre el efecto hiperalgésico inducido por el donador endógeno de  $H_2S$ , L-cisteína (-20min) a nivel periférico local en el modelo de formalina al 0.5% en ratas hiperglicémicas. Arriba: Curso temporal del efecto hiperalgésico producido por L-cisteína, administrada en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata y el efecto preventivo que tiene PPG cuando es administrado junto con L-cisteína en la misma región. La fase I abarca de 0-10 min, mientras que la fase II va de los 10-60 min. Abajo: Los datos son expresados en gráficas de barras como el ABC promedio de la fase I y II calculadas a partir de los cursos temporales mediante el método de trapezoides  $\pm$  el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. \*Estadísticamente diferente al grupo control (Veh) y #estadísticamente diferente del grupo de L-cisteína a 100  $\mu$ g/pata con una  $p < 0.05$  por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Abreviaturas: Veh: vehículo, s.c.: subcutánea, PPG: propargilglicina; Cist: L-cisteína.

### L-cisteína + HA (normoglicémicas)

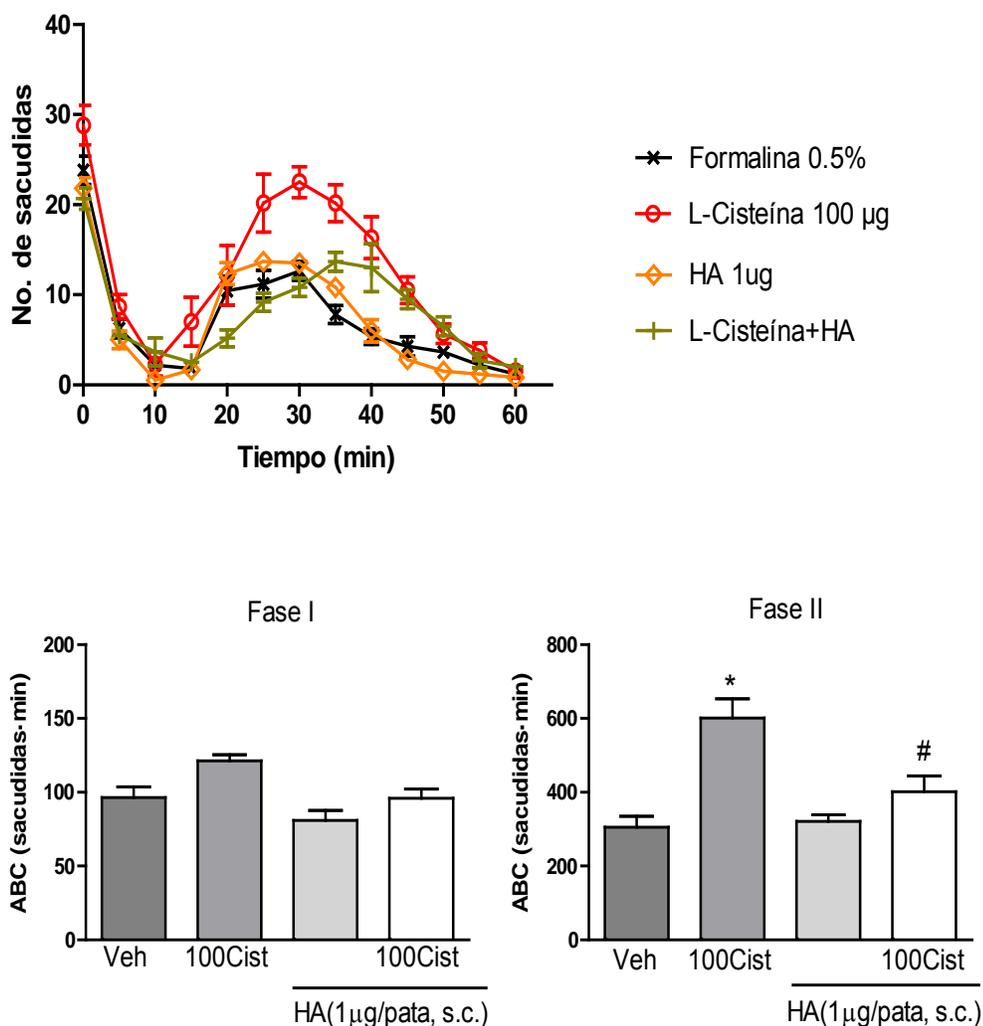


Figura 17. Efecto resultante de la administración del inhibidor de la enzima cistationin-β-sintasa, HA (-10 min), sobre el efecto pronociceptivo inducido por el donador endógeno de H<sub>2</sub>S, L-cisteína (-20min) a nivel periférico local en el modelo de formalina al 0.5% en ratas normoglicémicas. Arriba: Curso temporal del efecto pronociceptivo producido por L-cisteína, administrada en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata y el efecto preventivo que tiene HA cuando es administrado junto con L-cisteína en la misma región. La fase I abarca de 0-10 min, mientras que la fase II va de los 10-60 min. Abajo: Los datos son expresados en gráficas de barras como el ABC promedio de la fase I y II calculadas a partir de los cursos temporales mediante el método de trapezoides ± el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. \*Estadísticamente diferente al grupo control (Veh) y #estadísticamente diferente del grupo de L-cisteína a 100 µg/pata con una p < 0.05 por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunett. Abreviaturas: Veh: vehículo, s.c.: subcutánea, Cist: L-cisteína, HA: hidroxilamina.

