

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**EFFECTO DE ROSUVASTATINA SOBRE IL-1BETA, GSH/GSSG Y
TBARS EN RATONES CON DOLOR NEUROPÁTICO**

NICOLÁS ALONSO ARANDA ORTEGA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FISIOPATOLOGÍA

Director de Tesis: Prof. Dr. Hugo Miranda Guzmán

2016

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

NICOLÁS ALONSO ARANDA ORTEGA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Fisiopatología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de octubre de 2016

Prof. Dr. Hugo Miranda Guzmán
Director de Tesis
Programa de Farmacología Molecular y Clínica
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra Viviana Noriega

Prof. Dr. Rodrigo Castillo

Prof. Dr. Rodolfo Miralles

Prof. Dr. Juan Carlos Prieto
Presidente Comisión

Dedicatoria

A mi familia, amigos y polola.

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por apoyarme en los caminos que he elegido.

A Ana y Wenceslao, por enseñarme a ser y a hacer, a Andrés por ser un apoyo incondicional en la cotidianidad, a Jorge por ser una fuente de motivación e inspiración.

A Francisca por ser la mejor compañera y un pilar fundamental en la etapa de mi vida que ésta tesis representa.

A Felipe por ser un gran amigo y compañero de aventuras, dentro de las cuales está nuestro paso por la escuela de postgrado. A Álvaro para que no se ponga celoso.

Al Prof. Dr. Hugo Miranda, quien ha tenido la gentileza de no ser sólo un tutor académico, sino un amigo en la vida.

Al Prof. Dr. Juan Carlos Prieto por enseñarme mediante su ejemplo el deber y el sentido de la academia, tanto en su forma como en su fondo, dentro y fuera del aula.

A Don José, quien es una fuente de aprendizaje y será una inspiración al momento de afrontar los desafíos que la vida nos plantea.

A todas las personas vinculadas al laboratorio, me siento profundamente honrado y agradecido de que sean parte de la historia tras este documento.

Índice

1.- Resumen.	3
2.- Abstract	4
3.- Introducción.	5
3.1.- Fisiopatología del dolor neuropático.	6
3.2.- Dolor neuropático por paclitaxel.	9
3.3.- Rosuvastatina como antinociceptivo, antiinflamatorio y antioxidante.	13
4.- Hipótesis.	16
5.- Objetivo general.	16
6.- Objetivos específicos.	16
7.- Materiales y métodos.	17
7.1.- Animales.	17
7.2.-Neuropatía inducida por Paclitaxel.	17
7.3.- Neuropatía inducida por ligadura parcial del nervio ciático.	18
7.4.- Premedicación con rosuvastatina.	18
7.5.- Pruebas conductuales.	18
Test de hot plate y cold plate.	18
Prueba de von Frey electrónico.	20
7.6.-Pruebas moleculares.	20

Determinación de IL-1 β	20
Determinación de la relación GSH/GSSG(91).....	21
Determinación de lipoperoxidación con TBARS(33).....	21
7.9.- Análisis estadístico.	22
8.- Resultados.....	24
8.1.- Hot Plate Test.....	25
8.2.- Cold Plate Test.....	26
8.3.- e-VF Test	27
8.4.- Determinación de IL-1 β	28
8.5.- Razón GSH/GSSG	29
8.6.- TBARS	30
9.- Discusión	31
10.- Conclusiones	34
11.- Bibliografía.....	35

1.- Resumen.

Introducción: El dolor neuropático es aquel causado por una lesión o disfunción del sistema nervioso, siendo uno de los más severos que el hombre puede experimentar. Es producido por cambios patológicos a consecuencia de una enfermedad metabólica, infección viral, lesión traumática o secundario a la quimioterapia. El presente estudio evalúa las diferencias conductuales de hipernocicepción y los cambios medulares de marcadores inflamatorios y del estado redox en ratones con neuropatía y cómo la administración de rosuvastatina (RSV) afecta dichos cambios.

Métodos: Mediante la ligadura parcial del nervio ciático (PSNL) y la administración de paclitaxel (PTX) se obtuvieron ratones con neuropatía por daño neural quirúrgico y por neurotoxicidad. Pre y post tratamiento con rosuvastatina, se evaluó la hipernocicepción mediante los test de hot plate, cold plate y Von Frey electrónico, además se determinó los niveles medulares de IL-1 β , GSH/GSSG y TBARS.

Resultados: La administración de RSV fue capaz de revertir la alodinia mecánica en lesiones agudas y crónicas, sin embargo, solamente fue capaz de revertir la hiperalgesia térmica crónica. La administración de RSV revirtió el alza de IL-1 β en ambos modelos de neuropatía. En PSNL recuperó los niveles normales de GSH/GSSG y PTX fue capaz de revertir la lipoperoxidación neuronal.

Conclusión: Este estudio demuestra la actividad antinociceptiva de RSV, sugiriendo que actúa mediante el control del ambiente proinflamatorio y del estado redox medular.

2.- Abstract

Introduction: Neuropathic pain is caused by injury or dysfunction of the nervous system, one of the most severe that a person can experience. It is produced by pathological changes resulting from a metabolic disease, viral infection, traumatic injury or secondary to chemotherapy. This study evaluated hypernociceptive behavioral differences and spinal changes of inflammatory and redox state markers in neuropathic mice and how rosuvastatin (RSV) affects those changes.

Methods: Neuropathic mice were obtained by partial sciatic nerve ligation (PSNL) and the administration of paclitaxel (PTX). Hypernociception was assessed using the hot plate test, cold plate test and electronic Von Frey test, also, the spinal levels of IL-1 β , GSH/GSSG and TBARS was determined, pre and post treatment with RSV.

Results: Administration of RSV was able to reverse the mechanical allodynia in acute and chronic injuries, however, it was only able to reverse the chronic thermal hyperalgesia. RSV administration reversed the increase of IL-1 β levels in both neuropathy models, in the PSNL model recovered normal levels of GSH/GSSG and in the PTX model was able to reverse the neuronal lipid peroxidation.

