



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

EFFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA ADMINISTRACION DE CEFTRIAXONA Y  
ACIDO CLAVULANICO EN EL DOLOR INFLAMATORIO Y NEUROPATICO Y SU  
CORRELACION CON FACTORES PRO Y ANTI INFLAMATORIOS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE: DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA: ABRAHAM OCHOA AGUILAR

TUTOR: DRA. ROSA VENTURA MARTINEZ  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. ANA BRIGIDA CLORINDA ARIAS ALVAREZ INSTITUTO DE CIENCIAS  
BIOMEDICAS, UNAM  
DRA. RUTH JAIMEZ MELGOZA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD DE MEXICO, JUNIO, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco inicialmente al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México la oportunidad de haber realizado mis estudios de postgrado y al CONACYT por el apoyo recibido con la beca número 294713. Agradezco también a mi tutora principal, la Dra. Rosa Ventura Martínez y a mis co-tutoras la Dra. Clorinda Arias y la Dra. Ruth Jaimez por haberme ayudado a terminar este doctorado. Del mismo modo, aprecio infinitamente el apoyo recibido en el laboratorio de desarrollo de medicamentos de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Del mismo modo agradezco infinitamente a todos aquellos que estuvieron cerca durante estos años, entre ellos a aquellos profesores que se han convertido en mis amigos: Citlali Trueta, Ulises Coffeen, Claudia Gómez, Ricardo Plancarte, Guadalupe Castro, muchas gracias a todos.

A mi maestro, amigo, socio y mentor Marco Sotomayor le agradezco que haya confiado en mí a pesar de mí mismo. A mi abuela, mi hermana, mis tíos y primas les agradezco su tolerancia para conmigo y mis formas. A Ari por darme aliento en momentos difíciles

A mi padre le agradezco por darme la necesidad de ser mejor cada día y valerme por mi mismo sin esperar nada de nadie más.

Y por supuesto, gracias mamá. Sin ti nada de esto hubiera sido posible.

# Índice

Resumen Español	1
Resumen Inglés	2
1.- Introducción	3
2. Marco teórico	6
2.1 Dolor	6
2.1.1 Clasificación del dolor	6
2.1.2 Vía del dolor	7
2.1.2.1 Activación de los nociceptores	7
2.1.2.2 Transmisión del estímulo nociceptivo	10
2.1.2.3 Participación del glutamato en la transmisión del dolor	11
2.1.2.4 Participación de la glia en la transmisión del dolor	15
2.1.2.5 Participación de las citocinas en la transmisión del dolor	16
2.1.3. Vías analgésicas descendentes	17
2.1.3.1 Sistema opioidérgico	18
2.1.3.2 Sistema noradrenérgico	19
2.1.3.3 Sistema serotoninérgico	19
2.1.3.4 Sistema dopaminérgico	20
2.2 Tratamiento farmacológico del dolor	21
2.2.1 Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	21
2.2.2 Analgésicos opioides	22
2.2.3 Adyuvantes analgésicos	23
2.2.4 Nuevas aproximaciones	24
2.3 Moléculas betalactámicas	24
2.3.1 Ceftriaxona (CFX).	26
2.3.2 Ácido clavulánico (AC)	27
2.3.3 Evidencias de la eficacia analgésica de la CFX y AC.	27
3. Planteamiento del problema	29

4. Hipótesis	29
5. Objetivos	29
6. Metodología	30
7. Resultados	38
8. Discusión de resultados	52
9. Conclusiones	57
10. Referencias	58
11. Artículo publicado	66

INDICE DE FIGURAS	Pág.
Fig 1. Activación de los nociceptores por algunos mediadores del dolor.	9
Fig 2. Representación gráfica de la vía espinotalámica involucrada en la vía del dolor.	12
Fig 3. Representación gráfica de una sinapsis medular	14
Fig 4. Estructura química de algunas moléculas betalactámicas	25
Fig 5. Modelo de constricción nerviosa del nervio ciático de Bennett	32
Fig 6. Pletismómetro para medir el edema por desplazamiento de volúmen	34
Fig 7. Aplicación de los Filamentos de Von -Frey para la determinación de la alodinia Mecánica	35
Fig 8. Aplicación de acetona para la determinación de la alodinia al frío	36
Fig 9. Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por los Filamentos de Von Frey en el modelo de constricción del nervio ciático (CCI) en ausencia y en presencia de gabapentina (GAP)	39
Fig 10. Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por los Filamentos de Von Frey en el modelo de constricción del nervio ciático (CCI) y el efecto antialodínico de la administración de CFX (100, 200 y 400 mg/kg).	40
Fig 11. Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por los Filamentos de Von Frey en el modelo de constricción del nervio ciático (CCI) y el efecto antialodínico de la administración de CA (0.1, 1.0 Y 10 mg/kg)	41
Fig 12. Curso temporal de la alodinia térmica inducida por una gota de acetona en el modelo de constricción del nervio ciático (CCI) y el efecto antialodínico de la administración de GAP (10.0 mg/kg).	42
Fig 13. Curso temporal de la alodinia térmica inducida por una gota de acetona en el modelo de constricción del nervio ciático (CCI) y el efecto antialodínico de la administración de CFX (100, 200 y 400 mg/kg)	43

Fig 14. Curso temporal de la alodinia térmica inducida por una gota de acetona en el modelo de constricción del nervio ciático (CCI) y el efecto antialodínico de la administración de CA (0.1, 1.0, 10.0 mg/kg)	44
Fig 15. Concentración sérica de citocinas en el modelo de CCI en animales tratados con GAP, CFX y CA	45
Fig 16. Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por la administración de CARR y el efecto antialodínico del DIC	46
Fig 17. Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por la administración de CARR y el efecto antialodínico de la CFX (200 mg/kg)	47
Fig 18. Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por la administración de CARR y el efecto antialodínico del CA (10 mg/kg)	48
Fig 19. Curso temporal de 3, 24 y 48 horas posteriores a la administración de CARR intraplantar y el volumen dispersado con los diferentes tratamientos	49
Fig 20. Concentración sérica de citocinas en el modelo de CARR en animales tratados con DIC, CFX y CA	51

## Lista de abreviaturas

AA-	Ácido clavulánico	K-	Potasio
AINEs-	Antiinflamatorios no esteroideos	Kg-	Kilogramo
AMPA-	receptor de ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxy-5 metil-4-isoxazolepropionico	LTP-	Potenciación a largo plazo
ATP-	Adenosin trifosfato	MAPK-	Proteína cinasa activada por mitógeno
BHE-	Barrera hematoencefálica	Mg-	Magnesio
BLM -	Moléculas betalactámicas	MGLUR-	Receptor metabotrópico de glutamato
CA-	Ácido clavulánico	MIN-	Minuto
CARR-	Carragenina	NaCl-	Cloruro de sodio
CC-	centímetro cúbico	NMDAr	Receptor N-metil- D Aspartato
CCI-	Modelo de constricción nerviosa de Bennett	NOM-	Norma oficial Mexicana
CFX-	Ceftriaxona	NRM-	Núcleo de Rafé Magno
COX-	Ciclooxigenasa	OMS-	Organización mundial de la salud
DIC-	Diclofenaco	PG-	Prostaglandina
DHK-	Ácido Dihidrocaínico	PKA-	Proteín cinasa A
EAAT-	Transportador de aminoácidos excitadores	PKC-	Proteín cinasa C
Fig.-	Figura	PLA <sub>2</sub> -	Fosfolipasa A 2
GAP-	Gabapentina	Q-	Glutamina
GLT1-	Transportador de Glutamato 1	R-	Arginina
IASP-	Asociación internacional para el estudio del dolor	RVM-	Área rostroventromedial
IL-	Interleucina	SEG-	Segundo
IP-	Intraperitoneal	SNC-	Sistema nervioso central
JNK-	Janus cinasa	TNF $\alpha$ -	Factor de necrosis tumoral alfa
		TRK-	Receptores de tirocin cinasa
		5HT-	5 Hidroxitriptamin



## Resumen en español

El dolor es una sensación desagradable que, en situación patológica carece de un rol protector se convierte en un evento deletéreo que afecta la vida de quien lo padece. Éste cambio es multifactorial pero incluye una gran cantidad de cambios en la relación neuroinmunológica como la disminución de la concentración del transportador de glutamato GLT1 y una alteración en las concentraciones séricas de moléculas pro y anti-inflamatorias como TNF $\alpha$  e IL10.

Los betalactámicos son fármacos generalmente utilizados como antibióticos en la clínica, sin embargo, la ceftriaxona ha mostrado en diversos estudios alterar la expresión de transportadores GLT1 y las concentraciones de diversas moléculas del sistema inmune así como efectos analgésicos 7 horas después de su administración en modelos de dolor neuropático. Por otro lado el ácido clavulánico, otra molécula con un anillo betalactámico sin efecto antibiótico clínicamente relevante, ha mostrado también efectos anti-inflamatorios y neuromoduladores en otros estudios.

La intención de la presente tesis fue la de poner a prueba la hipótesis de que ambas moléculas podían inducir un efecto antialodínico agudo en modelos murinos de dolor neuropático e inflamatorio y que este efecto estaba relacionado con una regulación de la concentración sérica de moléculas pro y anti-inflamatorias.

Nuestros resultados muestran un efecto antialodínico agudo significativo posterior a la administración de ambas moléculas por vía intraperitoneal en ambos modelos. Por otro lado, encontramos una modulación de las concentraciones séricas de TNF $\alpha$  e IL10 en ambos modelos.

Con estos resultados mostramos que los efectos antialodínicos de la administración de estas moléculas no son exclusivamente relacionadas con una sobreexpresión de transportadores GLT1 ya que este evento ocurre no antes de 7 horas de administrado el fármaco. Por otro lado mostramos que ambas moléculas alteran la concentración de moléculas pro y anti-inflamatorias séricas y que esto podría estar relacionado al efecto general. Consideramos que línea de investigación podría llevar al desarrollo de una terapia farmacológica alternativa a las actuales para el tratamiento de distintos tipos de dolor patológico en la clínica.

## Resumen en inglés

Pain is an unpleasant sensation that, in a pathological situation, lacks a protective role becomes a deleterious event that affects the life of the sufferer. This change is multifactorial but includes a large number of changes in the neuroimmune relationship such as the decrease in GLT1 glutamate transporter concentration and an alteration in serum concentrations of pro and anti-inflammatory molecules such as TNF $\alpha$  and IL10.

Beta-lactams are a family of molecules commonly used as antibiotics in the clinic, however, ceftriaxone has been shown in several studies to alter the expression of GLT1 transporters and concentrations of various molecules of the immune system as well as analgesic effects 7 hours after administration in models neuropathic pain. On the other hand, clavulanic acid, another molecule with a beta-lactam ring, with no clinically relevant antibiotic effect, has also shown anti-inflammatory and neuromodulatory effects in other studies.

The aim of this thesis was to test the hypothesis that both molecules could induce an acute antialodynic effect in murine models of neuropathic and inflammatory pain and that this effect was related to a regulation of the serum concentration of pro and anti molecules Inflammatory.

Our results show a significant acute antialodynic effect following administration of both molecules intraperitoneally in both models. On the other hand, we found a modulation of serum concentrations of TNF $\alpha$  and IL10 in both models.

With these results we show that the anti-allodynic effects of the administration of these molecules are not exclusively related to an overexpression of GLT1 transporters since this event happens not before 7 hours of administered the drug. On the other hand we show that both molecules alter the concentration of pro and anti-inflammatory molecules serum and that this could be related to the general effect. We consider that this line of research could lead to the development of an alternative drug therapy for the treatment of different types of pathological pain in the clinic.

## Introducción

El dolor es una sensación desagradable que cumple una función protectora, evitando un daño grave a los tejidos y ayudando a la recuperación celular una vez ocurrido el mismo (Jensen y Gebhart 2008; Milligan y Watkins 2009; van Hecke y cols. 2013). Sin embargo, cuando evoluciona en un proceso patológico, éste deja de cumplir su función protectora y se convierte un problema que puede llegar a ser incapacitante. La diversidad en las causas que lo originan ha llevado al desarrollo de varias alternativas terapéuticas para su tratamiento y alivio. Sin embargo, debido a la variabilidad en la fisiopatología de los diferentes tipos de dolor, las características propias del paciente y que se trata de una experiencia sensorial y emocional, hacen que el tratamiento sea muy complicado. Es por eso que la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas debe ir encaminado al manejo de la fisiopatología específica de cada tipo de dolor y no solo al alivio de la sintomatología.

Acerca de los mecanismos funcionales del dolor fisiológico se sabe que dependen de una serie de interacciones entre el sistema nervioso periférico, el central y el sistema glial que son finamente regulados para su control y funcionalidad (Ren y Dubner 2008; Von Korff y Dunn 2008; Milligan y Watkins 2009; van Hecke y cols. 2013). Desafortunadamente, en situaciones patológicas, esta regulación se pierde o actúa de manera menos eficiente, permitiendo la facilitación de la transmisión de los estímulos dolorosos (Ren y Dubner 2008; Milligan y Watkins 2009; van Hecke y cols. 2013). Entre los mecanismos principales que pierden su regulación de manera inicial está la recaptura del glutamato por medio de los transportadores GLT-1 localizados en los astrocitos perisinápticos (Milligan y Watkins 2009), permitiendo un incremento de glutamato en la sinapsis que perpetua la activación continua de la neurona postsináptica. Este proceso se pensaba, hasta hace algunos años, como un evento meramente neuronal, sin embargo se ha encontrado un mecanismo regulado por

células del sistema glial dependiente de la concentración local y periférica de factores moleculares pro y anti inflamatorios.(Milligan y Watkins 2009).

Considerando esto, varios investigadores han sugerido que el aumento del transportador GLT-1 es un potencial blanco farmacológico para el tratamiento del dolor. En 2005, Rothstein y cols. (2005) encontraron que la ceftriaxona, la penicilina y otros betalactámicos fueron capaces de incrementar la expresión de este transportador en cultivos celulares de astrocitos humanos y de roedor. Este aumento ha mostrado tener funciones diversas en el sistema nervioso (Rothstein y cols. 2005; Hu y cols. 2010; Rawls y cols. 2010a; Rawls y cols. 2010b; Yamada y Jinno 2011; Goodrich y cols. 2013), entre los cuales destaca su efecto antinociceptivo, mismo que hasta ahora solo se había demostrado para la ceftriaxona tanto en investigación básica (Rothstein y cols. 2005; Stepanovic-Petrovic y cols. 2014) como clínica (Caperton y cols. 1990; Albert y cols. 2013; Macaluso y cols. 2013). Por otra parte, otros betalactámicos han mostrado que parte de su efecto sobre el sistema nervioso central se debe, además de su participación en la vía del glutamato, a su efecto en la liberación de otros neurotransmisores como la serotonina y la dopamina (Kim y cols. 2009; Kost y cols. 2011; Kost y cols. 2012) además de una modulación directa en el sistema inmune (Banani y cols. 2012).

Los betalactámicos son una familia de fármacos conocidos en la clínica principalmente por su utilidad antibiótica (Suarez y Gudiol 2009). El principal representante de este grupo es la penicilina, medicamento que ha sido partícipe importante de la mejora en la salud pública desde mediados del siglo XX (Poole 1944; Demain y Sanchez 2009; Kardos y Demain 2011). También la ceftriaxona, una cefalosporina de tercera generación y, el ácido clavulánico, un inhibidor de las betalactamasas, pertenecen a este grupo farmacológico. Estos fármacos se caracterizan por tener en su estructura química un grupo funcional conocido como anillo betalactámico, mismo que ha mostrado ser indispensable para su actividad antibiótica y que es inactivado por unas enzimas sintetizadas por las bacterias conocidas como betalactamasas (Ellerbrok y

Hakenbeck 1988). En este trabajo se determinó el efecto antinociceptivo de la administración aguda de ceftriaxona y ácido clavulánico en un modelo de dolor neuropático y en uno de dolor inflamatorio; además se determinó la posible participación de dos citocinas en el efecto inducido por ambos fármacos en los modelos de dolor.

## **1. Marco teórico**

### **2.1 Dolor**

El dolor se describe como una percepción sensorial y emocional desagradable que está asociada a un daño tisular real o potencial o se describe en términos de dicho daño (Bonica 1979). En condiciones fisiológicas, el dolor funciona como un mecanismo de defensa contra la lesión tisular ya que al activarse inicia una respuesta conductual que induce el retiro del estímulo que ocasiona el daño y permite iniciar el proceso de recuperación del área afectada (Milligan y Watkins 2009). Sin embargo, existen situaciones en las cuales el efecto protector del dolor desaparece y se convierte en una patología de gran importancia clínica tanto por su duración como por la discapacidad que puede generar en los pacientes que la padecen (van Hecke y cols. 2013). Este cambio se debe a una amplia cantidad de procesos tanto neuronales como inmunológicos haciendo de esto una patología multicausal (Milligan y Watkins 2009). De hecho, es tal la importancia de este cambio que la clasificación misma del dolor se ha ido adecuando no solo a la duración del mismo, sino a la fisiopatología de los diferentes tipos de dolor que se ha estudiado con el paso de los años (Merskey 1986; Jensen y Gebhart 2008; Loeser y Treede 2008; Von Korff y Dunn 2008).

#### **2.1.1 Clasificación del dolor**

Tomando en cuenta la complejidad del dolor como mecanismo neurobiológico y como padecimiento clínico, se han creado diversas clasificaciones para facilitar su estudio y comprensión. Estas se basan en sus características tanto clínicas, como moleculares..

Con relación a su clasificación clínica, se puede dividir al dolor en función de su temporalidad en agudo y crónico (Merskey 1986; Loeser y Treede 2008). La Asociación Internacional de Estudio y Tratamiento del Dolor (IASP por sus siglas en inglés) considera al dolor como crónico cuando este persiste más allá del tiempo normal de reparación de un tejido, dando un tiempo de tres meses, en casos de dolor no maligno. Antes de ese tiempo se le clasifica como agudo (Von Korff y Dunn 2008).

Otra de las clasificaciones del dolor toma en cuenta su origen y se divide en neurogénico y neuropático (Bonica 1979). Dentro del dolor neurogénico se encuentra el dolor inflamatorio que se inicia cuando existe una lesión tisular que eleva los factores inflamatorios periféricos como interleucina (IL) 1 $\beta$  o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); además de una disminución de interleucinas antiinflamatorias como la IL4 o la IL10. Esta alteración permite que una neurona nociceptiva sea estimulada y eso de inicio a la percepción del dolor (Dray 1995). Por otro lado, el dolor neuropático es aquel que es causado por una lesión primaria, disfunción o inflamación del sistema nervioso central (SNC) (Merskey 1986; Moalem y Tracey 2006; Loeser y Treede 2008). Este tipo de dolor se caracteriza por presentar cambios neurofuncionales tanto periféricos (Thacker y cols. 2007) como medulares (Inquimbert y cols. 2012) que vuelven más probable percibir dolor por estímulos que previamente no eran dolorosos (alodinia) o que un estímulo ligeramente doloroso pudiera ser incluso insoportable (hiperalgesia) (Jensen y Finnerup 2014).

## **2.1.2 Vías del dolor**

### **2.1.2.1 Activación de los nociceptores**

En general, la activación de la vía del dolor inicia cuando un estímulo es capaz de causar daño a los tejidos y desencadena una cascada de eventos que se enfocan en tratar de evitar una lesión grave. En el ser humano, este mecanismo inicia con la activación de terminales nerviosas libres especializadas conocidas como nociceptores (Woolf y Ma 2007). Estas dendritas son capaces de responder de manera muy particular a diversos estímulos nocivos y se encuentran localizadas en la papila de la dermis, principalmente, aunque algunas se extienden a la epidermis, músculos y algunos órganos (Marchand 2008).

Existen principalmente dos tipos de nociceptores las fibras C y las A $\delta$  (Willis 2007). Las fibras C son amielínicas y conducen la información a una velocidad de entre 0.5 y 2 m/s. Éstas transmiten diversos tipos de estímulos como mecánicos, térmicos y

químicos por lo que son conocidas como fibras polimodales (Wooten y cols. 2014). Por otro lado, las A $\delta$  son fibras ligeramente mielinizadas que conducen la señal en un rango de velocidad de 2 a 20 m/s y responden a estímulos mecánicos y químicos; y sólo algunas de ellas se activan con cambios de temperatura (Geffeney y Goodman 2012).

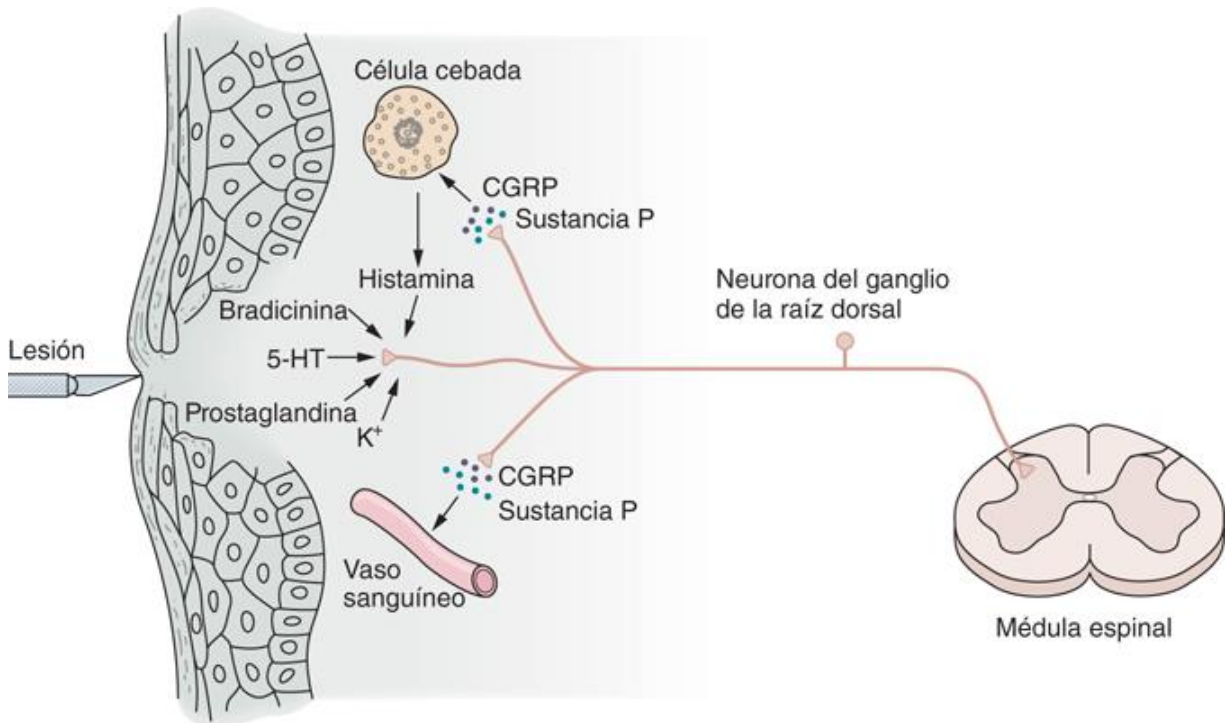
Como ya se mencionó, estos nociceptores son capaces de detectar una gran variedad de estímulos. Por ejemplo, la presencia de los receptores transitorios de potencial por canal o TRP, permiten detectar los cambios en la temperatura como en el caso de los TRPV1 que se activan con una temperatura aproximada de 42°C (Szolcsanyi y cols. 1988) o los TRPM8 que se activan con el frío o la aplicación de acetona en situaciones de alodinia (Bautista y cols. 2007; Colburn y cols. 2007). También los receptores TRPA1 se activan en situaciones de una disminución intensa de temperatura dando la sensación de quemadura por frío (Bandell y cols. 2004). Con relación a la detección del dolor mecánico (inducido por presión) se considera que los receptores ASIC (canales iónicos de membrana sensibles a H<sup>+</sup>) que son principalmente conocidos por ser activados por descensos en el pH extracelular, podrían ser los responsables. Sin embargo no existe información contundente que demuestre un receptor particular para esta sensación (Hu y cols. 2006).

Otro tipo de eventos que pueden activar la vía del dolor son aquellos en los que exista un daño tisular producido por un golpe o una lesión al tejido. En este caso, se liberan diversos mediadores químicos que, a través de sus vías de señalización específicas, activan a los nociceptores. Entre los principales mediadores del dolor encontramos a las prostaglandinas (PGs), que son un grupo de eicosanoides que son sintetizados a partir del ácido araquidónico (AA) por la vía de la ciclooxigenasa (COX). Existen principalmente dos isoformas de la COX, una constitutiva (COX 1) y una inducible (COX 2). Estas dos enzimas son los blancos farmacológicos de los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como se describirá más adelante (Basbaum y Bushnell 2008). A través de la COX2 se sintetiza la PGE2 que es la que participa de



manera más importante en la transmisión del dolor a través de la activación de sus receptores específicos conocidos como EP (McMahon y cols. 2013).

Es importante comentar que, además de la PGE<sub>2</sub>, existen otros mediadores químicos y factores liberados por el sistema inmune que pueden activar a los nociceptores, como la Bradicinina (Dray y Perkins 1993), el factor de necrosis tumoral (TNF) (Czeschik y cols. 2008) o la serotonina (Lloyd y cols. 2013) También la adenosina trifosfato (ATP) es capaz de activar a la neurona nociceptiva de manera directa por medio de receptores conocidos como NP2X3 (Fig. 1) Todas estas activaciones pueden deberse a receptores específicos (por ejemplo los receptores 5-HT<sub>3</sub> de serotonina) o por activación fosforilación secundaria de canales de sodio dependientes de voltaje u otro tipo de canal debido a la función metabotrópica de las prostaglandinas



Fuente: Kim E. Barrett, Susan M. Barman, Scott Boitano, Heddwen L. Brooks: *Ganong. Fisiología médica*, 24e: [www.accessmedicina.com](http://www.accessmedicina.com)  
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

Fig. 1. Activación de los nociceptores por algunos mediadores del dolor.

Sin embargo, aunque la cantidad de estímulos que activan esta vía es diversa, el umbral de los nociceptores es más elevado que el de las vías sensitivas no dolorosas, por lo que la transmisión de la señal, en situaciones fisiológicas, es bastante selectiva (Woolf y Ma 2007).

### **2.1.2.2 Transmisión del estímulo nociceptivo**

Una vez que los nociceptores son activados, la señal dolorosa es transmitida hacia el asta posterior de la médula espinal, donde realizan su primer sinapsis. En este lugar existen interneuronas que se activan por el mismo estímulo y realizan la primera modulación, ya sea pro o antinociceptiva, dependiendo de la neurona excitada. La localización anatómica de los diferentes tipos de neurona se relaciona con los grupos celulares conocidos como láminas de Rexed (Todd 2010). De este modo se sabe que las fibras aferentes de tipo A $\delta$  realizan su primer sinapsis en las neuronas localizadas en las láminas II, III y IV de la médula espinal; mientras que, las fibras C, en las lámina I y II. Esto significa que los extremos proximales de la primer neurona tienen una distribución definida y eso facilita la interpretación y modulación de diversos tipos de estímulos dolorosos (Wrigley y cols. 2009).