### L-cisteína + HA (hiperglicémicas)

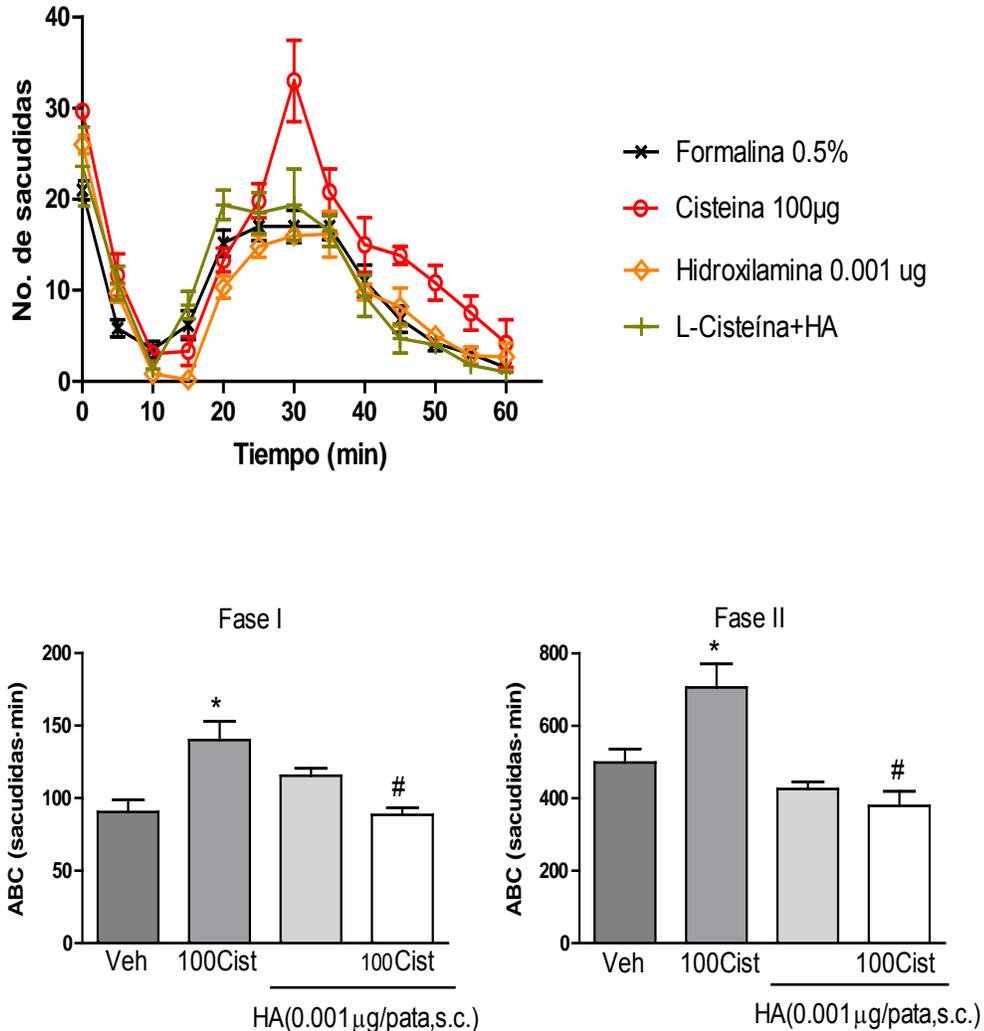


Figura 18. Efecto resultante de la administración del inhibidor de la enzima cistationin- $\beta$ -sintasa, HA (-10 min), sobre el efecto hiperalgésico inducido por el donador endógeno de  $H_2S$ , L-cisteína (-20min) a nivel periférico local en el modelo de formalina al 0.5% en ratas hiperglicémicas de 2 semanas. Arriba: Curso temporal del efecto pronociceptivo producido por L-cisteína, administrada en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata y el efecto preventivo que tiene HA cuando es administrado junto con L-cisteína en la misma región. La fase I abarca de 0-10 min, mientras que la fase II va de los 10-60 min. Abajo: Los datos son expresados en gráficas de barras como el ABC promedio de la fase I y II calculadas a partir de los cursos temporales mediante el método de trapezoides  $\pm$  el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. \*Estadísticamente diferente al grupo control (Veh) y #estadísticamente diferente del grupo de L-cisteína a 100  $\mu$ g/pata con una  $p < 0.05$  por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunett. Abreviaturas: Veh: vehículo, s.c.: subcutánea, HA: hidroxilamina; Cist: L-cisteína.

Participación de las enzimas productoras de sulfuro de hidrógeno, cistationin- $\beta$ -sintasa y cistationin- $\gamma$ -liasa, en el dolor inflamatorio y neuropático en ratas.

Tabla 3. Valores de ABC de las fases I y II del modelo de formalina, obtenidos con los diferentes tratamientos farmacológicos en ratas normoglicémicas.

Fármaco	Dosis ( $\mu$ g)	Fase 1 ABC (sacudidas · min)	Fase 2 ABC (sacudidas · min)
Formalina	0.5%	96.4 $\pm$ 7.4	305.2 $\pm$ 29.8
	1%	127.9 $\pm$ 14.2	533.3 $\pm$ 31.0
<b>INHIBIDORES</b>			
PPG	30	113.8 $\pm$ 11.4	610.0 $\pm$ 47.2
	100	117.5 $\pm$ 13.2 1	407.4 $\pm$ 55.8
	300	101.7 $\pm$ 13.3	309.2 $\pm$ 30.2*
	300CL	159.2 $\pm$ 8.0	551.7 $\pm$ 35.8
HA	1	136.7 $\pm$ 18.8	542.1 $\pm$ 41.4
	10	102.9 $\pm$ 10.9	323.8 $\pm$ 56.3*
	100	102.5 $\pm$ 10.2	307.5 $\pm$ 30.1*
	100CL	82.5 $\pm$ 5.2	560.4 $\pm$ 26.6
<b>DONADORES</b>			
NaHS (endógeno)	10	144.6 $\pm$ 11.0*	390.8 $\pm$ 22.0
	100	135.8 $\pm$ 18.5*	359.2 $\pm$ 20.8
	300	167.5 $\pm$ 7.7*	624.6 $\pm$ 22.1*
	300CL	95.8 $\pm$ 5.9	355.8 $\pm$ 28.1
L-cisteína (exógeno)	10	89.2 $\pm$ 7.6	375.0 $\pm$ 27.1
	30	101.7 $\pm$ 10.6	510.8 $\pm$ 42.9*
	100	121.3 $\pm$ 4.1	601.3 $\pm$ 52.0*
	100CL	99.2 $\pm$ 3.9	349.2 $\pm$ 19.2
<b>COADMINISTRACIONES</b>			
L-cisteína + PPG	100 + 30	53.8 $\pm$ 13.4	183.8 $\pm$ 37.9*
L-cisteína + HA	100 + 1	38.3 $\pm$ 5.2	379.2 $\pm$ 39.6*

\*Estadísticamente diferente al grupo control. Abreviaturas: PPG: propargilglicina, CL: contralateral, HA: hidroxilamina, NaHS: sulfhidrato de sodio.

Tabla 4. Valores de ABC de las fases I y II del modelo de formalina, obtenidos con los diferentes tratamientos farmacológicos en ratas hiperglicémicas.

Fármaco	Dosis (µg)	Fase 1 ABC (sacudidas · min)	Fase 2 ABC (sacudidas · min)
Formalina	0.5%	90.4 ± 8.5	499.2 ± 36.8
<b>INHIBIDORES</b>			
PPG	0.03	85.0 ± 13.4	381.5 ± 38.2
	0.3	66.3 ± 15.2	407.4 ± 55.8*
	30	67.9 ± 8.7	309.2 ± 30.2*
HA	0.001	116.4 ± 5.1	425.4 ± 20.0
	0.01	100.4 ± 9.7	323.3 ± 25.1*
	0.1	68.3 ± 5.1	275.4 ± 38.7*
<b>DONADORES</b>			
NaHS (endógeno)	0.1	78.8 ± 4.2	483.3 ± 48.9
	1	104.2 ± 9.5	623.8 ± 28.1
	10	135.0 ± 6.7*	684.6 ± 23.8*
L-cisteína (exógeno)	10	103.8 ± 7.7	591.3 ± 47.9
	30	142.9 ± 12.5*	733.8 ± 29.9*
	100	140.0 ± 13.0*	705.4 ± 65.9*
<b>COADMINISTRACIONES</b>			
L-cisteína + PPG	100 + 0.3	88.8 ± 18.7	337.1 ± 72.3*
L-cisteína + HA	100 + 0.001	94.6 ± 15.7	540.6 ± 57.8*

\*Estadísticamente diferente al grupo control. Abreviaturas: PPG: propargilglicina, CL: contralateral, HA: hidroxilamina, NaHS: sulfhidrato de sodio.

#### 8.4. Medición de la alodinia táctil

Con el fin de determinar si los resultados se podían extrapolar a la alodinia, se evaluaron ratas hiperglicémicas de 9-11 semanas después de haber administrado estreptozotocina con una dosis del inhibidor de la enzima cistationin-γ-liasa. La administración intraperitoneal de PPG (50 mg/kg, i.p.), redujo la alodinia táctil presente en ratas hiperglicémicas tratadas con estreptozotocina. El efecto antialodínico máximo de PPG se obtuvo 1.5 h después de la administración y éste declinó en aproximadamente 4 h. En el grupo control de ratas alodínicas, a las cuales se les administró solución salina i.p. mantuvieron un umbral de retiro mecánico menor a 4 g, mientras que las ratas normoglicémicas mostraron un valor constante de 15 g (Figura 19).

