



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SINTETASA
DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA AMÍGDALA CEREBRAL DE LA
RATA CON HIPERALGESIA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ANABEL ESPINOZA OLALDE

DIRIGIDA POR

DRA. ESTHER TALAVERA CUEVAS

SINODALES:

DRA. ESTHER TALAVERA CUEVAS

DIRECTOR

M. EN C. PATRICIA VILLALOBOS AGUILERA

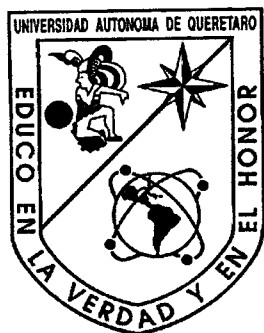
SINODAL

M. EN C. MA. DE LOS ÁNGELES ESCAMILLA NAVARRO

SINODAL

M. EN C. LETICIA DE LA ISLA HERRERA

SINODAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SINTETASA DEL
ÓXIDO NÍTRICO EN LA AMÍGDALA CEREBRAL DE LA RATA
CON HIPERALGESIA”**

TESIS

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

PRESENTA

ANABEL ESPINOZA OLALDE

DIRIGIDA POR

DRA. ESTHER TALAVERA CUEVAS

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2003

BIBLIOTECA CENTRAL UAQ
“ROBERTO RUIZ OBREGÓN”

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
1. Dolor	2
1.1 Características de los nociceptores	3
1.2 Percepción del dolor	5
1.3 Vías del dolor	6
2. Amígdala cerebral	8
3. Óxido nítrico	11
3.1 Óxido nítrico en la neurotransmisión	13
3.2 Hiperalgnesia y óxido nítrico	16
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	19
V. METODOLOGÍA	
a) Materiales	20
b) Métodos	21
Medición del umbral al dolor	21
Sacrificio y disección	24

Actividad enzimática	26
Determinación de proteínas por el método de Bradford	26
Método de incubación	26
Análisis estadístico	27
c) Diseño experimental	28
VI. RESULTADOS	29
VII. DISCUSIÓN	36
VIII. CONCLUSIÓN	38
IX. BIBLIOGRAFÍA	39
X. ANEXO I	44
ANEXO II	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Características de las fibras A δ y C.	3
2	Clasificación de nociceptores de acuerdo a Price y Dubner.	4
3	Tipo de fibras de conducción nociceptiva y sensación que generan con su activación.	4
4	Características de las isoformas de óxido nítrico sintetasas.	13
5	Efectos de los análogos de la L-Arginina en la actividad de SON.	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Percepción del dolor.	5
2	Vía de transmisión y modulación del dolor.	7
3	Amígdala cerebral.	8
4	Integración de las estructuras cerebrales involucradas en el sistema límbico.	9
5	Principales conexiones de la amígdala.	10
6	Vía de síntesis del óxido nítrico.	11
7	Representación esquemática de las sintetasas del óxido nítrico.	12
8	Mecanismo de neurotransmisión del óxido nítrico.	14
9	Analgesiómetro.	21
10	Medición del umbral al dolor.	
11	Disección de la amígdala cerebral.	22
12	Diagrama de flujo para la determinación de la actividad enzimática de la SON.	23
13	Resultados del Umbral al dolor.	26
14	Determinación de la actividad enzimática de SON en amígdala de rata utilizando 50µg, 100µg y 200µg de proteína.	28
15	Inhibición de la actividad enzimática de la SON.	29
16	Efecto del Ca ²⁺ en la actividad enzimática de la SON en la amígdala de la rata con hiperalgesia.	30
17	Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática de la SON en amígdala cerebral de rata con hiperalgesia.	31
18	Determinación cuantitativa de la actividad enzimática de la SON en estriado de rata con hiperalgesia.	32

RESUMEN

El óxido nítrico es un mensajero neuronal que está involucrado en diversos procesos biológicos como el dolor y la analgesia. En todos los tipos celulares donde se ha encontrado se sintetiza a partir del aminoácido arginina, mediante una reacción de oxidación que se lleva a cabo por una familia de isoenzimas denominadas las sintetetas del óxido nítrico; esta reacción da como producto al óxido nítrico y a la citrulina.

Se ha demostrado que el óxido nítrico participa en el procesamiento de la información de dolor que se lleva a cabo en el sistema nervioso central y periférico. El objetivo de este trabajo es determinar si la síntesis del óxido nítrico se incrementa en la amígdala cerebral de la rata con hiperalgesia (dolor), como parte de las estructuras donde se procesa la información de dolor. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de 290 a 300g de peso, las cuales fueron separadas en tres grupos experimentales: control, salino, carragenina. A todos los animales de experimentación se les midió el umbral al dolor durante tres días, al cuarto día se les aplicó una inyección intraplantar del polisacárido carragenina (200 μ l al 4%) y después de 4 horas que es el tiempo de dolor máximo se volvió a medir el umbral. Inmediatamente después las ratas fueron sacrificadas por decapitación y se disectó la amígdala cerebral y el estriado. Posteriormente se cuantificó la actividad de la sinteteta del óxido nítrico por medio de la conversión de ^3H -Arginina a ^3H -Citrulina. Los resultados del análisis fueron expresados en pmol/mg de proteína/min. Los datos de la detección de la actividad de la sinteteta del óxido nítrico (SON) fueron evaluados estadísticamente mediante un análisis de varianza ANOVA, así como por el método de Student-Newman-Keuls ($n= 5$ por grupo). Valores de $p<0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Se observó un incremento de la actividad de la SON en la amígdala del grupo carragenina (85.7 ± 10.1) en comparación con el grupo salino (30.4 ± 2.7) y el grupo control (31 ± 6.5). El estriado no mostró cambios significativos. Estos resultados permiten sugerir que el óxido nítrico está involucrado en los procesos de neurotransmisión de la información que se lleva a cabo en la amígdala cerebral que forma parte del sistema que codifica el componente afectivo del dolor.

I. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso de todos los animales tiene en común cierto número de funciones básicas, dentro de las cuales las más notorias son el análisis de la sensación y el control del movimiento. La sensibilidad implica la capacidad para percibir información sobre el mundo exterior. En el hombre, como en otros mamíferos, gran parte del sistema nervioso está dedicada a esta tarea que es llevada a cabo por los sentidos y por el sistema somatosensitivo. Este sistema tiene dos componentes principales: un subsistema para detectar estímulos mecánicos y otro que detecta los estímulos dolorosos y la temperatura.

El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a una lesión que afecta alguna región del organismo involucrado. Funciona como un sistema de alarma que le permite a los organismos mantener su integridad física.

Se ha considerado que el dolor es un proceso multifuncional que tiene dos componentes principales. a) el componente físico el cual es transmitido vía la médula espinal a varias áreas del cerebro que procesan la detección y localización del dolor y b) el componente emotivo que es codificado también vía médula espinal principalmente a áreas cerebrales conocidas como el sistema límbico entre las que se encuentra la amígdala cerebral y que está asociado con la sensación desagradable que produce un estímulo doloroso.

La integración de la respuesta cerebral al dolor es codificada por diversas sustancias neurotransmisoras entre las que se encuentra el mensajero celular óxido nítrico. Si bien es conocido que esta molécula participa en la integración del componente físico del dolor, se conoce poco sobre su papel en las estructuras límbicas que integran la información emotiva del dolor. Por lo que el objetivo principal de este proyecto de tesis es determinar si el óxido nítrico participa en la integración de la información nociceptiva (de dolor) en la amígdala cerebral y en el estriado.

II. ANTECEDENTES

1. DOLOR

El dolor se puede definir como una sensación desagradable producto de una lesión tisular actual o potencial que afecta alguna región del organismo involucrado. La experiencia dolorosa implica la existencia de dos elementos que son mutuamente necesarios para que ésta ocurra: 1) una percepción sensorial asociada a la lesión titular actual o potencial, y 2) un sentimiento emocional. En tal sentido se han distinguido tres dimensiones en la experiencia dolorosa: 1) sensorio-discriminativa, referida a los aspectos de la localización, 2) cognitiva-evaluativa, que comprende la percepción y la apreciación del significado de lo que está ocurriendo, y 3) afectiva-emocional, referida a los sentimientos provocados por dicho acontecimiento en relación con el deseo de evitar el daño. Es importante indicar que un organismo que experimenta la sensación de dolor puede presentar alteraciones en todo su estado emocional por lo que manifestará reacciones tan particulares como la agresión o, la que es más común, retracción del comportamiento e incluso la depresión, y en algunos casos, la muerte (Belmonte y Cervero, 1995).

En el SNC se encuentran dos grandes sistemas: el primero es el responsable de alertar al organismo e identificar al dolor como tal, localizar el lugar en donde se produjo la lesión y desencadenar los componentes emocionales y reacciones motoras que tienden a evitar un daño mayor (motivación para la evasión del dolor). El segundo sistema genera un mecanismo que tiene como finalidad ejercer el control del dolor para que el organismo encuentre un estado homeostático; este mecanismo es capaz de producir un estado de analgesia que permite, aun cuando el tejido siga lesionado, que se presente la ausencia de la sensación de dolor (Condés, 2002).

Actualmente se sabe que a nivel periférico participan dos tipos de fibras nerviosas para transmitir los impulsos del dolor a la médula espinal. Las fibras delgadas C y las fibras A δ , las cuales son las responsables de la conducción de dos tipos de dolor que han sido designados en forma diferente por distintos autores: epicrítico y protopático (Head, 1920), y rápido y lento (Bishop, 1949), filogenéticamente nuevo y antiguo (Bishop, 1959).

El siguiente cuadro muestra las características de las fibras A δ y C con respecto a su diámetro y su velocidad de conducción.

Cuadro 1. Características de las fibras A δ y C.

Fibra	Aδ	C
Diámetro	1 – 5 μ	0.3 – 1.5 μ
Velocidad de conducción	4 – 30 m/seg	0.4 – 2 m/seg

1.1 Características de los nociceptores

La existencia de receptores cutáneos, especializados en responder a los estímulos dolorosos, señala que su activación es el primer paso que nos puede conducir a la percepción del dolor. Sherrington (1986), señaló que el dolor generalmente va acompañado de la amenaza de lesión tisular. Parece que esta correlación se basa en la proposición de que el daño tisular es el común denominador de una vasta serie de estímulos que producen dolor, sugiriendo el grado nocivo del estímulo. Este sistema detector de estímulos nocivos tiene una función protectora en su respuesta, que seguramente ayuda a impedir un mayor daño tisular (Sherrington, 1986).

En estos términos, los órganos que detectan y señalan la presencia de estímulos nocivos se han denominado *nociceptores*.

Los nociceptores son neuronas primarias aferentes cuya terminal se encuentra localizada en el tejido periférico, una fibra aferente que es una vía de conducción, un cuerpo celular en el ganglio espinal o el ganglio del nervio trigémino y terminaciones centrales a nivel de la médula espinal o de la protuberancia. Estas células aferentes primarias incluyen dos tipos de fibras: A δ y C. Las fibras A δ son las responsables de la conducción de los impulsos codificados del dolor rápido, localizado y breve; y las fibras C, del dolor lento, difuso y duradero (Torebjok y Hallin, 1983).

Los nociceptores pueden ser de varios tipos como se presenta en los siguientes cuadros 2 y 3.

Cuadro 2. Clasificación de nociceptores. Price y Dubner (1997).

Tipo de nociceptor	Tipo de fibra	Tipo de activación
Térmicos	A δ	Frío
	A δ y C	Calor
	A δ y C	Alto umbral
Mecánicos	A δ	Alto umbral
	C	Alto umbral
	A δ y C	Bajo umbral
Mecánicos y térmicos	A δ	Calor
	C	Polimodal
	A δ y C	Mecánicos y frío

Cuadro 3. Tipo de fibras de conducción nociceptiva y sensación que generan con su activación. Kandel y *col.* (1991).

Tipo de nociceptor	Tipo de fibra	Sensación
Mecánico	A δ	Dolor agudo, picante y puntual
Térmico y mecánico-térmicos	A δ	Dolor agudo, picante y puntual
Térmico y mecánico-térmicos	C	Dolor lento, quemante y difuso
Polimodal	C	Dolor lento, quemante y difuso.