La continuación de este proceso se da a través de vías cruzadas ascendentes situadas en la región anterolateral de la médula espinal (Willis 2007) conocida como vía espinotalámica. Esta vía permite la transmisión del estímulo, principalmente de tipo glutamatérgico, hacia neuronas de segundo orden en niveles superiores como el tálamo o algunas estructuras como la médula rostral ventromedial (RVM) o el núcleo del rafe magno (NRM), mismas que participan tanto en la interpretación del estímulo como en la activación de mecanismos descendentes inhibidores del mismo (Willis 2007; Woolf y Ma 2007; Marchand 2008; Geffeney y Goodman 2012).

De acuerdo a la definición de dolor y tomando en cuenta su fisiopatología, se han estudiado dos de los componentes emocionales involucrados en esta sensación, el

discriminativo-sensorial y el afectivo. El primero es conducido principalmente por un complejo tálamo-cortical que, como su nombre lo dice, tiene proyecciones desde el tálamo hacia las cortezas somatosensoriales primaria y secundaria (Wrigley y cols. 2009). El segundo, el componente afectivo, es conducido por núcleos talámicos mediales que proyectan sus eferencias hacia diversas cortezas como la prefrontal, la anterior del cíngulo y el hipocampo, así como hacia áreas subcorticales como la amígdala (Bushnell y cols. 2013) (Fig. 2).

Una vez que se integra la información nociceptiva en centros superiores y se hace conciencia de la sensación dolorosa, se activan mecanismos analgésicos descendentes. Esta modulación descendente es fundamental para evitar que el dolor se vuelva un evento patológico y está mediada por diversos neurotransmisores (Hu y cols. 2006; Marchand 2008; Wood 2008; Bushnell y cols. 2013; Melik Parsadaniantz y cols. 2015).

### **2.1.2.3 Participación del glutamato en la transmisión del dolor**

El neurotransmisor excitador más importante en el SNC es el glutamato y tiene participación en diversos procesos metabólicos (Niswender y Conn 2010; Traynelis y cols. 2010). Este neurotransmisor tiene gran relevancia en la transmisión y procesamiento de los estímulos dolorosos, ya que, como se mencionó anteriormente, la primera sinapsis entre la fibra nociceptiva y las neuronas de las astas posteriores de la médula espinal es, principalmente glutamatérgica (Todd 2010).

Una vez que la membrana de la terminal nerviosa de la fibra nociceptiva cambia su voltaje, se induce la apertura de canales de calcio voltaje dependientes. El aumento en la concentración de  $Ca^{++}$  en el citoplasma produce la liberación del glutamato desde las vesículas hacia el espacio sináptico a través de un grupo de moléculas conocidas como SNARES (Sudhof 2013). Una vez liberado el glutamato al espacio sináptico, este se acopla a sus receptores postsinápticos (Platt 2007). La función excitadora del glutamato se produce por su acoplamiento a los receptores ionotrópicos conocidos

como AMPA, NMDA y Kainato (Bridges y Esslinger 2005; Platt 2007; Traynelis y cols. 2010).

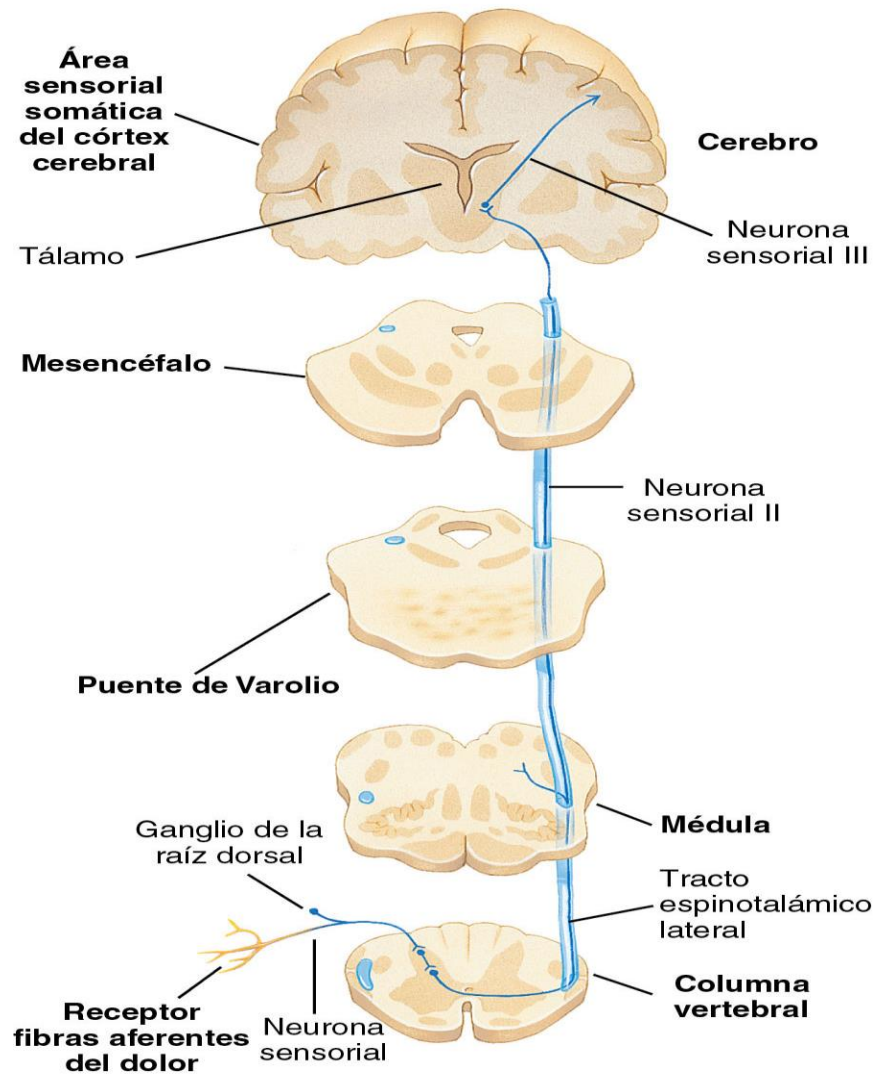


Fig. 2 Representación gráfica de la vía espinotalámica involucrada en la vía del dolor.

Los primeros en activarse son los receptores AMPA y Kainato los cuales permiten el paso selectivo de sodio al interior de la célula, tras lo cual el potencial de membrana

empieza a hacerse más positivo. Cuando el potencial eléctrico intracelular es suficientemente elevado, se desacopla una molécula de magnesio ( $Mg^{++}$ ) que se encuentra normalmente bloqueando el conducto de los receptores NMDA, permitiendo con esto, el paso tanto de sodio como de calcio al interior de la célula dando lugar a una despolarización (Traynelis y cols. 2010). Esta despolarización neuronal es la responsable de la transmisión del dolor a centros superiores.

En condiciones homeostáticas, la concentración del glutamato en el espacio sináptico se regula a través de su metabolismo, el cual se realiza primero por su transporte del espacio sináptico al interior de los astrocitos, por medio de los transportadores EAAT2/GLT-1. Estos transportadores son responsables de aproximadamente el 90% del proceso de recaptura del glutamato y por ende de su metabolismo (Bridges y Esslinger 2005; Platt 2007; Lee y cols. 2008; Traynelis y cols. 2010). Una vez dentro del astrocito, el glutamato se metaboliza por medio de una molécula conocida como glutamina-sintetasa transformándose en glutamina y perdiendo su función excitadora. La glutamina posteriormente regresa a la terminal presináptica por medio de una proteína recapturadora dependiente de sodio e introducida a la mitocondria donde por medio de una glutaminasa vuelve a su forma original de glutamato (Fig. 3) (Platt 2007).

En situaciones de dolor crónico se llevan a cabo una serie de procesos tanto en los mecanismos excitadores como en los moduladores centrales en la médula espinal (Thacker y cols. 2007; Costigan y cols. 2009). Cuando ocurre un proceso lesivo o se estimula de manera continua un nociceptor periférico, la producción y liberación de glutamato aumenta de manera importante en las astas posteriores de la médula (Thacker y cols. 2007); Inquimbert y cols. (2012) superando la capacidad de los recapturadores a glutamato (GLT-1) para regularla. Además, al aumentar la concentración de glutamato en el espacio sináptico, los astrocitos son activados iniciando así la síntesis de factores inflamatorios como interleucinas, factor de necrosis tumoral y prostaglandinas (Ren y Dubner 2008; Milligan y Watkins 2009). La presencia de estos factores disminuye la expresión de recapturadores GLT-1 en la membrana

del astrocito lo cual contribuye también al aumento de la concentración de glutamato (Ren y Dubner 2008; Milligan y Watkins 2009).

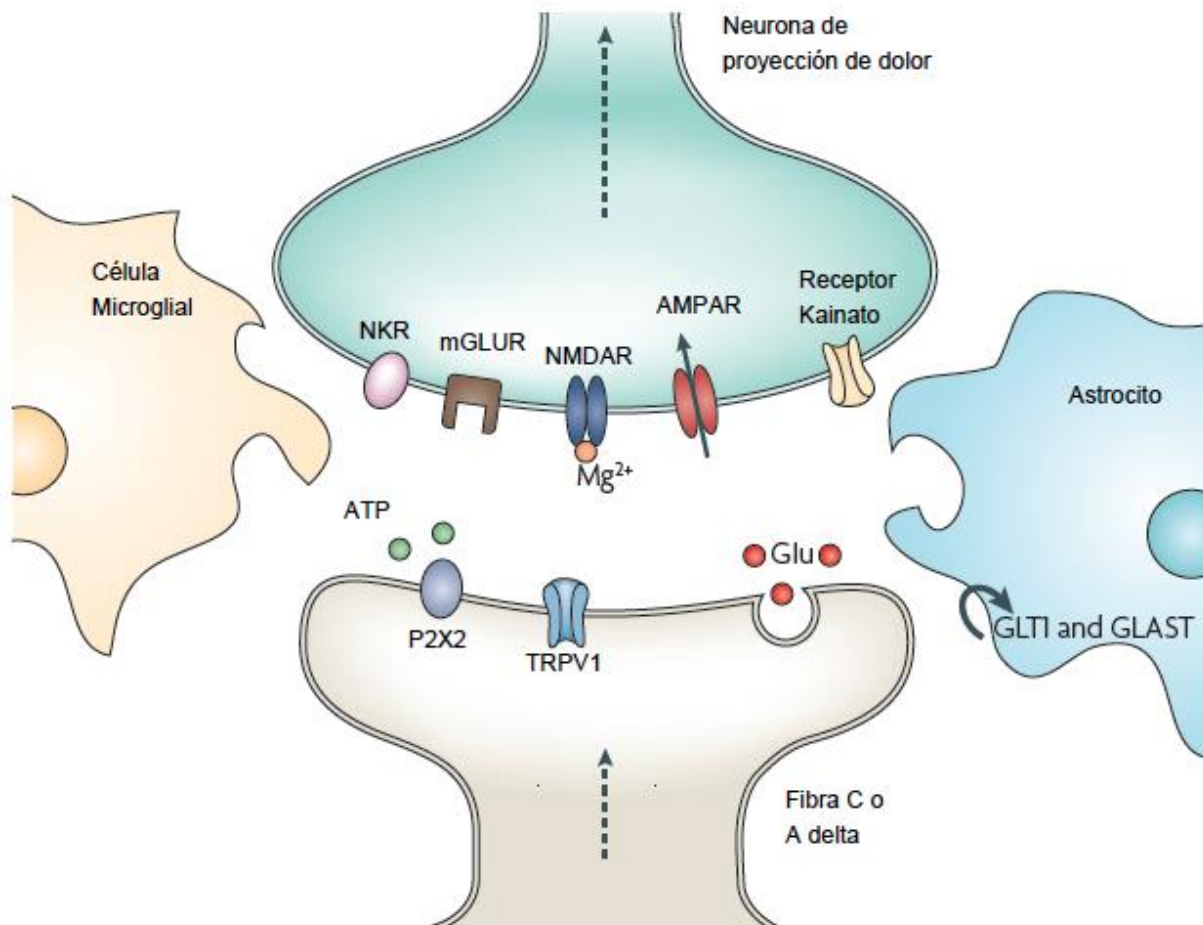


Fig 3. Representación gráfica de una sinapsis medular. En la parte inferior se presenta una neurona presináptica, liberando moléculas de glutamato (Glu) a la hendidura sináptica. Los receptores en la neurona postsináptica son tanto ionotrópicos (AMPA, Kainato y NMDAR) como metabotrópicos (mGLUR). La regulación de la concentración de glutamato se da por la presencia de transportadores GLUT-1 y GLAST en el astrocito (derecha). En una situación fisiológica, el estado de las células gliales es de inactividad (izquierda). Modificado de Milligan y Watkins (2009).

Cuando la concentración de glutamato se eleva de manera sostenida en el espacio sináptico, la concentración de calcio en la neurona postsináptica aumenta. Este aumento da como resultado una sobrerregulación de la expresión de receptores AMPA

con una variante post transcripcional que modifica un codón que codifica para glutamina (Q) a uno que modifica para arginina (R) en la subunidad GluA2. Este receptor variado, a diferencia del receptor presente fisiológicamente, permite el paso tanto de sodio como de calcio al interior de la neurona postsináptica lo cual perpetúa el ciclo y facilita la transmisión del estímulo doloroso (Wright y Vissel 2012). A este proceso se le conoce como potenciación a largo plazo (LTP) o wind up (Costigan y cols. 2009).

#### **2.1.2.4 Participación de la glía en la transmisión del dolor**

Las células que forman parte del sistema inmune en el SNC son conocidas como células de la glía; siendo la microglia y los astrocitos las más estudiadas. Durante varios años, la función de estas células era considerada exclusivamente como de sostén, sin embargo recientemente se ha mostrado que están encargadas de la regulación de muchos procesos fisiológicos en el sistema nervioso y son parte importante de la fisiopatología del dolor crónico (Austin y Moalem-Taylor 2010).

Las células de la microglía constituyen entre el 5 y el 10 % de las células gliales en el SNC y en situaciones fisiológicas se mantienen en una forma quiescente con un fenotipo no inflamatorio; sin embargo, en presencia de factores inflamatorios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  entre otros) o una excitación neuronal aumentada, este grupo celular se activa participando en la sobreregulación excitadora. Este cambio es relevante en la fisiopatología del dolor ya que se ha mostrado que el bloqueo de este grupo celular atenúa de manera importante la alodinia y la hiperalgesia causadas por el daño de un nervio periférico o una inflamación periférica constante (Mika 2008).

Los astrocitos son la población celular más abundante del SNC y están presentes en todas las sinapsis cumpliendo funciones de mantenimiento, protección y regulación de las mismas. Esto es posible gracias a una complejidad molecular muy grande ya que estas células expresan receptores y/o transportadores para prácticamente todos los neurotransmisores y neuropéptidos implicados en la transmisión neuronal además de

participar en diversos pasos metabólicos importantes para la transmisión sináptica (Austin y Moalem-Taylor 2010).

La importancia de este tipo de células en el dolor radica tanto en su función reguladora de la concentración del glutamato sináptico; así como en la inducción de la liberación de citocinas proinflamatorias acumuladas previamente (como ejemplo IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) y la sobrerregulación de la síntesis de las mismas (Milligan y Watkins 2009).

#### **2.1.2.5 Participación de las citocinas en el dolor**

Como ya se comentó, el sistema inmunológico regula la función de diversos mecanismos neuronales en el cuerpo. Esto se debe principalmente a la liberación de proteínas conocidas como citocinas (Clark y cols. 2013). Estas moléculas, generalmente de tipo protéico, se dividen a grandes rasgos en pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), las prostaglandinas (PG) o la interleucina 1 $\alpha$  (IL1 $\alpha$ ) (Leung y Cahill 2010) y anti-inflamatorias como la interleucina 10 (IL-10) o la 4 (IL4) (Shen y cols. 2013). Su función principal es la de regular a la alta y a la baja en un mecanismo de feedback la respuesta del sistema inmune ante diversos eventos como la necesidad de activar la hemostasia (Margetic 2012) o el ingreso y proliferación de bacterias (Shah y cols. 2017). Sin embargo, su relación con el sistema somatosensorial y su función en el dolor dista mucho de ser exclusivamente en los procesos agudos. Principalmente el feedback entre el TNF $\alpha$  y la IL10 ha mostrado tener una importancia fundamental en la instauración del dolor patológico como se describe más adelante.

El TNF- $\alpha$  es una citocina proinflamatoria que es liberada en situaciones de daño nervioso tanto en la periferia como a nivel central. Se ha demostrado que esta citocina es capaz de alterar las propiedades de las neuronas, incluyendo la generación de disparos ectópicos o la disminución del umbral mecánico en fibras C (Austin y Moalem-Taylor 2010). Otra citocina proinflamatoria que es secretada por varias células del sistema inmune (macrófagos, monocitos o microgía) es la IL-1 $\beta$ . Cuando existe un



daño tisular en el tejido nervioso central o periférico, se induce un aumento en la concentración de mRNA de esta citocina en las células periféricas al tejido dañado; además, su administración tópica, intraperitoneal o subcutánea, produce un efecto hiperalgésico, sugiriendo su participación a nivel neuronal (Thacker y cols. 2007).

La interleucina 10 (IL-10), es una citocina anti-inflamatoria que regula la liberación de citocinas inflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ). De modo que la participación de esta citocina se da en la regulación a la baja del dolor en modelos de dolor inflamatorio y neuropático (Austin y Moalem-Taylor 2010).

Las citocinas proinflamatorias actúan a través de la activación de receptores acoplados a proteínas Gs o Gq, los cuales debido a sus sistemas de segundos mensajeros, activan grupos de proteína cinasas, como la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa C (PKC). También activan a la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), responsable de la liberación de AA desde los fosfolípidos membranales. El papel de este en el dolor es fundamental ya que, como se comentó previamente, el AA es el precursor de la síntesis de PGs. En este sentido la expresión del gen que codifica para la síntesis de la COX-2 en los sitios de inflamación es regulada por las citocinas inflamatorias.

Por otro lado, el TNF- $\alpha$ , no actúa a través de receptores acoplados a proteínas G sino a receptores de tirocina cinasa (TRKs) activando a la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) o la Janus cinasa (JNK). Estas cinasas, además de funcionar como activadores protéicos que permiten la formación de nuevos receptores, pueden fosforilar a los receptores y canales iónicos ya existentes. Esto facilita la apertura de los canales aumentando, finalmente, la probabilidad de apertura de un canal o el tiempo que éste permanece abierto (Basbaum y Bushnell 2008).

### **2.1.3 Vías analgésicas descendentes.**

La regulación del dolor es un proceso necesario para el control y funcionamiento normal de esta sensación. Una vez iniciada la transmisión del estímulo doloroso desde la periferia se activan también diversos mecanismos moduladores desde el SNC que

activa al sistema analgésico descendente. Este tiene tres componentes principales interrelacionados funcionalmente: el opioidérgico, el noradrenérgico y el serotoninérgico. El sistema opioide integrado por los precursores opiáceos y sus respectivos péptidos está presente en la amígdala, el hipotálamo, la sustancia gris periacueductal, el núcleo del rafe magno y el asta posterior. Las neuronas noradrenérgicas se proyectan desde el locus coeruleus y otras células noradrenérgicas hasta el asta posterior, a través del cordón dorsolateral. La estimulación de estas áreas produce analgesia, al igual que la administración directa o intratecal de agonistas de los receptores adrenérgicos  $\alpha$ -2. En el sistema serotoninérgico, las neuronas del núcleo del rafe magno contienen serotonina y envían sus proyecciones a la médula por el cordón dorsolateral. El bloqueo farmacológico o la lesión del núcleo del rafe magno puede reducir los efectos de la morfina y la administración de serotonina en la médula produce analgesia (Serrano-Atero y cols., 2002).

#### **2.1.3.1 Sistema opioidérgico.**

El sistema opioidérgico está distribuido en todo el sistema nervioso, tanto central como periférico y es el principal encargado de la modulación analgésica descendente (Benarroch 2012).

Los receptores opioides están acoplados a proteínas G-i/0 y se dividen en tres familias:  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$ . Los receptores  $\mu$  son codificados por el gen OPRM1 y se encuentran principalmente distribuidos en la corteza cerebral, en el tallo y en las astas posteriores. Los receptores  $\kappa$ , son codificados por el gen OPRK1 y se encuentran distribuidos de manera muy importante en el hipocampo, el estriado, el hipotálamo y en las astas posteriores de la médula. Mientras que, los receptores  $\delta$  son codificados por el gen OPRD1 y se distribuyen en la corteza cerebral, el tálamo, el estriado, y las células de las astas posteriores de la médula (Benarroch 2012).

Estos receptores son activados por opioides endógenos, como la  $\beta$ -endorfina, con particular afinidad a los receptores  $\mu$ ; la encefalina; con afinidad a los receptores  $\delta$  y algunos de los  $\mu$ ; y la dinorfina, con mayor afinidad a los  $\delta$ . Estas moléculas tienen

precursores proteicos de gran tamaño: la proopiomelanocortina, la preproencefalina y, la preprodinorfina, respectivamente (Benarroch 2012).

Recientemente se ha encontrado que la participación del sistema opioidérgico en el control del dolor no solo es a nivel central sino también a nivel periférico. Algunos estudios indican que los receptores opioides se encuentran expresados en neuronas periféricas pero que se encuentran inactivos en circunstancias basales; sin embargo, cuando existe un proceso inflamatorio en el área circundante, este sistema se activa y aumenta tanto la función antinociceptiva como la respuesta del sistema inmune (Benarroch 2012).

### **2.2.3.2 Sistema adrenérgico**

La noradrenalina, debido a la actividad de sus receptores y la localización de los mismos, es uno de los mecanismos analgésicos descendentes con más eficacia para el dolor agudo en situaciones de estrés, sin embargo, este sistema sufre cambios fundamentales en casos de dolor patológico (Pertovaara 2013). Como todo sistema de neurotransmisores clásicos, la regulación del proceso cognitivo del dolor del sistema adrenérgico depende de la localización y el tipo de sus receptores. Por ejemplo, en una situación fisiológica, el tipo de receptor cuya expresión es más común en la médula es el tipo  $\alpha$ -2, un receptor acoplado a proteína  $G_i$ , por lo que la presencia de noradrenalina sería analgésica (Pertovaara 2013).

Sin embargo, en situaciones patológicas como un daño nervioso periférico los receptores  $\alpha$ 2 pueden acoplarse a canales de  $Ca^{++}$  tipo N, causando por tanto potenciales ectópicos en nervios periféricos. Por otro lado, el daño o la inflamación han mostrado también causar cambios en la expresión de receptores adrenérgicos alterando la expresión de receptores  $\alpha$ 2 y aumentando la expresión de  $\alpha$ 1, receptores acoplados a proteína  $G_q$  que son capaces de aumentar la función proalgésica de esa neurona (Pertovaara 2013).

### **2.2.3.3 Sistema serotoninérgico**

La serotonina (5-hidroxitriptamina o 5HT) es un neurotransmisor monoaminérgico ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y en la periferia de los mamíferos. La función moduladora de este neurotransmisor se da a razón de la proyección córtico-medular hacia el área rostro ventro medial (RVM) un sitio ampliamente reconocido por su actividad analgésica (Bardin 2011). Estudios recientes han demostrado que la actividad analgésica o antihiperalgésica de este neurotransmisor está mediada por los receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en la médula tanto en dolor mecánico como en térmico (Sommer 2004; Bardin 2011).

Es importante mencionar que el papel de la serotonina en la modulación del dolor es compleja ya que su presencia puede resultar tanto pronociceptiva como antinociceptiva dependiendo del tiempo y su localización. Por ejemplo, cuando la serotonina es liberada en la periferia, en combinación con mediadores inflamatorios, la serotonina excita y sensibiliza las aferentes primarias (Sommer 2004). Por otro lado, cuando se administran agonistas selectivos de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 1B en la médula espinal induce efectos antinociceptivos en dolor mecánico. (Bardin y cols. 2000)

#### **2.2.3.4 Sistema dopaminérgico**

Además de los neurotransmisores mencionados, existen otros neurotransmisores involucrados en las vías analgésicas descendentes, como el sistema dopaminérgico. La dopamina es una catecolamina que participa en las funciones involucradas con el movimiento (Cenci 2007), la cognición (Nieoullon 2002) y el sistema de recompensa (Leknes y Tracey 2008); sin embargo, su función en el dolor ha sido reconocida y probada ampliamente en diversos estudios científicos (Wood 2008). Las neuronas dopaminérgicas tiene proyecciones tanto a la médula espinal como a la corteza cerebral (Hokfelt y cols. 1979).

Existen 5 subtipos de receptores dopaminérgicos numerados del 1 al 5, todos ellos acoplados a proteínas G (Cenci 2007; Wood 2008). Los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub> son miembros de una subfamilia denominada D<sub>1</sub> ya que son receptores acoplados a

proteínas Gs; mientras que, los receptores D2, D3 y D4 forman la familia denominada D2 y están acoplados a proteínas Gi/0 (Bjorklund y Dunnett 2007; Wood 2008).

Se ha demostrado que este neurotransmisor produce un efecto analgésico o antihiperálgico en distintos niveles como en la corteza anterior del cíngulo (Lopez-Avila y cols. 2004), o en la médula espinal (Tamae y cols. 2005), a través de la activación de la subfamilia de receptores D2.

## **2.2 Tratamiento farmacológico del dolor**

Considerando que el dolor es un síntoma que acompaña a muchas de las patologías clínicas y que cuando se convierte en patología puede comprometer la calidad de vida de los pacientes que lo padecen, se ha realizado un gran esfuerzo a lo largo de por lo menos 50 años en busca de tratamientos para su alivio (Kissin 2010).

La adecuada elección del tratamiento en la clínica no es fácil, ya que involucra diversos factores como el tipo de dolor, su intensidad, la patología que lo está generando; así como el tipo de paciente. Además, existen diversas opciones farmacológicas y/o no farmacológicas para su alivio. Entre las opciones farmacológicas encontramos a los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), analgésicos opioides y adyuvantes analgésicos. Sin embargo, los medicamentos clínicamente disponibles para el tratamiento del dolor producen efectos adversos que limitan su uso a largo plazo.

### **2.2.1 Analgésicos Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)**

Los AINES son un grupo de fármacos utilizados para el alivio del dolor leve a moderado; además, producen efectos antiinflamatorios, antipiréticos y antiplaquetarios. El prototipo de este grupo es el ácido acetilsalicílico (Dray 1995), pero también pertenecen a él fármacos como el naproxeno, el diclofenaco, el ketorolaco, el ketoprofeno, la indometacina, el ibuprofeno y el metamizol, entre otros. Todos ellos producen su efecto analgésico por la inhibición de la ciclooxigenasa (COX) que, como se mencionó anteriormente, es la responsable de la síntesis de prostaglandinas,

mediadores importantes para la transmisión del dolor (Gan 2010). Sin embargo, también producen efectos adversos que limitan su utilidad clínica, como ulceración gastrointestinal, daño renal y problemas cardiovasculares. La diferencia en la eficacia analgésica, así como la intensidad en los efectos adversos de los diferentes AINEs; se debe en parte, a su perfil de inhibición de las dos isoformas existentes de la COX, la COX-1 y la COX-2. En este sentido, los efectos analgésicos de estos fármacos se atribuyen a la inhibición de la COX-2; mientras que, sus efectos adversos a la inhibición de la COX-1. Es por eso que para tratar de evitar los efectos adversos de las AINEs, se sintetizaron moléculas más selectivas para la inhibición de la COX-2, como el celecoxib y el rofecoxib; aunque con su uso clínico a largo plazo se ha demostrado una limitada eficacia analgésica (Saraf 2008). A pesar de los efectos adversos que producen, los AINEs tradicionales continúan siendo los analgésicos más utilizados por recomendación de la OMS desde 1986 (Ballantyne y cols. 2016) por su bajo costo y por su fácil acceso (Ussai y cols. 2015).