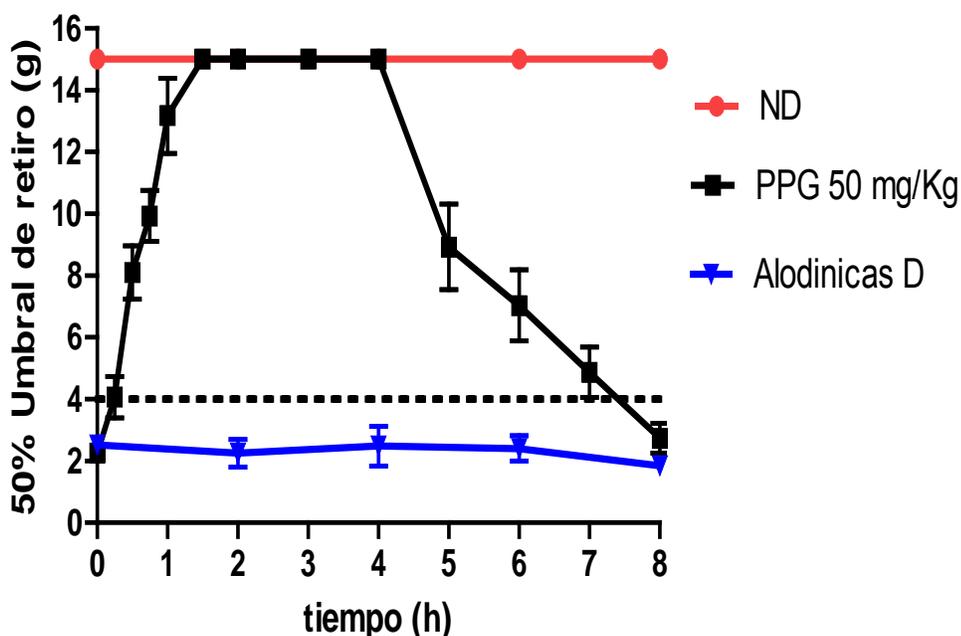


Figura 19. Curso temporal del efecto antialodínico del inhibidor selectivo de la cistationin- $\gamma$ -liasa, PPG (50mg/Kg) en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas de 9-11 semanas de haberles administrado estreptozotocina.

### 8.5. Medición de H<sub>2</sub>S

Con la finalidad de determinar la concentración de H<sub>2</sub>S a lo largo de la vía nociceptiva durante el desarrollo de la neuropatía diabética inducida por estreptozotocina. Se midieron los niveles de H<sub>2</sub>S en nervio ciático, GRD, médula espinal y suero en ratas normoglicémicas y con 2 y 9-11 semanas de haberles inducido hiperglicemia. En la determinación de los niveles de H<sub>2</sub>S en el suero se encontró que en los tres casos no existe diferencia estadísticamente significativa. En cuanto a las mediciones en nervio ciático, GRD y médula espinal se observó que conforme se desarrolla la neuropatía periférica debida a la hiperglicemia generada en las ratas, la concentración de H<sub>2</sub>S disminuye de manera significativa respecto a las ratas normoglicémicas (Figura 20).

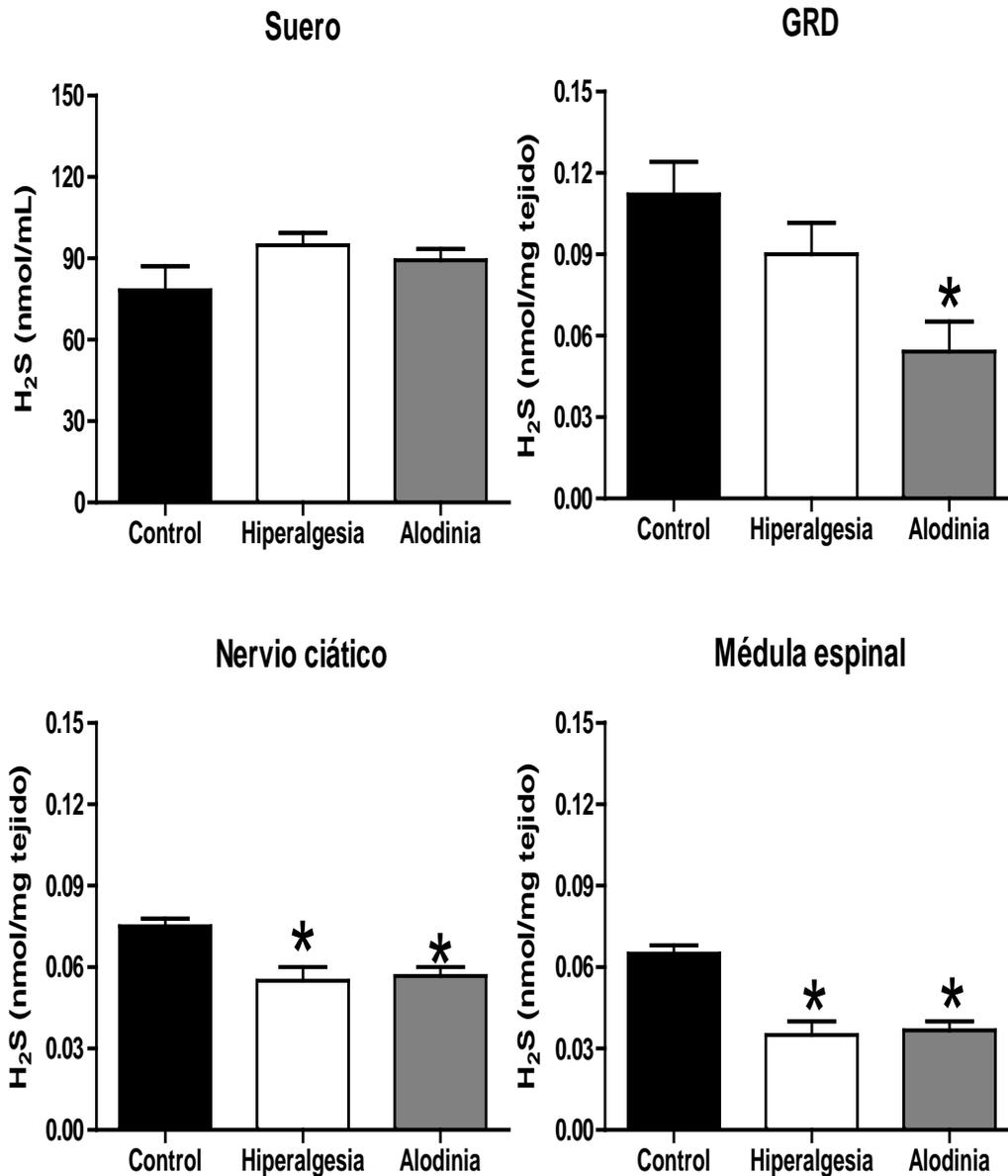


Figura 20. Concentración de H<sub>2</sub>S en suero, ganglios de la raíz dorsal (GRD, L4-L6), nervio ciático y médula espinal de ratas Wistar normoglicémicas e hiperglicémicas de 2 y de 9-11 semanas de haberles administrado estreptozotocina. Los datos son expresados en gráficas de barras como el la concentración de H<sub>2</sub>S promedio  $\pm$  el error estándar de al menos 3 experimentos independientes. \*Estadísticamente diferente al grupo control con una  $p < 0.05$  por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett.

## 9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 9.1. Prueba de Formalina.

La administración de 50  $\mu$ L de formalina diluida al 0.5% y 1% vía subcutánea en la región dorsal de la pata posterior derecha de ratas hembra, produjo una conducta nociceptiva bifásica representada por sacudidas y dependiente de la concentración de formalina y de el fármaco previamente administrado. En la fase I se observó un inicio rápido de gran intensidad con una duración de 10 minutos aproximadamente, enseguida se observó un periodo de tiempo de 5 minutos en el cual la rata no mostró la conducta sugestiva de nocicepción (sacudidas). Posterior a este período, se inició la fase II, la cual aumentó de manera gradual alcanzando un límite de sacudidas máximo entre los 25 y 40 en formalina diluida al 0.5 y 1 %. Estos cursos temporales concuerdan con los publicados por Dubuisson y Dennis (1997) y Tjøsen et al., (1992). En base a la literatura se puede argumentar que existe la manifestación de una conducta nociceptiva durante la fase I y ésta es consecuencia de la activación directa de los nociceptores que se encuentran localizados en las fibras C, mientras que la conducta nociceptiva evocada en la fase II, se debe a la liberación de sustancias mediadoras del dolor e inflamación tanto en el sistema nervioso periférico, como a nivel espinal, dando origen a proceso de sensibilización de la vía nociceptiva (Hunnskaar y Hole, 1987; Tjølsen et al., 1992).