En general, los nociceptores A δ de conducción más rápida responden a los estímulos mecánicos peligrosamente intensos o a los estímulos mecanotérmicos y tienen campos receptivos que consisten en conjuntos de puntos sensibles. Otros nociceptores amielínicos tienden a responder a los estímulos térmicos, mecánicos y químicos y, en consecuencia se dice que son polimodales; por lo tanto, hay tres clases principales de nociceptores en la piel: nociceptores mecanosensibles A δ , nociceptores mecanotérmicos A δ y nociceptores polimodales asociados con fibras C (Purves y *col.*, 2001).

1.2 Percepción del dolor

Se han descrito dos categorías de percepción del dolor: un primer dolor agudo y una sensación más tardía (y más duradera) que por lo habitual es el llamado segundo dolor. Cuando se eleva la intensidad del estímulo hasta un nivel que activa un subgrupo de fibras A δ , se comunica una sensación de hormigueo o, si la estimulación es lo suficientemente intensa, de dolor agudo. Si se incrementa aún más la intensidad del estímulo, de modo que entren en juego los axones de las fibras C de conducción lenta y diámetro pequeño, se experimenta una sensación de dolor más sordo y duradero (ver figura 1), (Purves y *col.*, 2001, 2001).

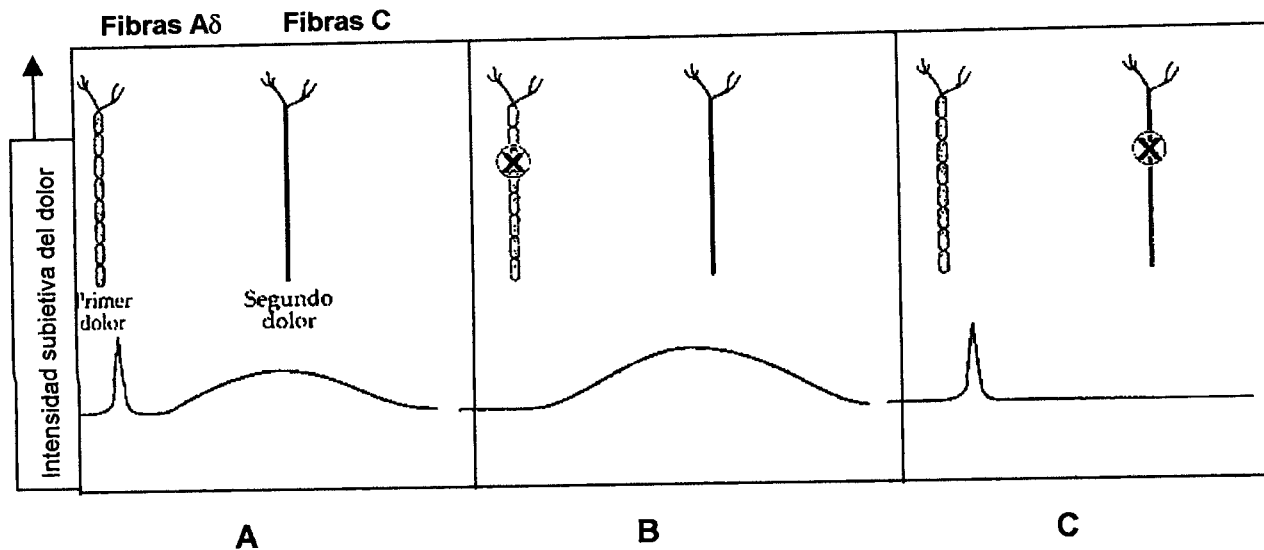


Figura 1. Percepción del dolor. El dolor puede ser separado en una percepción temprana de dolor agudo y una percepción más tardía de una cualidad más sorda y quemante. A. El primero y segundo dolor son transmitidos por axones diferentes, como puede ser demostrado por (B) el bloqueo selectivo de los axones miélinicos de conducción más rápida que transmiten la sensación de primer dolor o (C) el bloqueo de las fibras C de conducción más lenta que transmiten la sensación de segundo dolor (Purves y col., 2001).

1.3 Vías del dolor

Una vez que un estímulo que produce dolor es detectado por los nociceptores a nivel periférico, esta información entra a las raíces dorsales de la médula espinal y es integrada por el sistema nervioso a través de diferentes vías o rutas (ver figura 2). Las vías nociceptivas ascienden primero a partir de la lámina I, IV y V de la médula espinal a núcleos del tallo cerebral y de allí proyectan a diferentes regiones del tálamo, estas conexiones talámicas activan la corteza somatosensorial para producir la discriminación rápida de la respuesta al dolor en términos de su detección, localización, intensidad, discriminación, cualidad y duración, a esta vía de detección del dolor se le ha denominado sistema anterolateral o neoespinal del dolor (Neugebauer y Weidong, 2001).

Otra de las vías conocidas es el sistema medial o paleospinotalámica que también recibe proyecciones de la médula espinal que van al mesencéfalo y posteriormente al núcleo medial del tálamo o a estructuras como la amígdala y el hipotálamo proyectando finalmente a diferentes áreas de la corteza, esta vía regula o codifica el componente emotivo del dolor, es decir, la sensación desagradable que produce un estímulo nocivo. Así varias rutas ascendentes y regiones cerebrales son activadas por estímulos nociceptivos y participan en el procesamiento de dolor. El número y tamaño de la activación de todas estas regiones son variables y controversiales y van a depender de la intensidad del dolor mismo (Snyder, 1980).

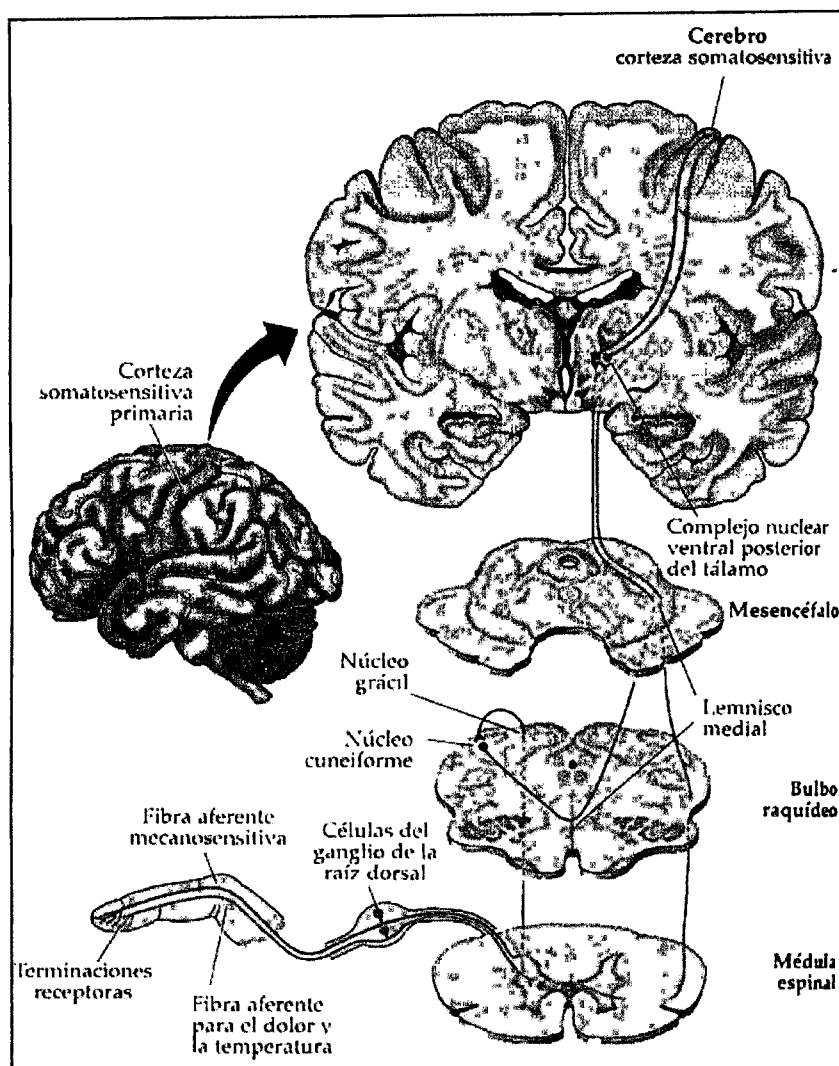


Figura 2. Vías de transmisión y modulación del dolor (Snyder, 1980).

2. AMÍGDALA CEREBRAL

Como la amígdala cerebral es la estructura anatómica de interés en esta tesis, en este capítulo se describirán brevemente sus características anatómicas y funcionales.

La amígdala es un complejo nuclear que se continúa con la cola del núcleo caudado, se localiza en la porción medial del lóbulo temporal como se muestra en la figura 3. La amígdala está involucrada en una gran variedad de conductas y funciones regulatorias (Paxinos, 1995). Se cree que está generalmente implicada en los sustratos neuronales de la emoción. Como parte del sistema límbico, la amígdala juega un papel clave en los aspectos complejos afectivos y autonómicos de la conducta, la evaluación de la expresión emocional de los estímulos sensoriales, aprendizaje emocional y memoria, miedo, ansiedad, depresión y respuestas de estrés (Volwer y Weidong, 2001).

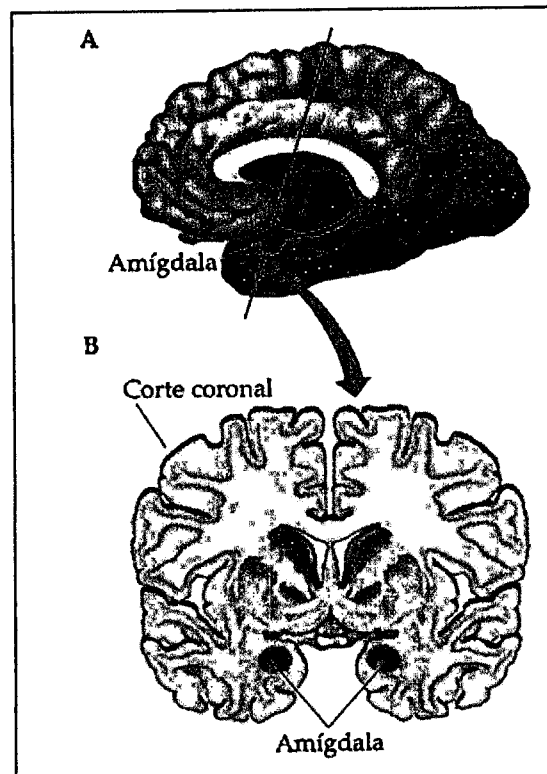


Figura 3. Amígdala Cerebral. A. Vista sagital del encéfalo que muestra la localización de la amígdala en el lóbulo temporal. La línea indica el nivel del corte en B. B. Corte coronal a través del encéfalo a nivel de la amígdala (Purves y col., 2001).

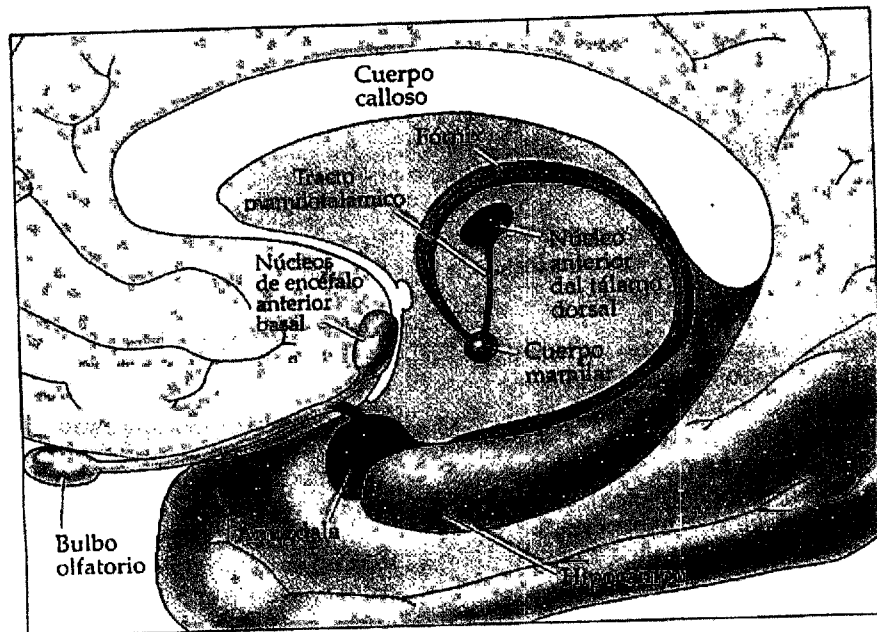


Figura 4. Integración de las estructuras cerebrales involucradas en el sistema límbico (Purves y col., 2001).