### **2.2.2 Analgésicos opioides**

Los analgésicos opioides son un grupo de fármacos utilizados para el alivio del dolor de moderado a severo cuyo prototipo farmacológico es la morfina. A este grupo también pertenecen la buprenorfina, la oxicodona, la metadona, el fentanilo, la pentazocina y el tramadol, entre otros. A pesar de su efectividad, su uso está relacionado a la aparición de diversos efectos adversos como náuseas, vomito, estreñimiento, prurito, hipotensión, depresión respiratoria, sedación, alucinaciones, convulsiones y dependencia física, entre otros. También, con la administración repetida de estos fármacos se produce tolerancia a su efecto analgésico, pero no a la depresión respiratoria que desarrollan los pacientes y esto les podría ocasionar la muerte (McMahon y cols. 2013).

Las moléculas opioides son agonistas a los receptores opioides  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$ ; descritos previamente, que están acoplados a una proteína  $G_i$ . El efecto analgésico de este grupo de fármacos se debe a la activación de estos receptores, que a nivel

presinápticos, inhiben la formación de AMPc induciendo el cierre de canales de calcio voltaje dependientes y reducen la liberación de neurotransmisores del dolor, como la sustancia P; además, a nivel post-sináptico, hiperpolarizan a las neuronas por apertura de canales de K<sup>+</sup>. Estos eventos ocasionan un incremento en el umbral de excitación de las neuronas produciendo analgesia.

Estas moléculas pueden clasificarse a su vez en opioides débiles como la codeína y opioides fuertes como la morfina. Cada molécula de este grupo tiene diferente afinidad a los receptores a opioides; por ejemplo, la morfina es un potente agonista  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  mientras que la buprenorfina es un agonista parcial  $\mu$  y un antagonista  $\kappa$ . Sus diferencias les proveen de capacidades analgésicas distintas por lo que, a pesar de pertenecer al mismo grupo farmacológico, su utilidad clínica para el alivio dolor es muy variable (McMahon y cols. 2013)

A pesar de sus efectos adversos, el uso de los opioides está muy extendido en el mundo, de modo que su uso clínico incluye patologías terminales como el cáncer y algunas patologías que involucran dolor crónico como las compresiones radicales (Pedersen y cols. 2014).

### **2.2.3 Adyuvantes analgésicos**

Este grupo se compone de todos aquellos medicamentos que, por su mecanismo de acción, interfieren en las vías de dolor y/o activan a la vía analgésica descendente, produciendo un efecto analgésico, pero son utilizados clínicamente para otro propósito terapéutico, tal como los antidepresivos, como la amitriptilina y la duloxetina; y los anticonvulsivos, como la gabapentina y la pregabalina. En general, este tipo de fármacos ha mostrado utilidad clínica en el alivio de dolor neuropático de diversos orígenes, que, como se mencionó previamente, es un dolor crónico difícil de aliviar.

Por un lado, la amitriptilina y la duloxetina, por ser inhibidores de la recaptura de serotonina y noradrenalina, incrementan los niveles de estos neurotransmisores en el SNC, activando la vía analgésica descendente. Mientras que, la gabapentina y la

pregabalina son medicamentos que tienen un efecto inhibitor de la liberación de glutamato ya que bloquean de manera parcial los canales de calcio voltaje dependientes de las neuronas presinápticas, disminuyendo la frecuencia de disparo de las neuronas centrales, bloqueando así la transmisión y la percepción del dolor (Kukkar y cols. 2013). Se ha mostrado evidencias de que estos medicamentos tienen un efecto analgésico muy importante y han mostrado tener un efecto sinérgico con algunos otros fármacos como la morfina en situaciones experimentales (Papathanasiou y cols. 2016). Además, por su eficacia y su bajo costo, la gabapentina se considera uno de los mejores fármacos para el tratamiento de dolor neuropático a nivel clínico.

A pesar de la amplia variedad de fármacos disponibles para el tratamiento de diferentes tipos de dolor, su control dista mucho de ser ideal, quizá por la amplia variedad de mecanismos involucrados en su patogenia. Con base en esto, se continúa con la búsqueda de moléculas clínicamente útiles que ofrezcan alternativas terapéuticas para el tratamiento del dolor, que estén enfocadas en la modulación de los factores alterados en la relación neuroglial (Richner y cols. 2016).

#### **2.2.4 Nuevas aproximaciones**

En este sentido, y tomando en cuenta la participación del glutamato en el dolor crónico, la búsqueda de un tratamiento que disminuya los niveles de glutamato en el espacio sináptico ha sido parte importante de la investigación en esta dirección en los últimos años. Algunos autores han sugerido a las moléculas betalactámicas como alternativas en el tratamiento del dolor, ya que se ha demostrado su capacidad para incrementar la expresión de los transportadores GLT-1 presentes en la glía, que, como ya se mencionó, se encargan de la recaptura del glutamato para su metabolismo (Rothstein y cols. 2005).

#### **2.3 Moléculas betalactámicas**



Las moléculas betalactámicas son una familia de fármacos que comparten en su estructura química un anillo betalactámico (Suarez y Gudiol 2009). Este anillo es una amida cíclica de cuatro lados y es llamada betalactámico por la unión de un nitrógeno con una molécula de carbono beta junto a un grupo carbonilo (Fig. 4). El representante de este grupo es la penicilina que fue originalmente aislada del hongo *Penicillium notatum* y utilizada como antibiótico. Se ha demostrado que el anillo betalactámico es el responsable del efecto antibacteriano de este grupo de fármacos y que su inactivación, equivale a la pérdida de su actividad (Suarez y Gudiol 2009). Ese es, de hecho, el blanco del mecanismo de resistencia a los antibióticos que algunas bacterias han desarrollado, ya que las bacterias producen una enzima llamada betalactamasa que rompe el anillo betalactámico inactivándolo y provocando que pierdan su eficacia antibiótica (Ellerbrok y Hakenbeck 1988).

Los betalactámicos están conformados por al menos 5 grupos estructuralmente relacionados: las penicilinas, las cefalosporinas, los carbapenémicos, los monobactámicos y los inhibidores de las betalactamasas (Suarez y Gudiol 2009). Cada fármaco de los diferentes grupos tiene espectros antimicrobianos variables; sin embargo, los inhibidores de las betalactamasas tienen un espectro antibacteriano muy limitado y carece de eficacia clínica; aunque se utiliza en la clínica para incrementar la actividad antibiótica de la amoxicilina, una penicilina semisintética (Suarez y Gudiol 2009).

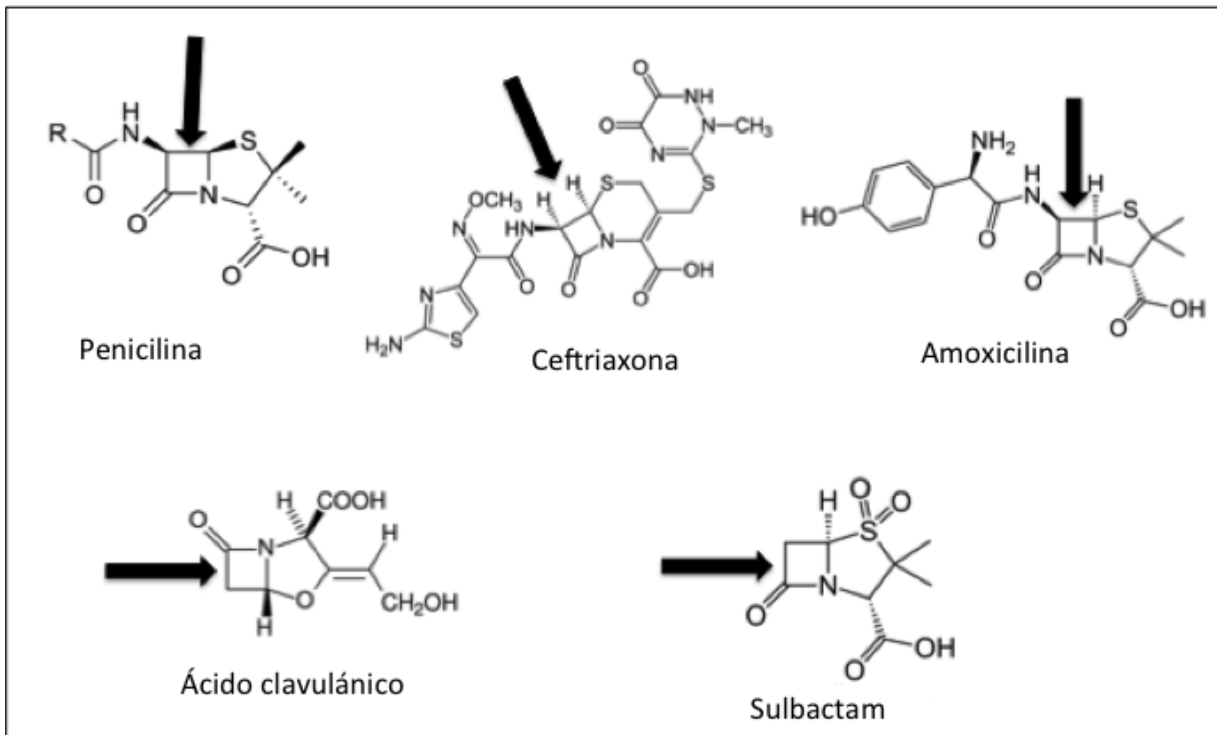


Fig. 4. Estructura química de algunas moléculas betalactámicas. La flecha señala el anillo betalactámico

Rothstein y cols. (2005) realizaron un cernimiento farmacológico de 1060 fármacos (aprobados por la FDA para diversas indicaciones terapéuticas) en la búsqueda de moléculas capaces de aumentar de manera significativa la expresión de los recaptadores GLT-1 en los astrocitos y encontraron que algunas moléculas con anillo betalactámico como la penicilina y la ceftriaxona incrementaron hasta 6 veces la expresión de las proteínas que sintetizan a los transportadores GL-1 en los astrocitos de humanos y ratas 8 horas después de su administración (Rothstein y cols. 2005).

La consecuente disminución en las concentraciones de glutamato en la sinapsis neuronal inducida por estos fármacos ha sido motivo de diversos estudios en los últimos años. Por ejemplo, varios de ellos se han enfocado en el estudio de la capacidad de la ceftriaxona para cambiar o modular diversos estados patológicos, como en el aumento de la supervivencia neuronal y la disminución de la respuesta glial (Yamada y Jinno 2011), así como sus propiedades antiepilépticas (Goodrich y cols. 2013), neuroprotectoras (Rothstein y cols. 2005) y antihiperalgésicas (Hu y cols. 2010).

Casi todos los estudios se han enfocado a la ceftriaxona; sin embargo, otra molécula con anillo betalactámico como el ácido clavulánico ha demostrado también actividad ansiolítica (Kim y cols. 2009), antiinflamatoria (Banani y cols. 2012), neuroprotectora (Kost y cols. 2012), antiepiléptica (Rawls y cols. 2010b) y de facilitación de la liberación de dopamina (Kost y cols. 2011) y serotonina (Kim y cols. 2009) en el SNC.

### **2.3.1 Ceftriaxona (CFX)**

La ceftriaxona (CFX) es una molécula que forma parte de un grupo de betalactámicos que fueron inicialmente aislados de una cepa de *Cephalosporium acremonium* a la que originalmente llamaron Cefalosporina C (Abraham y Newton 1961). Esta molécula posee un núcleo conocido como 7-aminocefalosporinico además del anillo betalactámico y tiene una farmacocinética particular ya que se debe administrar parenteralmente debido a que no se absorbe por vía digestiva. Su tiempo de vida media es de aproximadamente de 6 horas con una eliminación renal de hasta 399 ml/hr, haciendo de este fármaco uno con un tiempo de vida media prolongado y uno de los más utilizados en la clínica (Yuk y cols. 1989) Se une ampliamente a las proteínas plasmáticas y se distribuye en la mayor parte de los órganos. En situaciones fisiológicas, solo el 1% de la concentración de CFX sérica atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE); sin embargo, en situaciones de meningitis bacteriana el porcentaje puede subir hasta un 94% (Nau y cols. 2010) Una parte del fármaco se excreta por filtración glomerular y otra a través de la bilis.

### **2.3.2 Ácido clavulánico (AC).**

El ácido clavulánico (AC) fue aislado por primera vez de un cultivo de *Streptomyces clavuligerus* en el último tercio del siglo pasado (Reading y Cole 1977). Aunque por sí mismo su efecto antibiótico ha resultado muy pobre, su efecto como inhibidor de la  $\beta$ -lactamasa ha permitido que se combine con otros antibióticos, como la amoxicilina, para favorecer el efecto antibiótico de la penicilina. Debido a esto, a lo largo de los años, el CA ha sido utilizado en combinación con otras BLMs como la amoxicilina o la ticarcilina (Saudagar y cols. 2008). Los parámetros farmacocinéticos de esta molécula

son muy particulares. Su tiempo de vida media aproximado es de 1 hora, haciendo que sea relativamente corto comparado con otros BLMs, a pesar de esto, su efecto sobre las  $\beta$ -lactamasas es suficiente para potenciar la función antibiótica de la amoxicilina. Por otro lado, su paso por la BHE es relativamente alto con un 25% de la concentración sérica pasando a líquido cefalorraquídeo (Munch y cols. 1981; Adam y cols. 1982)

### **2.3.3 Evidencias de la eficacia de algunas moléculas betalactámicas en el tratamiento del dolor**

La primera aproximación experimental al efecto de estos fármacos en el proceso doloroso se dio por Hu y cols. (2010), donde mostraron la función antihiperálgica de la ceftriaxona a una dosis de 200 mg kg de peso en un modelo de constricción nerviosa de Bennett en ratones (Hu y cols. 2010).

De manera interesante, en la clínica ya se han reportado resultados que sugieren el efecto analgésico de la administración crónica de diferentes betalactámicos en dolor por artritis reumatoide (Caperton y cols. 1990), síndrome doloroso regional complejo (Ware y Bennett 2014) y lumbalgia crónica (Albert y cols. 2013). A nivel preclínico, utilizando modelos experimentales se ha demostrado el efecto analgésico de la ceftriaxona en dolor de tipo neuropático crónico (Hu y cols. 2010), visceral (Lin y cols. 2011a) e inflamatorio agudo (Stepanovic-Petrovic y cols. 2014). Ha sido tal la importancia de estos hallazgos que se han iniciado estudios clínicos en pacientes con dolor postoperatorio (Macaluso y cols. 2013) con resultados alentadores.

### **3. Planteamiento del problema**

A pesar de la información disponible sobre la eficacia analgésica de la ceftriaxona y el ácido clavulánico en algunos modelos experimentales de dolor, no se conoce con precisión el mecanismo de acción responsable del efecto analgésico producido por estas moléculas. Además, como ya se mencionó, la mayoría de los estudios experimentales involucran la administración crónica de los betalactámicos, pero poco de ellos se han enfocado a determinar su efectividad en administración aguda para el alivio del dolor de diferentes orígenes como el neuropático y/o el inflamatorio.

Además, tampoco se ha explorado si existe una relación en la eficacia analgésica de los betalactámicos y la modulación de las interleucinas en el dolor neuropático e inflamatorio.

### **4. HIPÓTESIS**

La ceftriaxona y el ácido clavulánico producirán efectos antinociceptivos comparables en un modelo de dolor inflamatorio y en uno de dolor neuropático que estarán relacionados con una disminución en la concentración sérica de TNF- $\alpha$  y un incremento en la concentración de interleucina 10.

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1. Objetivo general**

Determinar el efecto antinociceptivo de la ceftriaxona y ácido clavulánico en el dolor inflamatorio y neuropático y su correlación con factores pro y anti inflamatorios

#### **5.2. Objetivos particulares**

5.2.1. Determinar el efecto antinociceptivo de la ceftriaxona en un modelo de dolor neuropático y su correlación con TNF- $\alpha$  e IL10

5.2.2 Determinar el efecto antinociceptivo del ácido clavulánico en un modelo de dolor neuropático y su correlación con TNF- $\alpha$  e IL10

- 5.2.3 Determinar el efecto antinociceptivo de la ceftriaxona en un modelo de dolor inflamatorio y su correlación con TNF- $\alpha$  e IL10.
- 5.2.4 Determinar el efecto antinociceptivo del ácido clavulánico en un modelo de dolor inflamatorio y su correlación con TNF- $\alpha$  e IL10.
- 5.2.5 Comparar el efecto antinociceptivo de la ceftriaxona y del ácido clavulánico en dolor inflamatorio y neuropático.
- 5.2.6 Comparar la concentración de interleucinas en ausencia y presencia de la ceftriaxona y del ácido clavulánico en dolor inflamatorio y neuropático.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Animales**

Se utilizaron ratas Wistar macho con peso entre 300 y 350 g, los cuales fueron alojados bajo condiciones estandarizadas en un cuarto con ciclo de luz oscuridad de 12 horas con agua y alimentación ad libitum. Todos los procedimientos experimentales se realizaron siguiendo las guías de manejo de animales de la NOM-062-ZOO-1999 y los estándares éticos para investigaciones de dolor experimental en animales concientes dados por la IASP (Zimmermann 1983) en las instalaciones del laboratorio de Desarrollo de Medicamentos del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. El número de animales y la cantidad de estímulos nociceptivos utilizados fueron los mínimos indispensables para demostrar un efecto consistente de los tratamientos utilizados.

### **6.2. Fármacos y reactivos**

La ceftriaxona se compró de Laboratorios Pisa (Mexico), el ácido clavulánico, el diclofenaco y la gabapentina se compraron de Sigma Aldrich, (Alemania). Todos los fármacos fueron preparados el día del experimento en solución salina (0.9% NaCl) en un volumen de 1 ml/kg de peso de rata y fueron administrados por vía intraperitoneal (i.p.).

Para la cirugía de la constricción nerviosa se anestesió a los animales con una mezcla de ketamina (80 mg/Kg) (Anesket, laboratorio Pisa, México) con xilazina (12.6 mg/Kg) (Sigma Aldrich, Alemania).

Para inducir el dolor inflamatorio se utilizó una dilución de carragenina al 2% (Sigma Aldrich, Alemania) en solución salina y para inducir la alodinia térmica se utilizó acetona 90-100% (Avantor J.T. Baker, P.A. Estados Unidos). Para sacrificar a los animales se utilizó una sobre dosis de pentobarbital sódico (Pisabental, Pisa, México).

### **6.3. Modelo de dolor neuropático por constricción nerviosa del nervio ciático (CCI)**

Para inducir el dolor neuropático se utilizó el modelo de contricción nerviosa del nervio ciático (CCI, por sus siglas en inglés) descrito por Bennett y Xie (1988). Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina/xilazina (80/12.6 mg/kg) y se les realizó una incisión en el muslo de la pata derecha para exponer el nervio ciático. Se disecó el nervio en el área cercana a la trifurcación ciática y se ligó suavemente con sutura catgut 3-0 en cuatro segmentos con una separación de 0.2 cm entre cada uno (Fig. 5). Posteriormente se suturó la piel con sutura de nylon -00 y la rata fue colocada en su caja para su recuperación. Al grupo SHAM se le realizó el mismo procedimiento quirúrgico, pero sin ligar el nervio ciático. Todos los procedimientos se realizaron por la misma persona bajo condiciones estándar de desinfección.

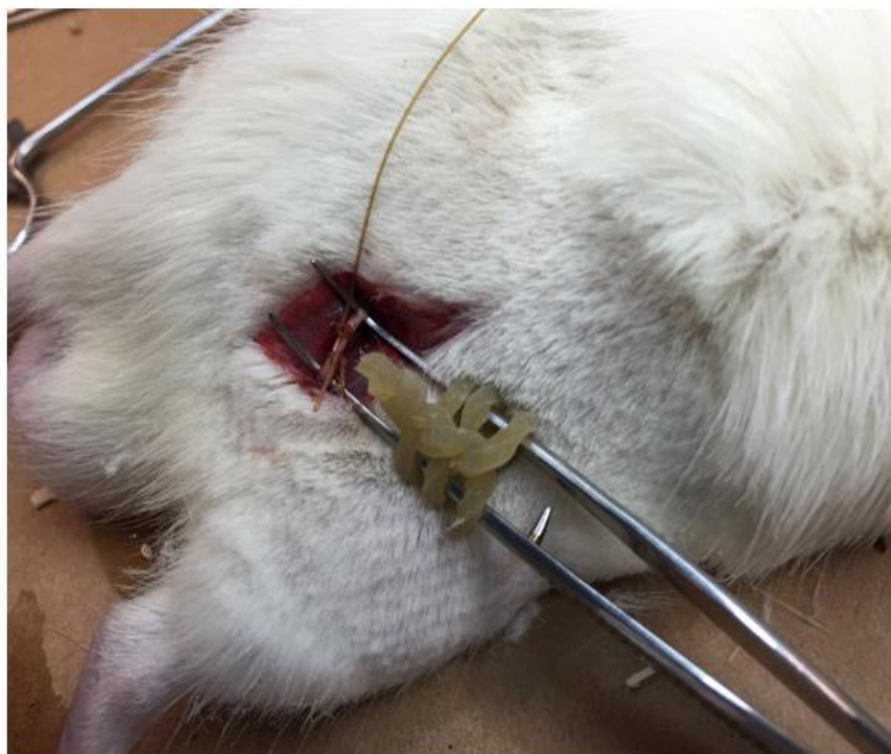


Fig. 5. Modelo de constricción nerviosa del nervio ciático de Bennett.

#### **6.4. Modelo de dolor inflamatorio con carragenina**

El dolor inflamatorio se indujo con la administración de 0.25 mL de carragenina al 1% por vía intraplantar en el dorso de la pata posterior derecha, justo en la subdermis de la planta de la pata evitando lesionar el hueso o tejido muscular. En esta prueba se determinó tanto el edema inducido por la carragenina, como las respuestas dolorosas.

El edema se determinó usando un pletismómetro. Para esto, la pata posterior derecha de cada animal se sumergió hasta la altura de la articulación calcáneo-tibial en el depósito lleno de líquido del pletismómetro (Ugo Basile, Italia). El volumen desplazado de cada pata fue registrado por triplicado y se toma un promedio de las tres mediciones (Vazquez y cols. 2015). 5 minutos después, se determinó la alodinia mecánica y la alodinia térmica, como se describe en los párrafos siguientes.



Los tratamientos a evaluar se administraron 30 minutos después de la carragenina y se determinó su efecto antiinflamatorio con el pletismómetro y su efecto analgésico utilizando las pruebas conductuales de alodinia mecánica y térmica.

## **6.5. Modelos conductuales de dolor neuropático**

### **6.5.1. Determinación de la alodinia mecánica**

Para determinar la alodinia mecánica se utilizaron una serie de filamentos de nylon calibrados según la fuerza aplicada, conocidos como Filamentos de Von Frey. Para esto, las ratas se colocaron en compartimentos individuales de acrílico sobre una malla metálica de 6 mm, para permitir el paso de los filamentos; donde permanecieron para su adaptación al menos 10 minutos antes de la prueba. Los filamentos se aplicaron perpendicularmente a la superficie plantar de la pata derecha de los animales con fuerza suficiente hasta que se dobla ligeramente durante 1 segundo (Fig. 7). La estimulación de cada animal se inició con los filamentos en orden creciente con un intervalo de estimulación de 5 minutos. El estímulo se inició con un filamento de 1 gr (aplicado 5 veces con 30 segundos de intervalo entre cada aplicación). Se consideró una respuesta dolorosa cuando los animales retiraron abruptamente la pata ante el estímulo con un solo filamento en 3 de 5 ocasiones, en caso contrario se utilizó el filamento inmediato superior. El filamento de corte fue el de 15 g para evitar daño al tejido. De las cinco mediciones en cada animal se calcularon la medias de los gramos de fuerza a los que presentó la respuesta dolorosa.



Fig.6 . Pletismómetro para medir el edema por desplazamiento de volúmen.

Después de tomar la lectura basal en todos los grupos experimentales, se administró el tratamiento a evaluar y se determinó la alodinia mecánica bajo el mismo procedimiento cada 30 minutos durante 4 horas.

Para la evaluación de dolor neuropático, en los animales expuestos a cirugía del nervio ciático, la alodinia mecánica se realizó el día 12 posterior a la cirugía; mientras que para la evaluación del dolor inflamatorio, la alodinia mecánica se realizó 30 minutos después de la administración de la carragenina.



Fig.7 Aplicación de los Filamentos de Von -Frey para la determinación de la alodinia mecánica.

### **6.5.2. Determinación de la alodinia térmica**

Para medir la alodinia térmica al frío a los mismos grupos experimentales se les aplicó 0.1 ml de acetona a la planta de la extremidad posterior derecha (con cirugía) (Fig. 8) a los 60, 120 y 180 minutos después de la administración de los diferentes tratamientos. La aplicación de la acetona se realiza inmediatamente después de la segunda, cuarta y sexta pruebas con los filamentos de von Frey, cuando la rata permanece inmóvil o en acicalamiento. En esta prueba se registró el tiempo que la pata permaneció levantada después de la aplicación de la acetona y se promedió entre grupos (Decosterd y Woolf 2000; Hulse y cols. 2012).

### **6.6. Determinación de los niveles sanguíneos de interleucinas**

Se obtuvieron muestras sanguíneas de tres animales de cada grupo a través de una punción abdominal 3 horas después de la administración de cada tratamiento, justo al término de la evaluación conductual. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min y se separó el suero en viales plásticos para su almacenamiento en el congelador a -20°C, hasta la determinación de las citocinas.



Fig. 8. Aplicación de acetona para la determinación de la alodinia al frío.

Para determinar la concentración de las citocinas en las muestras sanguíneas, se realizó un ensayo inmunoenzimático (Protocolo de ELISA) para lo cual se utilizaron Kits prefabricados de la marca Abcam (TNF: Abcam ab46070 e IL10: Abcam 100764, Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. De manera breve, una vez abierto el kit y teniendo los agentes reactivos a temperatura ambiente, se diluyó el buffer estándar en agua destilada en una concentración 1/10 y el buffer de lavado a una concentración de 1/200. Los anticuerpos biotinylados fueron preparados inmediatamente antes de su uso a razón de 240  $\mu$ l de anticuerpo diluido en 6,360  $\mu$ l de diluyente en el caso de TNF- $\alpha$  y de 60  $\mu$ l de una dilución de 100 ng/ml de anticuerpo en 940  $\mu$ l de diluyente para la IL-10.

Posteriormente se colocaron 100  $\mu$ l de cada dilución estándar junto con la muestra de suero y se incubó a temperatura ambiente durante 2.5 horas. Se desechó la solución y se realizaron 4 lavados con 300  $\mu$ l de la solución indicada en las instrucciones. Inmediatamente después se agregaron 100  $\mu$ l del anticuerpo de detección y se incubó

1 hora a temperatura ambiente en constante movimiento. Se realizaron nuevamente 4 lavados y posteriormente se colocaron 100 µl de solución HRP estreptavidina a cada pozo y se incubó por 45 minutos. Inmediatamente después se realizaron lavados y al término se colocaron en cada pozo 100 µl de solución TMB dejando un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en obscuridad total. Por último se aplicó la solución de paro a cada pozo y se leyó en el espectrofotómetro a un espectro de onda de 450 nm.