Conclusion: This study demonstrates the antinociceptive activity of RSV, suggesting that acts by controlling the medullary proinflammatory environment and redox state.

3.- Introducción.

El dolor generalmente se origina como una consecuencia de la activación de una vía nociceptiva aferente primaria por un estímulo asociado a un daño real o potencial de los tejidos. Este tipo de dolor es fisiológico. Sin embargo, el dolor también puede ser generado en el sistema nociceptivo en ausencia de estímulo adecuado en los terminales sensitivos, para esta situación es empleado el término de dolor neuropático (1).

La IASP (International Association for the Study of Pain) define el dolor neuropático como el dolor causado por una lesión o enfermedad en el sistema nervioso (2). Esta definición ha sido útil para distinguir el dolor neuropático de otros tipos de dolores, pero sin mucha especificidad diagnóstica ni anatómica (3-9), por ello es importante hacer referencia a orígenes identificables de dolor neuropático, tales como procesos infecciosos, inflamatorios, autoinmunes, neurodegenerativos, traumas, anormalidades metabólicas, irradiación, neurotoxinas, quimioterapia, cirugías, compresión nerviosa o infiltración tumoral, entre otros (7, 9). El dolor neuropático prevalece entre 1-8% en la población general, valor que varía según edad, sexo y situación sociodemográfica (10), y afecta la calidad de vida, reduce la funcionalidad física y emocional, e impone un costo sustancial a la sociedad (11). Los pacientes con dolor neuropático requieren más medicamentos y reportan menos alivio que los pacientes con otros dolores crónicos (12), por lo que hay una gran necesidad de

comprender su fisiopatología, para así obtener mejores farmacoterapias para su manejo y otorgar bienestar y buena calidad de vida al paciente (13).

3.1.- Fisiopatología del dolor neuropático.

El dolor neuropático se manifiesta clínicamente por alteraciones sensoriales de hiperalgesia (aumento del dolor provocado por un estímulo de daño real o potencial) y alodinia (dolor frente a un estímulo que normalmente no produce dolor). Los mecanismos del dolor neuropático no están del todo esclarecidos. Una simple lesión de un nervio desencadena una serie de procesos en el sistema nervioso central y periférico que pueden contribuir al dolor persistente y la sensación anormal (7). La inflamación, mecanismos de reparación de los tejidos neurales en respuesta a una lesión y la reacción de los tejidos adyacentes a ésta, llevan a un estado de hiperexcitabilidad en los nociceptores aferentes primarios, un fenómeno denominado sensibilización periférica (14-16). A su vez, las neuronas centrales inervadas por dichos nociceptores se someten a fuertes cambios funcionales que pueden conllevar a un estado de hiperexcitabilidad denominado sensibilización central. Normalmente, estos procesos de sensibilización e hiperexcitabilidad se extinguen cuando el tejido sana y disminuye la inflamación. Sin embargo, cuando la función aferente primaria se altera de forma permanente por una lesión o enfermedad del sistema nervioso, estos procesos persisten y pueden ser altamente resistentes al tratamiento (7, 9, 17).

A la fecha se han descubierto muchas anormalidades relacionadas con el dolor neuropático y las vías neuronales afectadas. Sin embargo, hay que considerar que las neuronas no están aisladas, por lo que hay que tomar en cuenta su medio

ambiente, tanto a nivel periférico como central (16, 18, 19). En la periferia, cuando la continuidad axonal es dañada o interrumpida, ya sea por factores traumáticos, tóxicos, isquémicos o metabólicos, se gatillan cascadas de eventos que incluyen: pérdida de la barrera hemato-neural, proliferación de células de Schwann, reclutamiento de macrófagos circulantes, reorganización del espacio endoneural, cambios en los componentes de la matriz extracelular (16) y elevación en la producción de neurotrofinas (20), citoquinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF α , entre otras), factores de transcripción (NF- κ β y c-Jun), metabolitos del ácido araquidónico y activación del sistema del complemento (21, 22). Entre las consecuencias, se encuentran la expresión alterada de receptores adrenérgicos, canales de sodio, potasio y de calcio tipo-N y tipo-L a nivel de los nociceptores afectados y en sus ganglios dorsales asociados, disminuyendo el umbral de despolarización, y así permitiendo la generación de descargas ectópicas (9, 15, 23-26). De igual modo las injurias neurales periféricas pueden inducir la activación aberrante de las vías sensitivas, principalmente a nivel de la raíz del ganglio dorsal y de las astas dorsales de la médula espinal, resultando en múltiples alteraciones anatómicas y funcionales (9, 19, 27). Estos eventos no sólo afectan a las neuronas sensitivas de la asta dorsal, sino que también afectan a la microglía espinal, las cuales se encuentran normalmente en reposo, pero que frente a las noxas en las neuronas periféricas pasan a estar en un estado activo (28-30). Es importante considerar la transmisión a través de sinapsis glutamatérgicas (receptores AMPA y NMDA), y la inhibición sensorial en las sinapsis GABAérgicas y glicinérgicas. La hiperexcitabilidad puede ser producida, entonces, por facilitación de las vías

glutamatérgicas, o por supresión de las vías GABAérgicas y glicinérgicas, generando respuestas sensitivas amplificadas, tales como alodinia o hiperalgesia (7, 9, 17, 19, 30).