La amígdala o complejo amigdalino comprende tres subdivisiones, cada una de las cuales tiene un conjunto singular de conexiones con otras partes del encéfalo. El grupo de núcleos corticomediales posee conexiones extensas con el bulbo olfatorio y la corteza olfatoria. El grupo basolateral, el cual es especialmente grande en los seres humanos, tiene sus conexiones principales con la corteza cerebral, sobre todo las áreas asociativas sensitivas. El grupo central y anterior de núcleos se caracteriza por conexiones con el tronco encefálico y el hipotálamo y con áreas viscerosensitivas como el núcleo del tracto solitario.

Existen dos vías importantes de proyecciones que transmiten la información hacia la amígdala y desde ella; el sistema amigdalofugo ventral y la estra terminal, un haz de fibras más compacto.

La amígdala conecta regiones corticales que procesan la información sensitiva con sistemas efectores hipotalámicos y del tronco encefálico como se muestra en la figura 5 (Purves y col., 2001).

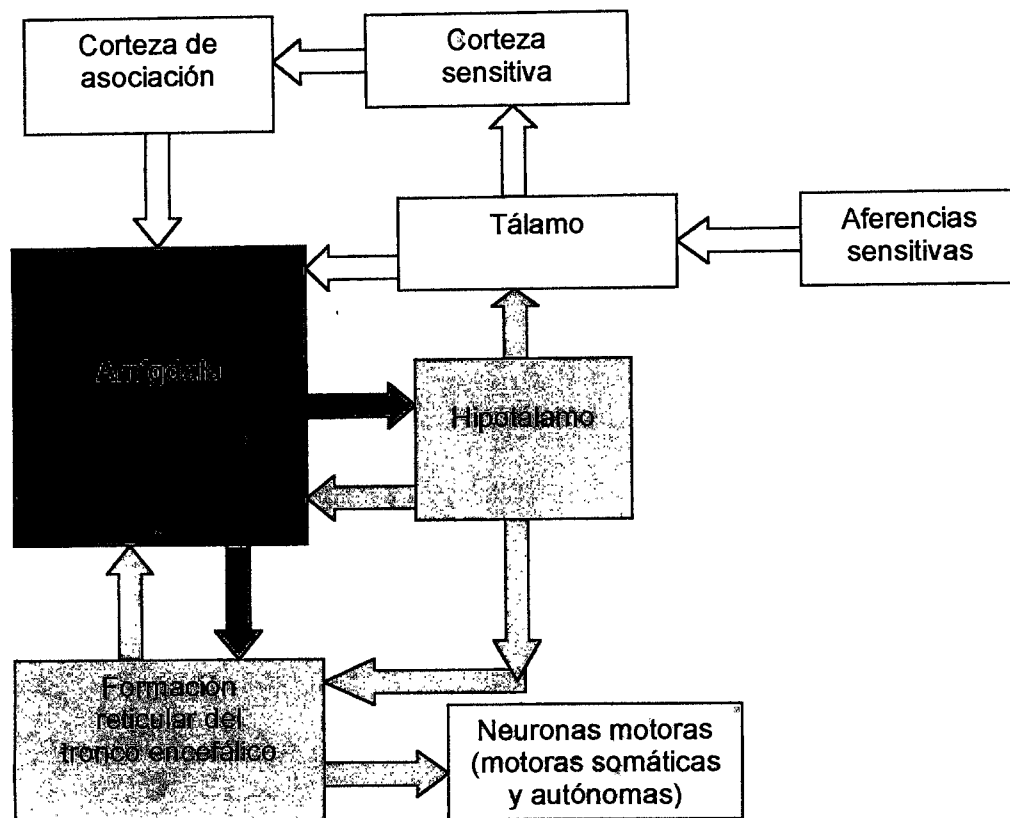


Figura 5. Principales conexiones de la amígdala. Las conexiones con las áreas asociadas de la corteza, la corteza límbica fologenéticamente más antigua, y los núcleos sensitivos viscerales y efectores del tronco encefálico permiten que la amígdala coordine muchos aspectos de la conducta, organizando así las respuestas asociadas con las emociones (Purves y col., 2001)

La amígdala está directamente unida a centros nociceptivos en la médula espinal y el tallo cerebral por la vía del dolor espino-ponto-amigdalino del área parabraquial de los núcleos centrales de la amígdala (CeA). Esta vía de nociceptores se origina de neuronas de la lámina I en la médula espinal y el nervio trigeminal.

3. ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (ON) es una molécula mensajera que está involucrada en diversos procesos biológicos como la vasodilatación, la inhibición plaquetaria, la broncodilatación, la activación de la función inmune por macrófagos, en la analgesia y en los procesos de dolor entre otros (Snyder y Bredt, 1992).

El ON y su coproducto de reacción, la citrulina, se sintetiza en la célula a partir del aminoácido L-arginina mediante la acción de la sintetasa del óxido nítrico (SON), como se observa en la figura 6 (Jaramillo, 2001). De esta enzima se han aislado tres isoformas: la neuronal (I), la inducible o de los macrófagos (II) y la endotelial (III). Las SON neuronal y endotelial son producidas constitutivamente, son Ca^{2+} /calmodulina dependientes y al ser activadas liberan picomoles de ON; a diferencia de la SON de los macrófagos, que es expresada a bajas concentraciones en condiciones basales, pero al ser inducida por gama interferón y lipopolisacáridos libera nanomoles de ON durante largos períodos, y no requiere calcio para ser activada (Snyder y Bredt, 1992).

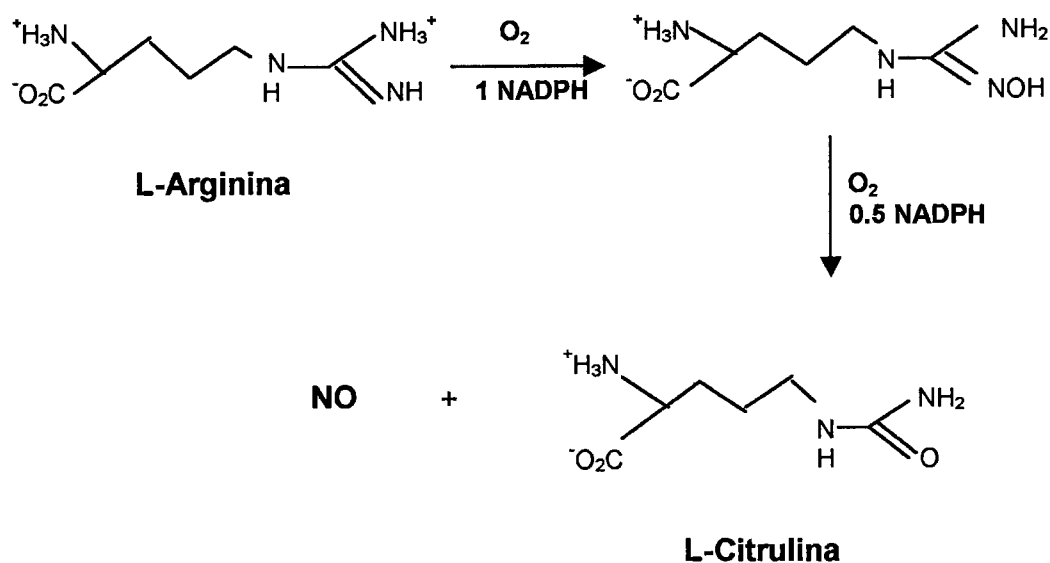


Figura 6. Vía de síntesis del óxido nítrico (Jaramillo, 2001)

En el sistema nervioso (SN) se ha encontrado que la forma constitutiva de la SON está localizada en neuronas, mientras que la forma inducible se encuentra en el tejido glial. Aunque la distribución de ambas enzimas es diferencial y necesitan distintas señales para ser activadas, ambas requieren de los cofactores: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH); tetrahidrobiopterinas (TBH₄) y flavinas (FAD/FMN) y el complejo Ca²⁺/Calmodulina, como se observa en la figura 7 (Henry y col.,1997; Ignarro, 2000).

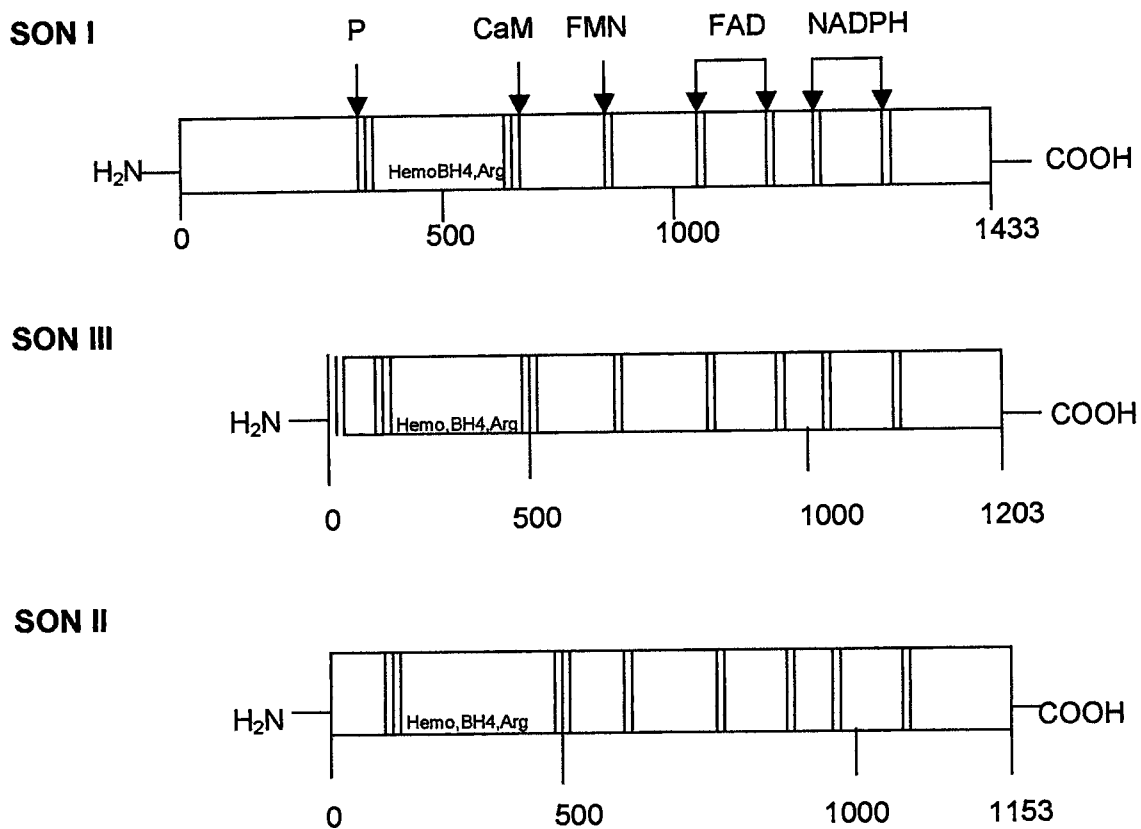


Figura 7. Representación esquemática de las sintetasas del óxido nítrico. SON I (neuronal), SON II (inducible) y SON III (endotelial), CaM (calmodulinas), FMN (mononucleótido de flavina), FAD (dinucleótido de flavina), NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido), Kda (Kilodaltones), P (sitio de fosforilación) (Ignarro, 2000).

Aunque estas enzimas tienen características comunes difieren en la manera en que son reguladas, y esto va a depender del medio celular donde se encuentren, la función que tengan en ese sitio, su interacción con otras moléculas, así como de la cantidad de óxido nítrico que necesiten producir en ese tejido. El cuadro 4 resume varias de las características de dichas enzimas.

Cuadro 4. Características de las isoformas de óxido nítrico sintetasa.