La concentración de citocinas se expresó en las gráficas como picogramos de antígeno por mililitro de suero (pg/mL).

### **6.7. Diseño experimental**

Para la determinación del dolor neuropático se formaron nueve grupos experimentales: tres con ceftriaxona (CFX, 100, 200 y 400 mg/kg), tres con ácido clavulánico (CA) (0.1, 1.0 y 10 mg/kg), uno con gabapentina (GAP, 10 mg/kg) como control positivo, uno con solución salina (vehículo) y un sham, con una n=8 para cada grupo. Todos los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal 12 días después de la cirugía de la constricción del nervio ciático (CCI), y se determinó la alodinia mecánica y la alodinia térmica como se describió previamente.

Para la determinación del dolor inflamatorio se formaron otros cinco grupos experimentales: uno con CFX (200 mg/kg), uno con CA (10 mg/kg), uno con diclofenaco (10 mg/kg) como control positivo, uno con solución salina (vehículo) y uno sin tratamiento (SHAM), con una n=8 para cada grupo. Todos los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal 30 minutos después de la administración de carragenina, excepto el grupo sham, como se describió previamente.

Se determinaron las concentraciones de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-10) en las muestras sanguíneas obtenidas de los diferentes grupos experimentales en animales con dolor neuropático y en animales con dolor inflamatorio.

### **6.8. Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos se utilizó el programa Graphpad (versión 7.0) y se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) de medidas repetidas con un post hoc de Dunnet

siendo el control el grupo CCI o CARR respectivamente. Se consideró significativo una  $p < 0.05$ .

Para la medición de alodinia mecánica se analizó el PWT de cada grupo a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos. Todos los resultados se expresan como la media en gramos  $\pm$ S.E.

Para la medición de la alodinia térmica se analizó el PPT de cada grupo a los 60, 120 y 180 minutos. Todos los resultados se expresan como la media en segundos  $\pm$ S.E.

Para la medición de inflamación se realizó la medición a las 0, 3, 24 y 48 horas. Todos los resultados se expresan como la media de volumen en CC  $\pm$ S.E.

Para la medición de TNF $\alpha$  e IL10 en dolor neuropático se realizó la medición al término del experimento conductual. En el modelo de carragenina se obtuvieron muestras a las 3, 24 y 48 hrs. Todos los resultados se expresan como la media en pg/ml  $\pm$ S.E.

## **7. Resultados**

### **7.1 Efecto de la CFX y el CA en el dolor neuropático.**

#### **7.1.1. Alodinia mecánica**

Doce días después de la cirugía de la constricción del nervio ciático (CCI), los animales con dolor neuropático desarrollaron una respuesta alodínica por debajo de 4 gramos al estímulo mecánico con los Filamentos de von Frey. El umbral de retirada de la pata (PWT, por sus siglas en inglés: paw withdrawal threshold) disminuyó significativamente desde 15 g el día cero (antes de la cirugía) a  $3.18 \pm 0.56$  g después de la cirugía en los animales del grupo CCI. Por el contrario, los animales del grupo sham no mostraron ninguna respuesta de retirada ni con el filamento de 15 g, que se tomó como el punto de corte de la prueba. Por otro lado, la gabapentina (GAP), utilizada como control positivo, indujo un efecto antialodínico desde los 30 minutos de la prueba, incrementando el PWT con relación al grupo CCI ( $9.0 \pm 0.53$  vs  $3.18 \pm 0.55$  g,  $P < 0.05$ ). El máximo efecto antialodínico de la GAP se obtuvo a los 60 minutos de su administración ( $12.5 \pm 0.94$  g), y permaneció prácticamente sin cambios durante los siguientes 120 minutos de la prueba. Los PWTs de los grupos sham y GAP mostraron

diferencias significativas en comparación con el grupo CCI desde los 30 min de la prueba (Fig. 9).

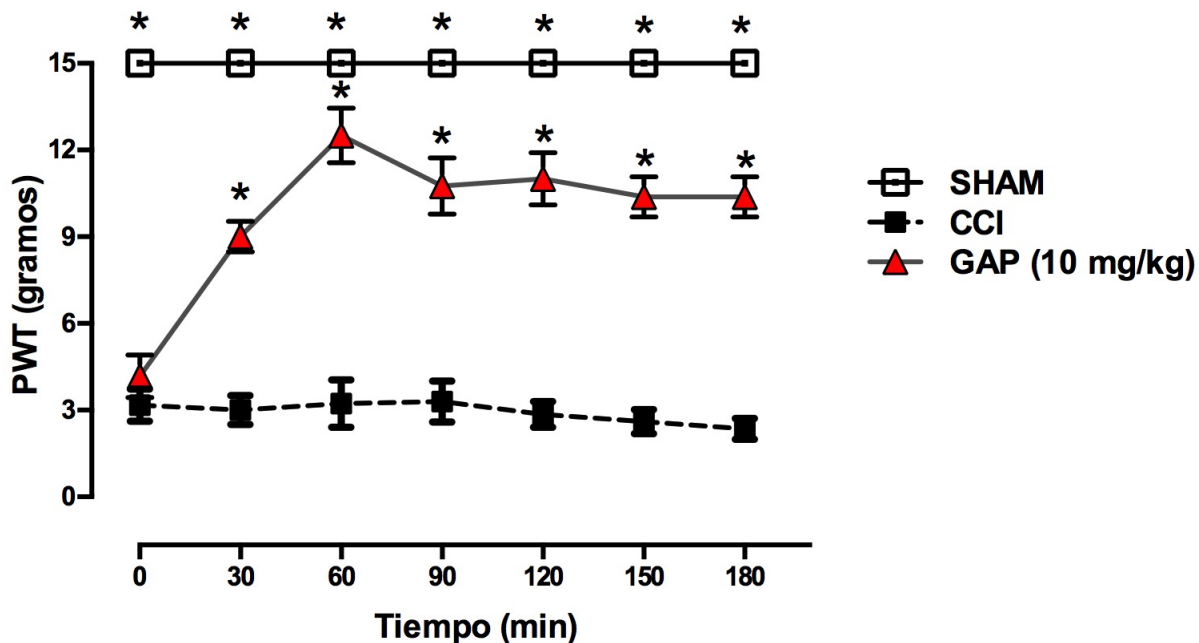


Fig. 9. Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por los Filamentos de Von Frey en el modelo de constricción del nervio ciático (CCI) en ausencia y en presencia de gabapentina (GAP). También se muestran los valores del grupo SHAM. En todos los casos se presentan las medias  $\pm$  error estándar de 8 ratas por grupo. \* $p < 0.05$  en comparación con grupo CCI (ANOVA de dos vías seguido por post hoc de Dunnett).

El análisis del área bajo la curva (ABC) de PWT en el grupo CCI fue significativamente menor que el del grupo sham ( $8.9 \pm 1.4$  vs  $45 \pm 0$  ABC,  $p < 0.05$ ) mientras que el grupo GAP mostró un incremento significativo del ABC en comparación con el grupo CCI ( $30.45 \pm 1.3$  vs  $8.9 \pm 1.4$  ua,  $P < 0.5$ ). El efecto antialodínico global de GAP correspondió a 67.7 % tomando el valor de ABC del grupo sham como el 100%.

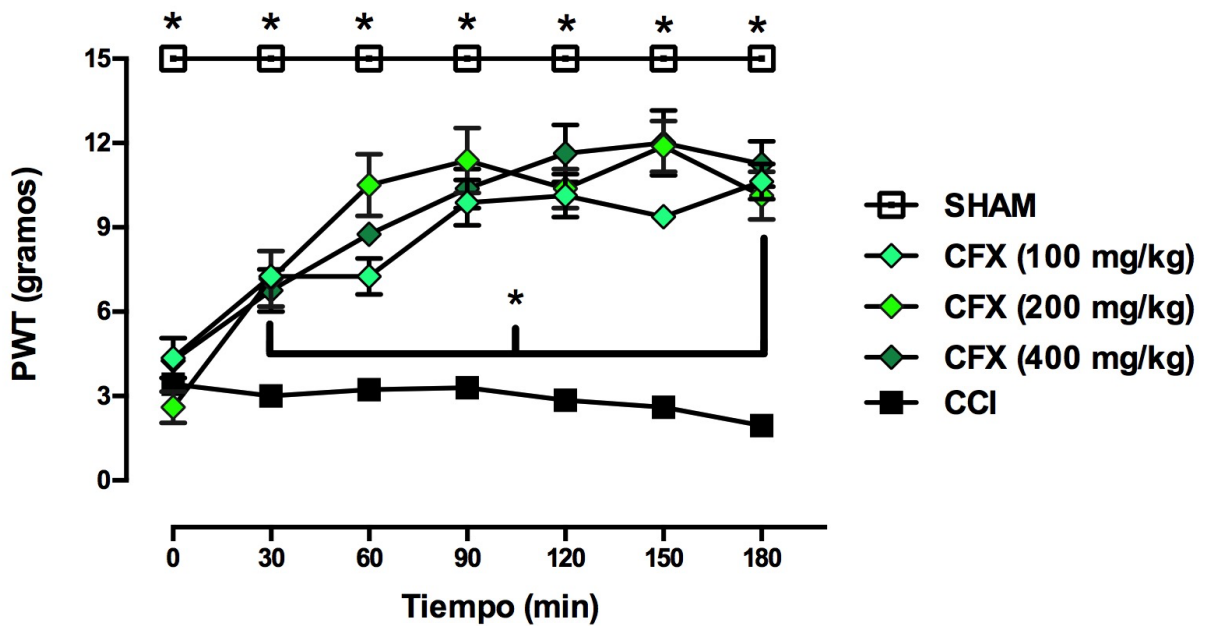


Fig. 10.- Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por los Filamentos de Von Frey en el modelo de constricción del nervio ciático (CCI) y el efecto antialodínico de la administración de CFX (100, 200 y 400 mg/kg). También se muestran los valores del grupo SHAM. En todos los casos se presentan las medias  $\pm$  error estándar de 8 ratas por grupo. \* $p < 0.05$  en comparación con grupo CCI (ANOVA de dos vías seguido por post hoc de Dunnett).

De modo similar, todas las dosis de CA (0.1, 1 and 10 mg/kg) incrementaron significativamente el PWT a los 30 min ( $8.5 \pm 0.50$  g,  $8.0 \pm 0.53$  g, y  $13.7 \pm 0.81$  g), a los 60 ( $8.2 \pm 0.59$  g,  $8.7 \pm 0.84$  g, y  $14.3 \pm 0.62$ ), y a los 90 minutos ( $7.0 \pm 0.65$  g,  $7.5 \pm 0.90$  g, y  $9.5 \pm 0.32$  g), a las dosis respectivas. Sin embargo, a los 120 y 150 min solo la dosis de 10 mg/kg mostró una diferencia significativa del valor de PWT con relación al grupo CCI ( $8.5 \pm 0.50$  g y  $5.7 \pm 0.45$  g vs  $3.2 \pm 0.52$  y  $3.1 \pm 0.62$  g, respectivamente,  $P < 0.05$ ). Ninguna de las dosis de CA mostró diferencia significativa a los 180 min con relación al grupo CCI (Fig. 11). Como se puede observar en la Fig. 11, con la dosis de 10 mg/kg el PWT el efecto antialodínico de CA es tan importante a los 30 y 60 min que no mostró diferencia significativa con el grupo Sham.

El análisis del área bajo la curva (ABC) de PWT mostró diferencias significativas de todos los grupos de CA (0.1, 1.0 y 10.0 mg/kg) en comparación con el vehículo ( $18.4 \pm 0.8$ ,  $20.0 \pm 1.0$  y  $28.1 \pm 1.6$  vs  $8.86 \pm 1.4$  ua, respectivamente,  $P < 0.05$ ); también, las



dos primeras dosis de CA mostraron diferencia significativa con la dosis de 10 mg/kg. Los efectos antialodínicos de las dosis de CA corresponden a 40.9, 44.4 y 62.5 % respectivamente, en relación al grupo Sham.

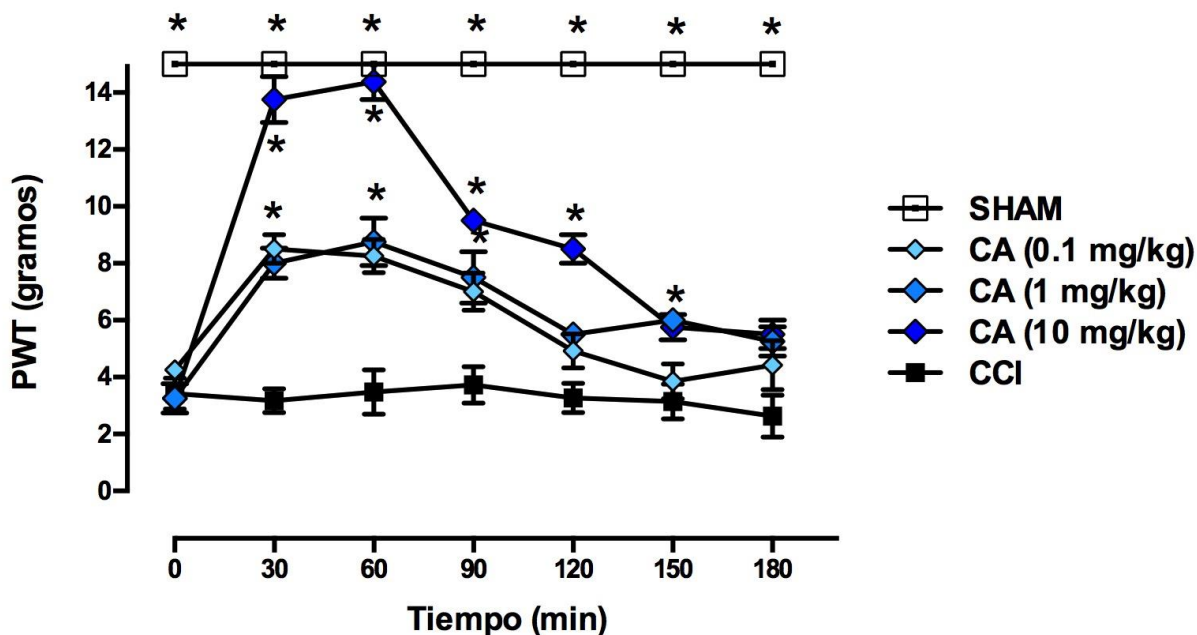


Fig. 11. Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por los Filamentos de Von Frey en el modelo de constricción del nervio ciático (CCI) y el efecto antialodínico de la administración de CA (0.1, 1.0 Y 10 mg/kg). También se muestran los valores del grupo SHAM. En todos los casos se presentan las medias  $\pm$  error estándar de 8 ratas por grupo. \* $p < 0.05$  en comparación con grupo CCI (ANOVA de dos vías seguido por post hoc de Dunnett).

### 7.1.2. Alodinia térmica al frío

La alodinia térmica se expresa como el tiempo total que los animales mantienen posada la pata en un periodo de 60 segundos posterior a la aplicación de una gota de acetona en la pata derecha (PPT por las siglas en inglés de Paw Placement Time). La aplicación de acetona no indujo el retiro de la pata de ninguna de las ratas del grupo SHAM en ninguno de los puntos de observación, expresando esta respuesta como de 60 s. Por el contrario, el grupo CCI mostró una diferencia significativa vs SHAM en el PPT en todos los tiempos de evaluación (0 min,  $26.0 \pm 4.57$  s.; 60 min,  $21.7 \pm 2.93$  s; 120 min,  $26.7 \pm 4.02$  s, y 180 min,  $24.1 \pm 2.20$  s). La administración de GAP indujo un

incremento del PWT (60 min:  $43.4 \pm 4.57$  s. 120 min:  $43.0 \pm 1.10$  s y 180 min:  $31.9 \pm 2.05$  s) (Fig. 12). El efecto antialodínico de GAP en el modelo de la acetona correspondió al 63.9% con relación al grupo Sham.

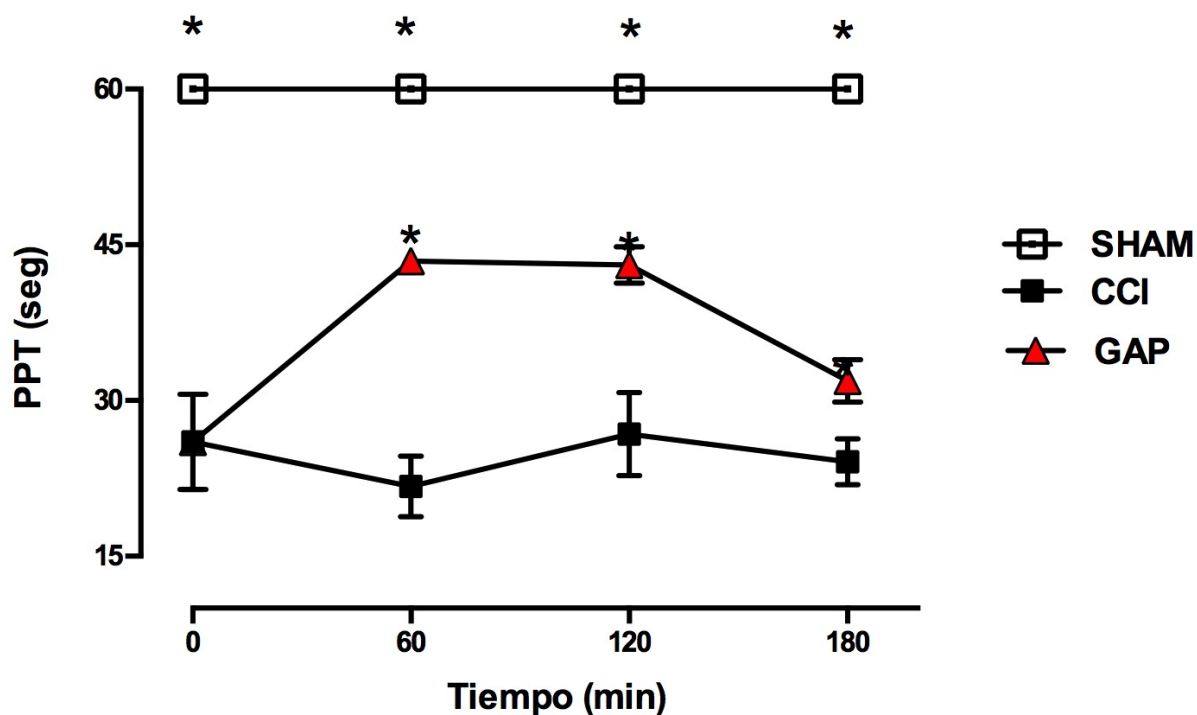


Fig. 12. Curso temporal de la alodinia térmica inducida por una gota de acetona en el modelo de constricción del nervio ciático (CCI) y el efecto antialodínico de la administración de GAP (10.0 mg/kg). También se muestran los valores del grupo SHAM. En todos los casos se presentan las medias  $\pm$  error estándar de 8 ratas por grupo. \* $p < 0.05$  en comparación con grupo CCI (ANOVA de dos vías seguido por post hoc de Dunnett).

También en la alodinia al frío, la CFX indujo un incremento en el PPT desde los 60 hasta los 180 min. A los 60 min: con 100 mg/kg de  $45.7 \pm 3.02$  s, con 200 mg/kg de  $45.4 \pm 5.45$  s y con 400 mg/kg de  $53.5 \pm 1.36$  s; a los 120 min: con 100 mg/kg de  $42.4 \pm 4.01$  s, con 200 mg/kg de  $43.8 \pm 4.88$  s, y con 400 mg/kg de  $50.0 \pm 1.60$  s; finalmente, a los 180 min: con 100 mg/kg de  $43.3 \pm 3.02$  s, con 200 mg/kg de  $45.3 \pm 2.28$  s y con 400 mg/kg de  $49.0 \pm 2.00$  s (Fig 13). Este efecto también se encontró en el ABC

con un incremento significativo en todas las concentraciones (100 mg/kg  $68.2 \pm 2.52\%$ , 200 mg/kg  $69.4 \pm 5.25\%$  and 400 mg/kg  $78.4 \pm 1.60\%$ ).

El análisis del área bajo la curva (ABC) de PPT mostró un efecto antialodínico con todas las dosis de CFX (100, 200 y 400 mg/kg) que corresponden a  $68.2 \pm 2.5$ ,  $69.4 \pm 5.25$  y  $78.4 \pm 1.6 \%$  respectivamente, en relación al grupo Sham.

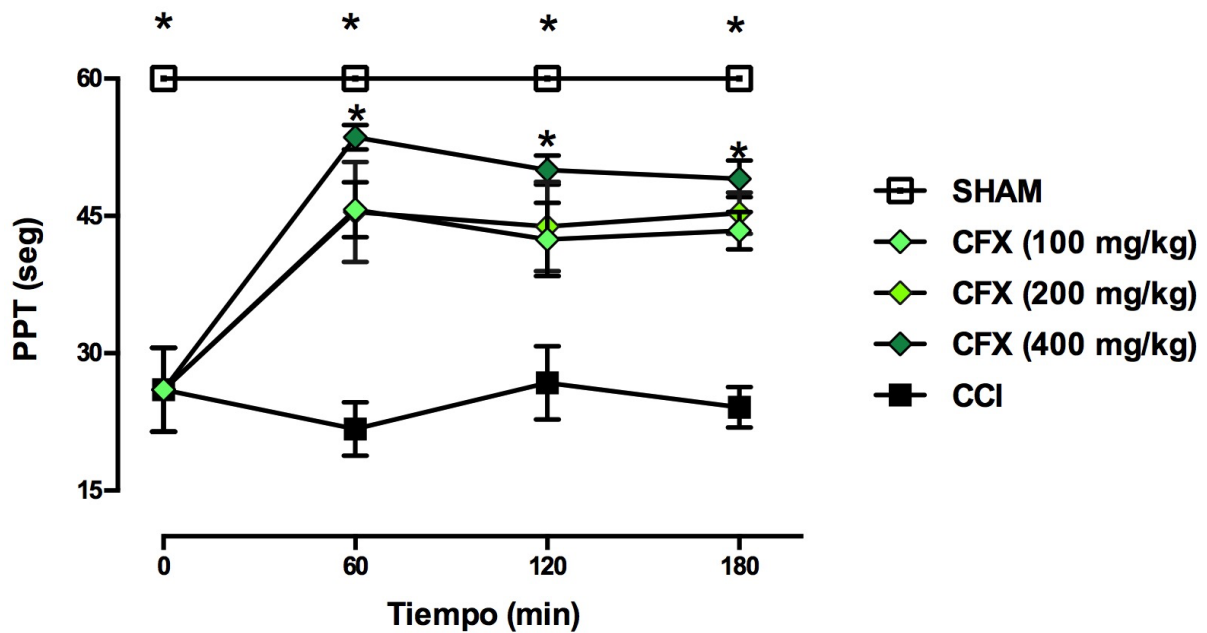


Fig. 13. Curso temporal de la alodinia térmica inducida por una gota de acetona en el modelo de constricción del nervio ciático (CCI) y el efecto antialodínico de la administración de CFX (100, 200 y 400 mg/kg). También se muestran los valores del grupo SHAM. En todos los casos se presentan las medias  $\pm$  error estándar de 8 ratas por grupo. \* $p < 0.05$  en comparación con grupo CCI (ANOVA de dos vías seguido por post hoc de Dunnett).

Con relación al efecto de CA en la respuesta a la alodinia al frío, a la dosis de 0.1 y 1 mg/kg se observó un aumento significativo de PPT a los 60 min con relación al grupo CCI ( $34.6 \pm 6.88$  s. y  $41.2 \pm 3.20$  vs  $21.7 \pm 2.93$ , respectivamente;  $P < 0.05$ ); sin embargo no se encontró una diferencia significativa ni a los 120 ( $22.7 \pm 2.04$  y  $20.1 \pm 5.57$

respectivamente) ni a los 180 min ( $21.0 \pm 3.53$  s. y  $28.4 \pm 3.49$  s, respectivamente). Sin embargo, la dosis de 10 mg/kg aumentó el PPT de manera significativa en todos los tiempos probados: a los 60 min a  $51.6 \pm 1.19$  s, a los 120 min a  $45.8 \pm 2.32$  s y a los 180 min a  $44.6 \pm 2.42$  s, con relación al grupo CCI ( $P < 0.05$ ) (Fig. 14).

El análisis del área bajo la curva (ABC) de PPT mostró que solo las dosis de CFX de 1.0 y 10 mg/kg indujeron efecto antialodínico que corresponden a 45 y 54.2% respectivamente, en relación al grupo Sham.

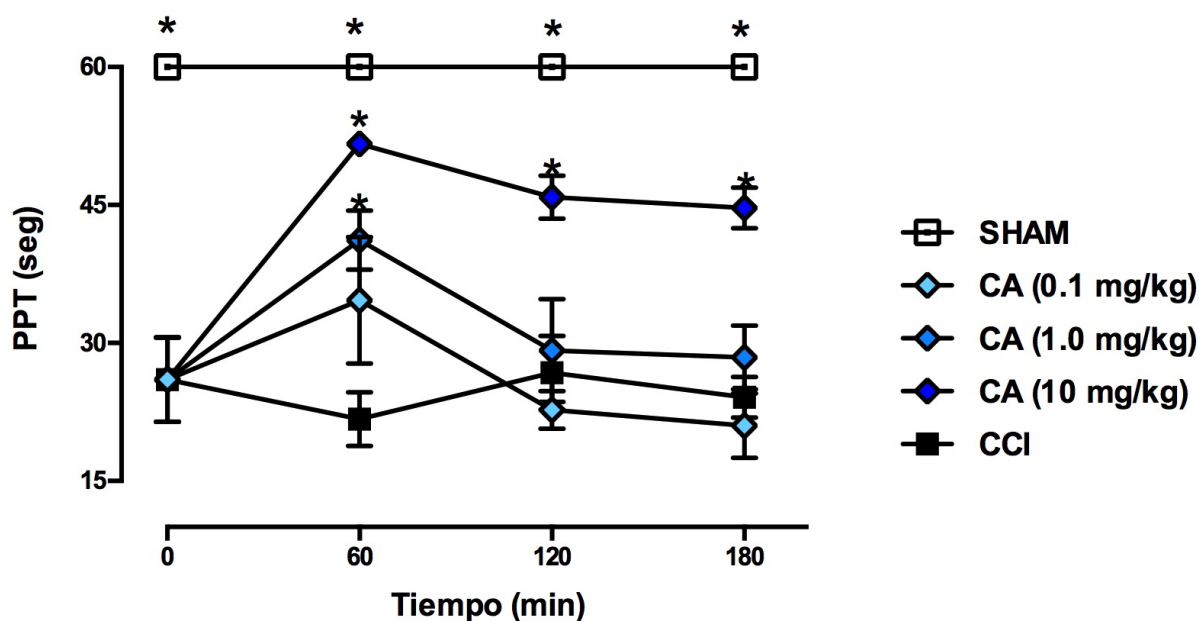


Fig. 14. Curso temporal de la alodinia térmica inducida por una gota de acetona en el modelo de constricción del nervio ciático (CCI) y el efecto antialodínico de la administración de CA (0.1, 1.0, 10.0 mg/kg). También se muestran los valores del grupo SHAM. En todos los casos se presentan las medias  $\pm$  error estándar de 8 ratas por grupo. \* $p < 0.05$  en comparación con grupo CCI (ANOVA de dos vías seguido por post hoc de Dunnett).