La participación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en el dolor neuropático es actualmente aceptada, ya que inyecciones de antioxidantes como N-Acetilcisteína o α -fenil-N-tert-butilnitrona ejercen un efecto analgésico (31, 32). Sin embargo, el sitio de acción de estos complejos no ha sido bien establecido. Inyecciones intratecales o sistémicas han mostrado tener efectos similares, y por lo tanto la médula espinal pareciera ser un sitio de mayor acción antioxidante (31). Posiblemente las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno activarían segundos mensajeros relacionados a sensibilización central, perpetuando el dolor posiblemente por adaptaciones neuroquímicas en la medula espinal (33, 34). La médula espinal es la región donde los primeros procesamientos nociceptivos ocurren, por lo tanto, una injuria a un nervio provoca muchas adaptaciones neuroquímicas, regulando hacia arriba o hacia abajo una serie de compuesto químicos (9, 22, 35). En los últimos años se ha reportado la participación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (31, 36). Las ROS actúan normalmente en procesos celulares y la concentración de estos elementos es controlada por los sistemas antioxidantes, entre los que se encuentran moléculas no enzimáticas como el glutatión (GSH) y enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa. El GSH es un compuesto natural que consta de tres aminoácido (ácido glutámico, cisteína y glicina) y es un el mayor antioxidante endógeno, participando en muchas reacciones de detoxificación para proteger al organismo de radicales

libres y ROS, al hacer esto se transforma en glutatión reducido (GSSG) (37). Se ha probado su rol en la prevención del dolor neuropático inducido sin mucho éxito, pero sigue siendo un buen determinador de los niveles generales de los sistemas antioxidantes (37).

Cuando la producción de ROS es mayor que la actividad de los sistemas antioxidantes se produce estrés oxidativo, y puede ocurrir daño celular (38). Gran parte de ese daño es debido a la peroxidación lipídica. Los peróxidos lipídicos son tóxicos y pueden dañar la mayoría de las células del cuerpo (39), esto se debe a que los peróxidos lipídicos al ser degradados producen aldehídos reactivos, como el malondialdehído, que pueden unirse covalentemente a las proteínas alterando su estructura y función (34, 39).

Cualquiera de los procesos mencionados anteriormente podría suponer una alteración en las propiedades intrínsecas de la membrana neuronal, de la conductancia voltaje-activada o de la conductancia activada sinápticamente en neuronas de transmisión nociceptiva, por lo que claramente los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el dolor neuropático son complejos e involucran procesos tanto centrales como periféricos (22, 34, 40).

3.2.- Dolor neuropático por paclitaxel.

La neurotoxicidad periférica inducida por quimioterapéuticos ha cobrado gran relevancia, representando el segundo efecto adverso más frecuente después de la toxicidad hematológica, pudiendo ésta última ser tratada con factores de crecimiento hematopoyéticos, a diferencia de la neurotoxicidad que actualmente no

puede ser efectivamente prevenida o tratada (41). Dichos efectos adversos afectan el éxito del tratamiento de pacientes con cáncer, ya sea por disminución de las dosis o por suspensión de la terapia (42, 43). La neurotoxicidad se puede desarrollar como consecuencia del tratamiento de la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos, tales como los derivados del platino, alcaloides de la vinka, taxanos, epotilonas, inmunomoduladores, agentes alquilantes, inhibidores de la topoisomerasa, antimetabolitos, entre otros (42, 44-46). Se estima una incidencia de neuropatía periférica de entre 10 – 100%, dependiendo del fármaco analizado (47, 48). El desarrollo, tipo (sensorial pura, sensorial-motora o autonómica) y severidad de la neuropatía periférica está relacionada a numerosos factores: edad, intensidad de la dosis, dosis acumulativa, duración de la terapia, coadministración con otros agentes quimioterapéuticos neurotóxicos, y preexistencia de condiciones tales como diabetes o alcoholismo (49, 50).

La aparición de neuropatía periférica está relacionada a la ausencia de barrera hemato-neural en el ganglio raquídeo posterior y a la mayor permeabilidad del *vasa nervorum*, comparada con la barrera hematoencefálica (43, 45). Los mecanismos que subyacen a la neurotoxicidad inducida por quimioterapéuticos son diversos, destacando la inducción de apoptosis en el ganglio raquídeo posterior, secundario a daño en la estructura terciaria del DNA nuclear y aumento en la generación de disfunción mitocondrial (45, 46, 51); y alteración en la despolimerización de los microtúbulos, interfiriendo en el transporte axonal y en el resto de las funciones celulares básicas mediadas por éstos, entre ellas, el metabolismo energético, causando una disfunción de la neurona que conllevará la consecuente

degeneración axonal (45, 46, 50). Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos implicados directamente en la patogenia de la neuropatía inducida por quimioterapéuticos son parcialmente conocidos, probablemente de etiología multifactorial y no siempre guardan relación con su mecanismo antitumoral (43, 45). La familia de los taxanos, representada por paclitaxel y docetaxel, es usada ampliamente en el tratamiento de carcinomas sólidos, que incluyen cáncer de mama, ovario, cabeza y cuello, pulmonar de células pequeñas, melanomas y sarcoma de Kaposi (52, 53). Su mecanismo de acción se basa en la unión a las subunidades de β -tubulina, causando hiperestabilización de los microtúbulos mediante su entrecruzamiento, disminuyendo la capacidad dinámica de reorganizar el citoesqueleto, principalmente inhibiendo el transporte axonal y la división celular, postulándose este mecanismo como potencial inductor de neurotoxicidad a nivel periférico (43, 46, 54).

La neurotoxicidad por paclitaxel aparece como un efecto adverso significativo que limita la dosificación de éste (55). La neuropatía se manifiesta como pérdida sensorial distal simétrica con distribución en guante-y-calceta, parestesias, alodinia mecánica y fría, dolor quemante, y pérdida de reflejos tendíneos profundos conduciendo a déficit en la propiocepción, marcha y en la motricidad fina (43, 48, 56). Los síntomas pueden aparecer después de 24 a 72 horas de iniciado el tratamiento con altas dosis ($\geq 250 \text{ mg/m}^2$), pero usualmente ocurren después de múltiples tratamientos a dosis convencionales ($135 \text{ a } 250 \text{ mg/m}^2$). La neurotoxicidad severa es rara a dosis convencionales ($\leq 200 \text{ mg/m}^2$), incluso en pacientes que han recibido previamente otros agentes neurotóxicos, como el cisplatino (57). Los

síntomas tienden a persistir a largo plazo, aunque alguna reversibilidad ha sido reportada (46).