Isoforma	Otro nombre	Peso molecular	Regulación	Localización
SON Tipo I	nSON	155 Kda	Ca ⁺⁺ /calmodulina	Neuronas del SNC y SNP, neuroglías, islotes del páncreas.
SON tipo II	iSON	125 Kda	Expresión inducida por citocinas y endotoxinas	Macrófagos, hepatocitos, células musculares lisas, neutrófilos y otros.
SON Tipo III	ESON	135 Kda	Ca ⁺⁺ /calmodulina	Endotelio vascular, riñón, plaquetas

3.1 Óxido nítrico en la neurotransmisión

La síntesis del óxido nítrico se inicia por la liberación presináptica de ácido glutámico (figura 8), que se une a receptores NMDA (N-metil-d-aspartato), AMPA/kainato y metabotrópicos. Dicha unión produce, por diferentes mecanismos, un incremento en la concentración de Ca²⁺ que activa diferentes proteínas y cascada de segundos mensajeros.

Entre estas proteínas se encuentra la Calmodulina (CaM) que forma el complejo Ca²⁺/CaM que a su vez se une a la sintetasa del óxido nítrico neuronal y

produce cambios en su conformación, que facilitan la oxidación de la arginina para sintetizar citrulina y óxido nítrico.

Este último se difunde rápidamente ($t_{1/2} = 30s$) en dirección retrógrada a la neurona presináptica donde se une a la guanilato ciclasa y activa la síntesis de GMPc (monofosfato de guanosina cíclico) o bien modifica la liberación de neurotransmisores como acetilcolina, aspartato o glutamato. También puede regresar a su sinapsis original e influir en la liberación de neurotransmisores de sinapsis adyacentes.

En el sistema nervioso periférico, la síntesis de ON se activa por glutamato, bradicinina, serotonina, acetilcolina, histamina, endotelina-1 y sustancia P (Zigmond y col., 1999).

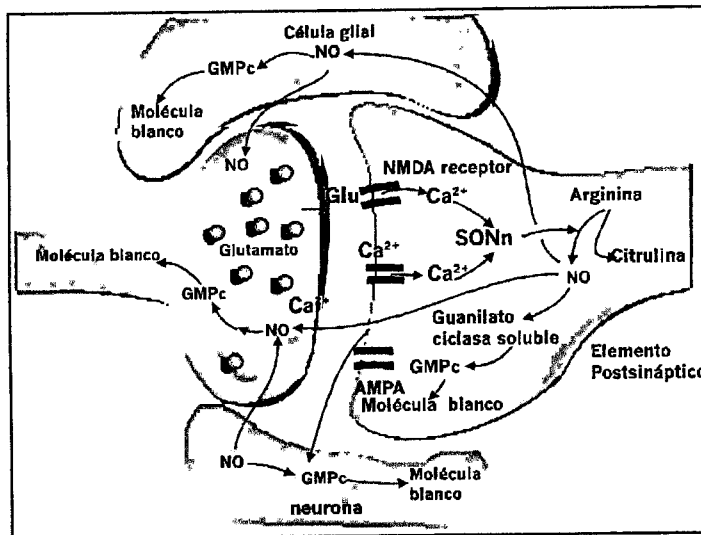


Figura 8. Mecanismo de neurotransmisión del óxido nítrico (Talavera y col., 2003).

La reacción enzimática que cataliza la SON puede ser inhibida de manera endógena por fosforilación y exógenamente por diversas sustancias con estructura molecular análoga a la L-arginina, pero que producen efectos opuestos como por ejemplo: N-monometil-L-arginina (L-NMMA), nitroarginina (Noarg) y nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), como lo indica el cuadro 5 (Henry y col., 1997).

Cuadro 5. Efectos de los análogos de la L-Arginina en la actividad de SON. Obsérvese los diferentes radicales que pueden ser sustituidos en la molécula de L-Arginina. K_i =concentración del inhibidor, IC_{50} =Dosis letal 50(Henry y col., 1997).

Análogos de la Arginina	R:	SON I	SON II
$\begin{array}{c} \text{OOC} \\ \\ \text{H}_2\text{N}^+ - \text{C} - (\text{CH}_2)_3 - \text{R} \end{array}$			
N ^o -metil arginina (NMMA)		$K_i = 0.7\mu\text{M}$ (70)	$K_i = 2.5\mu\text{M}$ (70)
N ^o -nitro arginina (NO ₂ Arg)		$K_i = 0.2\mu\text{M}$ (70)	$K_i = 8.7\mu\text{M}$ (70)
N ^o -amino arginina (AminoArg)		$K_i = 1.2\mu\text{M}$ (70)	$K_i = 1.7\mu\text{M}$ (70)
N ^δ -amino ornitina (NIO) etil		$IC_{50} = 3.9\mu\text{M}$ (71)	$IC_{50} = 2.2\mu\text{M}$ (71)
N ^ε -amino etil lisina (NIL)		$IC_{50} = 92\mu\text{M}$ (71)	$IC_{50} = 3.3\mu\text{M}$ (71)
N ^o -ally arginina		$K_i = 0.85\mu\text{M}$ (71)	$K_i = 8.5\mu\text{M}$ (71)
N ^o -metoxi arginina		$K_i = 6\mu\text{M}$ (70)	$K_i = 20\mu\text{M}$ (70)
Tiocitrulina		$K_i = 60\text{nM}$ (72)	$K_i = 3.6\mu\text{M}$ (72)
S-metil tiocitrulina iso-		$K_i = 5\text{nM}$ (73)	$K_i = 5\text{nM}$ (73)
N ^o -hidroxi citrulina		----- (74)	----- (74)
N ^o -hidroxi indospicina		----- (74)	----- (74)
Indospicina		----- (75)	----- (77)

3.2 Hiperalgnesia y óxido nítrico:

Se denomina hiperalgnesia al incremento en la respuesta a un estímulo nocivo. Los estímulos que producen dolor en el tejido cutáneo pueden ser provocados por irritantes químicos como la carragenina, por el calor, la estimulación eléctrica o por enfermedades dermatológicas, todos estos estímulos se caracterizan por producir dos zonas de hiperalgnesia: a) la zona primaria que comprende a la región del tejido dañado en donde se produce un incremento en la sensibilidad al dolor por estímulos mecánicos y químicos, b) la zona de hiperalgnesia secundaria que se encuentra alrededor de la zona primaria la cual puede ser sensible a los estímulos calientes e hipersensible a los estímulos fríos (Aloe y col., 1997; Bessou y Perl, 1969; Simone y col., 1989).

Los mecanismos productores de la hiperalgnesia primaria involucran procesos que son integrados en el SNC, pero que pueden explicarse predominantemente por eventos que ocurren en la periferia en los nociceptores. Dichos eventos son transmitidos por las aferentes primarias y procesados en la médula espinal – procesamiento primario-. Por otro lado la zona de hiperalgnesia secundaria se caracteriza por presentar alodinia – sensación de dolor producida por estímulos que en condiciones normales no producen dolor- lo cual puede explicarse por mecanismos centrales, que se integran en los centros de revelo supraespinal tales como el tálamo y estructuras cortico límbicas. (Millan, 1999; Wall y Melzack, 1995)

La inyección subcutánea del polisacárido carragenina induce hiperalgnesia primaria y secundaria por lo que se considera un modelo de dolor prolongado, subcrónico, cuya duración es de días y reproduce además la alodinia (Millan, 1999).

Utilizando este y otros modelos de dolor se ha descrito que el daño en el tejido periférico y las fibras aferentes producen un incremento en la concentración de

óxido nítrico, así como una sobre-expresión de su enzima de síntesis SON (Dickenson,1997; Xu XJ,1997; Sten Shi T-J y col.,1998).

Así mismo, el uso de fármacos que inhiben a la SON inhiben la nocicepción (Lawand y Westrlund,1997). Por ejemplo la administración intratecal (i.t.), intracerebroventricular u oral del inhibidor L-N G-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME).

En otro modelo de dolor como el de la constricción crónica del nervio ciático, Meller y col. (1992) encontraron que la inyección i.t. de L-NAME reduce la hiperalgesia térmica y mecánica. Handy y Moore (1998) corroboraron estos resultados pero utilizando el modelo de dolor producido por carragenina.

En humanos la inyección intra cutánea de óxido nítrico produce dolor y el efecto es dosis dependiente (Holthusen y Arndt, 1994).

Todos estos antecedentes muestran que el óxido nítrico participa en los mecanismos de producción de dolor, ya que al utilizar inhibidores de su síntesis se disminuye el dolor y la inflamación. El ON puede actuar en el sitio de origen del dolor (receptores periféricos) o bien como un neurotransmisor en la comunicación intercelular en estructuras centrales. Se sabe que la SON se activa en sitios periféricos y en los ganglios de la raíz dorsal (Sten Shi T-J,1998). Sin embargo, no se conoce si esta enzima se activa en estructuras centrales como la amígdala en el procesamiento de la información nociceptiva, así como si se activa en las estructuras que constituyen la vía ponto-amigdalocortezal que procesa el componente afectivo del dolor.

III. HIPÓTESIS

El dolor producido durante la hiperalgesia incrementa la síntesis del óxido nítrico en la amígdala cerebral, por lo que la actividad de la sintetasa del óxido nítrico estará aumentada.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el neurotransmisor óxido nítrico actúa en el procesamiento de la información de dolor en la amígdala cerebral de la rata en condiciones de hiperalgesia (dolor), tomando como estructura control al estriado, donde se sabe no se producen cambios significativos durante la hiperalgesia.

OBJETIVO PARTICULAR

1. Llevar a cabo el modelo experimental de hiperalgesia producido por la inyección del polisacárido carragenina y medir el umbral al dolor en los grupos experimentales control, salino y carragenina.
2. Analizar la actividad de la sintetasa del óxido nítrico en los grupos experimentales control, salino y carragenina.

V. METODOLOGÍA

a) Materiales:

- Tubos de ensaye
- Vasos de precipitado
- Micropipetas
- Tubos eppendorf
- Columnas para cromatografía de adsorción
- Gradillas
- Puntas

Soluciones y Reactivos:

- Fosfato de sodio dibásico anhidro
- Fosfato de sodio monobásico
- Triton X-100 0.3%
- EGTA (ácido etilen glicol-bis[β -aminoetil éter] N',N',N'-tetra acético) 1mM
- EDTA (ácido etilen diamino tetra acético) 1mM
- Aprotinina 2mg/L
- Inhibidor de tripsina 10mg/l
- Leupeptin 1mM
- Metil fenil sulfonil fluoride 1mM
- 2-Mercaptoetanol al 0.1%
- Buffer de disolución Hepes 20mM pH 7.4
- ^3H -Arginina 0.1 μCi
- L-Arginina-HCl 10 μM
- β -NADPH (β -Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido) 1mM
- Calmodulina 10 μM

- CaCl_2 2.5 μM
- FAD (dinucleótido de flavina) 1 μM
- FMN (mononucleótido de flavina) 1 μM
- Tetrahidrobiopterinas 10 μM
- Resina Dowex WG-50
- Buffer stop pH 5.5
- Carragenina 1%

Aparatos:

- Analgesiómetro
- Potenciómetro
- Homogenizador
- Baño María
- Contador de centelleo
- Espectrofotómetro

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 290 a 300 g de peso, las cuales fueron mantenidas en condiciones de temperatura y luz controlada, con agua y alimento a libre demanda.

b) Métodos:

Medición del umbral al dolor

Durante tres días previos a la aplicación del estímulo doloroso las ratas fueron manipuladas con el propósito de disminuir el estrés, por lo que se les midió el

umbral al dolor con un analgesiómetro (ver figura 9), el cual consta de: a) una base donde se coloca la pata de la rata, b) una pesa que ejerce presión sobre esta y de c) una escala que indica el peso que soportó la rata, esta medida es considerada como el umbral al dolor. Como se mencionó anteriormente el umbral se midió por tres días consecutivos (figura 10). Posteriormente se formaron los siguientes grupos experimentales: control, salino y carragenina, cuyas características se describen a continuación.

Control: ratas que no recibieron ningún estímulo pero que se les determinó el umbral al dolor a las 4 horas.

Salino: ratas que fueron inyectadas con solución salina al 0.9% por vía subcutánea en el cojinete plantar y que se les midió el umbral al dolor a las 4 horas, después de la aplicación de la solución salina.

Carragenina: Grupo de ratas que fueron inyectadas con 200 μ l de una solución de carragenina al 4% por vía subcutánea en el cojinete plantar, a las cuales se les midió el umbral al dolor a las 4 horas después de la aplicación de la carragenina (un momento antes de ser sacrificadas).

El método experimental utilizado se describe en el diagrama de flujo de la figura 12. Se describe en los siguientes párrafos.