### 7.1.3 Efecto de la CFX y el CA en la concentración de citocinas en CCI

En el modelo de dolor neuropático el grupo SHAM mostró una concentración de  $21.9 \pm 1.34$  pg/ml de TNF- $\alpha$  considerándose este valor como la basal para todos los

grupos. El grupo CCI mostró un incremento significativo de las concentraciones de TNF- $\alpha$  a  $46.6 \pm 5.01$  pg/ml con relación al grupo SHAM ( $P < 0.05$ ); mientras que, los animales con dolor neuropático tratados con GAP (10 mg/kg), CFX (200 mg/kg) y CA (10 mg/kg) las concentraciones séricas de TNF- $\alpha$  disminuyeron en comparación con el grupo CCI ( $22.7 \pm 1.75$ ,  $21.3 \pm 0.71$ ,  $14.9 \pm 1.21$  vs  $46.6 \pm 5.01$  pg/ml, respectivamente,  $P < 0.05$ ) (Fig. 15a), casi al mismo nivel que las detectadas en el grupo SHAM.

Con relación a las concentraciones séricas de IL10, en el grupo SHAM se detectó una concentración de  $372.4 \pm 69.69$  pg/ml; mientras que, en el CCI se detectó un incremento significativo en la concentración de esta citocina a  $3,424.0 \pm 593.41$  pg/ml con relación al grupo SHAM ( $P < 0.05$ ). En los grupos con dolor neuropático tratados con GAP (10 mg/kg), CFX (200 mg/kg) y CA (10 mg/kg), al igual que con la TNF- $\alpha$ , las concentraciones séricas de IL-10 disminuyeron en comparación con el grupo CCI ( $182.4 \pm 59.73$ ,  $95.7 \pm 9.71$  y  $3,424.0 \pm 593.41$  pg/ml, respectivamente,  $P < 0.05$ ), casi al mismo nivel que las detectadas en el grupo SHAM (Fig. 15b).

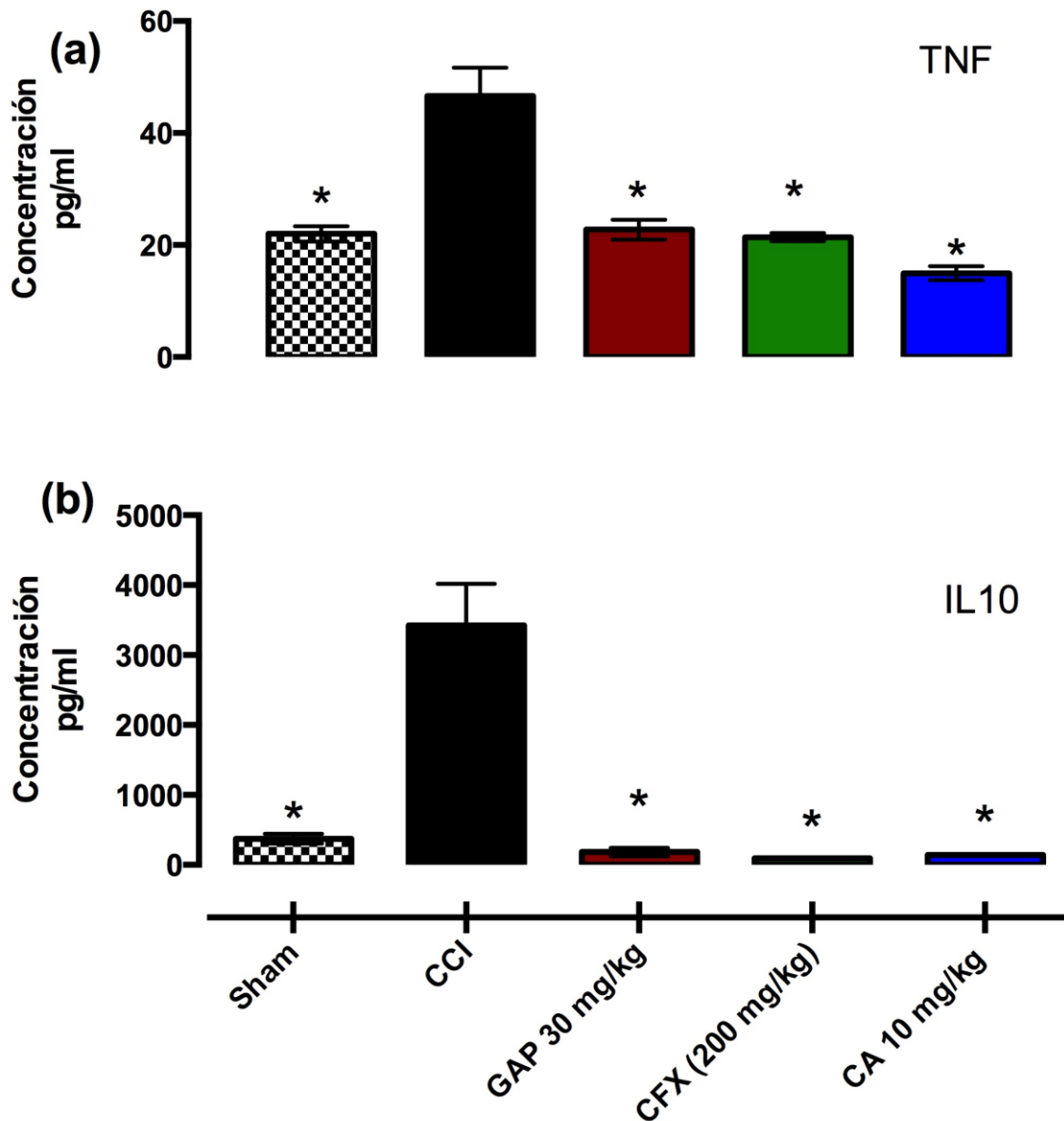


Fig. 15.-Concentración sérica de citocinas en el modelo de CCI en animales tratados con GAP, CFX y CA. a) Concentración sérica de TNF $\alpha$  3 horas después de la administración de los tratamientos. b) Concentración sérica de IL10 3 horas después de la administración de los tratamientos. Valores de media  $\pm$  S.E.M. de 4 ratas por grupo por duplicado. \*  $p < 0.05$  vs CCI (ANOVA de dos vías seguida de una prueba Dunnett)

## 7.2 Efecto de la CFX y el CA en el dolor inflamatorio.

### 7.2.1. Alodinia mecánica

Una hora después de la administración de carragenina los animales desarrollaron una respuesta alodínica por debajo de 4 g al estímulo mecánico con los Filamentos de von Frey. Al igual que en los animales con CCI, en este modelo el PWT disminuyó significativamente desde 15 g al tiempo cero (antes de la administración de CARR) a  $3.71 \pm 0.68$  g, una hora después de la administración de CARR. En este estudio se utilizó diclofenaco (DIC) como control positivo, el cual indujo un efecto antialodínico con relación al grupo CARR tanto en el evento agudo (máximo efecto a los 90 min:  $8.5 \pm 0.36$  gr) (Fig. 16a) como a las 24 ( $7.5 \pm 1.60$  g), 48 ( $9.4 \pm 1.60$  g) y 72 h ( $10.5 \pm 1.19$  g) (Fig. 16b). Los PWTs de los grupos SHAM y DIC mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo CARR desde los 30 min de la prueba y durante las 72 horas observadas (Fig. 16b).

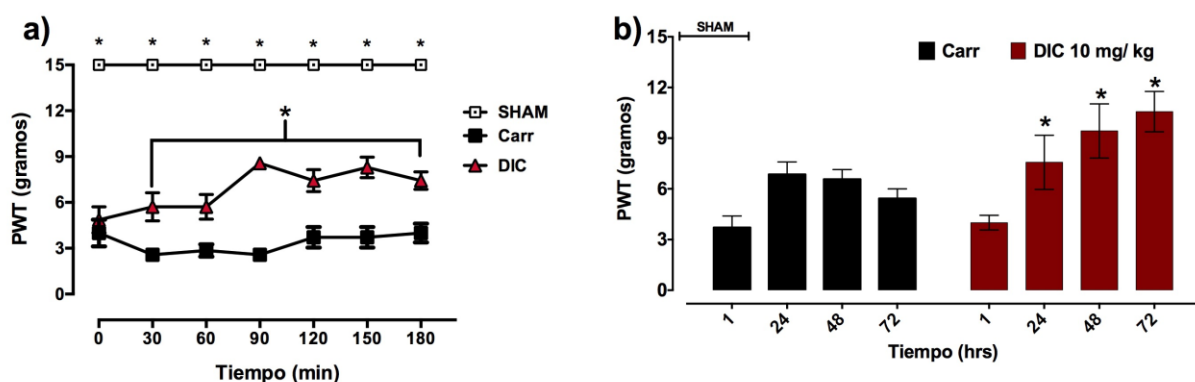


Fig. 16.- a) Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por la administración de CARR y el efecto antialodínico de la administración aguda del DIC. b) Curso temporal de 72 horas de la alodinia mecánica inducida por la administración de CARR y el efecto antialodínico de administración crónica de DIC. Los valores se presentan en medias  $\pm$  S.E.M. de 7 ratas por grupo. \* $p < 0.05$  vs grupo CARR (ANOVA de dos vías seguido por post hoc de Dunnet).

En el dolor inflamatorio inducido por carragenina la dosis de CFX ( 200 mg/kg) no indujo un efecto antialodínico en los primeros 180 min de evaluación a la alodinia mecánica. El valor de PWT de este grupo a los 30 min fue:  $2.8 \pm 0.59$  g, a los 60 min fue:  $2.2 \pm 0.28$  g, a los 90 min fue:  $4.5 \pm 1.04$  g, a los 120 min fue:  $4.2 \pm 0.52$  g, a los 150 min fue:  $4.2 \pm 0.68$  g y a los 180 min fue:  $3. \pm 0.59$  g (Fig. 17a). Sin embargo, en administración crónica, la CFX sí indujo un efecto antialodínico a las 24, 48 y 72 h

después de su administración que mostró una PWT significativa al grupo CARR al tiempo correspondiente ( $11.2 \pm 1.40$  g vs  $6.8 \pm 0.73$  g;  $11.4 \pm 0.92$  g vs  $6.5 \pm 0.57$  y  $14.2 \pm 0.71$  vs  $5.4 \pm 0.57$  g, a los respectivos tiempos,  $P < 0.05$ ) (Fig. 17b).

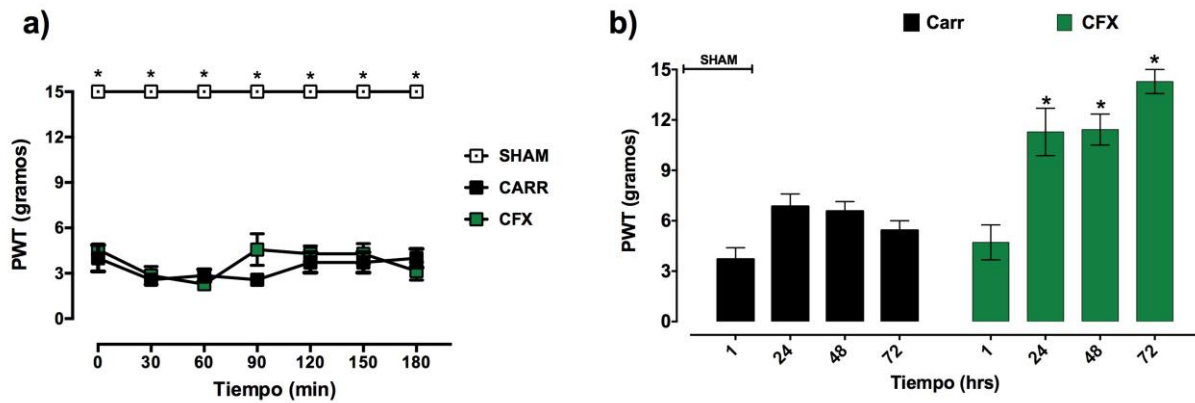


Fig. 17.- a) Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por la administración de CARR y el efecto de la administración aguda de CFX (200 mg/kg). b) Curso temporal de 72 horas de la alodinia mecánica inducida por la administración de CARR y el efecto antialodínico de administración crónica CFX (200 mg/kg). Los valores se presentan en medias  $\pm$  S.E.M. de 7 ratas por grupo. \* $p < 0.05$  vs grupo CARR (ANOVA de dos vías seguido por post hoc de Dunnet).

Por último, se determinó el efecto de la administración aguda y crónica de CA (10 mg/kg) en el dolor inflamatorio. En este caso, con relación a la administración aguda de CA, se encontró un efecto antialodínico a los 30, 60 y 90 min que mostró diferencias con respecto al grupo de CARR ( $7.5 \pm 1.34$ ,  $8.0 \pm 0.87$  y  $6.2 \pm 0.68$  g vs  $2.5 \pm 0.36$ ,  $2.8 \pm 0.40$ ,  $2.5 \pm 0.36$ ; respectivamente,  $P < 0.05$ ) (Fig 18a). Este efecto antialodínico obtenido con la CA se mantuvo durante su administración crónica a las 24, 48 y 72 h, con una diferencia significativa con el grupo CARR ( $11.8 \pm 1.14$  vs  $6.8 \pm 0.73$ ;  $10.8 \pm 1.12$  g vs  $6.5 \pm 0.57$ ; y  $11.8 \pm 1.21$  g vs  $5.4 \pm 0.57$ , a los tiempos respectivos,  $P < 0.05$ ) (Fig. 18b).



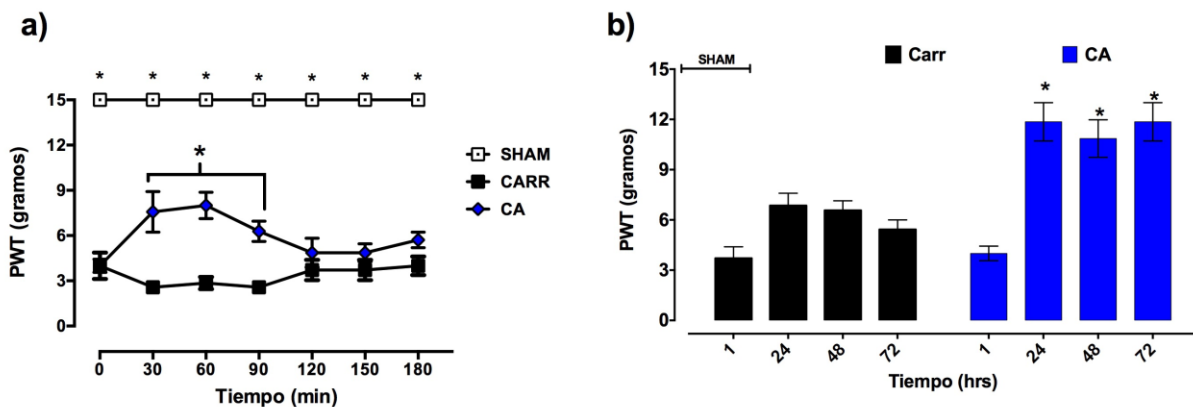


Fig. 18.- a) Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por la administración de CARR y el efecto de la administración aguda de CA (10 mg/kg). b) Curso temporal de 72 horas de la alodinia mecánica inducida por la administración de CARR y el efecto antialodínico de administración crónica CA (10 mg/kg). Los valores se presentan en medias  $\pm$  S.E.M. de 7 ratas por grupo. \* $p < 0.05$  vs grupo CARR (ANOVA de dos vías seguido por post hoc de Dunnet)

### 7.2.3. Efecto de los betalactámicos sobre el edema inducido por carragenina.

De manera inicial no encontramos una diferencia significativa en ninguna de las mediciones de volumen de la pata de las ratas del grupo SHAM (tiempo 0:  $1.1 \pm 0.02$  cc, 3 hrs:  $1.05 \pm 0.02$  cc, 24 hrs.:  $1.1 \pm 0.01$  cc y 48 hrs.  $1.1 \pm 0.02$  cc). Posteriormente medimos el aumento de volumen inducido por la administración de CARR encontrando un aumento significativo comparado con el grupo SHAM a partir de la segunda medición y durante todo el experimento (tiempo 0:  $1.0 \pm 0.04$  cc, 3 hrs.:  $2.2 \pm 0.08$  cc, 24 hrs.  $2.0 \pm 0.09$  cc, y 48 hrs.  $1.4 \pm 0.02$  cc.). Se encontró una disminución significativa del volumen con la administración de DIC (tiempo 0:  $1.1 \pm 0.02$  cc, 3 hrs:  $1.9 \pm 0.10$  cc, 24 hrs.:  $1.3 \pm 0.03$  cc y 48 hrs.  $1.2 \pm 0.02$  cc).

Por su parte la administración de CFX causó un efecto dispar. Por un lado, se encontró un aumento significativo de la inflamación a las 3 horas de haber administrado CARR ( $2.4 \pm 0.08$  cc) mientras que se encontró una disminución significativa a las 24 ( $1.5 \pm 0.04$  cc) horas y no se encontró significancia a las 48 horas ( $1.5 \pm 0.01$  cc). Por último el grupo CA mostró una disminución significativa a las 3 ( $1.9 \pm 0.02$  cc) y a las 24 ( $1.2 \pm 0.02$  cc) horas. Este efecto no fue significativo a las 48 horas ( $1.2 \pm 0.02$  cc) (Fig. 19)

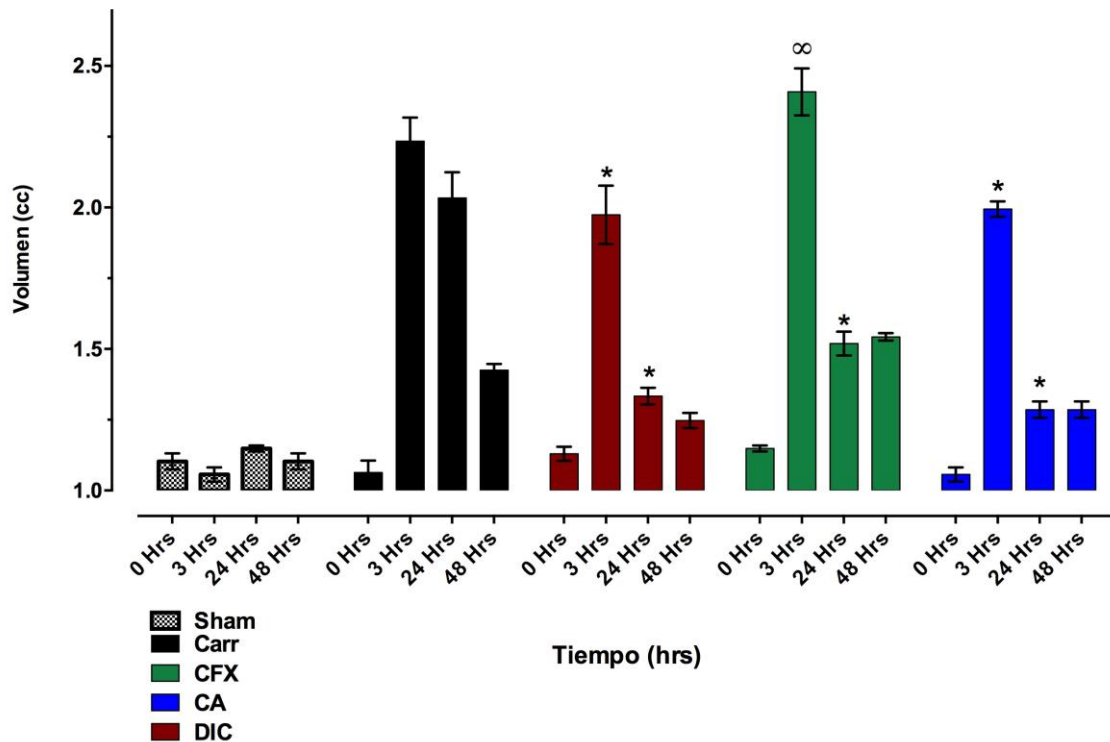


Fig. 19.- a) Curso temporal de 3, 24 y 48 horas posteriores a la administración de CARR intraplantar y el volumen dispersado al sumergir la pata en un pleetismómetro así como el efecto de los diferentes fármacos estudiados. Los valores se presentan en medias  $\pm$  S.E.M. de 7 ratas por grupo. \* $p < 0.05$  vs grupo CARR (ANOVA de dos vías seguido por post hoc de Dunnet).  $\infty p < 0.05$  de aumento vs CARR.

#### 7.2.4. Concentración de citocinas en el dolor inflamatorio.

La administración de carragenina indujo un incremento significativo de las concentraciones séricas de  $\text{TNF}\alpha$  a las 3 horas de su administración en comparación con el grupo sham ( $73.6 \pm 11.16$  pg/ml vs  $21.9 \pm 1.34$  pg/ml). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa del grupo CARR ni a las 24 ni a las 48 h con el grupo Sham ( $19.9 \pm 2.51$  pg/ml y  $16.7 \pm 2.29$  pg/ml vs vs  $21.9 \pm 1.34$  pg/ml). La administración de DIC (10 mg/kg), CFX (200 mg/kg) y CA (10 mg/kg) disminuyó significativamente la concentración sérica de  $\text{TNF}\alpha$  inducida por la carragenina, pero sólo a las 3 h ( $23.3 \pm 3.18$ ,  $33.7 \pm 3.34$  y  $17.9 \pm 2.51$  pg/ml vs  $73.6 \pm 11.16$  pg/ml, respectivamente,  $P < 0.05$ ) (Fig 20a); ni a las 24 ( $14.7 \pm 1.31$ ,  $9.9 \pm 13.34$  y  $10.7 \pm 0.29$  vs  $19.9 \pm 2.51$  pg/ml, respectivamente) ni a las 48 h ( $15.8 \pm 2.58$ ,  $13.3 \pm 1.80$  y  $14.5 \pm 1.82$  vs  $16.7 \pm 2.29$  pg/mL, respectivamente) se encontraron diferencias (Fig 20a)

Con relación a las concentraciones séricas de IL10 en el grupo SHAM se detectó una concentración de  $372.14 \pm 69.69$  pg/ml; mientras que, en el grupo con CARR se detectó un incremento significativo en la concentración de esta citocina a  $1,329.2 \pm 215.03$  pg/ml a las 3 h que disminuyó a las 24 y 48 h después de la administración de la CARR ( $533.0 \pm 80.49$  y  $192.1 \pm 32.08$  pg/ml, respectivamente). Las concentraciones séricas de esta citocina en animales administrados con DIC no se alteraron ni a las 3 ( $1,464.1 \pm 404.93$  vs  $3,919.6 \pm 903$ .pg/ml) ni a las 48 h ( $489.4 \pm 294.39$  vs  $192.1 \pm 32.08$  pg/ml), solo hubo un incremento significativo a las 24 h con relación a su control de CARR ( $3,919.6 \pm 903.20$  vs  $533.0 \pm 80.49$  pg/mL). La administración de CFX no alteró las concentraciones séricas de esta citocina en comparación con su respectivo grupo CARR ni a las 3 ( $1,329.2 \pm 215.03$  pg/ml vs  $2,094.7 \pm 307.38$  pg/ml), ni a las 24 ( $167.7 \pm 20.57$  vs  $533.0 \pm 80.49$  pg/ml) ni a las 48 h ( $612.0 \pm 95.74$  vs  $192.1 \pm 32.08$  pg/ml). Finalmente, la administración de CA incrementó las concentraciones de IL-10 solo a las 3 h en comparación con su control de CARR ( $2758.7 \pm 678$  vs  $1,329.2 \pm 215.03$  pg/ml); ni a las 24 ( $508.9 \pm 150.7$  pg/ml vs  $533.0 \pm 80.49$  pg/ml)) ni a las 48 h ( $137.7 \pm 5.25$  vs  $192.132.08$  pg/ml) hubo cambios significativas (fig. 20b).

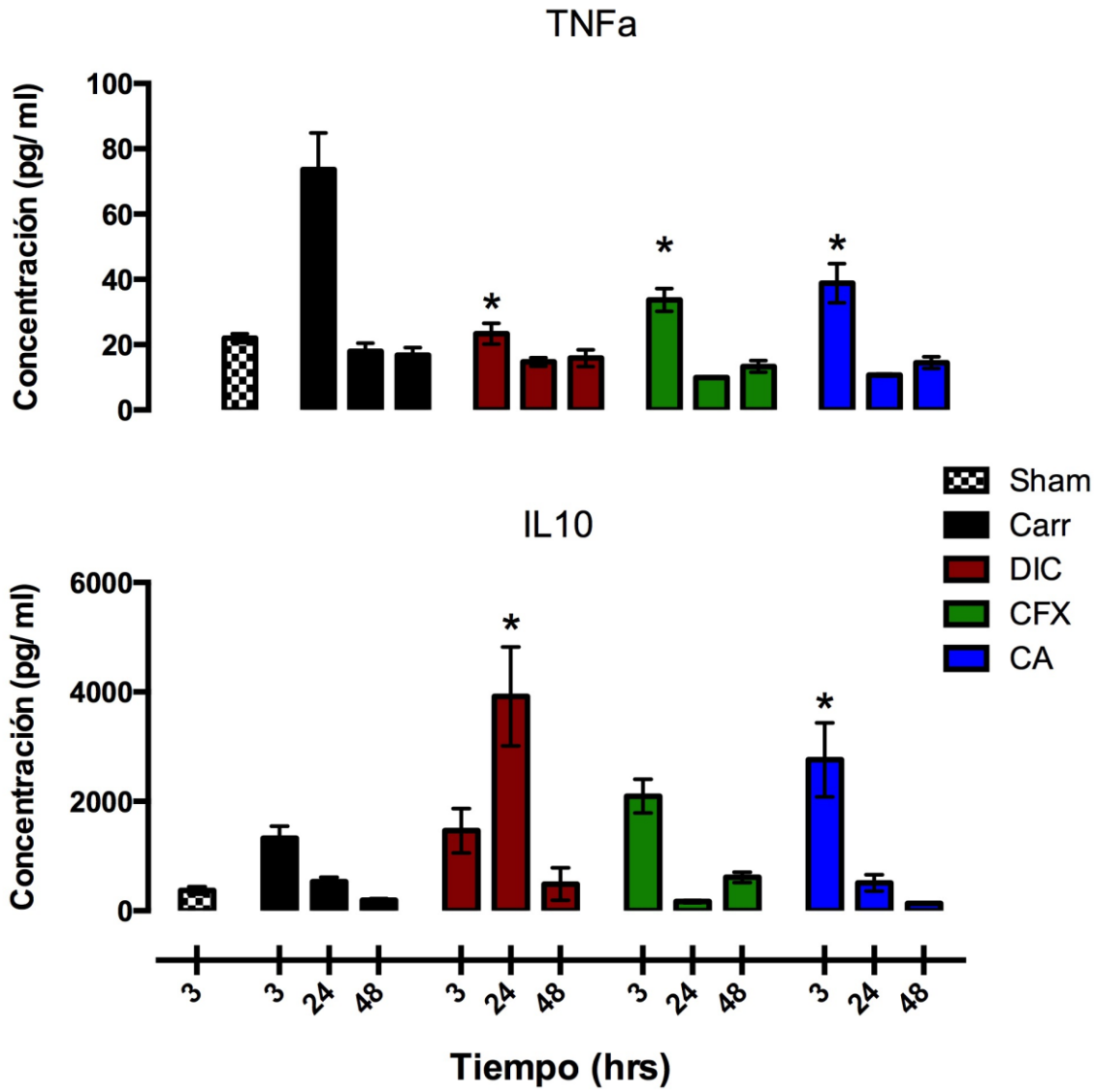


Fig. 20.-Concentración sérica de citocinas en el modelo de inflamación con carragenina (CARR) en animales tratados con DIC, CFX y CA. a) Concentración sérica de TNF- $\alpha$  en animales con dolor inflamatorio con y sin tratamiento. b) Concentración sérica de IL10 en animales con dolor inflamatorio con y sin tratamiento. Valores de media  $\pm$  S.E.M. de 4 ratas por grupo por duplicado. \*  $p < 0.05$  vs CCI (ANOVA de dos vías seguida de una prueba Dunnett)

## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1. Efecto de la CFX y el CA en el dolor neuropático.**

Nuestro estudio además de confirmar evidencias previas del efecto antialodínico de la CFX (Hu y cols. 2010), por primera vez muestra evidencia de este efecto tras la administración aguda de CA en un modelo de dolor neuropático. Del mismo modo, mostramos una probable relación entre los efectos mostrados y una modulación en la concentración sérica de una citocinas pro -inflamatoria (TNF- $\alpha$ ).