En estudios histológicos y electrofisiológicos de neuropatía inducida por paclitaxel en ratas, se ha descrito degeneración axonal severa e hipomielinización en las raíces dorsales, acumulación intraaxonal de microtúbulos, cambios morfológicos en las células de Schwann, asociado a reducción en la velocidad de conducción de fibras sensitivas gruesas (54, 56, 58). También se ha caracterizado aumento en la expresión de MMP-3 (metaloproteinasa de la matriz-3) y en la densidad de macrófagos en los ganglios dorsales y en los nervios ciáticos, junto con activación de astrocitos y microglía en la médula espinal (59, 60). Por otra parte, el uso de paclitaxel se ha asociado a cambios atípicos en las mitocondrias, que incluyen edematización y vacuolización, tanto en fibras delgadas C como en axones mielinizados, conduciendo a despolarización de la membrana y a generación de descargas ectópicas (61).

El tratamiento del paciente con dolor neuropático inducido por quimioterapéuticos es relativamente refractario al tratamiento de primera línea usado en otras condiciones (7, 9, 41). Actualmente, el tratamiento de esta condición se sustenta en dos pilares: prevención (ajuste de dosis y neuroprotección) y tratamiento sintomático (43, 45, 62). Cabe destacar que el desarrollo de estrategias neuroprotectoras debe basarse en el entendimiento de la fisiopatología de la neurotoxicidad inducida por quimioterapéuticos, por lo que diferentes mecanismos de neurotoxicidad inevitablemente necesitarán estrategias específicas de protección (46, 62).

Entre las drogas estudiadas en humanos y animales como agentes preventivos se encuentran amifostina, glutatión, glutamina, calcio/magnesio, vitamina E, acetil-L-carnitina, N-acetilcisteína, rhuLIF (factor inhibidor de leucemia humana recombinante), NGF (factor de crecimiento nervioso), eritropoyetina, anticonvulsivantes (carbamazepina y oxcarbazepina), venlafaxina y ácido valpróico(43, 45, 46, 49, 62), en tanto que para el tratamiento sintomático se han estudiado antidepresivos tricíclicos (nortriptilina y amitriptilina), ligandos α 2- δ de canal de calcio (gabapentina y pregabalina), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y noradrenalina (duloxetina y venlafaxina), anticonvulsivantes (lamotrigina), ácido α -lipoico, acetil-L-carnitina y aplicación tópica de lidocaína y baclofeno/amitriptilina/ketamina(41, 45, 49, 62, 63). Sin embargo, a pesar de las numerosas drogas estudiadas para la prevención y tratamiento de la neuropatía por quimioterapéuticos, ninguno ha sido probadamente efectivo, por lo que aún no existen pautas claras para recomendar ningún agente debido a la insuficiente evidencia, siendo necesaria la realización de futuros estudios clínicos controlados para confirmar sus efectos, sin interferir en la actividad antitumoral, antes de su implementación en la práctica clínica (43, 45, 46, 62, 63).

3.3.- Rosuvastatina como antinociceptivo, antiinflamatorio y antioxidante.

Durante los últimos 15 años, los estudios sobre la familia de las estatinas, inhibidores competitivos de la enzima hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA), usados ampliamente para el tratamiento de la hipercolesterolemia, y como prevención primaria y secundaria de los eventos cardiovasculares (64), han

demostrado que poseen una importante actividad antioxidante (65, 66), antinociceptiva (67, 68) y antiinflamatoria (69-71) en ensayos de inflamación crónica y aguda, tanto experimentales como clínicos (72-74). Además, está claramente demostrado el efecto pleiotrópico de las estatinas, tanto dependiente como independiente de la inhibición de la síntesis de mevalonato (75), en la modulación de varios mediadores inflamatorios, tales como, interleuquinas (IL-1 β , 2, 4, 5, 6, 10, 12), interferón- γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), ciclooxigenasa-2 (COX-2), prostaciclina, óxido nítrico sintetasa constitutiva (cNOS), tromboxanos A₂ y B₂, entre otros efectos (76, 77).

Teniendo en consideración las propiedades anti-inflamatorias e inmunomoduladoras de las estatinas, es que recientemente se han publicado algunos trabajos en donde se generaron modelos experimentales de dolor neuropático en ratas y ratones mediante trauma neural (78, 79), mostrándose el potencial neuroprotector de estos fármacos para prevenir, e incluso, revertir el estado de hipernocicepción inducido. Dentro de los hallazgos se cuentan atenuación significativa de la disrupción estructural, de la lipoperoxidación, de la migración y acumulación de macrófagos, de la expresión de IL-1 β , de la apoptosis neural, y de la activación de microglía y astrocitos, con aumento en la expresión de genes relacionados con la regeneración (78, 79).

Por las razones previamente descritas, se estudió la variación de los biomarcadores IL-1 β , GSH/GSSG, TBARS en los modelos de dolor neuropático y cómo esas variaciones fueron afectadas por la medicación con rosuvastatina. Se eligió rosuvastatina por ser una estatina de expandido uso clínico, demostrada actividad

antinociceptiva y antiinflamatoria, y baja incidencia de efectos adversos respecto de las otras estatinas. Los modelos de neuropatía periférica en ratones estudiados fueron el inducido por paclitaxel y el inducido por ligadura del nervio ciático, el comportamiento nociceptivo fue medido por los test de cold plate, hot plate y test de von Frey electrónico. Por otra parte se midió en muestras de médula espinal las variaciones de los valores interleucina IL-1 β , elegido como marcador selectivo de inflamación y dolor (80), la relación GSH/GSSG como indicador de capacidad antioxidante intracelular, TBARS como indicador de lipoperoxidación total (68, 81).