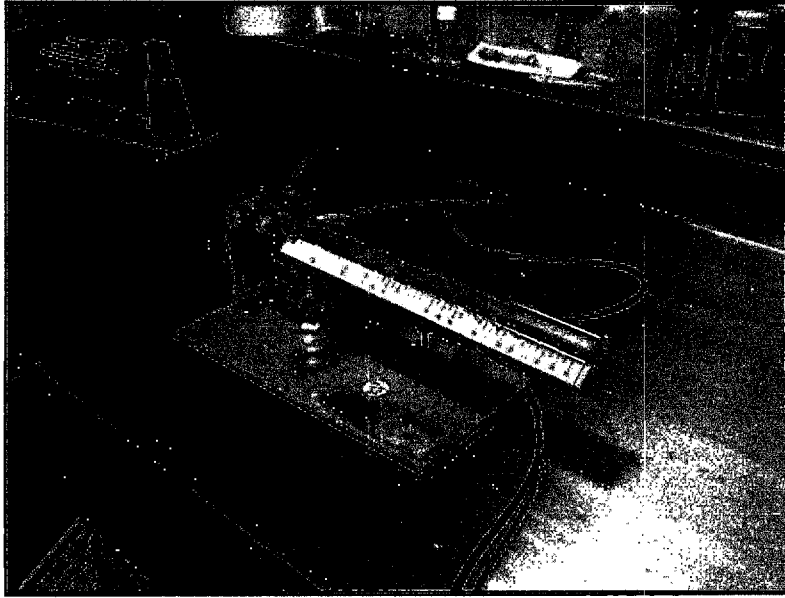


Figura 9. Analgesiómetro. Aparato que mide el umbral al dolor mediante la aplicación de presión en la pata de la rata.



Figura 10. Medición del umbral al dolor. Técnica para medir el umbral al dolor en la pata de la rata utilizando el analgesiómetro.

Sacrificio y disección

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación y se efectuó la disección de la amígdala cerebral y del estriado en una plancha fría a 4°C, tomando como referencia el atlas de Paxinos y Watson (1998), ver figura 11.

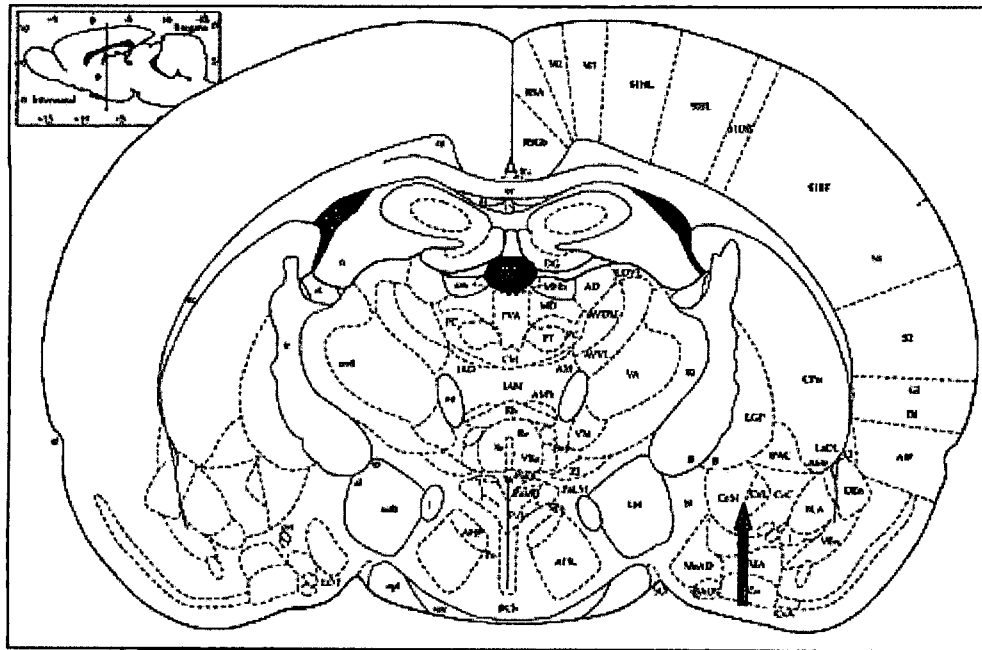


Figura 11. Disección de la amígdala cerebral. Esquema de un corte coronal del cerebro de la rata en donde se muestra el área que fue disectada para la medición de la sintetasa del óxido nítrico (Paxinos y Watson, 1998).

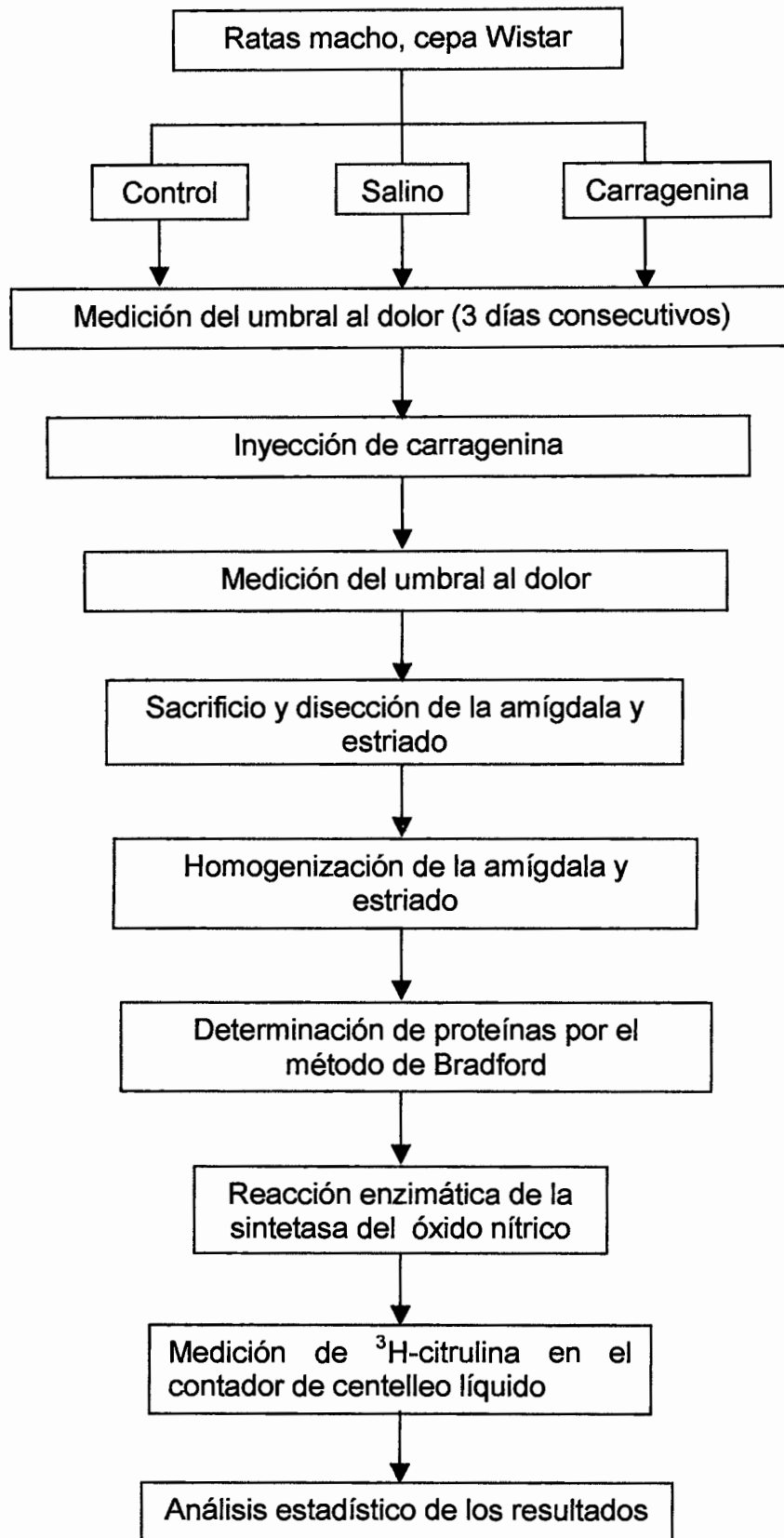


Figura 12. Diagrama de flujo para la determinación de la actividad enzimática de la SON.

Actividad enzimática

La actividad de la sintetasa del óxido nítrico (SON) se ensayó midiendo la conversión de [³H]-L-Arginina a [³H]-L-Citrulina. El tejido se homogenizó a 4°C en 250 µl de buffer fosfatos 0.1 M pH 7.4 que contiene, Triton X-100 al 0.3%, EDTA 1mM, EGTA 1mM y los siguientes inhibidores de proteasas: Aprotinina 2 mg/l, Inhibidor de tripsina 10 mg/l, Leupeptin 1mM, Metil fenil sulfonil fluoride 1mM.

Se tomó una alícuota para determinar proteínas por el método de Bradford descrito por Walker (1994).

Determinación de proteínas por el método de Bradford (ver anexo 1)

Método de Incubación

Se tomó un volumen de homogenado que contenía 50µg de proteína el cual fue incubado en presencia de L-Arginina-HCl 10µM, 0.1µCi de ³H-Arginina, β-NADPH 1mM, Calmodulina 10µM, CaCl₂ 2.5µM, FAD 1µM, FMN 1µM, tetrahidrobiopterinas 10µM por 30 minutos a 37°C. Terminado el tiempo de incubación, la reacción se paró mediante la adición de 1mL de buffer Hepes (N-[2 hidroxietil] piperazina- N'-[2-etanesulfónico]) 20mM que contenía además EGTA 2mM, EDTA 2mM; pH 5.5 (buffer stop). Por último la mezcla de reacción se colocó en una columna para cromatografía con 1mL de resina Dowex WG-50, la cual fue activada previamente. La citrulina producida en la reacción fue eluida de la columna con 2ml de buffer stop y recibida en viales de centelleo, se adicionó líquido de conteo para su medición en el contador de centelleo líquido, los resultados fueron expresados en dpm y convertidos en pmol de [³H]-L-Citrulina/mg de proteína/minuto.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba estadística de análisis de varianza ANOVA* que sirve para estimar y contrastar los valores promedio de los resultados obtenidos en los diferentes grupos experimentales (esto se llevó a cabo utilizando el programa estadístico Systat). Una vez identificado con el análisis de ANOVA que existe diferencia entre los promedios de los tres grupos, se procede a realizar la prueba de Student-Newman-Keuls para identificar cuál de los valores promedio de los grupos es significativamente diferente. Se consideró significativa como mínimo una $p < 0.05$.

En resumen el procesamiento de los resultados fue el siguiente: primero llevar a cabo la prueba de ANOVA para determinar si hay diferencia entre los grupos y posteriormente llevar a cabo la prueba de Student-Newman-Keuls para determinar cuál o cuáles son los grupos diferentes.

* Abreviatura del término Analysis of variance (ANOVA).