El modelo de constricción nerviosa del nervio ciático (CCI) induce alodinia térmica y mecánica como fue previamente reportado por Bennett y Xie (1988). También en este modelo, la gabapentina (GAP) en administración aguda ha mostrado efecto antialodínico (Kilic y cols. 2012) es por eso que se utiliza como control positivo en este estudio.

La CFX, como ya se comentó, es una molécula betalactámica conocida y utilizada como tratamiento de elección para diversas enfermedades infecciosas ya que posee efectos antibacterianos importantes (Paul y cols. 2014). Por otro lado, el CA, a pesar de ser otra molécula betalactámica, carece de efecto antibiótico; sin embargo, es utilizado como un adyuvante de otras moléculas betalactámicas, como la amoxicilina, por su efecto inhibitor sobre las betalactamasas que inducen algunas bacterias, protegiendo y prolongando así el efecto antibiótico de la amoxicilina (Reading y Cole 1977). A pesar del amplio conocimiento científico que se tiene de estas moléculas, Rothstein y cols. (2005) demostraron que algunas moléculas betalactámicas, entre ellas la CFX, incrementaban la concentración de transportadores de glutamato (GLT-1) en cultivos de astrocitos murinos y de humanos 48 horas después de ser administradas. El GLT-1 es un transportador que se encuentra en los astrocitos y se encarga de la recaptura de cerca del 90% del glutamato (Rothstein y cols, 1994). Se ha demostrado que la regulación a la baja en la expresión de este transportador en la médula espinal de animales con dolor neuropático (Sung y cols, 2003; Mirzaei y cols, 2010; Shi y cols, 2016), así como el incremento en los niveles de glutamato en el espacio sináptico, están relacionados en la percepción del dolor y la sensibilización central (Fundytus, 2001; Shi y cols., 2016).

El efecto antialodínico de la CFX ya ha sido reportado por otros autores; sin embargo, en la mayoría de los reportes la CFX ha sido administrada de manera crónica (por 7 días) previniendo el desarrollo de alodinia térmica y mecánica en ratas diabéticas (Gunduz y cols., 2011) y en ratas con CCI (Hu y cols, 2010; Amin y cols, 2012). Sin embargo, nuestros resultados demuestran el efecto antialodínico de la CFX doce días después de la cirugía en el modelo de CCI, es decir, cuando el dolor neuropático ya está establecido. Por otro lado, existen reportes que indican que la administración aguda de la CFX no induce efectos antialodínicos ni antinociceptivos en animales con neuropatía diabética (Gunduz y cols., 2011) ni en dolor visceral (Stepanovic-Petrovic y col., 2014). Tales diferencias en los reportes pueden deberse a la variabilidad en la etiología del tipo de dolor, a las especies de animales y a las condiciones experimentales.

El efecto antinociceptivo inducido por la administración crónica de la CFX ha sido relacionado con una disminución de la concentración de glutamato en el espacio sináptico, debido quizá, a un incremento en la expresión y actividad de los transportadores GLT-1, también conocidos como EAAT2, que se encargan de la recaptura del glutamato, disminuyendo así sus concentraciones en el espacio sináptico. Además, el efecto antinociceptivo de CFX fue revertido por el ácido dihidrokaínico (DHK), un inhibidor del transportador GLT-1 (Gunduz y cols, 2011). Sin embargo, los efectos antialodínicos de la CFX observados en este estudio, parecen no corresponder a un aumento de la expresión de GLT-1 ya que este aumento se produce 48 horas después de la administración del fármaco (Rothstein y cols. 2005); Shi y cols, 2016) y nuestros resultados demuestran un efecto antialodínico a partir de los 30 minutos de su administración. Existen diversos sistemas de neurotransmisores involucrados en la activación del sistema analgésico endógeno, uno de ellos es la vía dopaminérgica. Algunos estudios han demostrado que la activación de los receptores D2 y el bloqueo de los receptores D1 en la corteza insular disminuyen el dolor neuropático en un modelo de transección nerviosa (Coffeen y cols., 2010); mientras que la aplicación de un agonista D2 en el estriado dorsolateral reduce el dolor inducido por la formalina (Magnusson y Fisher, 2000). Recientes estudios de nuestro grupo de trabajo demostraron que la administración de haloperidol, un antagonista D2 y naloxona, un antagonista de receptores a opioides, revierten el efecto antialodínico inducido por la CFX en estas condiciones experimentales, sugiriendo que parte de su

efecto se debe a la interacción del fármaco con estos dos sistemas endógenos (Ochoa-Aguilar y cols., 2017). Nuestros resultados del efecto antialodínico de CFX concuerdan con los reportes clínicos de analgesia con una sola dosis prequirúrgica de CFX en pacientes con síndrome del túnel del carpo, una condición reconocida como causante de dolor neuropático (Macaluso y cols. 2013). Por otro lado, la CFX también ha mostrado un efecto inmunomodulador en modelos de Parkinson (Kaur y Prakash 2017) y de traumatismo craneoencefálico (Goodrich y cols. 2013).

En el estudio de (Rothstein y cols. 2005), sobre el incremento en la expresión del transportador de glutamato (GLT-1) en astrocitos murinos y humanos, no se incluyó al CA; sin embargo, todas las moléculas probadas en ese estudio que poseían un anillo betalactámico mostraron el mismo efecto. Por lo que es posible suponer que el anillo betalactámico pudiera ser el responsable del efecto reportado por éstos autores. Partiendo de esa base, la posibilidad de que el CA induzca efectos antialodínicos, como fue demostrado para la CFX, es elevada.

Los resultados de nuestro estudio demuestran que también el CA induce efectos antialodínicos en la alodinia mecánica y térmica inducida por el modelo de CCI. Sin embargo, éste efecto, a diferencia del inducido por la CFX, no se mantuvo a lo largo de todo el estudio ya que con las dosis de 0.1 y 1 mg/kg, los efectos antialodínicos correspondieron al tiempo promedio de vida media del fármaco (1 h); mientras que, con la dosis de 10 mg/kg, el efecto se mantuvo prácticamente durante las 3 horas de evaluación. Estos resultados son los primeros que han sido reportados acerca del efecto antialodínico del CA en un modelo de dolor neuropático; aunque su efecto analgésico ya ha sido reportado en un modelo de dolor inflamatorio (Hajhashemi y Dehdashti 2014). Además, en el ámbito clínico, se ha reportado la efectividad analgésica de la combinación de amoxicilina con CA en lumbalgias crónicas con cambios imagenológicos (Albert y cols. 2013). A pesar de que los autores comentan que el efecto analgésico se debe principalmente a las propiedades antibióticas de la combinación de éstos fármacos, la probabilidad de que lo que se esté observando sea un efecto analgésico directo de BLMs podría relacionarse con nuestros hallazgos. El efecto antialodínico y analgésico del CA en modelos preclínicos sugiere que el mecanismo involucrado en este efecto es diferente al de la inactivación de betalactamasas. Esta idea había sido probada previamente en modelos de daño neuronal (Huh y cols. 2010; Kost y cols. 2012) e inflamación sistémica (Banani y cols.

2012). De hecho, al igual que con la CFX, estudios de nuestro grupo de trabajo demostraron que la administración de haloperidol y de naloxona revierten el efecto antialodínico inducido por la CFX en estas condiciones experimentales, sugiriendo que parte de su efecto antialodínico se debe a la interacción del fármaco con estos dos sistemas endógenos (Ochoa-Aguilar y cols., 2017).

## **8.2. Efecto de la CFX y el CA en el dolor inflamatorio.**

Con relación al modelo de dolor inflamatorio, nuestros resultados demuestran que la administración aguda de CFX (200 mg/kg) no indujo un efecto antialodínico en el dolor inducido por CARR. Aunque, existen reportes que indican que la CFX induce un modesto efecto antihiperálgico en administración aguda en el modelo de carragenina y un efecto antinociceptivo en un modelo de dolor visceral (Stepanovic-Petrovic y col., 2014). La diferencia en nuestros resultados y los previamente reportados de la CFX en un modelo de dolor con carragenina pueden deberse a que en nuestros experimentos utilizamos una concentración mayor de carragenina que la reportada en el estudio de Stepanovic-Petrovic y cols., en el 2014. Con relación al CA, la administración aguda de 10 mg/kg indujo un efecto antialodínico solo durante la primer hora de evaluación, lo cual pudiera explicarse con base a su tiempo de vida media (1h).

Esto podría correlacionarse con el hecho de que el efecto analgésico de ambas moléculas betalactámicas se relaciona con altas concentraciones de las mismas en el sistema nervioso central. La diferencia entre ambos modelos de dolor empleados en este estudio es principalmente el tiempo en que se presenta el proceso inflamatorio. En el modelo CCI, por ejemplo, se ha mostrado un aumento significativo de la liberación de TNF $\alpha$ , una citosina inflamatoria, en las astas posteriores de la médula (Leung y Cahill 2010), lo que altera la permeabilidad de la BHE favoreciendo el paso de las moléculas al SNC (Echeverry y cols. 2011) como la CFX, que en condiciones fisiológicas normales no atraviesa la BHE. Por otro lado, la inflamación periférica aguda inducida por la carragenina libera factores inflamatorios similares; sin embargo, el tiempo requerido para que se cause una alteración en la BHE es superior al estudiado en nuestro modelo (Lin y cols. 2011b). Esto explicaría por qué la administración aguda de CFX induce efecto antialodínico en el dolor neuropático, pero no en el dolor inflamatorio. Sin embargo, tanto la CFX como el CA inducen un efecto antialodínico a



las 24 y 48 h después de la administración de carragenina, sugiriendo que a estos tiempos la BHE ya está alterada y permite el ingreso de ambos fármacos al SNC para producir un efecto antialodínico.

Nuestros resultados sugieren también que ambos fármacos inducen un efecto modulador de la inflamación sistémica ya que el CA disminuyó el volumen de la pata inyectada con CARR a las 3 y las 24 h y la CFX lo hizo a las 24 h. Esto también confirma el efecto antiinflamatorio del CA reportado previamente (Banani y cols. 2012) y demuestra por primera vez que la CFX puede inducir un efecto antiinflamatorio además del antialodínico.

### **8.3. Efecto de la CFX y el CA sobre las concentraciones de citocinas en dolor neuropático e inflamatorio.**

Los resultados de nuestro trabajo muestran una elevación en la concentración sérica de TNF- $\alpha$ , tanto en el modelo de dolor neuropático (CCI) como en el de dolor inflamatorio (con CARR). Estos resultados concuerdan con los estudios que demuestran que un incremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias como la TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ , están relacionadas con la transmisión del dolor y el desarrollo del dolor neuropático inducido en el modelo de ligadura del nervio espinal (Lee y cols., 2013). De hecho el efecto antialodínico inducido por GAP en el modelo ligadura del nervio espinal puede deberse, de acuerdo a los autores, a la sobre-regulación de IL-10, una citosina antiinflamatoria, en la médula espinal, lo cual inhibe la expresión de citocinas proinflamatorias como la TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$  y la IL-6 en la médula espinal, de acuerdo a los autores (Lee y cols., 2013). Nuestros resultados muestran que la GAP, la CFX y el CA disminuyeron significativamente las concentraciones séricas de TNF- $\alpha$  en el modelo de CCI, sugiriendo que parte del efecto antialodínico de estos fármacos se debe a la regulación de esta citosina pro-inflamatoria. También el DIC, la CFX y el CA disminuyeron significativamente las concentraciones séricas de TNF- $\alpha$  en el modelo de CARR, pero solo 3 horas de la administración de la carragenina.

Con relación a las concentraciones séricas de la IL-10, una citosina antiinflamatoria, nuestros resultados muestran un aumento en la concentración sérica de ésta en los animales con dolor neuropático, y una disminución con el tratamiento de los fármacos (GAP, CFX y CA) en el mismo modelo. Estos resultados no concuerdan con el efecto reportado de esta citosina, ya que se esperaría que al ser una citosina antiinflamatoria

se encuentre en menores concentraciones en animales con dolor neuropático y en mayores concentraciones en animales con el mismo tipo de dolor pero con tratamiento farmacológico, por lo menos con GAP, como lo reportó previamente Lee y cols., en el 2013. Una posible explicación a este resultado inesperado podría ser que la regulación del sistema inmune generalmente se basa en feedbacks positivos y negativos, lo que significa que si aumenta la concentración de una molécula pro-inflamatoria, muy probablemente también aumentará una molécula que tenga el efecto contrario (Austin y Moalem-Taylor 2010); por otro lado, la regulación de citocinas también depende de manera muy importante del tiempo de la toma de muestra y en este estudio sólo se cuantificaron las concentraciones de esta citosina 3 h después del tratamiento farmacológico. A pesar de que la administración de CA y CFX causó una disminución de IL-10 sérica, esta diferencia no fue significativa comparado contra el grupo SHAM por lo que consideramos que pudiera representar una normalización de estas concentraciones debido a una disminución de TNF- $\alpha$  debida a la relación de feedback antes mencionada. Sin embargo, es importante que se determinen las concentraciones séricas de esta citosina a diferentes tiempos durante la evaluación del efecto antialodínico de CFX y CA.

Por otro lado, en el modelo de dolor inflamatorio solo el CA y el DIC a las 3 y 24 horas, respectivamente, mostraron un incremento en las concentraciones séricas de la IL-10, lo cual correlaciona con el efecto antiinflamatorio de ambos fármacos en la inflamación inducida por la carragenina, lo que podría indicar un efecto directo en la modulación de esta citosina en una situación de inflamación periférica aguda a diferencia de una de neuropatía crónica. Sin embargo, la CFX no mostró cambios significativos en las concentraciones séricas de IL-10, sugiriendo que su efecto antiinflamatorio puede deberse a otro mecanismo de acción ajeno a la modulación de las interleucinas.

## **9. CONCLUSIONES**

En conclusión, uno de los hallazgos más importantes de este estudio es que la administración aguda de CFX y CA induce un efecto antinociceptivo en situaciones donde el dolor neuropático ya se encuentra establecido y este efecto podría deberse a que ambos fármacos inducen una disminución de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$ ; aunque con relación a las concentraciones de la citocina antiinflamatoria IL-10, los

resultados no son claros y hacen falta más estudios. También, ambos fármacos inducen un efecto antinociceptivo y antiinflamatorio en la inflamación crónica, que también parece estar relacionada con una disminución de la TNF- $\alpha$  y un aumento de IL-10, por lo menos con el CA. Sin embargo, uno de las interrogantes que aún permanecen es si este efecto antinociceptivo está directamente relacionado con la posible interacción de estas moléculas en el sistema inmune ya que esto no pudo ser determinado en el presente estudio y será una línea de investigación a seguir en un futuro cercano.

## 10. REFERENCIAS

- Abraham, E. P. and G. G. Newton (1961). "The structure of cephalosporin C." *Biochem J* **79**: 377-393.
- Adam, D., I. de Visser and P. Koeppe (1982). "Pharmacokinetics of amoxicillin and clavulanic acid administered alone and in combination." *Antimicrob Agents Chemother* **22**(3): 353-357.
- Albert, H. B., J. S. Sorensen, B. S. Christensen and C. Manniche (2013). "Antibiotic treatment in patients with chronic low back pain and vertebral bone edema (Modic type 1 changes): a double-blind randomized clinical controlled trial of efficacy." *Eur Spine J* **22**(4): 697-707.
- Austin, P. J. and G. Moalem-Taylor (2010). "The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines." *J Neuroimmunol* **229**(1-2): 26-50.
- Ballantyne, J. C., E. Kalso and C. Stannard (2016). "WHO analgesic ladder: a good concept gone astray." *BMJ* **352**: i20.
- Banani, A., N. Maleki-Dizaji, A. Garjani, H. Soraya, S. Mostafalou and M. Ziaee (2012). "Clavulanic acid exhibits anti-inflammatory effects on carrageenan-induced paw edema model of inflammation in rats." *Ann Biol Res* **3**: 3312-3320.
- Bandell, M., G. M. Story, S. W. Hwang, V. Viswanath, S. R. Eid, M. J. Petrus, T. J. Earley and A. Patapoutian (2004). "Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin." *Neuron* **41**(6): 849-857.
- Bardin, L. (2011). "The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain." *Behavioural pharmacology* **22**(5 and 6): 390-404.
- Bardin, L., J. Lavarenne and A. Eschalier (2000). "Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats." *Pain* **86**(1): 11-18.

- Basbaum, A. I. and M. C. Bushnell (2008). Science of pain, Academic.
- Bautista, D. M., J. Siemens, J. M. Glazer, P. R. Tsuruda, A. I. Basbaum, C. L. Stucky, S. E. Jordt and D. Julius (2007). "The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold." *Nature* **448**(7150): 204-208.
- Benarroch, E. E. (2012). "Endogenous opioid systems: current concepts and clinical correlations." *Neurology* **79**(8): 807-814.
- Bennett, G. J. and Y. K. Xie (1988). "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man." *Pain* **33**(1): 87-107.
- Bjorklund, A. and S. B. Dunnett (2007). "Dopamine neuron systems in the brain: an update." *Trends Neurosci* **30**(5): 194-202.
- Bonica, J. J. (1979). "The need of a taxonomy." *Pain* **6**(3): 247-248.
- Bridges, R. J. and C. S. Esslinger (2005). "The excitatory amino acid transporters: pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes." *Pharmacol Ther* **107**(3): 271-285.
- Bushnell, M. C., M. Ceko and L. A. Low (2013). "Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain." *Nat Rev Neurosci* **14**(7): 502-511.
- Caperton, E. M., K. L. Heim-Duthoy, G. R. Matzke, P. K. Peterson and R. C. Johnson (1990). "Ceftriaxone therapy of chronic inflammatory arthritis. A double-blind placebo controlled trial." *Arch Intern Med* **150**(8): 1677-1682.
- Cenci, M. A. (2007). "Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia." *Trends Neurosci* **30**(5): 236-243.
- Clark, A. K., E. A. Old and M. Malcangio (2013). "Neuropathic pain and cytokines: current perspectives." *J Pain Res* **6**: 803-814.
- Colburn, R. W., M. L. Lubin, D. J. Stone, Jr., Y. Wang, D. Lawrence, M. R. D'Andrea, M. R. Brandt, Y. Liu, C. M. Flores and N. Qin (2007). "Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice." *Neuron* **54**(3): 379-386.
- Costigan, M., J. Scholz and C. J. Woolf (2009). "Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage." *Annu Rev Neurosci* **32**: 1-32.
- Czeschik, J. C., T. Hagenacker, M. Schäfers and D. Büsselberg (2008). "TNF- $\alpha$  differentially modulates ion channels of nociceptive neurons." *Neuroscience letters* **434**(3): 293-298.
- Decosterd, I. and C. J. Woolf (2000). "Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain." *Pain* **87**(2): 149-158.

- Demain, A. L. and S. Sanchez (2009). "Microbial drug discovery: 80 years of progress." *J Antibiot (Tokyo)* **62**(1): 5-16.
- Dray, A. (1995). "Inflammatory mediators of pain." *Br J Anaesth* **75**(2): 125-131.
- Dray, A. and M. Perkins (1993). "Bradykinin and inflammatory pain." *Trends in neurosciences* **16**(3): 99-104.
- Echeverry, S., X. Q. Shi, S. Rivest and J. Zhang (2011). "Peripheral nerve injury alters blood-spinal cord barrier functional and molecular integrity through a selective inflammatory pathway." *J Neurosci* **31**(30): 10819-10828.
- Ellerbrok, H. and R. Hakenbeck (1988). "Penicillin-degrading activities of peptides from pneumococcal penicillin-binding proteins." *Eur J Biochem* **171**(1-2): 219-224.
- Gan, T. J. (2010). "Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile." *Curr Med Res Opin* **26**(7): 1715-1731.
- Geffeney, S. L. and M. B. Goodman (2012). "How we feel: ion channel partnerships that detect mechanical inputs and give rise to touch and pain perception." *Neuron* **74**(4): 609-619.
- Goodrich, G. S., A. Y. Kabakov, M. Q. Hameed, S. C. Dhamne, P. A. Rosenberg and A. Rotenberg (2013). "Ceftriaxone treatment after traumatic brain injury restores expression of the glutamate transporter, GLT-1, reduces regional gliosis, and reduces post-traumatic seizures in the rat." *J Neurotrauma* **30**(16): 1434-1441.
- Hajhashemi, V. and K. Dehdashti (2014). "Antinociceptive effect of clavulanic acid and its preventive activity against development of morphine tolerance and dependence in animal models." *Res Pharm Sci* **9**(5): 315-321.
- Hokfelt, T., O. Phillipson and M. Goldstein (1979). "Evidence for a dopaminergic pathway in the rat descending from the A11 cell group to the spinal cord." *Acta Physiol Scand* **107**(4): 393-395.
- Hu, J., N. Milenkovic and G. R. Lewin (2006). "The high threshold mechanotransducer: a status report." *Pain* **120**(1-2): 3-7.
- Hu, Y., W. Li, L. Lu, J. Cai, X. Xian, M. Zhang, Q. Li and L. Li (2010). "An anti-nociceptive role for ceftriaxone in chronic neuropathic pain in rats." *Pain* **148**(2): 284-301.
- Huh, Y., M. S. Ju, H. Park, S. Han, Y. M. Bang, C. F. Ferris, G. A. Koppell, J. A. King, M. L. Kim and D. J. Kim (2010). "Clavulanic acid protects neurons in pharmacological models of neurodegenerative diseases." *Drug Development Research* **71**(6): 351-357.
- Hulse, R. P., L. F. Donaldson and D. Wynick (2012). "Differential roles of galanin on mechanical and cooling responses at the primary afferent nociceptor." *Mol Pain* **8**: 41.

Inquimbert, P., K. Bartels, O. B. Babaniyi, L. B. Barrett, I. Tegeder and J. Scholz (2012). "Peripheral nerve injury produces a sustained shift in the balance between glutamate release and uptake in the dorsal horn of the spinal cord." *Pain* **153**(12): 2422-2431.

Jensen, T. S. and N. B. Finnerup (2014). "Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms." *The Lancet Neurology* **13**(9): 924-935.

Jensen, T. S. and G. F. Gebhart (2008). "New pain terminology: a work in progress." *Pain* **140**(3): 399-400.

Kardos, N. and A. L. Demain (2011). "Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes." *Appl Microbiol Biotechnol* **92**(4): 677-687.

Kaur, B. and A. Prakash (2017). "Ceftriaxone attenuates glutamate-mediated neuro-inflammation and restores BDNF in MPTP model of Parkinson's disease in rats." *Pathophysiology*.

Kilic, F. S., B. Sirmagul, E. Yildirim, S. Oner and K. Erol (2012). "Antinociceptive effects of gabapentin & its mechanism of action in experimental animal studies." *The Indian journal of medical research* **135**(5): 630.

Kim, D. J., J. A. King, L. Zuccarelli, C. F. Ferris, G. A. Koppel, C. T. Snowdon and C. H. Ahn (2009). "Clavulanic acid: a competitive inhibitor of beta-lactamases with novel anxiolytic-like activity and minimal side effects." *Pharmacol Biochem Behav* **93**(2): 112-120.

Kissin, I. (2010). "The development of new analgesics over the past 50 years: a lack of real breakthrough drugs." *Anesth Analg* **110**(3): 780-789.

Kost, G. C., S. Selvaraj, Y. B. Lee, D. J. Kim, C. H. Ahn and B. B. Singh (2011). "Clavulanic acid increases dopamine release in neuronal cells through a mechanism involving enhanced vesicle trafficking." *Neurosci Lett* **504**(2): 170-175.

Kost, G. C., S. Selvaraj, Y. B. Lee, D. J. Kim, C. H. Ahn and B. B. Singh (2012). "Clavulanic acid inhibits MPP(+)-induced ROS generation and subsequent loss of dopaminergic cells." *Brain Res* **1469**: 129-135.

Kukkar, A., A. Bali, N. Singh and A. S. Jaggi (2013). "Implications and mechanism of action of gabapentin in neuropathic pain." *Arch Pharm Res* **36**(3): 237-251.

Lee, S. G., Z. Z. Su, L. Emdad, P. Gupta, D. Sarkar, A. Borjabad, D. J. Volsky and P. B. Fisher (2008). "Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes." *J Biol Chem* **283**(19): 13116-13123.

Leknes, S. and I. Tracey (2008). "A common neurobiology for pain and pleasure." *Nat Rev Neurosci* **9**(4): 314-320.

Leung, L. and C. M. Cahill (2010). "TNF-alpha and neuropathic pain--a review." *J Neuroinflammation* **7**: 27.

- Lin, Y., K. Roman, K. D. Foust, B. K. Kaspar, M. T. Bailey and R. L. Stephens (2011a). "Glutamate Transporter GLT-1 Upregulation Attenuates Visceral Nociception and Hyperalgesia via Spinal Mechanisms Not Related to Anti-Inflammatory or Probiotic Effects." *Pain Res Treat* **2011**: 507029.
- Lin, Y. T., L. S. Ro, H. L. Wang and J. C. Chen (2011b). "Up-regulation of dorsal root ganglia BDNF and trkB receptor in inflammatory pain: an in vivo and in vitro study." *J Neuroinflammation* **8**: 126.
- Loeser, J. D. and R. D. Treede (2008). "The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology." *Pain* **137**(3): 473-477.
- Lopez-Avila, A., U. Coffeen, J. M. Ortega-Legaspi, R. del Angel and F. Pellicer (2004). "Dopamine and NMDA systems modulate long-term nociception in the rat anterior cingulate cortex." *Pain* **111**(1-2): 136-143.
- Loyd, D. R., M. A. Henry and K. M. Hargreaves (2013). Serotonergic neuromodulation of peripheral nociceptors. Seminars in cell & developmental biology, Elsevier.
- Macaluso, A., M. Bernabucci, A. Trabucco, L. Ciolli, F. Troisi, R. Baldini, R. Gradini, G. Battaglia, F. Nicoletti and S. Collini (2013). "Analgesic effect of a single preoperative dose of the antibiotic ceftriaxone in humans." *J Pain* **14**(6): 604-612.
- Marchand, S. (2008). "The physiology of pain mechanisms: from the periphery to the brain." *Rheum Dis Clin North Am* **34**(2): 285-309.
- Margetic, S. (2012). "Inflammation and hemostasis." *Biochemia Medica* **22**(1): 49-62.
- McMahon, S., M. Koltzenburg, I. Tracey and D. C. Turk (2013). Wall & Melzack's Textbook of Pain, Elsevier Health Sciences.
- Melik Parsadaniantz, S., C. Rivat, W. Rostene and A. Reaux-Le Goazigo (2015). "Opioid and chemokine receptor crosstalk: a promising target for pain therapy?" *Nat Rev Neurosci* **16**(2): 69-78.
- Merskey, H. E. (1986). "Classification of chronic pain: Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms." *Pain*.
- Mika, J. (2008). "Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness." *Pharmacol Rep* **60**(3): 297-307.
- Milligan, E. D. and L. R. Watkins (2009). "Pathological and protective roles of glia in chronic pain." *Nat Rev Neurosci* **10**(1): 23-36.
- Moalem, G. and D. J. Tracey (2006). "Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain." *Brain Res Rev* **51**(2): 240-264.