4.- Hipótesis.

La inducción de dolor neuropático en ratones produce elevación de IL-1 β y TBARS y una disminución de la razón GSH/GSSG, las cuales son atenuadas por la medicación con rosuvastatina.

5.- Objetivo general.

Determinar en la médula de ratones neuropáticos los niveles de los biomarcadores IL-1 β , GSH/GSSG y TBARS antes y después de la administración de rosuvastatina.

6.- Objetivos específicos.

- 1) Determinar en ratones con neuropatía inducida por paclitaxel las variaciones de los niveles medulares de IL-1 β , GSH/GSSH, TBARS, con y sin medicación de rosuvastatina.
- 2) Determinar en ratones con neuropatía inducida por ligadura del nervio ciático las variaciones de los niveles medulares de IL-1 β , GSH/GSSH, TBARS, con y sin medicación de rosuvastatina.
- 3) Evaluar la alodinia e hiperalgesia en el dolor neuropático inducido por administración de paclitaxel en el ratón con y sin medicación de rosuvastatina.
- 4) Evaluar la alodinia e hiperalgesia en el dolor neuropático inducido por ligadura del nervio ciático en el ratón con y sin medicación de rosuvastatina.

7.- Materiales y métodos.

7.1.- Animales.

Los experimentos fueron realizados en ratones machos CF-1, provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, de peso entre 20 a 25 gramos, mantenidos en un ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, con libre acceso al agua y la alimentación. Los experimentos fueron realizados de acuerdo al protocolo sometido a la Comisión de Ética de la misma Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los animales fueron aclimatados al ambiente del laboratorio, al menos 2 horas antes de ser sometidos a cualquier protocolo de investigación. Los animales se usaron solamente una vez en cada protocolo y eutanasiados por sobredosis de anestesia, inmediatamente después del test experimental.

7.2.-Neuropatía inducida por Paclitaxel.

Se indujo neuropatía periférica mediante la administración del quimioterapéutico paclitaxel por inyección intraperitoneal (i.p.), una vez al día, durante 5 días consecutivos (0 - 4^o día) (82). Los ratones del grupo control fueron inyectados con 10 ml/kg de solución fisiológica i.p., durante 5 días consecutivos (0 - 4^o día). La evaluación de nocicepción se realizó los días 7^o y 14^o desde la 1^a administración de paclitaxel.

7.3.- Neuropatía inducida por ligadura parcial del nervio ciático.

Los ratones fueron anestesiados con hidrato de cloral al 7%, el muslo izquierdo fue afeitado y el nervio ciático expuesto. Luego el nervio ciático fue ligado sin presión con sutura 7-0 de seda y la herida cerrada. En el ratón control el nervio fue expuesto, pero no ligado (83).

7.4.- Premedicación con rosuvastatina.

Rosuvastatina fue diluida en una solución salina y administrada por vía intraperitoneal en dosis de 50mg/kg 30 min. antes de cada prueba nociceptiva de acuerdo a Noriega et al (81).

7.5.- Pruebas conductuales.

Para estandarizar el curso temporal de los procedimientos nociceptivos, las latencias basales en cada animal fueron obtenidas previas a la inducción de dolor neuropático. La evaluación analgésica pos tratamiento fueron medida a los 7 y 14 días después de la inducción del dolor neuropático.

Test de hot plate y cold plate.

La evaluación de la hiperalgesia térmica se efectuó por el método de la plancha caliente o hot plate y la alodinia térmica en la plancha fría o cold plate (84, 85). En este método se usa un artefacto especialmente diseñado (Ugo Basile, Varese, Italia) para medir la latencia de las respuestas. El test consiste en colocar al animal sobre una plancha metálica circular de aproximadamente 25cm de diámetro, que se

encuentra rodeada por un cilindro acrílico y transparente que evita que el ratón salga de la superficie de la plancha. La superficie de la plancha es mantenida a una temperatura específica y entonces se pone el ratón sobre ella, midiéndose en segundos el tiempo que demora en gatillar alguna acción atribuible al estímulo térmico recibido en sus patas (tiempo de respuesta). Al momento de colocar al ratón sobre la plancha se activa un cronómetro digital controlado por medio de un pedal, que permite determinar el tiempo que demora en responder al estímulo, siendo ésta la medida que se usa para evaluar el efecto analgésico. El artefacto mantiene la temperatura en un valor constante para todo el curso de la experimentación y se establece un tiempo máximo de espera de respuesta (tiempo de corte o cut-off) para evitar daño de la piel en caso de que el animal no reaccione al estímulo. Para comenzar la experimentación, se determinaron los valores de las latencias controles, realizándose al menos tres mediciones por cada ratón y se calculó el promedio (86).

Para efectuar el test de hot plate se configuró el artefacto a una temperatura de $50\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ y se estableció un tiempo de corte de 30 seg. Para efectuar el test de plancha fría se configura a una temperatura de $10\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ y se estableció un tiempo de corte de 60 seg. Las acciones consideradas como respuesta al estímulo por parte de los ratones son el lamido de las superficies plantares de sus patas, movimientos rápidos de una pata, actitud exploratoria reiterativa en la periferia de la plancha, orinar o saltar de la plancha.

La hiperalgesia inducida fue evaluada a los 7 y 14 días de iniciados los métodos de inducción de neuropatía descritos anteriormente.

Prueba de von Frey electrónico.