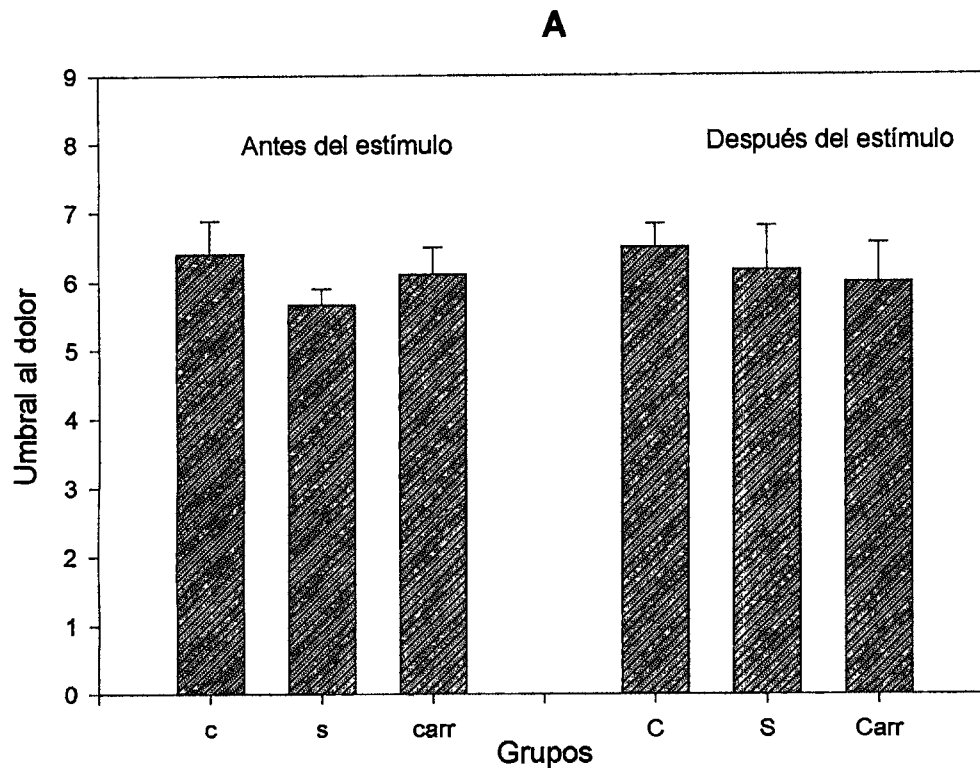
c) Diseño Experimental:

1. Las ratas macho de la cepa Wistar de 290-300 g de peso se mantuvieron en las condiciones adecuadas.
2. Se formaron tres grupos experimentales: control, salino y carragenina.
3. A los tres grupos se les midió el umbral al dolor, para la adaptación.
4. Se preparó el grupo salino, al cual se le inyectó solución salina al 0.9% por vía subcutánea en el cojinete plantar en el tiempo indicado, a las 4 horas y se les determinó el umbral al dolor.
5. Se preparó el grupo carragenina, al cual se le inyectó 200 μ l de una solución de carragenina al 4% por vía subcutánea en el cojinete plantar, a la cual se le midió el umbral al dolor a las 4 horas (un momento antes de ser sacrificada).
6. Posteriormente los grupos de ratas fueron sacrificadas por decapitación y se efectuó la disección de la amígdala cerebral y del estriado en una plancha fría a 4°C.
7. Posteriormente se procedió a la homogenización del tejido
8. Luego se llevó a cabo la determinación de proteínas del tejido por el método de Bradford.
9. Después se realizó la medición de la actividad enzimática de la SON.
10. Se llevó a cabo el conteo en el contador de centelleo líquido.
11. Por último se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos mediante la prueba de análisis de varianza y la prueba de Student-Newman-Keuls.

VI. RESULTADOS

Umbral al dolor

Como se puede observar en las figuras siguientes, en la pata derecha que NO fue inyectada (figura A) no se observan cambios al determinar el umbral al dolor cuando se aplica un estímulo como la inyección de carragenina al 4%, mientras que en la pata izquierda (figura B) se produce un cambio significativo en el umbral al dolor después de haberle aplicado la inyección de carragenina.



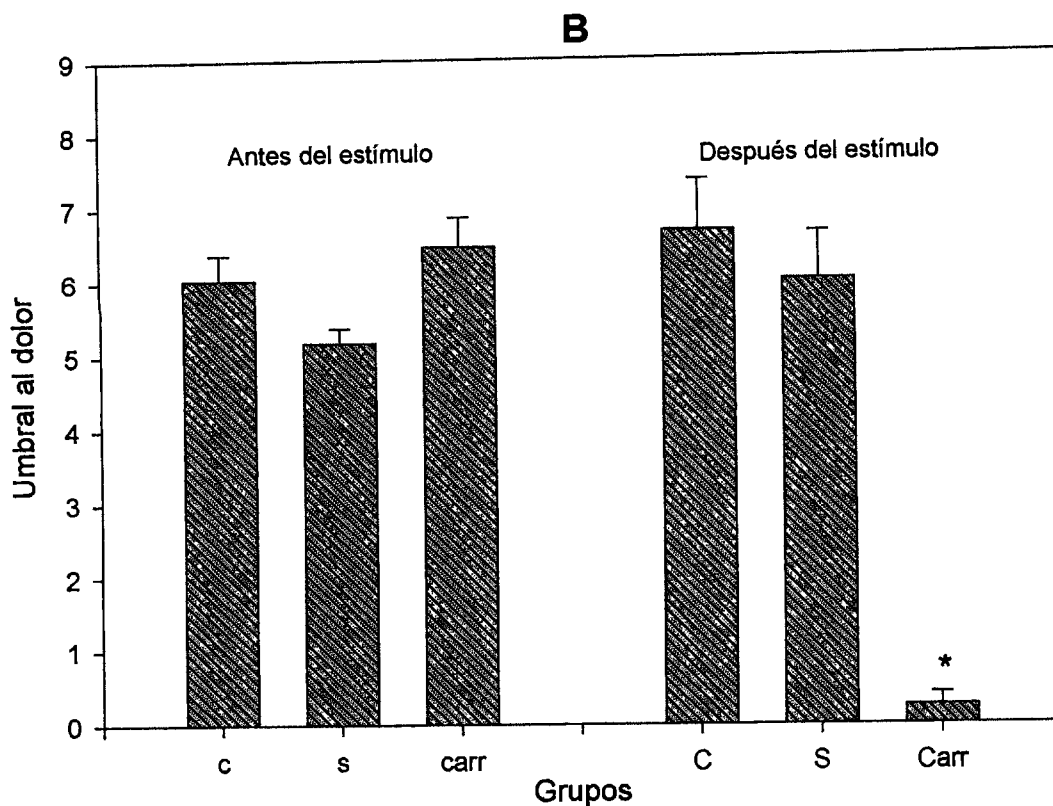


Figura 13. Resultados del umbral al dolor. Grupos experimentales: control (c), salino (s) y carragenina (Carr). A) pata derecha antes y después del estímulo. B) pata izquierda antes y después del estímulo. La ANOVA llevada a cabo para comparar los grupos mostró una diferencia significativa de $*p= 0.00011$ y la comparación entre los grupos con la prueba de Student-Newman-Keuls $*p<0.05$ mostró diferencias en el grupo carragenina pata izquierda después del estímulo. Las barras representan el valor promedio \pm error estándar ($n= 5$).

Actividad enzimática

Se estandarizó la cantidad de proteína suficiente para determinar la actividad enzimática de la sintetasa del óxido nítrico por lo que se llevó a cabo la cuantificación en diferentes cantidades de proteínas, como se muestra en la figura 14, donde se observa que 50 μ g es la cantidad de proteína ideal que se puede utilizar, ya que con 200 μ g se presenta una saturación del efecto y podría dar como resultados falsos negativos.

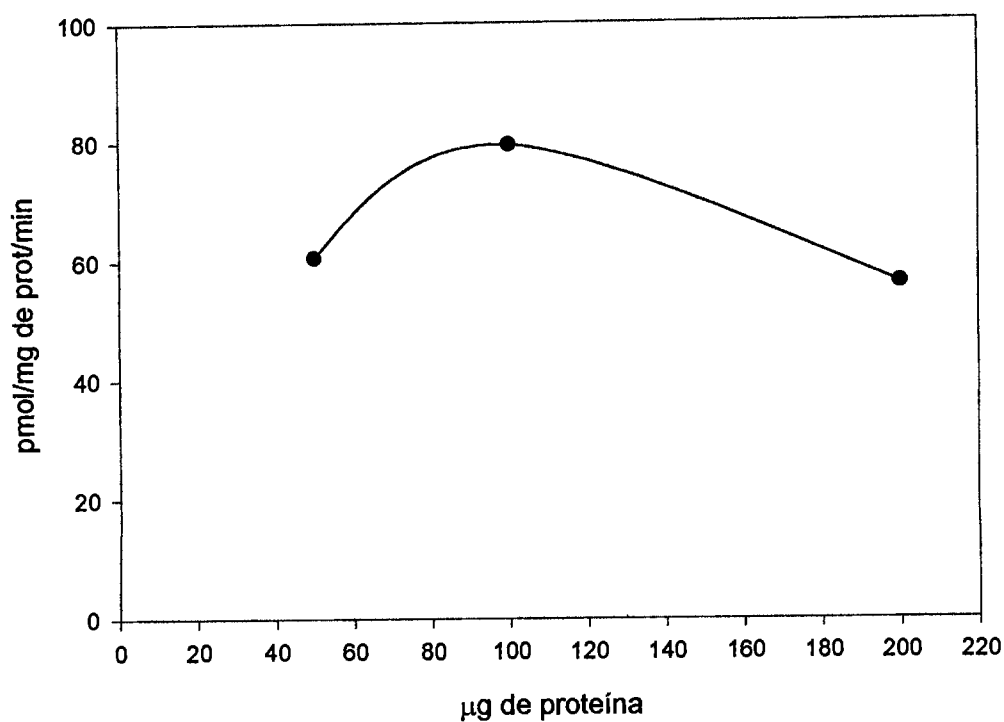


Figura 14. Determinación de la actividad enzimática de SON en amígdala cerebral de rata utilizando 50 μ g, 100 μ g y 200 μ g de proteína.

La actividad enzimática de la sintetasa del óxido nítrico puede ser inhibida de diferente manera, la figura 15 muestra la inhibición de la actividad de la SON por efecto del inhibidor L-NAME que es un análogo de la L-Arginina y por ausencia de algún cofactor β -NADPH que es necesario para activar a la enzima.

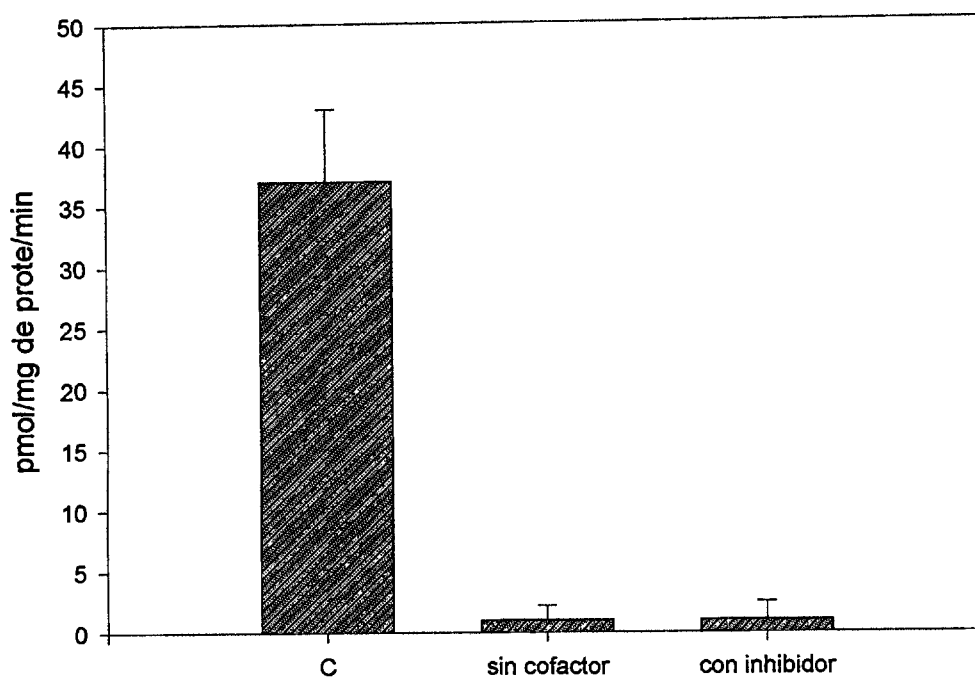


Figura 15. Inhibición de la actividad enzimática de SON. Se muestra la inhibición de la actividad de la SON al quitar del medio de incubación al cofactor β -NADPH 1mM o al adicionar el inhibidor Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 1M. "C" corresponde a una muestra control con cofactor y sin inhibidor. Las barras indican el valor promedio \pm error estándar (n=5).

De la misma forma se evaluó el tipo de isoforma de la enzima presente en la amígdala por lo que se realizó la determinación de la actividad enzimática de SON en presencia y en ausencia de calcio como se muestra en la figura 16, donde se observa que la isoforma presente es dependiente de calcio, ya que si se quita el Ca^{2+} del medio disminuye considerablemente la actividad de la enzima.