- Munch, R., R. Luthy, J. Blaser and W. Siegenthaler (1981). "Human pharmacokinetics and CSF penetration of clavulanic acid." *J Antimicrob Chemother* **8**(1): 29-37.
- Nau, R., F. Sorgel and H. Eiffert (2010). "Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections." *Clin Microbiol Rev* **23**(4): 858-883.
- Nieoullon, A. (2002). "Dopamine and the regulation of cognition and attention." *Prog Neurobiol* **67**(1): 53-83.
- Niswender, C. M. and P. J. Conn (2010). "Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **50**: 295-322.
- Papathanasiou, T., R. V. Juul, A. M. Heegaard, M. Kreilgaard and T. M. Lund (2016). "Co-administration of morphine and gabapentin leads to dose dependent synergistic effects in a rat model of postoperative pain." *Eur J Pharm Sci* **82**: 97-105.
- Paul, M., A. Lador, S. Grozinsky - Glasberg and L. Leibovici (2014). "Beta lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam - aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis." *The Cochrane Library*.
- Pedersen, L., P. C. Borchgrevink, Riphagen, II and O. M. Fredheim (2014). "Long- or short-acting opioids for chronic non-malignant pain? A qualitative systematic review." *Acta Anaesthesiol Scand* **58**(4): 390-401.
- Pertovaara, A. (2013). "The noradrenergic pain regulation system: a potential target for pain therapy." *European journal of pharmacology* **716**(1): 2-7.
- Platt, S. R. (2007). "The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review." *Vet J* **173**(2): 278-286.
- Poole, L. (1944). "Army progress with penicilin." *British Journal of Surgery* **32**(125): 110-111.
- Rawls, S. M., D. A. Baron and J. Kim (2010a). "beta-Lactam antibiotic inhibits development of morphine physical dependence in rats." *Behav Pharmacol* **21**(2): 161-164.
- Rawls, S. M., F. Karaca, I. Madhani, V. Bhojani, R. L. Martinez, M. Abou-Gharbia and R. B. Raffa (2010b). "beta-lactamase inhibitors display anti-seizure properties in an invertebrate assay." *Neuroscience* **169**(4): 1800-1804.
- Reading, C. and M. Cole (1977). "Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*." *Antimicrob Agents Chemother* **11**(5): 852-857.
- Ren, K. and R. Dubner (2008). "Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity." *Curr Opin Anaesthesiol* **21**(5): 570-579.



Richner, M., C. B. Vaegter and L. T. Pallesen (2016). "Targeting glial dysfunction to treat post-surgical neuropathic pain." *Scandinavian Journal of Pain* **10**: 58-60.

Rothstein, J. D., S. Patel, M. R. Regan, C. Haenggeli, Y. H. Huang, D. E. Bergles, L. Jin, M. Dykes Hoberg, S. Vidensky, D. S. Chung, S. V. Toan, L. I. Bruijn, Z. Z. Su, P. Gupta and P. B. Fisher (2005). "Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression." *Nature* **433**(7021): 73-77.

Saraf, S. (2008). NSAIDs Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs: An Overview, PharmaMed Press.

Saudagar, P. S., S. A. Survase and R. S. Singhal (2008). "Clavulanic acid: a review." *Biotechnol Adv* **26**(4): 335-351.

Shah, K. K., B. S. Pritt and M. P. Alexander (2017). "Histopathologic review of granulomatous inflammation." *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*.

Shen, K. F., H. Q. Zhu, X. H. Wei, J. Wang, Y. Y. Li, R. P. Pang and X. G. Liu (2013). "Interleukin-10 down-regulates voltage gated sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons." *Exp Neurol* **247**: 466-475.

Sommer, C. (2004). "Serotonin in pain and analgesia." *Molecular neurobiology* **30**(2): 117-125.

Stepanovic-Petrovic, R. M., A. M. Micov, M. A. Tomic, J. M. Kovacevic and B. D. Boskovic (2014). "Antihyperalgesic/antinociceptive effects of ceftriaxone and its synergistic interactions with different analgesics in inflammatory pain in rodents." *Anesthesiology* **120**(3): 737-750.

Suarez, C. and F. Gudiol (2009). "Antibióticos betalactámicos." *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* **27**(2): 116-129.

Sudhof, T. C. (2013). "Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle." *Neuron* **80**(3): 675-690.

Szolcsanyi, J., F. Anton, P. W. Reeh and H. O. Handwerker (1988). "Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin." *Brain Res* **446**(2): 262-268.

Tamae, A., T. Nakatsuka, K. Koga, G. Kato, H. Furue, T. Katafuchi and M. Yoshimura (2005). "Direct inhibition of substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord by activation of dopamine D2-like receptors." *J Physiol* **568**(Pt 1): 243-253.

Thacker, M. A., A. K. Clark, F. Marchand and S. B. McMahon (2007). "Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules." *Anesth Analg* **105**(3): 838-847.

Todd, A. J. (2010). "Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn." *Nat Rev Neurosci* **11**(12): 823-836.


- Traynelis, S. F., L. P. Wollmuth, C. J. McBain, F. S. Menniti, K. M. Vance, K. K. Ogden, K. B. Hansen, H. Yuan, S. J. Myers and R. Dingledine (2010). "Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function." *Pharmacol Rev* **62**(3): 405-496.
- Ussai, S., L. Miceli, F. E. Pisa, R. Bednarova, A. Giordano, G. Della Rocca and R. Petelin (2015). "Impact of potential inappropriate NSAIDs use in chronic pain." *Drug Des Devel Ther* **9**: 2073-2077.
- van Hecke, O., N. Torrance and B. H. Smith (2013). "Chronic pain epidemiology and its clinical relevance." *Br J Anaesth* **111**(1): 13-18.
- Vazquez, E., M. Navarro, Y. Salazar, G. Crespo, G. Bruges, C. Osorio, V. Tortorici, H. Vanegas and M. López (2015). "Systemic changes following carrageenan-induced paw inflammation in rats." *Inflammation Research* **64**(5): 333-342.
- Von Korff, M. and K. M. Dunn (2008). "Chronic pain reconsidered." *Pain* **138**(2): 267-276.
- Ware, M. A. and G. J. Bennett (2014). "Case report: Long-standing complex regional pain syndrome relieved by a cephalosporin antibiotic." *Pain* **155**(7): 1412-1415.
- Willis, W. D., Jr. (2007). "The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain." *Brain Res Rev* **55**(2): 297-313.
- Wood, P. B. (2008). "Role of central dopamine in pain and analgesia." *Expert Rev Neurother* **8**(5): 781-797.
- Woolf, C. J. and Q. Ma (2007). "Nociceptors--noxious stimulus detectors." *Neuron* **55**(3): 353-364.
- Wooten, M., H. J. Weng, T. V. Hartke, J. Borzan, A. H. Klein, B. Turnquist, X. Dong, R. A. Meyer and M. Ringkamp (2014). "Three functionally distinct classes of C-fibre nociceptors in primates." *Nat Commun* **5**: 4122.
- Wright, A. and B. Vissel (2012). "The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain." *Front Mol Neurosci* **5**: 34.
- Wrigley, P. J., S. R. Press, S. M. Gustin, V. G. Macefield, S. C. Gandevia, M. J. Cousins, J. W. Middleton, L. A. Henderson and P. J. Siddall (2009). "Neuropathic pain and primary somatosensory cortex reorganization following spinal cord injury." *Pain* **141**(1-2): 52-59.
- Yamada, J. and S. Jinno (2011). "Alterations in neuronal survival and glial reactions after axotomy by ceftriaxone and minocycline in the mouse hypoglossal nucleus." *Neurosci Lett* **504**(3): 295-300.
- Yuk, J. H., C. H. Nightingale and R. Quintiliani (1989). "Clinical pharmacokinetics of ceftriaxone." *Clinical pharmacokinetics* **17**(4): 223-235.

Zimmermann, M. (1983). "Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals." *Pain* **16**(2): 109-110.

## **11. Artículo publicado**

## Research Article

## Antiallodynic Activity of Ceftriaxone and Clavulanic Acid in Acute Administration is Associated with Serum TNF- $\alpha$ Modulation and Activation of Dopaminergic and Opioidergic Systems

A. Ochoa-Aguilar,<sup>1</sup> M.A. Sotomayor-Sobrinó,<sup>1</sup> R. Jaimez,<sup>1</sup> R. Rodríguez,<sup>1</sup>  
R. Plancarte-Sánchez,<sup>2</sup> and R. Ventura-Martínez <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510, Delegación Coyoacán, Ciudad de México, México

<sup>2</sup>Clínica del Dolor, Instituto Nacional de Cancerología

Strategy, Management and Health Policy				
Enabling Technology, Genomics, Proteomics	Preclinical Research	Preclinical Development Toxicology, Formulation Drug Delivery, Pharmacokinetics	Clinical Development Phases I-III Regulatory, Quality, Manufacturing	Postmarketing Phase IV

**ABSTRACT** The aim of this study was to determine the antiallodynic effect of acute administration of the  $\beta$ -lactam antimicrobials, ceftriaxone (CFX) and clavulanic acid (CLAV), for the control of established pain on a model of neuropathic pain (NP). We also investigated the involvement of dopaminergic and opioidergic pathways as well as alterations in serum concentrations of TNF- $\alpha$  in the antiallodynic actions of these drugs. CFX, CLAV, or gabapentin (GAP), a reference drug, were administered i.p. twelve days after constriction of the sciatic nerve in rats. Mechanic and cold allodynia were evaluated for 3 h and alterations in serum concentration of TNF- $\alpha$  determined. Both CFX and CLAV had antiallodynic effects in response to mechanical and cold stimulation, similar to GAP. The antiallodynic effects of CFX and CLAV were blocked by haloperidol (HAL), a D2 receptor antagonist, and by naloxone (NLX), an opioid receptor antagonist. Additionally, serum TNF- $\alpha$  levels were attenuated following CFX and CLAV administration. These results suggest that acute administration of CFX and CLAV may represent a promising approach for treating the acute allodynia of NP, and that the mechanisms involved in these effects involve activation of dopaminergic and opioidergic pathways as well as modulation of TNF- $\alpha$  production. Drug Dev Res 00 : 000000, 2017. © 2017 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** ceftriaxone; clavulanic acid; neuropathic pain

### INTRODUCTION

Neuropathic pain (NP) is a chronic disorder that affects up to 10% of the general population, with affected patients presenting a wide range of disabilities [van Hecke et al., 2013]. NP syndromes are characterized by allodynia, an exaggerated response to non-noxious stimuli; although numerous pharmacological treatments have been studied, only a modest efficacy has been reported in the control of this type of pain [Finnerup et al., 2015].

\*Correspondence to: R. Ventura-Martínez, Av. Universidad No. 3000, Col. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, P.O. 04510, Mexico City, Mexico. E-mail: rventuram7@hotmail.com

Grant sponsor: CONACYT; Grant number: 294713; Grant sponsor: UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN204416; Grant number: IN204416  
Received 23 February 2017; Accepted 24 February 2017

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/ddr.21381

© 2017 Wiley Periodicals, Inc.

The difficulty in achieving adequate pain control stems from the complexity of the pathophysiology of this disorder [Nickel et al., 2012]. Indeed, interactions between both neuronal [Costigan et al., 2009] and immunological [Clark et al., 2013] systems underpin the numerous changes in different sensory pain transduction, perception, and integration systems that ultimately lead to a state of chronic pain [Price and Prescott, 2015]. The neuronal aspects of NP involve changes in both excitatory and inhibitory neurotransmitter systems. However, increased glutamatergic neurotransmission is one of the main changes related to NP induction [Nickel et al., 2012]; on the other, decreased levels of neurotransmitters in descending pathways, as dopamine (DA) and endogenous opioids, have been implicated in NP induction [Coffeen et al., 2010]. Proinflammatory cytokines, for example, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), can also stimulate spontaneous nociceptor activity and contribute to axonal damage. Increased levels of TNF- $\alpha$  occur in various chronic pain states [Sacerdote et al., 2013].

Ceftriaxone (CFX), a  $\beta$ -lactam antimicrobial molecule (BLM) [Donnelly et al., 2017] has shown antinociceptive effects after repeated administration in NP models [Hu et al., 2010; Gunduz et al., 2011; Hajhashemi et al., 2013; Shi et al., 2016] and can enhance the analgesic effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in inflammatory and visceral models [Stepanovic-Petrovic et al., 2014]. CFX also has neuroprotective [Cui et al., 2014] and antiepileptic properties [Uyanikgil et al., 2016], inhibits drug-seeking reinstatement [Sari et al., 2009], and can release DA from the nucleus accumbens [Althobaiti et al., 2016].

Clavulanic acid (CLAV), is another BLM that lacks antibiotic effects but is widely used as a BLM adjuvant due to its ability to inhibit the  $\beta$ -Lactamase secreted by bacteria preventing the degradation of BLM antibiotics thus enhancing their efficacy [Saudagar et al., 2008]. It has neuroprotective [Kost et al., 2012] and anxiolytic activities [Kim et al., 2009] and produces antinociceptive effects [Hajhashemi and Dehdashti, 2014]. Like CFX, it can enhance DA release in the central nervous system (CNS) [Kost et al., 2011].

The antinociceptive effects of both BLMs have been principally attributed to their capacity to increase GLT-1 expression, the major glutamate transporter that removes the high concentrations of this neurotransmitter from extracellular space [Rothstein et al., 2005; Hu et al., 2010; Shi et al., 2016], although other mechanisms could be involved in their antinociceptive effects. The aim of this study was to

determine the antiallodynic effects of acute administration of CFX and CLAV in established NP induced by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in rats. We also investigated the involvement of the dopaminergic and opioidergic systems as well as alterations in concentrations of TNF- $\alpha$ , a proinflammatory cytokine, in the antiallodynic actions of these drugs.

## METHODS AND MATERIALS

### Animals

Male Wistar rats weighing 200–250 g were housed in plastic cages at a room with controlled temperature (22°C) and maintained in a 12:12 h light/dark cycle with food and water available *ad libitum*. All experiments were performed between 8:00 and 13:00. Experiments were conducted in accordance with the regulations of the Ethics Committee of the International Association for the Study of Pain [Zimmermann, 1983], and of the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and approved by our institutional Ethics Commission. The number of experimental animals was kept to a minimum ( $n = 8$  per group) and these were euthanized by cervical dislocation at the end of the experiments.

### Compounds and Drugs

CFX (Pisa, Mexico City, Mexico), potassium clavulanate (CLAV; Sigma, St. Louis, MO), gabapentin (GAP; Sigma, St. Louis, MO), and naloxone (NLX; Sigma, St. Louis, MO) were dissolved in saline solution (0.9% NaCl); while haloperidol (HAL; Sigma, St. Louis, MO) was dissolved in a drop of acetic acid, diluted with distilled water, and adjusted to pH of 4.5–5. All the compounds were prepared immediately before their intraperitoneal (i.p.) administration and administered at a final volume of 1 ml/kg of body weight.

### CCI Procedure to Induce Neurophatic Pain

To induce NP, the CCI model was used [Bennett and Xie, 1988]. Briefly, rats were anesthetized with ketamine/xylazine (50:7.5 mg/kg, i.p.) and the area over the right pelvic joint was shaved and disinfected. An incision of ~10 mm was made over the pelvic joint and all muscles were separated to expose the sciatic nerve. Four ligatures were applied surrounding the sciatic nerve with a spacing of ~1 mm between each with chromic gut sutures (3-0) and muscle and skin were separately sutured with 4-0 silk. The sciatic nerves of sham-operated rats were

identically exposed but not ligated. Rats were returned to their home cages and monitored daily until the day of the experiment. All surgical procedures were performed by the same person under normal sterile conditions.

#### Behavioral Assessment

Behavioral testing with mechanical and cold stimuli was conducted twelve days postsurgery. For this, animals were placed in transparent acrylic cages with a wire mesh floor, which allowed access to the plantar surface of the hind paw. They were allowed to habituate to this environment until exploratory behavior diminished (a minimum of 20 min) before stimulation was initiated. Baseline levels of each type of stimulation were obtained prior to treatment administration to ensure consistent behavioral responses.

#### Mechanical Allodynia (Von Frey Test)

To evaluate mechanical allodynia, withdrawal threshold to mechanical stimuli was measured using a series of calibrated nylon monofilament fibers (Von Frey filaments; Stoelting, Wood Dale, IL). After a period of habituation, filaments in the order of increasing force (from 1 to 15 g) were applied perpendicular to the plantar surface of the right hind paw with sufficient force until it bowed slightly and was held for  $\sim 1$  s [Moss et al., 2002]. A painful response was recognized if the right hind paw was sharply withdrawn. Each trial was repeated five times at intervals of 30 s, and if the response was present in at least 3 occasions, the force was recorded. To avoid tissue injury the cutoff point was established at 15 g. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM of the paw withdrawal threshold (PWT) of each treatment, expressed in grams (g).

#### Cold Allodynia (Acetone Test)

Ten minutes after conduction of the previous test, at 60, 120, and 180 min, cold allodynia was measured in the same animals. For this, a drop of acetone was carefully applied to the right hind footpad of rats without touching the skin, using a blunt needle connected to a plastic syringe [Choi et al., 1994]. The total time at which the paw of the rat was lifted up in a period of 60 s was quantified and interpreted as a painful response. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM expressed as seconds, in which a paw was placed (Paw Placement Time, PPT) on top of the wire mesh during the period of observation.

#### TNF- $\alpha$ Assessment

After performing the behavioral tests, a blood sample was obtained from each animal to determine concentration of TNF- $\alpha$ . The blood samples were taken under deep pentobarbital anesthesia (36 mg/kg, i.p.) from the abdominal aorta with a vacutainer device through direct puncture, after which the animals were sacrificed. Blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 20 min; serum was separated and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The levels of TNF- $\alpha$  in samples of serum were quantified using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay kit (TNF- $\alpha$  Abcam, ab46070; Cambridge, Mass) according to the instruction of the manufacturer. The TNF- $\alpha$  concentration in each sample was expressed as picograms of antigen per milliliter of serum (pg/ml).

#### Experimental Design

The protocol consisted of two groups of experiments. In the first, antialloodynic effects produced by acute administration of CFX and CLAV as well as the changes in TNF- $\alpha$  concentration were evaluated; in the second, the possible participation of dopaminergic or opioidergic pathways on the antialloodynic effects of both drugs was determined.

In the first set of groups, CFX (100, 200, or 400 mg/kg), CLAV (0.1, 1, or 10 mg/kg), GAP (10 mg/kg, as positive control), or saline solution as vehicle (VEH) were administered in a volume 1 ml/kg i.p. to 8 neuropathic rats in the day 12 postsurgery. Baseline mechanical and cold allodynia were assessed, before administration of each treatment to confirm the typical painful behavior in each group. To determine the antialloodynic effects to mechanical or cold stimulus, animals were tested every 30 or 60 min, respectively, for 3 h postadministration.

Dosage selection for the second set of groups was based on the results from single administration of drugs, and were 200 mg/kg of CFX and 10 mg/kg of CLAV. In these experiments, HAL (0.1 mg/kg i.p.), a D2 antagonist; or NLX (10 mg/kg i.p.), an opioid antagonist, were administered 20 min before test drugs in different groups of rats with CCI. The overall antialloodynic effect during 3 h observation was expressed as the area under the curve (AUC) to compare cumulative antialloodynic effects of several treatments in the absence or presence of antagonists.

#### Statistical Analysis

The data and statistical analysis complied with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology [Curtis et al., 2015]. Data

are expressed as mean  $\pm$  SEM of 8 animals per group. Temporal courses of mechanical and cold antiallodynic effects after treatments were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated-measures followed by Tukey's post-hoc test. The cumulative antiallodynic effect during the entire period of observation (180 min or 3 h) of each treatment was expressed as the AUC of the corresponding time course. The AUCs for each treatment were obtained by the trapezoidal method [Rowland and Tozer, 1989] and were analyzed using a one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. The post-hoc test was used only if  $F$  achieved  $P < 0.05$  and there was no significant variance in homogeneity. For comparison between two groups, values were analyzed using Student's- $t$  test for independent groups. Differences between means with a  $P$ -value  $< 0.05$  were considered significant at the 95% confidence level. For analysis of data, GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) was used.

## RESULTS

### Antiallodynic Effects of CFX and CLAV with Mechanical Stimulus

Twelve days after surgery, animals with NP (CCI group) developed an allodynic response below 4 g ( $3.18 \pm 0.55$  g) to stimulus with the Von Frey filaments. The PWT decreased from 15 g, before surgery, to  $3.18 \pm 0.55$  g ( $P < 0.05$ ); while the sham-operated group did not show any variation from the set cut off point of 15 g. GAP, a positive control, induced an antiallodynic effect between 30 and 180 min ( $9.0 \pm 0.53$  to  $10.34 \pm 0.7$  g, respectively). GAP induced a maximal effect at 60 min postadministration ( $12.5 \pm 0.94$  g) that remained unchanged during the rest of the evaluation period. The PWT of sham and GAP groups showed differences from 30 min in comparison with CCI group (Fig. 1A). The AUC of PWT in CCI group was less than that of the sham group ( $8.9 \pm 1.4$  vs.  $45 \pm 0$  au;  $P < 0.05$ ), whereas GAP increased the PWT in comparison with the CCI group ( $30.45 \pm 1.3$  vs.  $8.9 \pm 1.4$  au,  $P < 0.05$ ; Fig. 1B). The antiallodynic effect of GAP corresponded to 67.7% in relation to responses in the sham group. All doses of CFX significantly increased the PWT between 30 and 180 min (Fig. 1C) in comparison to the VEH group ( $P < 0.05$ ). The AUC analysis showed significant differences of all CFX groups (100, 200, and 400 mg/kg) in comparison with VEH ( $25.7 \pm 0.8$ ,  $28.8 \pm 1.7$ , and  $28.6 \pm 1.2$  vs.  $8.86 \pm 1.4$  au, respectively); although there were no differences between doses (Fig. 1D). The antiallodynic effect of CFX

corresponded to 57.0, 64.0, and 63.6%, respectively, in relation to the sham group.

Similarly, all doses of CLAV significantly increased the PWT between 30 and 180 min (Fig. 1E) in comparison to the VEH ( $P < 0.05$ ). Moreover, the PWT of the CLAV 10 mg/kg group at 30 and 60 min was not different from that of the sham group ( $13.7 \pm 0.81$  and  $14.3 \pm 0.62$  vs. 15.0 g, respectively). All doses of CLAV diminished PWT at 90 min. In this case, the AUC analysis also showed differences for all CLAV groups (0.1, 1.0, and 10 mg/kg) in comparison with VEH ( $18.4 \pm 0.8$ ,  $20.0 \pm 1.0$ , and  $28.1 \pm 1.6$  vs.  $8.86 \pm 1.4$  au, respectively), as well as between the 0.1 and 1.0 mg/kg groups with the 10 mg/kg group (Fig. 1F). This antiallodynic effects correspond to 40.9, 44.4, and 62.5%, respectively, in relation to the sham group.

### Antiallodynic Effect of CFX and CLAV with Cold Stimulus

Animals with NP (CCI group) developed cold allodynia to acetone in  $< 27$  s ( $26.0 \pm 4.6$  s) and was expressed as PPT. This response was maintained at all times tested (at 60, 120, and 180 min:  $21.7 \pm 2.9$ ,  $26.7 \pm 4.0$ , and  $24.1 \pm 2.2$  s, respectively). In contrast, in sham operated animals, acetone drop did not induce changes in PPT in the 60 s of observation. GAP induced an antiallodynic effect at 60 and 120 min increasing PPT in comparison with the CCI group (at 60 min:  $43.4 \pm 1.1$  vs.  $21.7 \pm 2.9$  s; and at 120 min:  $43.0 \pm 1.8$  vs.  $26.8 \pm 4.0$  s, respectively; Fig. 2A). The AUC analysis of these temporal courses showed that the value of the CCI group was less than those of the sham group ( $73.6 \pm 5.9$  vs.  $180 \pm 0$  au;  $P < 0.05$ ); whereas, GAP increased them in comparison with the CCI group ( $115.5 \pm 2.1$  vs.  $73.6 \pm 5.9$  au,  $P < 0.05$ ; Fig. 2B). The antiallodynic effect exerted by GAP in the acetone model corresponds to 63.9% in relation to the sham group.