La administración de formalina en la pata de la rata evoca diferentes conductas nociceptivas que pueden ser cuantificadas, como morder su pata, lamérsela, sacudirla o mantenerla levantada. Debido a que la conducta de sacudidas es el parámetro más utilizado para medir la intensidad del dolor (Dubuisson y Dennis, 1977). Además, de que la conducta de sacudidas es más rítmica y constante durante el periodo de observación que las otras conductas, las cuales son más esporádicas. Por estas razones, en el presente trabajo se decidió cuantificar la conducta de sacudidas.

## 9.2. Efecto de los inhibidores enzimáticos.

En el presente trabajo se valoró si la inhibición de las enzimas productoras de H<sub>2</sub>S (cistationin- $\gamma$ -liasa y cistationin- $\beta$ -sintasa) a nivel periférico local disminuía el efecto pronociceptivo evocado por el H<sub>2</sub>S en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas en el modelo de formalina. Para este propósito se emplearon los inhibidores PPG para la enzima cistationin- $\gamma$ -liasa (Qu et al., 2008; Lee et al. 2008) e HA para la enzima cistationin- $\beta$ -sintasa (Guang-Yin Xu., et al. 2009).

A nivel periférico local, la administración subcutánea del inhibidor de la enzima cistationin- $\gamma$ -liasa (PPG) produjo un efecto antinociceptivo de manera dependiente de la dosis en la fase II de la prueba de la formalina al 1%. Alcanzando diferencia estadística a la dosis de 300  $\mu$ g/pata en ratas normoglicémicas. Además, la administración contralateral de PPG a la dosis más alta empleada a nivel periférico local no modificó la conducta nociceptiva de formalina sugiriendo un efecto antinociceptivo local y no sistémico a las dosis administradas. En el mejor de nuestro conocimiento, ésta es la primera evidencia que se tiene referente al efecto antinociceptivo de PPG a nivel periférico local. De acuerdo con nuestros datos y los datos de Lee y colaboradores (2008) se administraron 50 mg/Kg de PPG vía intraperitoneal 30 minutos antes de la administración en el dorso de la pata derecha de formalina a diferentes concentraciones (0.625, 1.25 y 5 %). Este protocolo dio como resultado una inhibición de la conducta de sacudidas con formalina al 5%, pero no con formalina al 0.625 o 1.25%, durante la fase II, lo que sugiere que el efecto de este gas depende en gran medida de la intensidad del estímulo. Con el mismo objetivo, se llevó a cabo la administración de PPG con formalina al 0.5% en ratas hiperglicémicas. Se decidió utilizar formalina al 0.5% en esta ratas debido a que la hiperglicemia induce una sensibilización en las terminales periféricas nerviosas distales (patas). En esta condición, PPG también disminuyó de manera dependiente de la dosis el número de sacudidas evocadas por formalina durante la fase II, pero no en la fase I, de la prueba. Sin embargo, en las ratas hiperglicémicas la diferencia estadística observada en la fase II se presentó a las dosis de 0.3 y 30  $\mu$ g/pata, lo que representa una dosis de 100 a 1000 veces menor en comparación con las ratas normoglicémicas. Estos resultados sugieren

que durante el desarrollo de la neuropatía diabética la enzima cistationin- $\gamma$ -liasa se vuelve más sensible a la inhibición por PPG.

Por otro lado se administro HA (inhibidor de la enzima cistationin- $\beta$ -sintasa) en ratas normoglicémicas en un rango de dosis de 1 a 100  $\mu\text{g/pata}$ ; en la fase I no se observó la disminución de la conducta nociceptiva, no obstante, en la fase II se observaron respuestas estadísticamente significativas en las dosis de 10 y 100  $\mu\text{g/pata}$ . En la administración contralateral, no hubo una respuesta estadísticamente significativa respecto al grupo control, esto nos da a entender que el efecto antinociceptivo producido por HA en la pata posterior derecha es local y no sistémico a las dosis administradas. Por su parte, la administración periférica local de HA en ratas hiperglicémicas sólo mostró un efecto antihiperalgésico dependiente de la dosis en la fase II de la prueba de formalina al 0.5% a las dosis de 0.01 y 0.1  $\mu\text{g/pata}$ . Nuevamente, las ratas hiperglicémicas requirieron una dosis 1000 veces menor de HA respecto a las ratas normoglicémicas. Es necesario destacar que este es el primer estudio donde se evalúa la participación nociceptiva local de la enzima cistationin- $\beta$ -sintasa en la prueba de formalina. Al igual que con la enzima cistationin- $\gamma$ -liasa, los resultados sugieren que la enzima cistationin- $\beta$ -sintasa se sensibiliza a la inhibición de HA durante el desarrollo de la neuropatía distal inducida por estreptozotocina.

En resumen, la inhibición de las enzimas cistationin- $\gamma$ -liasa y cistationin- $\beta$ -sintasa disminuye la conducta nociceptiva evocada por formalina en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas. Los resultados nos indican que la inhibición de las enzimas productoras de  $\text{H}_2\text{S}$  son potenciales blancos terapéuticos en el tratamiento del dolor inflamatorio y de la neuropatía periférica asociada a la diabetes.

### **9.3. Donadores de $\text{H}_2\text{S}$**

Con el objetivo de determinar la participación del  $\text{H}_2\text{S}$  en el dolor inflamatorio y en el neuropático inducido por estreptozotocina se llevó a cabo la administración de los donadores de  $\text{H}_2\text{S}$ , NaHS y L-cisteína en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas (Kawabata et al., 2007). El NaHS es un donador exógeno de  $\text{H}_2\text{S}$  ya que en agua se disocia en  $\text{HS}^- + \text{Na}^+$ , el  $\text{HS}^-$  una vez disociado entra en equilibrio con  $\text{H}^+$  para formar un 30% de  $\text{H}_2\text{S}$  respecto a la

dosis administrada de NaHS (Lee et al., 2008). En el presente estudio, NaHS aumentó el número de sacudidas de manera dependiente de la dosis en ambas fases de la prueba de formalina al 0.5% en ratas normoglicémicas. El efecto pronociceptivo observado con NaHS fue local ya que la administración contralateral de este fármaco no produjo una respuesta nociceptiva estadísticamente diferente al grupo control. Además, la administración de NaHS indujo por sí mismo conductas nociceptivas en el dorso de la pata derecha ya que en el intervalo de tiempo entre la administración de NaHS y la administración de formalina al 0.5% (10 min) se observaron lamidas y sacudidas, sobre todo a la dosis de 300 $\mu$ g/pata. Con respecto a las ratas hiperglicémicas, NaHS produjo un efecto hiperalgésico estadísticamente diferente en ambas fases a la dosis de 10  $\mu$ g/pata. Esta dosis fue igual en la fase I y 30 veces menor en la fase II, respecto a la dosis que induce un efecto significativo en ratas normoglicémicas. Estos resultados están en línea con lo reportado por Lee y colaboradores en 2008, en donde la conducta nociceptiva evocada por formalina al 1.25%, se incrementa a niveles observados con formalina al 5%, cuando se coadministra con NaHS.

Además, la evidencia creciente sugiere que el H<sub>2</sub>S estimula fibras nociceptivas sensibles a capsaicina (Patacchini et al., 2005) induciendo la liberación de neuropéptidos como la neurocinina A, la sustancia P y el CGRP (Patacchini et al., 2004; Trevisani et al., 2005). Siendo así un blanco efectivo para la disminución del dolor crónico. En este sentido, Kawabata et al. (2007) mostró en animales que la inyección intraplantar de NaHS o L-cisteína produce hiperalgnesia mecánica a través de la activación de canales de Ca<sup>2+</sup> tipo T. Estos datos fueron comprobados por Matsunami et al. (2009) en un modelo de dolor visceral concluyendo que la hiperalgnesia y alodinia observadas en este modelo se deben a que el NaHS a 1.5 mM refuerza las corrientes de estos canales de Ca<sup>2+</sup>, pero no de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L. Asimismo, se ha demostrado que el H<sub>2</sub>S activa de manera preferencial fibras aferentes primarias sensibles a capsaicina (Patacchini et al., 2005). En síntesis, nuestros datos concuerdan con la mayoría de la literatura que le confiere al H<sub>2</sub>S un papel pronociceptivo.