La alodinia mecánica fue medida como el umbral de retiro de la pata izquierda en respuesta a un estímulo mecánico utilizando una versión electrónica del test estesiométrico de von Frey (Ugo Basile; Varese, Italia) (87, 88). Cada animal fue colocado sobre una rejilla metálica en una cámara plástica de observación (89), la cual permite el acceso a la superficie plantar de las patas del animal. Los animales fueron acostumbrados a este ambiente por 15 min. Un filamento rígido de extremo romo unido al estesiómetro fue cargado contra la superficie plantar del animal. El umbral de respuesta será definido como el promedio de la fuerza (g) requerida para provocar el retiro de la pata estimulada en tres ocasiones. Todos los grupos experimentales fueron evaluados antes de la inducción del dolor, para determinar el umbral basal táctil. La hiperalgesia inducida fue evaluada a los 7 y 14 días de iniciado los métodos de inducción de neuropatía con los protocolos descritos anteriormente.

7.6.-Pruebas moleculares.

Determinación de IL-1 β .

Para las determinaciones de IL-1 β , se usó el método descrito por Kagari y colaboradores (90). Brevemente, los animales fueron anestesiados por vía i.p. con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) / xilamina (10 mg/g) o con 50 mg/kg de pentobarbital y luego sacrificados. A continuación, se extrajo los tejidos de los ratones controles y tratados. Las muestras fueron homogenizadas en un Polytro en una solución PBS frío con 0,05% de Tween 20; 0,1 mM PMSF; 0,1 mM dioxicolato

de sodio; 10 mM EDTA y 20 UI de aprotinina. El volumen de PBS se ajustó a 75 mg de tejido por ml de PBS. Posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 1.870 g y el sobrenadante se centrifugó durante 5 min a 13.230 g. Los sobrenadantes se almacenaron a -70 ° C hasta su posterior análisis para determinar IL-1 β mediante kits de ELISA según el protocolo del kit. Se determinó la concentración de proteína total en cada sobrenadante mediante el método del ácido bicinconínico (BCA, Sigma). La curva de calibración se realizó con cantidades crecientes de albúmina sérica de bovino para cada grupo de muestras, éstas se midieron en una micro placa de 96 pocillos a 570 nm en un lector de ELISA. La concentración de las citoquinas se expresó en pg por mg de proteína.

Determinación de la relación GSH/GSSG(91).

El estado redox medular fue evaluado por un método fluorométrico para medir el glutatión oxidado (GSSG) y el glutatión reducido (GSH) de acuerdo al método descrito por Hissin (91). La relación GSH/GSSG fue entonces calculada.

Determinación de lipoperoxidación con TBARS(33).

Se usó la medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) para evaluar la lipoperoxidación. Para esta prueba se agregó ácido tricloroacético (10%) al homogenizado de médula para precipitar las proteína y acidificar la muestra (92). Esta mezcla fue centrifugada para separar las proteínas. La muestra libre de proteínas fue mezclada con ácido tiobarbitúrico y colocada en un baño de agua a

100°C por 15 min. El malondialdehído fue medido a una absorbancia de 535nm y los resultados reportados como nmol/mg de proteína.

7.9.- Análisis estadístico.

En primer lugar, se estableció el tamaño muestral mínimo estableciendo un endpoint continuo y considerando los grupos de experimentación independientes entre sí, estableciendo un valor α de 0,05 y un β de 0,2 (93). Para ello se utilizó el promedio de los valores de tiempo de respuesta de un grupo control ($21 \pm 1,5$) y un grupo con neuropatía inducida (18.13) obtenidos en estudios previos de hiperalgesia en la prueba de hot plate, de acuerdo a la fórmula planteada a continuación.

$$k = \frac{n_2}{n_1} = 1$$

$$n_1 = \frac{(\sigma_1^2 + \sigma_2^2/K)(z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta})^2}{\Delta^2}$$

$$n_1 = \frac{(1.5^2 + 1.5^2/1)(1.96 + 0.84)^2}{2.87^2}$$

$$n_1 = 4$$

$$n_2 = K * n_1 = 4$$

Donde:

$\Delta = |\mu_2 - \mu_1|$ = diferencia absoluta entre dos promedios.

σ_1, σ_2 = varianzas de los promedios

n_1 = tamaño de muestra para grupo #1

n_2 = tamaño de muestra para grupo #2

α = probabilidad de error tipo I (0.05)

β = probabilidad de error tipo II (0.2)

z = valor crítico de Z para α o β establecidos

k = razón entre tamaños muestrales para grupo #2 sobre grupo #1

Una vez realizadas las mediciones se procedió a realizar el análisis estadístico mediante el programa SPSS (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp). Se determinó que los grupos poseen una distribución normal mediante el test de Shapiro-Wilk (94), procediendo posteriormente a realizar la comparación entre los promedios de los diferentes grupos mediante el test de ANOVA de una vía utilizando la corrección para comparaciones múltiples de Tukey.

8.- Resultados.

Para la presentación de los resultados se utilizarán las siguientes abreviaturas:

PTX: Paclitaxel; **PSNL:** Ligadura parcial nervio ciático; **RSV:** Rosuvastatina

PTX 7: Grupo al que se le indujo neuropatía con PTX y se realizaron pruebas conductuales a los 7 días post inicio de la inducción.

PTX 14: Grupo al que se le indujo neuropatía con PTX y se realizaron pruebas conductuales a los 14 días post inicio de la inducción.

PTX+RSV 7: Grupo al que se le indujo neuropatía con PTX y se le administró RSV previo a la realización de pruebas conductuales a los 7 días post inicio de la inducción.

PTX+RSV 14: Grupo al que se le indujo neuropatía con PTX y se le administró RSV previo a la realización de pruebas conductuales a los 14 días post inicio de la inducción.

PSNL 7: Grupo al que se le indujo neuropatía por PSNL y se realizaron pruebas conductuales a los 7 días post cirugía.

PSNL 14: Grupo al que se le indujo neuropatía por PSNL y se realizaron pruebas conductuales a los 14 días post cirugía.

PSNL+RSV 7: Grupo al que se le indujo neuropatía por PSNL y se le administró RSV previo a la realización de pruebas conductuales a los 7 días post cirugía.