Animals treated with CFX showed an increased in PPT at all doses and at all times tested (Fig. 2C). The AUCs of these groups (100, 200, and 400 mg/kg) were increased in comparison with that receiving VEH ( $122.9 \pm 4.5$ ,  $125 \pm 9.9$ , and  $141.2 \pm 2.9$  vs.  $73.6 \pm 5.9$  au, respectively) but, there were no differences in the effect induced by the different doses (Fig. 2D). Thus, the antiallodynic effect of each dose were  $68.2 \pm 2.5$ ,  $69.4 \pm 5.25$ , and  $78.4 \pm 1.6\%$ , respectively, in relation to the sham group. Finally, CLAV increased PPT at 1 and 10 mg/kg at 60 min in comparison with VEH ( $41.2 \pm 3.2$  and  $51.6 \pm 1.2$  vs.  $21.7 \pm 2.9$  s, respectively) and at the higher dose during the rest of the experiment (at 120 and 180 min:

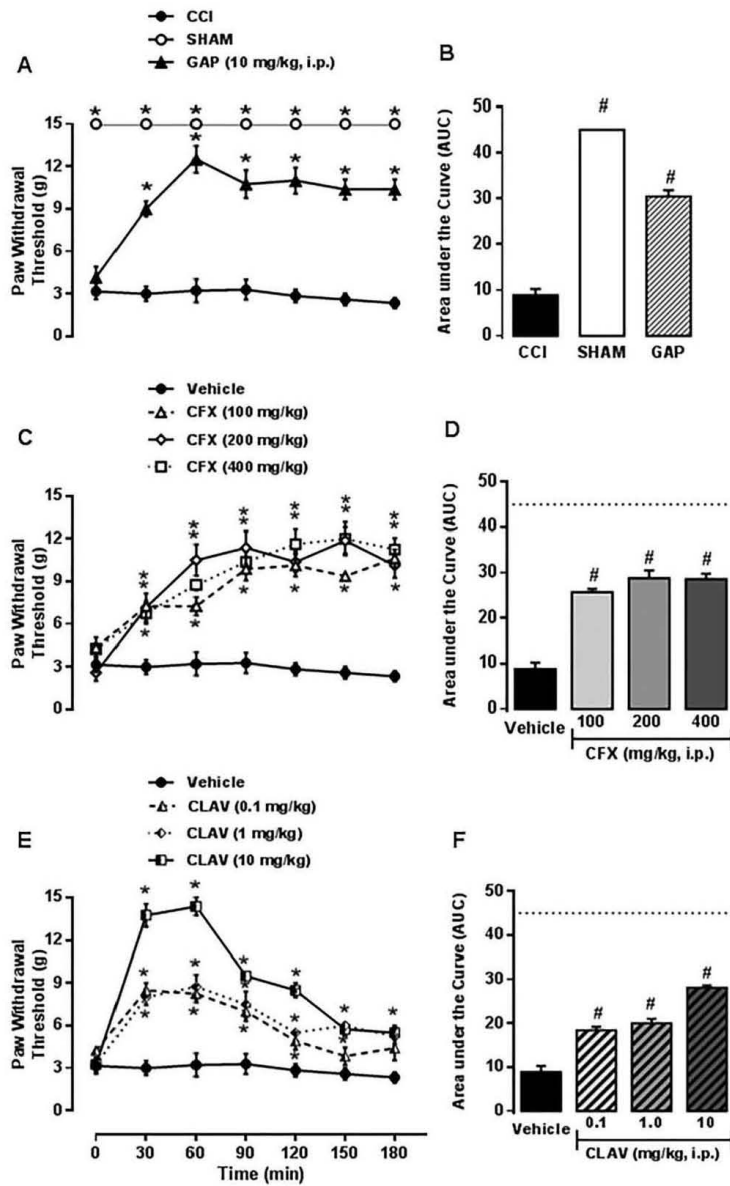
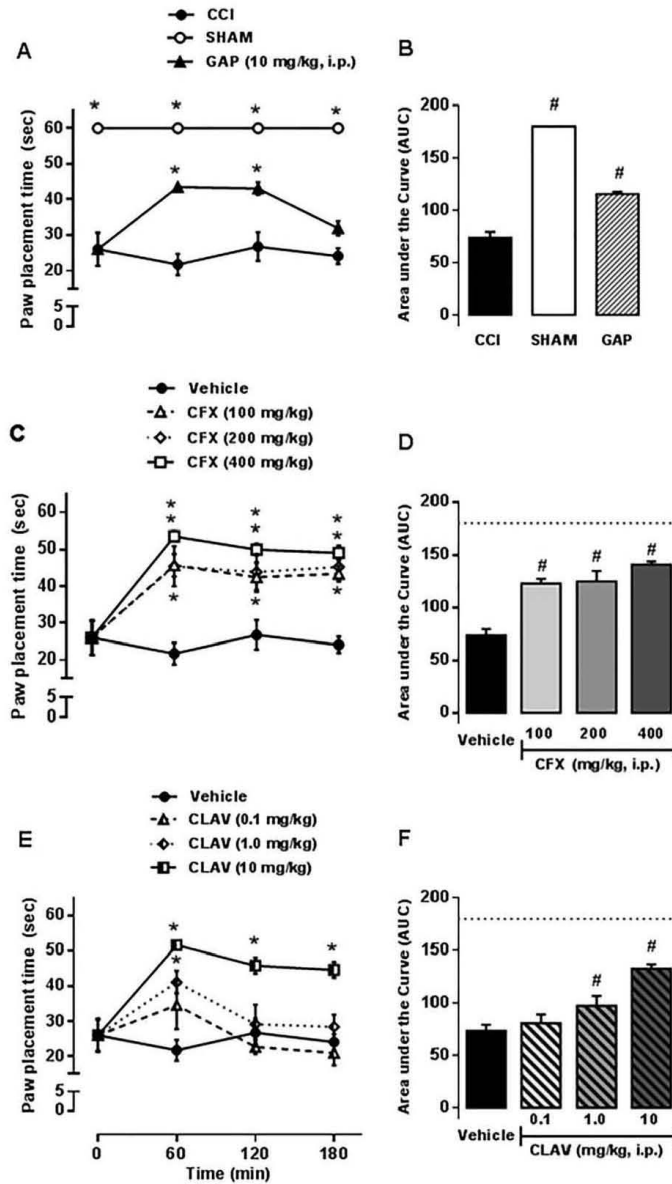


Fig. 1. Antiallodynic activity of GAP (A and B), CFX (C and D), and CLAV (E and F) in acute administration on mechanical allodynia in a NP model. Panels A, C, and E represent the time courses of PWT to mechanical stimulus after CCI or sham surgery in rats. Vehicle and drugs were administered 12 days after surgery. Panels B, D, and F represent the AUCs obtained of time courses of PWT to mechanical stimulus. Data are mean  $\pm$  SEM of 8 animals in each group. \* $P < 0.05$  compared with CCI (A) or vehicle (C and E), two way ANOVA followed by a Tukey's test. # $P < 0.05$  compared with CCI (B) or vehicle (D and F), one way ANOVA followed by Dunnett's test.





**Fig. 2.** Effect of GAP (A and B), CFX (C and D), and CLAV (E and F) in acute administration on cold allodynia in a NP model. Panels A, C, and E represents the time courses of PPT to cold stimulus with a drop of acetone after CCI or sham surgery in rats. Vehicle and drugs were administered twelve days after surgery. Panels B, D, and F represent the AUCs obtained of time courses of PPT to cold stimulus. Data are mean  $\pm$  SEM of 8 rats in each group. \* $P < 0.05$  compared with CCI (A) or vehicle group (C and E) (two way ANOVA followed by a Tukey's test). # $P < 0.05$  compared with CCI (B) or vehicle group (D and F), one way ANOVA followed by Dunnett's test.

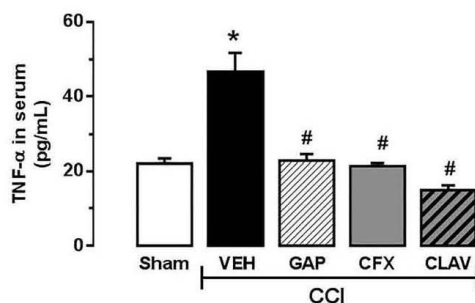


Fig. 3. Concentrations of TNF- $\alpha$  in serum of rats with CCI or sham surgery. Concentrations of cytokine were measured 3 h after different treatments (VEH; GAP, 10 mg/kg; CFX, 200 mg/kg; or CLAV, 10 mg/kg) in animals with NP. Each column represents mean  $\pm$  SEM of 8 rats. \* $P < 0.05$ , all treatments compared with sham group, # $P < 0.05$  groups compared with VEH group (one way ANOVA followed by Tukey's test).

45.8  $\pm$  2.3 and 44.6  $\pm$  2.4 vs. 21.7  $\pm$  2.9 s, respectively; Fig. 2E). In the AUC analysis, only animals receiving 1.0 and 10 mg/kg of CLAV showed a difference in comparison with the VEH group (97.6  $\pm$  9.3 and 132.8  $\pm$  4.3 vs. 73.6  $\pm$  5.9 au, respectively). In addition, the global antiallodynamic effect of 10 mg/kg of CLAV was greater than that induced by 1.0 mg/kg of CLAV (Fig. 2F). The antiallodynamic effect induced by CLAV (1.0 and 10 mg/kg) in the acetone model were 45.0 and 54.2%, respectively, in relation to the sham group.

#### TNF- $\alpha$ Assessment

The serum concentration of TNF- $\alpha$  in the group with CCI was increased in comparison with that of the sham group (46.6  $\pm$  5.0 vs. 22.0  $\pm$  1.3 pg/ml,  $P < 0.05$ ). GAP (10 mg/kg), CFX (200 mg/kg), and CLAV (10 mg/kg) decreased these levels in comparison with the VEH group in animals with CCI (22.7  $\pm$  1.8, 21.4  $\pm$  0.7, and 15.0  $\pm$  1.3 vs. 46.6  $\pm$  5.0 pg/ml, respectively,  $P < 0.05$ ; Fig. 3).

#### Participation of Dopaminergic and Opioidergic Pathways in the Antiallodynamic Effects of CFX and CLAV

Neither HAL (0.1 mg/kg) nor NLX (10 mg/kg) altered the AUC of the PWT induced by mechanical stimulus in animals with CCI in comparison with the VEH group (11.2  $\pm$  1.1 and 12.2  $\pm$  0.6 vs. 8.9  $\pm$  1.4 au, respectively). Pretreatment of CCI animals with HAL or NLX reversed the antiallodynamic effect induced by CFX (15.6  $\pm$  0.7 and 23.3  $\pm$  0.7 vs. 28.8  $\pm$  1.7 au,  $P < 0.05$ ) or CLAV (12.1  $\pm$  1 and

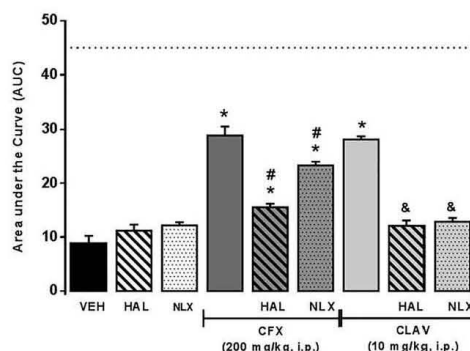


Fig. 4. Effect of CFX and CLAV in the presence or absence of HAL and NLX, on mechanical allodynia in a NP model. AUCs of each treatment were obtained of time courses of PWTs to mechanical stimulus. Each column represents mean  $\pm$  SEM of 8 rats. \* $P < 0.05$ , all treatments compared with VEH group, # $P < 0.05$  compared groups with CFX versus CFX alone, & $P < 0.05$  compared groups with CLAV versus CLAV alone (one way ANOVA followed by Tukey's test).

12.9  $\pm$  0.7 vs. 28.1  $\pm$  0.6 au, respectively,  $P < 0.05$ ) (Fig. 4). However, NLX partially blocked the antiallodynamic effect induced by CFX.

#### DISCUSSION

The CCI sciatic nerve model used in this work is one of the most frequently used representations of NP for the study of its physiopathology and treatment. This model produces nociceptive behaviors in animals similar those described by patients with this type of chronic pain, for example, allodynia (pain caused by a stimulus that does not normally provoke pain) and hyperalgesia (an increased response to a stimulus that is normally painful) [Bennett and Xie, 1988]. The management of NP involves prevention of its development and/or control of established NP.

This study was performed to determine the antiallodynamic efficacy of acute administration of CFX and CLAV, two BLMs, to control established NP and the possible mechanisms involved in this activity. The results indicate that acute administration of both CFX and CLAV diminished both mechanical and cold allodynia in the CCI model, and that these effects were blocked by the D2 and opioid receptor antagonists, HAL and NLX, respectively. In addition, both BLMs significantly inhibited CCI-induced TNF- $\alpha$  production. The antinociceptive effect of CFX has been reported by others where, chronic administration for 7 days prevented the development of thermal and mechanical allodynia in NP in diabetic rats

[Gunduz et al., 2011], as well as in the CCI model [Hu et al., 2010; Amin et al., 2012]. CFX also exerts antihyperalgesic and antinociceptive effects in somatic or visceral inflammatory pain models, respectively [Stepanovic-Petrovic et al., 2014]. Our results document the antinociceptive effect of CFX 12 days after CCI surgery, when NP was already established, and are in disagreement with other findings claiming that acute administration of CFX did not induce antiallodynic or antinociceptive effect in animals with diabetic neuropathy [Gunduz et al., 2011] or visceral pain [Stepanovic-Petrovic et al., 2014]. The only report of CFX-induced antihyperalgesia after acute administration, albeit with low efficacy, is in carrageenan-induced somatic inflammatory pain [Stepanovic-Petrovic et al., 2014]. These differences could be due to variability in pain etiology, animal species, and general experimental conditions.

In relation to CLAV, its anti-inflammatory effects in carrageenan-induced paw edema in rats [Banani et al., 2012] as well as its antinociceptive effect in acetic acid-induced writhing and formalin tests have been reported, although it was inactive against thermal nociception in the hot-plate test [Hajhashemi and Dehdashti, 2014] and, to our knowledge, has not been tested in a model of chronic NP. The results of our study show that, like CFX, CLAV is active after systemic administration when NP is established.

The magnitude and time course of the antinociceptive effects of the two BLMs in this study show interesting differences. CFX induced a progressive increase in the antiallodynic effect that reached a maximum at 90 min and persisted at 180 min, the end of the evaluation period. In contrast CLAV, at the highest dose, attains its maximum effect at 30 min but it lasts only 120 minutes and then gradually decreases. This difference may be related to the poor penetration by CFX of the intact blood brain barrier (BBB) [Nau et al., 2010], although the peripheral nerve damage present in the CCI model has shown to be able to alter spinal BBB [Echeverry et al., 2011]. CLAV has a higher permeability in the intact human BBB, which is even greater when this barrier is altered suggesting an increased CNS concentration [Franz et al., 1989; Kost et al., 2011]. Moreover, the short duration of the CLAV effect may be related to its short elimination half-life (60 min) [Adam et al., 1982].

The antinociceptive effect induced by chronic administration of CFX has been related to decreased levels of extrasynaptic glutamate, and BLMs can increase the expression and activity of GLT-1 (also known as EAAT2) in the brain and spinal cord [Rothstein et al., 2005]. Moreover, the

antinociceptive effect of CFX was reversed by the GLT-1 transport inhibitor, dihydrokainic acid [Gunduz et al., 2011]. GLT-1 is an astrocytic transporter which mediates 90% of cellular glutamate uptake and it is responsible for removing the excess of glutamate from the synaptic space [Rothstein et al., 1994]. The expression of this transporter is down regulated in the spinal cord in different models of NP [Sung et al., 2003; Mirzaei et al., 2010; Shi et al., 2016] and the resultant increased levels of glutamate participate in various neuronal functions including pain perception and central sensitization [Fundytus, 2001; Shi et al., 2016]. GLT-1 has also been implicated in the development of morphine dependence in rats, an effect blocked by CFX [Rawls et al., 2010]. Interestingly, CLAV does not share this effect [Hajhashemi and Dehdashti, 2014] but increases GLT-1 expression in a model of cocaine addiction [Kim et al., 2016]. In view of these findings, the antinociceptive effects after acute administration of CFX or CLAV are unlikely to be related to a GLT-1 up-regulation, given that the increased expression of this transporter occurs no earlier than 48 h after drug treatment [Rothstein et al., 2005].

Several neurotransmitter systems are implicated in the activation of the endogenous descending sensory pathways, one of them being the dopaminergic pathway. Studies have shown that D2 receptor activation and blockade of D1 receptors in the insular cortex, diminish neuropathic nociception in a nerve transection model [Coffeen et al., 2010]; while D2 receptor activation in the dorsolateral striatum reduces formalin-induced nociception [Magnusson and Fisher, 2000]. Both CLAV and CFX alter the dopaminergic pathway in other models: CLAV enhances DA release in vitro [Kost et al., 2011] while the D2 antagonist, HAL, partially reduced the in vivo effects induced by this drug, including penile erection and yawning [Sanna et al., 2013]. CFX affects cocaine-evoked dopaminergic transmission [Barr et al., 2015] and in a rat model of Parkinson's disease shows neuroprotective effects [Leung et al., 2012].

These findings led us to investigate the possible involvement of the dopaminergic pathway in the antinociceptive effect induced by acute administration of CFX and CLAV. We found that systemic administration of HAL completely abolished this activity, suggesting a role for D2 receptors in this response. Such actions are important in the activation of the endogenous descending analgesic system via a decreased inhibitory action of GABAergic interneurons leading to activation of the brainstem inhibitory system and depression of nociceptive inputs at the spinal dorsal horn level [Sheng et al., 2009]

Another key neurotransmitter system that is involved in descending inhibition of pain is that of the endogenous opioids [Stamford, 1995]. The analgesic effects of NSAIDs like diclofenac, paracetamol, aspirin, and metamizol, can be abolished by the opioid receptor antagonist, NLX [Vanegas et al., 2010]. It has also been reported that CFX, but not CLAV, attenuates the development of tolerance to the antinociceptive effect of morphine and reduces NLX-precipitated withdrawal [Habibi-Asl et al., 2014; Hajhashemi and Dehdashti, 2014]. In both cases, the effects evaluated may be related to release of endogenous opioids. In this study, we found that NLX reduces the antinociceptive effect of CFX and CLAV, suggesting mediation, at least in part, by release of endogenous opioids in the CNS.

We also measured the possible effects of CFX and CLAV on the increased concentrations of TNF- $\alpha$  induced by CCI. Both BLMs reduced this parameter. The increased expression of proinflammatory cytokines, like TNF- $\alpha$ , is related to pain transmission and to the development of allodynia in the spinal nerve ligation (SNL) model of NP [Lee et al., 2013]. In fact, the antialloodynic effect induced by GAP in the SNL model may be due, at least in part, to the up-regulation of antiinflammatory cytokine, IL-10 in the spinal cord, which leads to inhibition of the expression of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 [Lee et al., 2013]. Our results agree with this finding, since systemic administration of GAP reduce both mechanical and cold allodynia induced by CCI and also decreased serum TNF- $\alpha$ . The latter effect was also found with CFX and CLAV, although the mechanism involved is unknown. One limitation of our study is that only TNF- $\alpha$  levels were determined and it would be interesting to include other pro and antiinflammatory cytokines to determine their participation in the antinociceptive effect of GAB, CFX, and CLAV in the CCI model.

In summary, CFX and CLAV induce antinociceptive effects after acute systemic administration for the control of established pain on a NP model, although with somewhat different profiles in terms of intensity and time course. These effects observed appear to involve both dopaminergic and opioidergic systems with a possible down-regulation of TNF- $\alpha$ . Further investigation is necessary to fully determine the exact mechanism of action of the antinociceptive activity of these BLMs following acute administration.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to Mr. Román Valencia Martínez for his technical assistance. A. Ochoa-Aguilar

is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship No. 294713 from National Council for Sciences and Technology (CONACYT). This work was partially supported by project UNAM-DGAPA-PAPIIT-ÍN204416.

#### CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no conflict of interest.

#### REFERENCES

- Adam D, de Visser I, Koeppel P. 1982. Pharmacokinetics of amoxicillin and clavulanic acid administered alone and in combination. *Antimicrob Agents Chemother* 22:353-357.
- Althobaiti YS, Almalki AH, Das SC, Alshehri FS, Sari Y. 2016. Effects of repeated high-dose methamphetamine and ceftriaxone post-treatments on tissue content of dopamine and serotonin as well as glutamate and glutamine. *Neurosci Lett* 634:25-31.
- Amin B, Hajhashemi V, Hosseinzadeh H, Abnous KH. 2012. Antinociceptive evaluation of ceftriaxone and minocycline alone and in combination in a neuropathic pain model in rat. *Neuroscience* 224:15-25.
- Banani A, Maleki-Dizaji N, Garjani A, Soraya H, Mostafalou S, Ziaee M. 2012. Clavulanic acid exhibits anti-inflammatory effects on carrageenan-induced paw edema model of inflammation in rats. *Ann Biol Res* 3:3312-3320.
- Barr JL, Rasmussen BA, Tallarida CS, Scholl JL, Forster GL, Unterwald EM, Rawls SM. 2015. Ceftriaxone attenuates acute cocaine-evoked dopaminergic neurotransmission in the nucleus accumbens of the rat. *Br J Pharmacol* 172:5414-5424.
- Bennett GJ, Xie YK. 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.
- Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM. 1994. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 59:369-376.
- Clark AK, Old EA, Malcangio M. 2013. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *J Pain Res* 6:803-814.
- Coffeen U, Ortega-Legaspi JM, de Gortari P, Simón-Arceo K, Jaimes O, Amaya MI, Pellicer F. 2010. Inflammatory nociception diminishes dopamine release and increases dopamine D2 receptor mRNA in the rat's insular cortex. *Mol Pain* 6:75. doi: 10.1186/1744-8069-6-75.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. 2009. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 32:1-32.
- Cui C, Cui Y, Gao J, Sun L, Wang Y, Wang K, Li R, Tian Y, Song S, Cui J. 2014. Neuroprotective effect of ceftriaxone in a rat model of traumatic brain injury. *Neurol Sci* 35:695-700.
- Curtis MJ, Bond RA, Spina D, Ahluwalia A, Alexander SP, Giembycz MA, Gilchrist A, Hoyer D, Insel PA, Izzo AA, et al. 2015. Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP. *Br J Pharmacol* 172:3461-3471.
- Donnelly PC, Sutich RM, Easton R, Adejumo OA, Lee TA, Logan LK. 2017. Ceftriaxone-associated biliary and

- cardiopulmonary adverse events in neonates: A systematic review of the literature. *Paediatr Drugs* 19:21–34.
- Echeverry S, Shi XQ, Rivest S, Zhang J. 2011. Peripheral nerve injury alters blood-spinal cord barrier functional and molecular integrity through a selective inflammatory pathway. *J Neurosci* 31:10819–10828.
- Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNeil E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, et al. 2015. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 14:162–173.
- Franz P, von Rosen F, Garner C, Swozil U, Schmiedek P, Einhaupl K, Adam D. 1989. Cerebrospinal fluid penetration after single or multiple dosage with ticarcillin/clavulanate. *J Antimicrob Chemother* 24 Suppl B:107–110.
- Fundytus ME. 2001. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. *CNS Drugs* 15:29–58.
- Gunduz O, Oltulu C, Buldum D, Guven R, Ulugol A. 2011. Antiallodynic and anti-hyperalgesic effects of ceftriaxone in streptozocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett* 491:23–25.
- Habibi-Asl B, Vaez H, Najafi M, Bidaghi A, Ghanbarzadeh S. 2014. Attenuation of morphine-induced dependence and tolerance by ceftriaxone and amitriptyline in mice. *Acta Anaesthesiol Taiwan* 52:163–168.
- Hajhashemi V, Dehdashti K. 2014. Antinociceptive effect of clavulanic acid and its preventive activity against development of morphine tolerance and dependence in animal models. *Res Pharm Sci* 9:315–321.
- Hajhashemi V, Hosseinzadeh H, Amin B. 2013. Antiallodynia and antihyperalgesia effects of ceftriaxone in treatment of chronic neuropathic pain in rats. *Acta Neuropsychiatr* 25:27–32.
- Hu Y, Li W, Lu L, Cai J, Xian X, Zhang M, Li Q, Li L. 2010. An anti-nociceptive role for ceftriaxone in chronic neuropathic pain in rats. *Pain* 148:284–301.
- Kim DJ, King JA, Zuccarelli L, Ferris CF, Koppel GA, Snowdon CT, Ahn CH. 2009. Clavulanic acid: a competitive inhibitor of beta-lactamases with novel anxiolytic-like activity and minimal side effects. *Pharmacol Biochem Behav* 93:112–120.
- Kim J, John J, Langford D, Walker E, Ward S, Rawls SM. 2016. Clavulanic acid enhances glutamate transporter subtype 1 (GLT-1) expression and decreases reinforcing efficacy of cocaine in mice. *Amino Acids* 48:689–696.
- Kost GC, Selvaraj S, Lee YB, Kim DJ, Ahn CH, Singh BB. 2011. Clavulanic acid increases dopamine release in neuronal cells through a mechanism involving enhanced vesicle trafficking. *Neurosci Lett* 504:170–175.
- Kost GC, Selvaraj S, Lee YB, Kim DJ, Ahn CH, Singh BB. 2012. Clavulanic acid inhibits MPP<sup>+</sup>-induced ROS generation and subsequent loss of dopaminergic cells. *Brain Res* 1469:129–135.
- Lee BS, Jun IC, Kim SH, Park JY. 2013. Intrathecal gabapentin increases interleukin-10 expression and inhibits pro-inflammatory cytokine in a rat model of neuropathic pain. *J Korean Med Sci* 28:308–314.
- Leung TC, Lui CN, Chen LW, Yung WH, Chan YS, Yung KK. 2012. Ceftriaxone ameliorates motor deficits and protects dopaminergic neurons in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *ACS Chem Neurosci* 3:22–30.
- Magnusson JE, Fisher K. 2000. The involvement of dopamine in nociception: the role of D(1) and D(2) receptors in the dorso-lateral striatum. *Brain Res* 855:260–266.
- Mirzaei V, Manaheji H, Maghsoudi N, Zaringhalam J. 2010. Comparison of changes in mRNA expression of spinal glutamate transporters following induction of two neuropathic pain models. *Spinal Cord* 48:791–797.
- Moss A, Blackburn-Munro G, Garry EM, Blakemore JA, Dickinson T, Rosie R, Mitchell R, Fleetwood-Walker SM. 2002. A role of the ubiquitin-proteasome system in neuropathic pain. *J Neurosci* 22:1363–1372.
- Nau R, Sorgel F, Eiffert H. 2010. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 23: 858–883.
- Nickel FT, Seifert F, Lanz S, Maihöfner C. 2012. Mechanisms of neuropathic pain. *Eur Neuropsychopharmacol* 22:81–91.
- Price TJ, Prescott SA. 2015. Inhibitory regulation of the pain gate and how its failure causes pathological pain. *Pain* 156:789–792.
- Rawls SM, Baron DA, Kim J. 2010. Beta-Lactam antibiotic inhibits development of morphine physical dependence in rats. *Behav Pharmacol* 21:161–164.
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW. 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13:713–725.
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, et al. 2005. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433:73–77.
- Rowland M, Tozer TN. 1989. Clinical pharmacokinetics: concepts and applications. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, p 601.
- Sacerdote P, Franchi S, Moretti S, Castelli M, Proccacci P, Magnaghi V, Panerai AE. 2013. Cytokine modulation is necessary for efficacious treatment of experimental neuropathic pain. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:202–211.
- Sanna F, Melis MR, Angioni L, Argiolas A. 2013. Clavulanic acid induces penile erection and yawning in male rats: comparison with apomorphine. *Pharmacol Biochem Behav* 103:750–755.
- Sari Y, Smith KD, Ali PK, Rebec GV. 2009. Upregulation of GLT1 attenuates cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. *J Neurosci* 29:9239–9243.
- Saudagar PS, Survase SA, Singhal RS. 2008. Clavulanic acid: a review. *Biotechnol Adv* 26:335–351.
- Sheng HY, Qu CL, Huo FQ, Du JQ, Tang JS. 2009. D2-like but not D1-like dopamine receptors are involved in the ventrolateral orbital cortex-induced antinociception: a GABAergic modulation mechanism. *Exp Neurol* 215:128–134.
- Shi J, Jiang K, Li Z. 2016. Involvement of spinal glutamate transporter-1 in the development of mechanical allodynia and hyperalgesia associated with type 2 diabetes. *J Pain Res* 9: 1121–1129.
- Stamford JA. 1995. Descending control of pain. *Br J Anaesth* 75: 217–227.
- Stepanovic-Petrovic RM, Micov AM, Tomic MA, Kovacevic JM, Boskovic BD. 2014. Antihyperalgesic/antinociceptive effects of ceftriaxone and its synergistic interactions with different analgesics in inflammatory pain in rodents. *Anesthesiology* 120:737–750.
- Sung B, Lim G, Mao J. 2003. Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 23: 2899–2910.

- Uyanikgil Y, Özkeşkek K, Çavuşoğlu T, Solmaz V, Tümer MK, Erbas O. 2016. Positive effects of ceftriaxone on pentylenetetrazol-induced convulsion model in rats. *Int J Neurosci* 126:70–75.
- van Hecke O, Torrance N, Smith BH. 2013. Chronic pain epidemiology and its clinical relevance. *Br J Anaesth* 111:13–18.
- Vanegas H, Vazquez E, Tortorici V. 2010. NSAIDs, Opioids, Cannabinoids and the Control of Pain by the Central Nervous System. *Pharmaceuticals (Basel)* 3:1335–1347.
- Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109–110.