Por su parte, L-cisteína (sustrato de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S) fue administrado a las dosis de 10, 30 y 100  $\mu$ g/pata, las cuales produjeron un aumento en el número de sacudidas de manera dependiente de la dosis en la fase II, pero no en la fase I, de la prueba. La diferencia estadística observada en

la fase II se presentó a las dosis de 30 y 100  $\mu\text{g/pata}$ . Dicho efecto fue local y no sistémico como lo demuestra el grupo contralateral de 100  $\mu\text{g/pata}$ . Estos datos van en el mismo sentido de lo reportado por Kawabata et al. (2007), quién mostró en animales que la inyección intraplantar de L-cisteína producía hiperalgesia mecánica a través de la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otro lado, en el tratamiento a las ratas hiperglicémicas, el efecto hiperalgésico con L-cisteína se observó en ambas fases de la prueba de formalina para las dosis de 30 y 100  $\mu\text{g/pata}$ . Aunque L-cisteína inhibió la conducta nociceptiva en la fase II del modelo de formalina a las mismas dosis en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas, podemos decir; que la igual que con los inhibidores enzimáticos y con NaHS, hubo una sensibilización del sistema nociceptivo en el desarrollo de la neuropatía diabética ante la presencia de  $\text{H}_2\text{S}$ , ya que la concentración de formalina utilizada en ratas con diabetes experimental es más baja que la utilizada en ratas normoglicémicas. Además, L-cisteína aumento la conducta nociceptiva en la fase 1 del modelo de formalina en ratas hiperglicémicas, pero no en normoglicémicas.

En resumen el incremento de  $\text{H}_2\text{S}$  en la terminal nerviosa periférica, ya sea de manera exógena o endógena, tiene un efecto pronociceptivo local en el dolor inflamatorio y en la neuropatía diabética.

#### **9.4. Coadministración de los inhibidores enzimáticos de $\text{H}_2\text{S}$ con L-cisteína, a nivel periférico local en el dolor inducido por formalina**

Con la finalidad de demostrar que el efecto producido por la L-cisteína se debía a la producción de  $\text{H}_2\text{S}$  a partir de este aminoácido y no a la acción directa de L-cisteína sobre los nociceptores, se llevaron a cabo coadministraciones de L-cisteína con los inhibidores enzimáticos PPG e HA. En ratas normoglicémicas, dosis inefectivas de PPG (30  $\mu\text{g/pata}$ ) o HA (1  $\mu\text{g/pata}$ ) previnieron de manera significativa el efecto pronociceptivo evocado por L-cisteína (100  $\mu\text{g/pata}$ ) en la fase II del modelo de formalina al 0.5%. De igual manera, el efecto hiperalgésico inducido por L-cisteína (100  $\mu\text{g/pata}$ , -20min), en la pata posterior derecha de la rata, fue prevenido por la administración periférica local de los inhibidores PPG (0.03  $\mu\text{g/pata}$ , -10 min) e HA (1 ng/pata, -10 min), en ambas fases del modelo de formalina al 0.5% en ratas hiperglicémicas de 2 semanas, Los resultados nos indican que el efecto pronociceptivo evocado por L-cisteína en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas es prevenido cuando se inhibe la producción

de H<sub>2</sub>S por las enzimas cistationin- $\gamma$ -liasa y cistationin- $\beta$ -sintasa. Es necesario indicar que no existen estudios similares previos, siendo estos los primeros resultados en demostrar la participación periférica local de ambas enzimas productoras de H<sub>2</sub>S en la nocicepción inducida por formalina de ratas normoglicémicas e hiperglicémicas. En resumen el efecto pronociceptivo de L-cisteína es prevenido por un tratamiento de PPG o HA.

### **9.5. Medición de alodinia táctil.**

La administración intraperitoneal de PPG (50 mg/kg, i.p.) redujo la alodinia táctil presente en ratas hiperglicémicas tratadas con estreptozotocina de 9 – 11 semanas. El efecto antialodínico máximo de PPG se obtuvo 1.5 h después de la administración y éste declinó en aproximadamente 4 h. En el grupo control de ratas alodínicas, a las cuales se les administró solución salina i.p., mantuvieron un umbral de retiro mecánico menor a 4 g, mientras que las ratas normoglicémicas mostraron un valor constante de 15 g. Este experimento fue realizado con el fin de determinar si los resultados se podían extrapolar a la alodinia generada por hiperglicemia. No existen estudios anteriores a este, siendo el primero de su tipo. Los resultados nos sugieren que la inhibición de la CSE, enzima productora de H<sub>2</sub>S, puede ser un blanco terapéutico para la inhibición de neuropatías asociadas a la diabetes.

### **9.6. Medición de H<sub>2</sub>S.**

Se midieron los niveles de H<sub>2</sub>S en nervio ciático, GRD, médula espinal y suero en ratas normoglicémicas y con 2 y 9-11 semanas de haberles inducido hiperglicemia. En la determinación de los niveles de H<sub>2</sub>S en el suero, se encontró que en los tres casos no existe diferencia estadísticamente significativa. En este sentido, Yusuf et al. (2005) demostraron que aunque la concentración plasmática de H<sub>2</sub>S no cambia en ratas diabéticas, su producción por homogenados pancreáticos y hepáticos se encuentra incrementada, lo que podía ocurrir en nuestro caso en GRD, nervio ciático o médula espinal.

En este sentido, se llevaron a cabo las mediciones en nervio ciático, GRD y médula espinal, en estos tejidos y contrario a lo que se esperaba inicialmente, se observó que conforme se desarrolla la neuropatía periférica debida a la

hiperglicemia generada en las ratas, la concentración de  $H_2S$  disminuye de manera significativa respecto a las ratas normoglicémicas. Hasta la fecha no existen mediciones de concentración de  $H_2S$  en ratas alodínicas, siendo estos los primeros estudios realizados para este caso. En cuanto a las ratas normoglicémicas, Lee y colaboradores (2008) encuentran una disminución en la médula espinal cuando formalina al 5 % es administrada. Los autores en este artículo discuten que el efecto paradójico observado se debe a que al disminuir  $H_2S$  en los tejidos, se libera la inhibición que produce este gas sobre la expresión de citocinas, factores de crecimiento y moléculas inflamatorias. Si bien, durante el desarrollo de la neuropatía periférica aumenta la expresión de estos factores, pensamos además que la vía nociceptiva se sensibiliza ante la presencia de  $H_2S$ , como lo demuestran nuestros datos farmacológicos. En este sentido, es posible que durante el desarrollo de la neuropatía periférica asociada a la diabetes, el  $H_2S$  reaccione con diversos canales iónicos ricos en cisteínas para modificar su conformación, y volverlos más sensibles al efecto de este gas o a la estimulación nociceptiva. Se propone que los canales de la familia TRP como el TRPV1 o el TRPA1 podrían ser blancos farmacológicos del  $H_2S$ , ya que estos canales contienen cisteínas capaces de reaccionar con electrófilos (Macpherson et al., 2007). Además, es muy probable que los canales de  $Ca^{2+}$  tipo T, también sufran cambios conformacionales por la acción del  $H_2S$  sobre ellos. De igual manera, las enzimas productoras de  $H_2S$  podrían estar siendo sensibilizadas o estar sufriendo una regulación a la baja durante el desarrollo de la neuropatía diabética, ya que estas enzimas se vuelven más susceptibles a la inhibición farmacológica. No obstante, para demostrar cual es la razón de su sensibilización ante los inhibidores usados en el presente estudio, se requieren estudios posteriores que midan la expresión y la actividad enzimática de la cistationin- $\gamma$ -liasa y cistationin- $\beta$ -sintasa durante el desarrollo de la neuropatía.