PSNL+RSV 14: Grupo al que se le indujo neuropatía por PSNL y se le administró RSV previo a la realización de pruebas conductuales a los 14 días post cirugía.

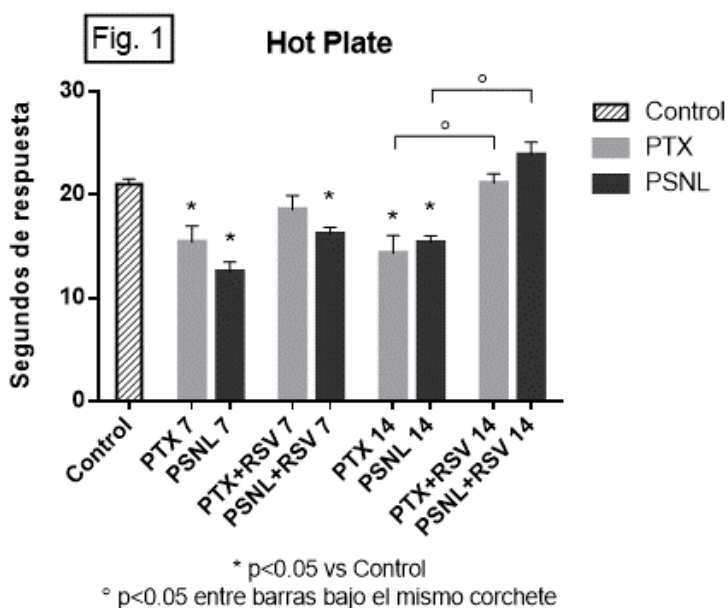
La administración de PTX (6 mg/kg, i.p.) durante 5 días y la PSNL resultaron eficaces en el desarrollo de neuropatía periférica, que se expresó por la aparición de una significativa hipernocicepción (hiperalgesia térmica y alodinia mecánica) a los 7 días y a los 14 días, como se observa en las figuras 1-3 y 7-9.

8.1.- Hot Plate Test.

Los resultados se encuentran graficados en la figura 1.

PTX: Los tiempos de respuesta en PTX 7 y PTX 14 fueron significativamente menores que el grupo control. PTX+RSV 7 no fue diferente de PTX 7 ni del control. PTX+RSV 14 fue significativamente mayor que PTX 14 y no presentó diferencias con el control.

PSNL: Los tiempos de respuesta de PSNL 7, PSNL 14 y PSNL+RSV 7 fueron significativamente menores que el control. PSNL+RSV 14 fue significativamente mayor que PSNL 14 y no presentó diferencias con el control. PSNL 7 y PSNL+RSV 7 no presentaron diferencias significativas

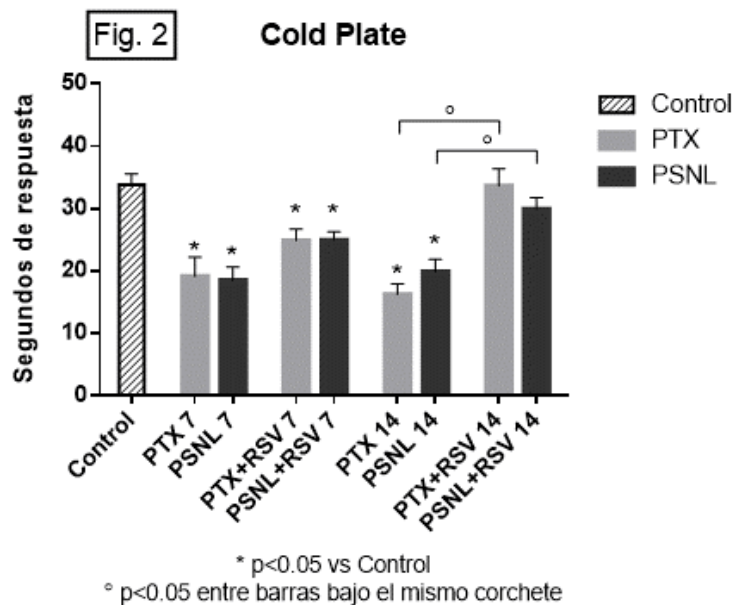


8.2.- Cold Plate Test

Los resultados se encuentran graficados en la figura 2.

PTX: Los tiempos de respuesta de PTX 7, PTX 14 Y PTX+RSV 7 fueron significativamente menores que el grupo control. PTX+RSV 14 fue significativamente mayor que PTX 14 y no presentó diferencias con el control. PTX 7 y PTX+RSV 7 no presentaron diferencias significativas entre sí.

PSNL: Los tiempos de respuesta de PSNL 7, PSNL 14 y PSNL+RSV 7 fueron significativamente menores que el control. PSNL+RSV 14 fue significativamente mayor que PSNL 14 y no presentó diferencias con el control. PSNL 7 y PSNL+RSV 7 no presentaron diferencias significativas entre sí.

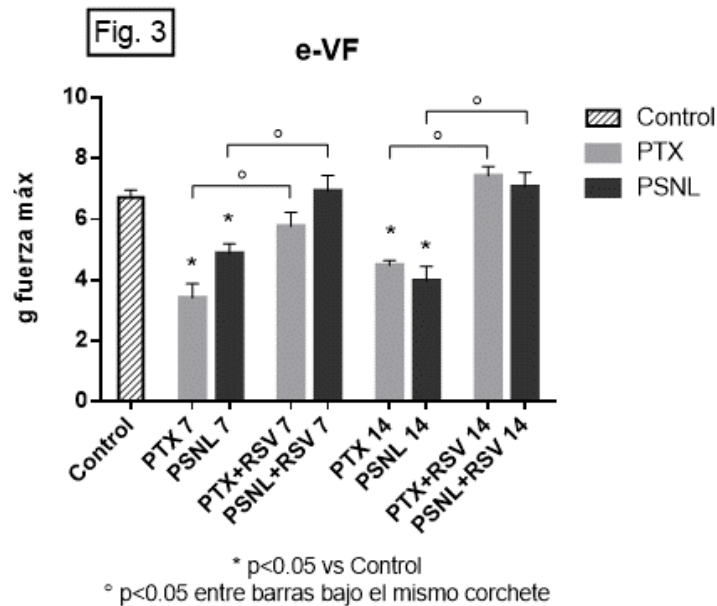


8.3.- e-VF Test

Los resultados se encuentran graficados en la figura 3.