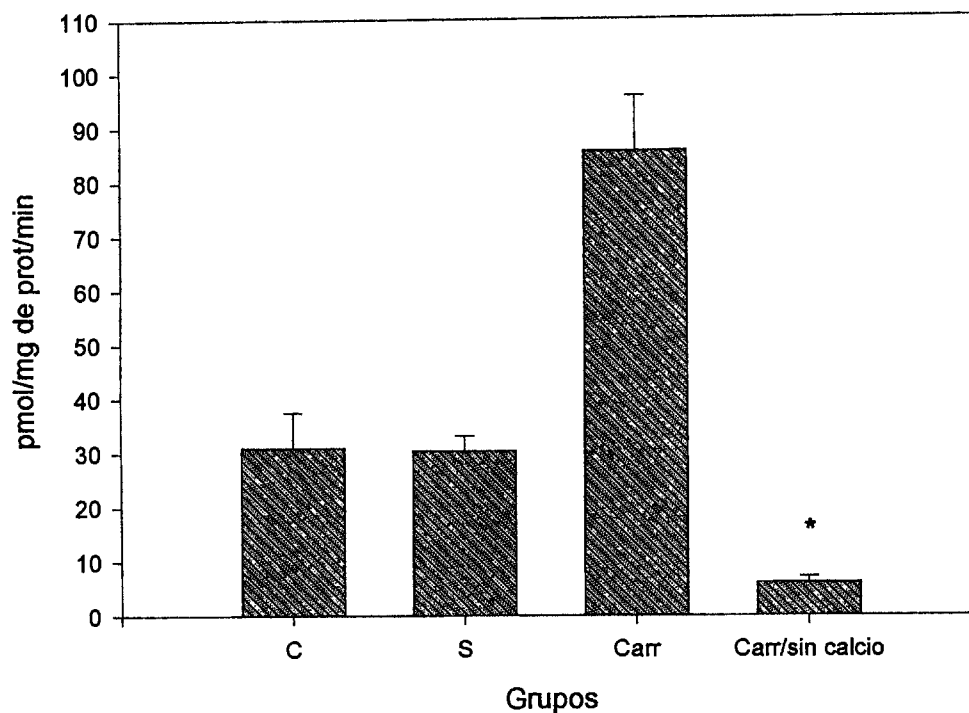


Figura 16. Efecto del Ca^{2+} en la actividad enzimática de la SON, en la amígdala cerebral de la rata con hiperalgesia. El análisis estadístico mostró diferencia significativa para el grupo de carragenina sin calcio con respecto al grupo de carragenina con calcio (* $p < 0.05$). Las barras representan el valor promedio \pm error estándar, $n = 5$.

Como se puede observar en la figura 17, en el grupo inyectado con carragenina la actividad de la sintetasa del óxido nítrico se incrementa con respecto a los grupos control y salino. Al llevar a cabo la prueba estadística de ANOVA se encontró una significancia de $p= 0.00034$.

AMÍGDALA

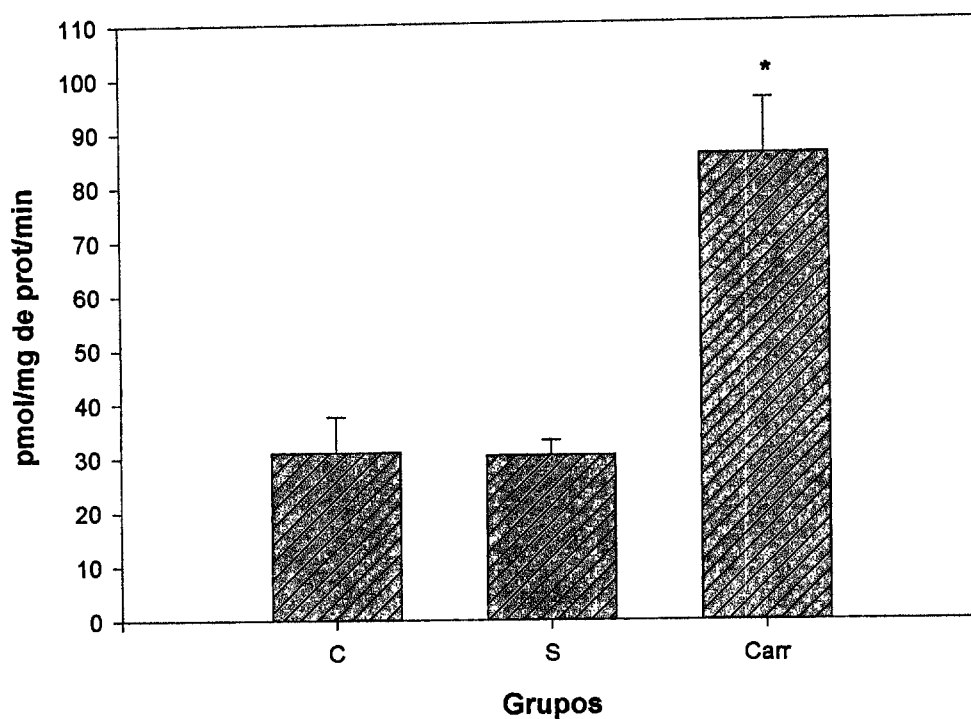


Figura 17. Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática de la SON en amígdala cerebral de rata con hiperalgesia. Grupos experimentales: control (C), salino (S) y carragenina (Carr). El análisis estadístico de la actividad enzimática expresados en pmol/mg de proteína/min mostró diferencias estadísticamente significativas para el grupo carragenina con respecto al grupo control y salino ($*p<0.05$). Las barras representan el valor promedio \pm error estándar ($n=5$).

La actividad enzimática de la sintetasa del óxido nítrico también se determinó en el estriado, que es una estructura control como se puede observar en la figura 18, ya que no se encontraron diferencias significativas en la actividad de la sintetasa del óxido nítrico en los grupos experimentales.

ESTRIADO

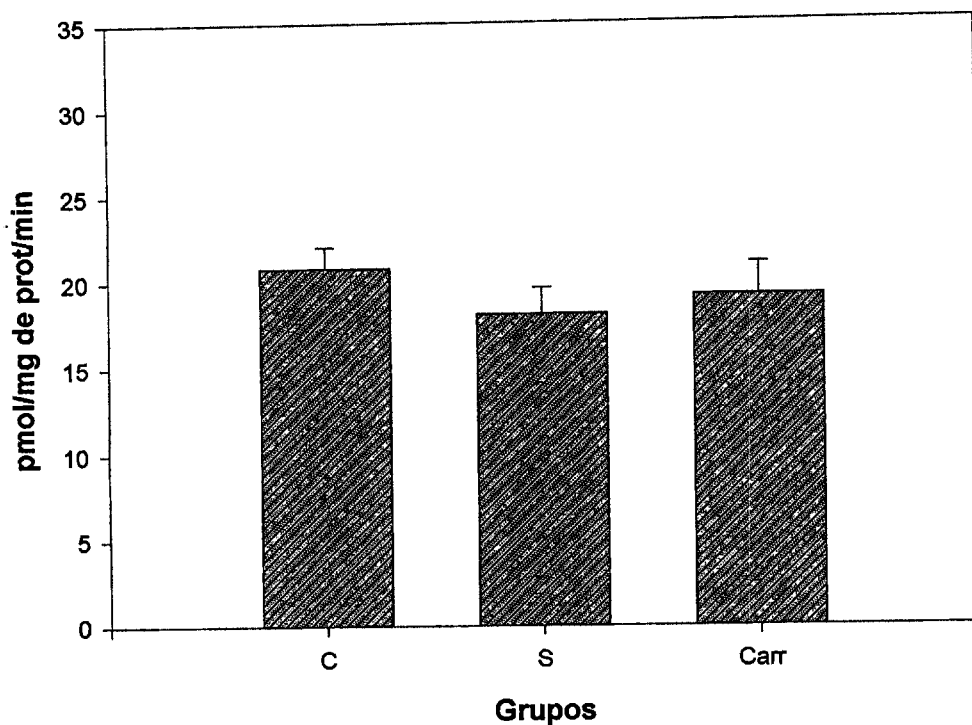


Figura 18. Determinación cuantitativa de la actividad enzimática de SON en estriado de rata con hiperalgesia. Grupos experimentales: control (C), salino (S) y carragenina (Carr). El análisis estadístico de la actividad enzimática no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Las barras representan el valor promedio \pm error estándar (n=5). Actividad enzimática expresada en pmol/mg de proteína/min.

VII. DISCUSIÓN

El presente estudio confirma que la aplicación intraplantar de carragenina produce inflamación y dolor en el sitio de su aplicación (Meller, 1992).

Nosotros hemos encontrado que el tiempo en el cual la carragenina produce el máximo dolor es a las 4 horas terminando su efecto después de 48 horas.

Otros autores han reportado un desarrollo similar del modelo de la carragenina pero con resultados variables en el umbral de máximo dolor probablemente porque han utilizado otros sistemas en los cuales se evalúa a los termonociceptores y no a los receptores por presión como se llevó a cabo en nuestras condiciones experimentales (Osborne, 1999; Meller, 1992).

El óxido nítrico está relacionado con el desarrollo y mantenimiento de la hiperalgesia, estos estudios se han llevado a cabo en aferentes primarias (Salvemini, 1996) (pata de la rata) en la médula espinal y raíces dorsales, así como en estructuras supraespinales como el tálamo y la corteza, estructuras que están relacionadas con el procesamiento somatosensorial del estímulo doloroso. Sin embargo la relación del óxido nítrico en el procesamiento afectivo de la información de dolor ha sido menos explorada.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que durante el tiempo de hiperalgesia máxima inducida mediante el modelo de la carragenina la actividad constitutiva de SON está incrementada en la amígdala, pero no en el estriado.

En un estudio reciente (Okere CH, 2000) utilizando la aplicación de capsaicina subcutánea en la rata se demostró que este estímulo produce un incremento en el RNAm (RNA mensajero) para la sintetasa del óxido nítrico neuronal (nSON) en amígdala medial, estos efectos disminuyeron cuando se pretrataron animales con L-NAME que es un inhibidor de la familia de las SON.

Si bien nuestros resultados coinciden con los reportados por este grupo, además muestran que el incremento en la síntesis del óxido nítrico está dado también por un incremento en la actividad constitutiva de la SON. Este efecto lo encontramos cuando la carragenina produce su efecto máximo (4 horas), a diferencia de la capsaicina cuyo efecto se presenta a los 30 minutos.

Así mismo el incremento en la concentración de óxido nítrico en amígdala puede deberse a la nSON (neuronal) o eSON (endotelial) pero no a la iSON (inducible) ya que nuestros resultados corroboraron que no hay actividad independiente de calcio. Otros autores han reportado expresión de iSON en aferentes periféricas (Salvemini, 1996), o bien en modelos de dolor neuropático (Levy, 1999) o contusión (Diaz-Ruiz, 2002) pero *in-situ*. Probablemente por que iSON está asociada a procesos de inflamación y edema que en nuestras condiciones se da únicamente en el sitio de inyección.

El componente afectivo-emocional es una parte esencial de la sensación de dolor y ha sido asociado clásicamente con el sistema nociceptivo medial el cual está conectado al sistema límbico. Una parte del sistema nociceptivo medial es la corteza y la amígdala, ambas estructuras pertenecen al circuito ponto-amigdalocorteza y se considera que este circuito sensa el complejo afectivo del dolor. Por lo que estos resultados demuestran que debido a que la amígdala pertenece a este sistema, cuando se aplica un estímulo doloroso, la actividad enzimática de la sintetasa del óxido nítrico se incrementa y por consecuencia la concentración del óxido nítrico, lo cual sugiere que el óxido nítrico participa en el procesamiento de la información hiperalgésica producida por la carragenina.

VIII. CONCLUSIONES

El modelo de hiperalgesia producido por la aplicación intraplantar de carragenina, permite estudiar las modificaciones en la neurotransmisión en el tejido cerebral.

La síntesis de óxido nítrico se modifica en la amígdala cerebral durante la hiperalgesia producida con el modelo de la carragenina.

Debido a que la amígdala sensa el componente emotivo del dolor y la concentración de ON se incrementa en el proceso de hiperalgesia, se puede sugerir que el óxido nítrico participa en el procesamiento del componente afectivo del dolor

IX. BIBLIOGRAFÍA

Aloe, L., Moroni, R., Angeluci, F., Fiore, M. **1997**. Role of TNF but not NGF in murine hyperalgesia induced by parasitic infection. *Psychopharm*; 134:287-292.

Belmonte, C., Cervero, F. **1995**. Sistema sensorial (sensibilidad somática y visceral) . En: Neurofisiología. Ed. Alhambra, Madrid: 145-148.

Bessou, P., Perl, E. R. **1969**. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibres to noxious stimuli. *J Neurophysiol*; 32:1025-1043.