En conclusión, hasta la fecha no existen estudios que demuestren el papel que juegan el  $H_2S$  y las enzimas principales que lo sintetizan en el desarrollo de la neuropatía periférica asociada a la diabetes, por lo que está es la primer evidencia que muestra de manera conductual el efecto pronociceptivo evocado por  $H_2S$  y el potencial terapéutico que podría tener la inhibición de las enzimas productoras de  $H_2S$  en el tratamiento de este padecimiento.

## 10. CONCLUSIONES

### 10.1. Conclusiones particulares.

Los inhibidores selectivos de las enzimas productoras de H<sub>2</sub>S (PPG e HA) disminuyeron la conducta nociceptiva de sacudidas en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas de 2 semanas, cuando se administraron como pretratamiento en el modelo conductual de la formalina al 1%.

Las ratas hiperglicémicas necesitaron dosis 1000 veces menores de ambos inhibidores, respecto a las ratas normoglicémicas, para generar diferencias estadísticas respecto al grupo control.

Los donadores exógeno (NaHS) y endógeno (cisteína) de H<sub>2</sub>S aumentan la conducta nociceptiva de sacudidas en ratas nomoglucemicas e hiperglucemicas de 2 semanas cuando se administran como pretratamiento en el modelo conductual de la formalina al 0.5%.

Las dosis necesarias de los donadores de H<sub>2</sub>S para producir pronocicepción en el modelo de formalina, fueron similares en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas.

En las administraciones conjuntas de L-cisteína + PPG y L-cisteína + HA, los inhibidores enzimáticos fueron capaces de prevenir el efecto pronociceptivo evocado por la L-cisteína de manera periférica local en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas de 2 semanas.

La administración de PPG de manera sistémica redujo significativamente la alodinia táctil en ratas hiperglicémicas de 9-11 semanas de haberles inducido esta condición con estreptozotocina.

Los niveles de H<sub>2</sub>S disminuyeron en el nervio ciático, los GRD y la médula espinal conforme se desarrolló la neuropatía diabética.

## **10.2. Conclusión General.**

Los datos indican que el H<sub>2</sub>S juega un papel pronociceptivo en el dolor inflamatorio y la neuropatía diabética en ratas nomoglicémicas e hiperglicémicas, respectivamente. Además, durante el desarrollo de la neuropatía diabética parece haber mecanismos de sensibilización que exacerban la respuesta pronociceptiva a este gas. Estos datos nos sugieren que la inhibición de las enzimas cistationin- $\gamma$ -liasa y cistationin- $\beta$ -sintasa, podría ser dos blancos terapéuticos novedosos para el tratamiento del dolor inflamatorio y la neuropatía diabética en seres humanos.

## **11. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES.**

Demostrar mediante técnicas para la detección de proteínas (inmunohistoquímica y western blot) la presencia de las enzimas cistationin- $\gamma$ -liasa y cistationin- $\beta$ -sintasa a lo largo de la vía nociceptiva.

Medir la actividad enzimática de la cistationin- $\gamma$ -liasa y cistationin- $\beta$ -sintasa en ganglios de la raíz dorsal y médula espinal de ratas normoglicémicas y ratas diabetizadas (hiperglicémicas) con estreptozotocina durante el desarrollo de la neuropatía diabética.

Identificar los blancos moleculares en los cuales el H<sub>2</sub>S actúa para producir su efecto pronociceptivo en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas

## 12. REFERENCIAS.

- Abe K, Kimura H. 1996. The posible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* 16: 1066-1071.
- Aley KO, McCarter G and Levine JD: Nitric oxide signalling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J Neurosci.* 1998;18:7008-7014.
- Almeida A, Storkson R, Lima D, Hole K, Tjolsen A. 1999. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates pain behaviour induced by formalin in the rat. *Eur J Neurosci.* 11:110-122.
- Almeida A, Tjolsen A, Lima D, Coimbra A, Hole K. 1996. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates acute nociception in the rat. *Brain Res Bull.* 39:7-15.
- Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. 2004. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res.* 1000:40-56.
- American Diabetes Association, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2009. *Diabetes Care.* 32, 62-67.
- Awata. 1995. Changes in cystathionine gamma-lyase in various regions of rat brain during development. *Biochem Mol Biol Int*
- Besson JM, Chaouch A. 1987. Descending serotonergic systems, neurotransmitters and pain control. In: pain headache. Ed H Akil, Lewis JW. 9: 64-100.
- Besson P, Perl E. 1969. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol.* 32:1025.
- Bester H, Matsumoto N, Besson JM, Bernard JF. 1997. Further evidence for the involvement of the spinoparabrachial pathway in nociceptive processes: a c-Fos study in the rat. *J Comp Neurol.* 383:439-458.

- Bhatia M, Sidhapuriwala J, Moochhala SM, Moore PK. 2005<sup>a</sup>. Hydrogen sulfide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in rat. *Br J Pharmacol.* 145: 141-144.
- Bhatia M, Wong FL, Fu D, Lau HY, Moochhala SM, Moore PK. 2005b. Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. *FASEB J.* 19: 623-625.
- Bian JS, Yong QC, Pan TT, Feng ZN, Ali MY, Zhou S, Moore PK. 2006. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 316: 670-678.
- Boehning D, Snyder SH. 2003. Novel neural modulators. *Annu Rev Neurosci.* 26: 105-131..
- Bonica J, Yaksh T, Liebeskind JC, Pechnick RN, Depantis A. 1990. Biochemistry and modulation of nociception and pain. En: John Bonica, The management of pain. 2nd ed. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. 96-120.
- Bouhassira D, Villanueva L, Bing Z, Le Bars D. 1992. Involvement of the subnucleus reticularis dorsalis in diffuse noxious inhibitory controls in the rat. *Brain Res.* 595:353-357.
- Boulton AJM. 2006. Treatment of prediabetic neuropathy. *Curr Diab Rep.* 6, 415-416.
- Boulton AJ, Armstrong DG. 2004. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes Care.* 27, 1458-1486.
- Brett DS and Snyder SH: Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron.* 1992;8:3-11.
- Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature.* 1990; 24;345:346-347.
- Calcutt NA. 2002. *Int Rev Neurobiol.* 50:205-228.

- Calcutt, N.A., Chaplan, S.R., 1997. Spinal pharmacology of tactile allodynia in diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 122, 1478-1482.
- Calcutt NA, Jorge MC, Yaksh TL, Chaplan SR. 1996. Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain.* 68, 293-299.
- Calejesan AA, Kim SJ, Zhou M. 2000. Descending facilitatory modulation of a behavioral nociceptive response by stimulation in the adult rat anterior cingulate cortex. *Eur J Pain.* 4:83-96.
- Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM: Kinins in pain and inflammation. *Pain.* 2000; 87:1-5.
- Caterina MJ, Julius D. 2001. The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. *Ann Rev Neurosci.* 24:487-517.
- Cervero F, Laird JM. 1995. Fisiología del dolor. En: tratamiento del dolor: teoría y práctica. MCR Barcelona. 9-25
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods.* 53, 55-63.
- Chávez-Piña AE. 2010. Inhibition of endogenous hydrogen sulfide synthesis by PPG protects against ethanol-induced gastric damage in the rat. *Eur J Pharmacol*
- Chen X, Jhee KH, Kruger WD. 2004. Production of the neuromodulator H<sub>2</sub>S by cystathionine- $\beta$ -synthase vía the condensation of cysteine and homocysteine. *J Biol Chem.* 279: 52082-52086.
- Chen, S.R., Pan, H.L., 2002. Hypersensitivity of spinothalamic tract neurons associated with diabetic neuropathic pain in rats. *J Neurophysiol.* 87, 2726-2733.
- Chen, X., Levine, J.D., 2003. Altered temporal pattern of mechanically evoked C-fiber activity in a model of diabetic neuropathy in the rat. *Neuroscience.* 121, 1007-1015.

- Collin M, Anuar FB, Murch O, Bhatia M, Moore PK. 2005. Thiemermman C: Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. *Br J Pharmacol.* 146: 498-505.
- Costigan M, Woolf CJ. 2000. Pain: Molecular Mechanism. *J Pain.* 1(3): 35-44.
- Courteix C. 1993. Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain.* 53(1):81-88.
- Courteix C, Bardin M, Massol J, Fialip J, Lavarenne J, Eschalier A. 1996. Daily insulin treatment relieves long-term hyperalgesia in streptozocin diabetic rats. *Neuroreport.* 7, 1922-1924.
- Courteix C, Bourget P, Caussade F, Bardin M, Coudore F, Fialip J, Eschalier A. 1998. Is the reduced efficacy of morphine in diabetic rats caused by alterations of opiate receptors or of morphine pharmacokinetics?. *J Pharmacol Exp Ther.* 285, 63-70.
- Courteix D, Bedu M, Fellmann N, Heraud MC, Coudert J. 1993. Chemical and nonchemical stimuli during breath holding in divers are not independent. *J Appl Physiol.* 75, 2022-2027.
- Davis SN, Granner DK. 2001. Insulin, oral hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas. En: Goodman y Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.* Ed. Mc Graw Hill. 10a. Ed., 1679-1714.
- Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Russo G, Caliendo G, Santagada V, Cirino G, Wallace JL, Fiorucci S. 2006. *J Pharmacol Exp Ther.* 316(1):325-335.
- Dixon WJ. 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 20:441-462.
- Doeller JE, Isbell TS, Benavides G, Koenitzer J, Patel RP, Lancaster JRJ. 2005. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Anal Biochem.* 341: 40-51.

- Dray A. 1995. Inflammatory mediators of pain. *BR J Anaesth.* 75 (2): 125-131.
- Dubner R, Bennett GJ. 1983. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Ann Rev Neurosci.* 6:381-418.
- Dubuisson D, Dennis SG. 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain.* 4:161-174.
- Duggan AW, North KA. 1983. Electrophysiology of opioids. *Pharmacol Rev.* 35(4): 219-281.
- Edwards JL, et al. 2008. *Pharmacol Ther.* 120(1):1-34.
- Elliot WH, Elliot DC: Chemical signaling in the body. *Biochemistry and molecular biology.* Oxford University. Press, Hong Kong. 1997; 359-364.
- Feldman SR, Meyer JS, Quenzer LF. 1997. Serotonin. In: *Principles of Neuropsychopharmacology.* Ed. Sinahuer Associates. USA. 9:345-389.
- Ferreira SH: Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol.* 1972; 13; 240: 200-203.
- Fields HL, Basbaum AI. 1994. Central nervous system mechanisms of pain modulation. En: Wall PD, Melzack R. *Textbook of Pain.* 3rd ed. Ed. Churchill Livingston. Edinburgh. 243–257.
- Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S, Zanardo R, Renga B, Di Sante M, Morelli A., Cirino G, Wallace JL. 2005. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology.* 129: 1210-1224.
- Fox A, Eastwood C, Gentry C, Manning D, Urban L. 1999. Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Pain.* 81, 307-316.
- García JAL, Herrero JF. 1998. Somestesia: Mecanorrecepción, Termorrecepción y Nocicepción. En: *Manual de Neurociencia.* Jose Ma.

- Delgado, Alberto Ferrús, Francisco Mora y J. Rubio. Ed.Síntesis. España. 18:457-481.
- Garthwaite J. 1991. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14:60-67.
  - Gauriau C, Bernard JF. 2002. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol.* 87:251-258.
  - Gray TS, Magnuson DJ. 1992. Peptide immunoreactive neurons in the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis project to the midbrain central gray in the rat. *Peptides* 13:451-460.
  - Guyton AC, Hall JE. Dolor, cefalea y sensaciones de temperatura. En: *Tratado de Fisiología Médica.* Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill. 1996:661-674.
  - Haley JE, Sullivan AF, Dickenson AH. 1990. Evidende for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. *Brain Res.* 518: 218-226.
  - Huycke MM. 2004. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Exp Biol Med (Maywood).* 229(7):586-597.
  - Jacobs RL, et al. 1998. *Diabetes.* 47(12):1967-1970.
  - Juárez-Rojop IE. 2006. Involvement of cholecystinin in peripheral nociceptive sensitization during diabetes in rats as revealed by the formalin response. *Pain.* 122(1-2):118-125.
  - Kaneko Y, et al. 2006. *Diabetes.* 55(5):1391-1397.
  - Kasperek MS, Linden DR, Kreis ME y Sarr MG. 2008. Gastrotransmitters in the gastrointestinal tract. *Surgery.* 143: 455-459.
  - Kawabata A. 2007. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. *Pain*

- Khan GM, Chen SR, Pan HL. 2002. Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats. *Neurosci.* 114, 291-299.
- Kimura H. 2000. *Biochem Biophys Res Commun.* 267(1):129-133.
- Kodama H, Hiroaki M, Keiko S, Shiro A, Kazuko N. 1983. Unusual Metabolism of Sulfur-Containing Amino Acids in Rats treated with D,L-propargylglycine. *Arch Biochem Biophys.* 225: 25-32.
- Lee AT. A nociceptive-intensity-dependent role for hydrogen sulphide in the formalin model of persistent inflammatory pain. *Neuroscience*
- Li CY, Song YH, Higuera ES, Luo ZD. 2004. Spinal dorsal horn calcium channel  $\alpha_2\delta$ -1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci.* 24(39):8494-8499.
- Li JL, Kaneko T, Shigemoto R, Mizuno N. 1997. Distribution of trigeminothalamic and spinothalamic tract neurons displaying substance P receptor-like immunoreactivity in the rat. *J Comp Neurol.* 378:508-521.
- Loeser JD, Melzack R. 1999. Pain: an overview. *Pain.* 353:1607-1609.
- Lowicka E y Beltowski J. 2007. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)- The third gas or interest for pharmacologists. *Pharmacol Rep.* 59: 4-24.
- Macpherson LJ, et al. 2007. *Nature.* 445(7127):541-545.
- Malcangio M, Tomlinson DR. 1998. A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats. *Pain.* 76, 151-157.
- Matsunami M, Tarui T, Mitani K, Nagasawa K, Fukushima O, Okubo K, Yoshida S, Takemura M, Kawabata A. 2009. Luminal hydrogen sulfide plays a pronociceptive role in mouse colon. *PMID .58(6):751-61.*
- Melzack R, Wall PD. 1965. Pain mechanism: A new theory. *Science.* 150:971-979.

- Merskey H. 1979. Pain terms: a list with definitions and notes on usage recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain*. 6:249.
- Millan MJ. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 57: 1-164
- Millan MJ. 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*. 66:355-474.
- Miller JW, et al. 1994. *Biochem J*. 298 ( Pt 2):415-9.
- Miller MW. 1987. The origin of corticospinal projection neurons in rat. *Exp Brain Res*. 67:339-356.
- Mitsuhashi H, et al. 2005. *Shock*. 24(6):529-534.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ. 2002. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci*. 22:6724-6731.
- Morgan MM, Sohn JH, Lohof AM, Ben-Eliyahu S, Liebeskind JC. 1989. Characterization of stimulation-produced analgesia from the nucleus tractus solitarius in the rat. *Brain Res*. 486:175-180.
- Mtui EP, Anwar M, Gomez R, Reis DJ, Ruggiero DA. 1993. Projections from the nucleus tractus solitarius to the spinal cord. *J Comp Neurol*. 337:231-252.
- Murphy AZ, Rizvi TA, Ennis M, Shipley MT. 1999. The organization of preoptic-medullary circuits in the male rat: evidence for interconnectivity of neural structures involved in reproductive behavior antinociception and cardiovascular regulation. *Neuroscience*. 91:1103-1116.
- Odeh F, Antal M. 2001. The projections of the midbrain periaqueductal grey to the pons and medulla oblongata in rats. *Eur J Neurosci*. 14:1275-1286.
- Olaiz-Fernández G, et al. 2007. *Salud Pública de México*. 49:S331-S337.

- Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S, Maggi CA. 2004. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) stimulates capsaicin-sensitive primary afferent neurons in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol.* 142(1):31-34.
- Pertovaara, A., Wei, H., 2001. Peripheral effects of morphine in neuropathic rats: role of sympathetic postganglionic nerve fibers. *Eur J Pharmacol.* 429, 139-145.
- Qu K, et al. 2008. *Neurochem Int.* 52(1-2):155-165.
- Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH. 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 32: 109-134.
- Rexed B. 1952. *Cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat.* *J Comp Neurol.* 96:415.
- Roberts WA, Eaton SA, Salt TE. 1992. Widely distributed GABA-mediated afferent inhibition processes within the ventrobasal thalamus of rat and their possible relevance to pathological pain states and somatotopic plasticity. *Exp Brain Res.* 89:363-372.
- Rocha-González HI, et al. 2009. *Neuroscience.* 160(1):156-164.
- Roediger WE. 1997. Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci.* 42:1571-1579.
- Rosland JH, Tjolsen A, Maehle Bjorn y Hole K. 1990. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain,* 42: 235-242.
- Rosland JH. 1991. The formalin test in mice: the onfluence of ambient temperature. *Pain.* 45: 211-216.
- Sawynok J, Liu XJ. 2003. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol.* 69:313-340.
- Schuman EM, Madison DV. 1994. Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci.* 17:153-183.
- Smith HS. 2009. Hydrogen sulfide's involvement in modulating nociception. *Pain Physician*

- Snider WD, McMahon SB. 1998. Tackling pain at the source: new ideas nociceptors. *Neuron*. 20:629-632.
- Sorkin LS. 1997. Farmacología y fisiología básicas del proceso del dolor agudo. En: *Clínicas de Anestesiología de Norteamérica*. Wallace MS, Dunn JS, Yaksh TL. Ed. Mc Graw Hill. 2:245-259.
- Sousa AM y Prado WA. 2001. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res*, 897: 9-19.
- Stimmel B. 1983. Neuroregulators and pain. In: *pain, analgesia and addiction: the pharmacologic treatment of pain*. Ed raven Press NY. Cap 2: 18-36
- Stipanuk MH, De la Rosa J, Hirschberger LL. 1990. Catabolism of cysteine by rat renal cortical tubules. *J Nutr*. 120: 450-458.
- Stipanuk MH. 1979. *J Nutr*. 109(12):2126-2139.
- Sun Q, Collins R, Huang s, Holmberg-Schiavone L, Anand GS, Tan C, Van-den-Berg S, Deng LW, Moore PK, Karlberg T, Sivaraman J. 2009. Structural Basis for the Production of H<sub>2</sub>S. *J Biol Chem*. 284: 3076-3085.
- Szabó C. 2007. *Nat Rev Drug Discov*. 6(11):917-935.
- Tallarida RJ, Murray RB. 1981. *Manual of pharmacologic calculations with computer programs*. Springer-Verlag. New York. Heidelberg, Berlin.
- Thomas PK. 1994. Growth factors and diabetic neuropathy. *Diabet Med*. 11, 732-739.
- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51(1):5-17.
- Tomlinson DR and Gardiner NJ. 2008. *Nat Rev Neurosci*. 9(1):36-45.
- Treede RD, Kenshalo DR, Gracely RH. 1999. The cortical representation of pain. *Pain*. 79:105-111.
- Trevisani M, et al. 2005. *Br J Pharmacol*. 145(8):1123-1131.

- Tucker JF, Brave SR, Charalambous L, Hobbs AJ and Gobbson A: L-NG-nitro arginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxations of guinea-pig isolated tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1990;100:663-664.
- Turk DC, Okifuji A. 1999. Assessment of patient's reporting of pain: an integrated perspective. *Lancet.* 353: 1784-1788
- Vanegas H, Schaible HG. Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cyclooxygenases] in the spinal cord. *Prog Neurobiol.* 2001;64:327-363.
- Vincent SR and Hope BT. 1992. Neurons that say NO. *Trends Neurosci.* 15:108-113.
- Wang R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J*
- Wang Z, Gardell LR, Ossipov MH, Vanderah TW, Brennan MB, Hochgeschwender U, Hruby V, Malan Jr TP, Lai J, Porreca F. 2001. Pronociceptive actions of dynorphin maintain chronic neuropathic pain. *J. Neurosci.* 21:1779-1786.
- Way KJ, Katai N, King GL. 2001. Protein kinase C the development of diabetic vascular complications. *Diabet Med.* 18, 945-959.
- Wheeler-Aceto H, Cowan A. 1991. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology (Berl)* 104(1):35-44.
- Wheeler-Aceto H, et al. 1990. *Pain.* 40(2):229-238.
- Wiertelak EP, Roemer B, Maier SF, Watkins LR. 1997. Comparison of the effects of nucleus tractus solitarius and ventral medial medulla lesions on illness-induced and subcutaneous formalin-induced hyperalgesia. *Brain Res.* 748:143-150.
- Wiklund L, Behzadi G, Kalen P, Headley PM, Nicolopoulos LS, Parsons CG, West DC. 1988. Autoradiographic and electrophysiological

- evidence for excitatory amino acid transmission in the periaqueductal gray projection to nucleus raphe magnus in the rat. *Neurosci Lett.* 93:158-163.
- Willis WD Jr, Zhang X, Honda CN, Giesler GJ Jr. 2001. Projections from the marginal zone and deep dorsal horn to the ventrobasal nuclei of the primate thalamus. *Pain.* 92:267-76.
  - Willis WD, Westlund KN. 1997. Neuroanatomy of the Pain System that modulate pain. *J Clin Neurophysiol.* 14:2-31.
  - Woolf CJ. 2004. Pain: moving from symptom control toward mecanismo specific pharmacologic management. *Ann Intern Med.* 140(6): 441-451
  - Woolf CJ. 1991. Generation of acute pain, central mechanism. *British Medical Bulletin.* 47:523-533.
  - Yaksh TL. 1976. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav.* 17(6):1031-1036.
  - Yang G. H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*
  - Yeziarski RP. 1990. Effects of midbrain and medullary stimulation on spinomesencephalic tract in the cat. *J Neurophysiol.* 63:240-255.
  - Yoshida A, Chen K, Moritani M, Yabuta NH, Nagase Y, Takemura M, Shigenaga N. 1997. Organization of the descending projections from the parabrachial nucleus to the trigeminal sensory nuclear complex and spinal dorsal horn in the rat. *J Comp Neurol.* 383:94-111.
  - Yusuf M, et al. 2005. *Biochem Biophys Res Commun.* 333(4):1146-1152.
  - Zanoardo RC, Brancaleone V, Distritti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. 2005. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation *FASEB J.* 20: 2118-2120.

- Zhang H, Zhi L, Moore PK, Bhatia M. 2006. Role of hydrogen sulfide in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290: L1193-L1201.
- Zhang YQ, Tang HS, Yuan B, Jia H. 1997. Inhibitory effects of electrically evoked activation of ventrolateral orbital cortex on the tail-flick reflex are mediated by periaqueductal gray in rats. *Pain.* 72:127-135.
- Zhong G, Chen F, Cheng Y, Tang C, Du J. 2003. The role of hydrogen sulfide generation in the pathogenesis of hypertension in rats induced by inhibition of nitric oxide synthase. *J Hypertens.* 21: 1879-1885.
- Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations on experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110.