Bishop, G. H. **1949**. Neural mechanisms of cutaneous sense. *Physiol Rev*, 26: 77-84.

Bishop, G. H. **1959**. The relation between nerve fiber, size and sensory modality. Phylogenetic implications of the afferent innervation of cortex. *J Nerv Ment Dis*; 128: 89-96.

Condés, L. M., Martínez, L. G., Talavera, C. E. **2002**. Dolor: una aproximación al estudio de sus mecanismos. En: Motivación animal y humana. Ed. El manual moderno, México: 173-185.

Díaz- Ruiz, A., Ibarra, A., Pérez, S. F., Guizar, S. G. **2002**. Constitutive and inducible nitric oxide activities after spinal cord contusion in rats. *Neurosci Lett*; 319: 129-132.

Dickenson, A. **1997**. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acids mechanisms and their control. In the Pharmacology of Pain. *Handbook of Experimental Pharmacology*; 130:167-210.

- Handy, R., Moore, P. K. **1998**. Effects of selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase on carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia. *Neuropharmacology*, 37:37-43.
- Head, H. **1920**. Pain. En: *Studies in Neurology*. Ed. Kegan Paul, New York: 157-160.
- Henry, A. Y., Guissani, A., Ducastel, B. **1997**. Nitric Oxide. En: *Nitric Oxide Research From Chemistry to Biology: EPR Spectroscopy of Nitrosylated Compounds*. Ed. Chapman & may, Francia: 175-192.
- Holthusen, H., Arndt, J. O. **1994**. Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. *Neurosci Letters*; 165:71-74.
- Ignarro, J. L. **2000**. Nitric Oxide Synthase. En: *Nitric Oxide Biology and Pathobiology*. Academic Press, Los Angeles California: 12, 873-894.
- Jaramillo, L. P. **2001**. Óxido nítrico y dolor. *MEDUNAB*; 4: 40-47.
- Kandel, E. R., Shchwartz, J. H., Jessell, T. M. **1991**. Nociceptores. En: *Neurociencia y conducta*. Prentice may, España: 635-652.
- Lawand, N. B., Westrlund, K. N. **1997**. Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. *NeuroReport*; 8:895-899.
- Levy D, Hûke A, Zochodne DW. **1999**. Local expression of inducible nitric oxide synthase in animal model of neurophatic pain. *Neurosci Lett*; 260: 207-209.
- Meller ST PP, Gebhart GP, Maves TJ. **1992**. Nitric Oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neurophatic pain in the rat. *Neuroscience*; 50:7-10.

Millan, M. **1999**. The induction of pain: An integrative review. *Progress in Neurobiology*; 57:1-164.

Neugebauer, V., Weidong, L. **2001**. Processing of Nociceptive Mechanical and Thermal Information in Central Amygdala Neurons With Knee-Joint Input. *J. Neurophysiol*; 87: 103-112.

Osborne, G., Codere, J. **1999**. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. *British J. of Pharmacology*; 126: 1840-1846.

Okere, C. H., Kaba, H., Higuchi, T. **2000**. Importance of endogenous nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and amygdala in mediating the response to capsaicin. *J Comp Neurol*; 423: 670-686.

Paxinos. **1995**. Amygdala. En: The rat nervous system. Ed. G Paxinos, London: 899-921.

Paxinos G, Watson CH. **1998**. The Rat Brain in stereotaxic coordinates. 4^a ed. San Diego California: Drawing & Photographs.

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick y col. **2001**. Sistema somatosensitivo, Sistema límbico y Dolor. En: Invitación a la neurociencia. Editorial médica panamericana, Buenos Aires, Argentina: 161-195, 405-420, 701-715.

Price, D. D., Dubner, R. **1997**. Neurons that subserve the sensory discriminative aspects to pain. *Pain*; 3:307-338.

Salvemini, D. W. Z., Wyate, P. S., Bourdon, D. M., Mariono, M. H. **1996**. Nitric Oxide: a key mediator in early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Alcohol-Alcohol*; 118: 829-838.

Sherrington, C. S. **1986**. System nociceptive. En: *The integrative Action of the Nervous System*. Ed. Charles Scribner's Sons, New York: 305-320.

Simone, D. A., Collins, J. G., LaMotte, R. H. **1989**. Sensibilization of cat dorsal horn neurons to innocuous mechanical stimulation after intradermal injection of capsaicin. *Brain Res*; 486:185-189.

Snyder, H. S. **1980**. Dolor. En: *El cerebro*. Ed. Labor, S. A., España: 161-163.

Snyder, H. S., Bredt, S. D. **1992**. Funciones biológicas del óxido nítrico. *Investigación y Ciencia*; 3: 12-20

Sten Shi T-J, H. K., David-Xu, Z. Q., Steinbush, H., Vente, J., Hokfelt, T. **1998**. Effect of peripheral nerve injury on cGMP and nitric oxide synthetase levels in rat dorsal root ganglia: time course and coexistense. *Pain*; 78:171-180.

Talavera, C. E., Martínez, L. G., Condes, L. M. **2003**. Revisión: Las funciones del óxido nítrico en el sistema nervioso central. Instituto de Neurobiología. Campus UNAM-UAQ, Juriquilla, Qro.

Torebjok, H. E., Hallin, R. G. **1983**. Perceptual changes accompanying controlled preferential blocking of A and C fiber responses in intact skin nerve. *Exp Brain Res*; 16:321-322.

Volwer, N., Weidong, L. **2001**. Processing of Nociceptive Mechanical and Thermal Information in Central Amygdala Neurons With Knee-Joint Input. *J Neurophysiol*; 87:103-112.

Walker, J. M. **1994**. The Bradford Method for Protein Quantitation. En: *The protein protocols Handbook*. Humana Press Inc, Totowa, NJ: 15-21.

Wall, P., Melzack, R. **1995**. Nitric Oxide and Hyperalgesia. En: Textbook of pain. Ed. Churchill Livingstone, New York: 150-180.

Xu XJ, W-HZ. **1997**. Novel Modulators in nociception. In the Pharmacology of Pain. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 130:211-234

Zigmond, J. M., Bloom, E. F., Landis, C. S., Roberts, L. J., Squire, R. L. **1999**. Nitric Oxide. En: Fundamental Neuroscience. Academic Press, San Diego, California: 228-229, 761-789.

X. ANEXO I

Determinación de proteínas por el método de Bradford.

Reactivos:

- Solución estándar de proteína (Albúmina sérica bovina 1.0mg/ml)
- Solución de azul de Coomassie (Reactivo de Bradford-BioRad)
- Agua

Materiales:

- Tubos de ensaye
- Gradilla
- Celdas desechables para espectrofotómetro
- Micropipetas

Equipo:

- Espectrofotómetro

Método:

1. Pipetear muestras por duplicado que contengan entre 1 y 10 μ g en un volumen total de 100 μ l (1, 1:10, 1:100, 1:1000) diluciones.
2. Para la curva de calibración, pipetear por duplicado volúmenes de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μ l de la solución estándar de albúmina sérica bovina 100 μ g/ml en tubos y ajustar el volumen a 800 μ l con agua. Pipetear 800 μ l de agua destilada en tubo para el blanco de reacción.
3. Preparar los tubos para las muestras con 5 μ l de una dilución 1:4 del homogenado y aforar a 800 μ l con agua.
4. Adicionar 200 μ l de reactivo de Bradford a todos los tubos y agitar brevemente
5. Esperar 5 minutos
6. Determinar la absorbancia a 595nm
7. Construir la curva estándar y extrapolar para calcular la concentración de proteína de las muestras problema.

ANEXO II

En este anexo se describe el procesamiento del manejo estadístico de los datos obtenidos en la cuantificación de la actividad enzimática de la SON, así como los resultados del análisis estadístico de los datos obtenidos en la amígdala cerebral y en el estriado, con el objetivo de mostrar que existe diferencia estadística significativa entre ambas estructuras, ya que en la amígdala existen cambios significativos entre los grupos experimentales, mientras que en el estriado no se observan cambios significativos. Este análisis fue llevado a cabo utilizando el programa SYSTAT versión II.

- a) Página 1. Se muestran los datos crudos para los grupos C (control), S (salino) y Carr (carragenina).
- b) Página 2. Se describen los resultados obtenidos del análisis estadístico descriptivo que contempla tamaño de muestra (size), valores faltantes (missing), la media o promedio de los datos (mean), desviación y error estándar, etc.
- c) Página 3. En la parte superior se muestra la prueba de ANOVA, la cual indica si existe diferencia estadística significativa entre los grupos experimentales.

En la parte inferior se muestran los resultados de la comparación múltiple realizada mediante la prueba estadística de Student-Newman-Keuls que describe entre qué grupos hay diferencia estadística significativa.

AMÍGDALA CEREBRAL

Datos crudos

C	S	Carr
39.5	-	87.02
15.17	34.36	116.88
15.17	34.36	96.55
44.21	22.84	67.10
41	29.96	61.18

Descriptive Statistics:

Column	Size	Missing	Mean
C	5	0	31.0
S	5	1	30.4
Carr	5	0	85.7

Column	Std Dev	Std. Error	Range
C	14.56	6.51	29.0
S	5.44	2.72	11.5
Carr	22.58	10.10	55.7

Column	Max	Min	Median
C	44.2	15.2	39.5
S	34.4	22.8	32.2
Carr	116.9	61.2	87.0

Column	25%	75%	Sum
C	15.2	41.8	155.1
S	26.4	34.4	121.5
Carr	65.6	101.6	428.7

Column	Sum of Squares	Confidence	Skewness
C	5656.0	18.08	-0.545
S	3780.5	8.65	-1.255
Carr	38800.7	28.03	0.367

Column	Kurtosis	K-S Distance	P Value
C	-3.232	0.320	0.0970
S	0.735	0.268	0.3532
Carr	-1.080	0.196	0.6167

One Way Analysis of Variance

Normality Test: Passed (P = 0.5811)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.0664)

Group	N	Missing
C	5	0
S	5	1
Carr	5	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
C	31.0	14.6	6.5
S	30.4	5.4	2.7
Carr	85.7	22.6	10.1

Power of performed test with alpha = 0.0500: 0.9977

Source of Variance	DF	SS	MS
Between Treatments	2	9729.8	4864.9
Residual	11	2975.5	270.5
Total	13	12705.2	

Source of Variance	F	P
Between Treatments	18.0	0.0003
Residual		
Total		

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.00034).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparison	Diff of Means	p	q
Carr vs S	55.37	3	7.097
Carr vs C	54.74	2	7.442
C vs S	0.63	2	0.081

Comparison	P<0.05
Carr vs S	Yes
Carr vs C	Yes
C vs S	No

ESTRIADO

Datos crudos

C	S	Carr
17.72	14.36	15.72
17.72	14.36	14.41
22.81	20.55	23.82
22.81	20.55	19.51
22.81	20.55	22.40

Descriptive Statistics:

Column	Size	Missing	Mean
C	5	0	20.8
S	5	0	18.1
Carr	5	0	19.2

Column	Std Dev	Std. Error	Range
C	2.78	1.24	5.09
S	3.39	1.52	6.19
Carr	4.12	1.84	9.41

Column	Max	Min	Median
C	22.8	17.7	22.8
S	20.6	14.4	20.6
Carr	23.8	14.4	19.8

Column	25%	75%	Sum
C	17.7	22.8	103.9
S	14.4	20.6	90.4
Carr	15.4	22.9	96.2

Column	Sum of Squares	Confidence	Skewness
C	2189.9	3.45	-0.609
S	1679.3	4.21	-0.609
Carr	1920.3	5.11	-0.154

Column	Kurtosis	K-S Distance	P Value
C	-3.33	0.367	0.0261
S	-3.33	0.367	0.0261
Carr	-2.54	0.204	0.5781

One Way Analysis of Variance

Normality Test: Failed (P = 0.0102)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.0694)

Group	N	Missing
C	5	0
S	5	0
Carr	5	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
C	20.8	2.78	1.24
S	18.1	3.39	1.52
Carr	19.2	4.12	1.84

Power of performed test with alpha = 0.0500: 0.0493

The power of the performed test (0.0493) is below the desired power of 0.8000. You should interpret the negative findings cautiously.

Source of Variance	DF	SS	MS
Between Treatments	2	18.4	9.21
Residual	12	144.7	12.06
Total	14	163.1	

Source of Variance	F	P
Between Treatments	0.763	0.4875
Residual		
Total		

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.487).