PTX: El umbral de respuesta mecánica fue significativamente menor en PTX 7 y 14 que en el grupo control. PTX+RSV 7 fue significativamente mayor que PTX 7 y no presentó diferencias con el control. De igual modo PTX+RSV 14 fue mayor que PTX 14 y no se diferencia del control.

PSNL: El umbral de respuesta mecánica fue significativamente menor en PTX 7 y 14 que en el grupo control. PTX+RSV 7 fue significativamente mayor que PTX 7 y no presentó diferencias con el control. De igual modo PTX+RSV 14 fue mayor que PTX 14 y no se diferencia del control.

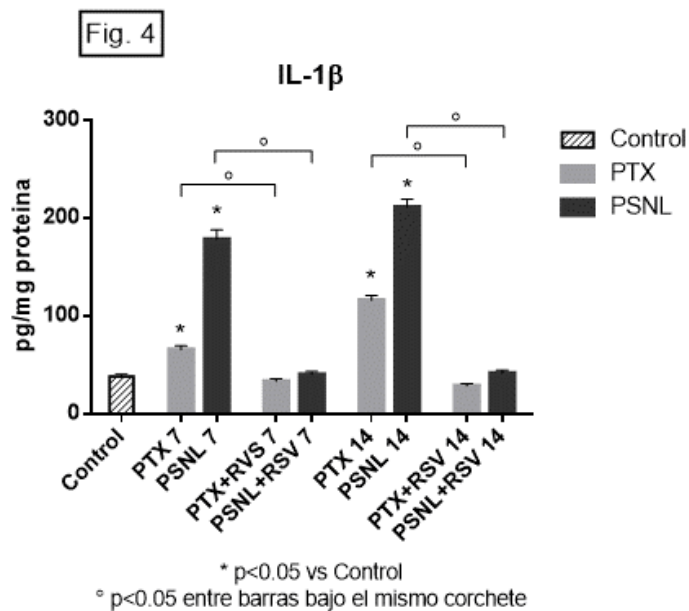


8.4.- Determinación de IL-1 β

Los resultados se encuentran graficados en la figura 4.

PTX: PTX 7 y PTX 14 fueron estadísticamente mayores que el control. PTX+RSV 7 fue estadísticamente menor que PTX 7, de igual modo PTX+RSV 14 fue menor que PTX 14. PTX+RSV a 7 y 14 días no fue diferente del control. PTX aumentó los niveles pro inflamatorios de la médula espinal y la administración de RSV previno dicho cambio a los 7 y 14 días post administración de PTX.

PSNL: PSNL 7 y PSNL 14 fueron estadísticamente mayores que el control sham. PSNL+RSV 7 fue estadísticamente menor que PSNL 7, de igual modo PSNL+RSV 14 fue menor que PSNL 14. PSNL+RSV a 7 y 14 días no fue diferente del control sham. PSNL aumentó los niveles de IL-1 β y la administración de RSV previno dicho cambio a los 7 y 14 días post cirugía.

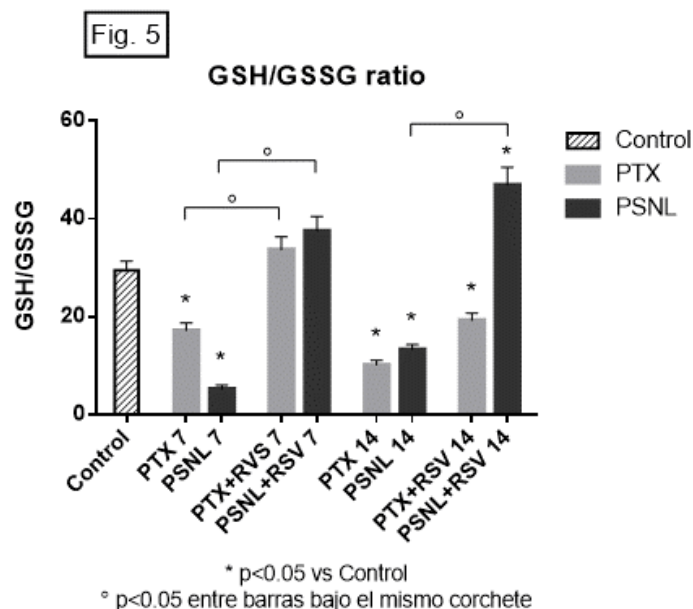


8.5.- Razón GSH/GSSG

Los resultados se encuentran graficados en la figura 5.

PTX: PTX 7 y PTX 14 y PTX+RSV 14 fueron estadísticamente menores que el control. PTX+RSV 7 fue estadísticamente mayor que PTX 7, pero no diferente al control. PTX+RSV 14 fue estadísticamente menor que el control, pero mayor que PTX 14. La PTX redujo el estado antioxidante general de la médula y la administración de RSV previno dicho cambio a los 7 días post administración de PTX. A los 14 días RSV logró una recuperación significativa del estado antioxidante, pero no suficiente para mantener niveles normales.

PSNL: PSNL 7 y PSNL 14 fueron estadísticamente menores que el control sham. PSNL+RSV 7 fue estadísticamente mayor que PSNL 7, pero no diferente al control. PSNL+RSV 14 fue estadísticamente mayor que el control sham y que PSNL 14. La PSNL redujo el estado antioxidante general de la médula y la administración de RSV previno dicho cambio, logrando incluso un mayor estado al basal a los 14 días post cirugía.

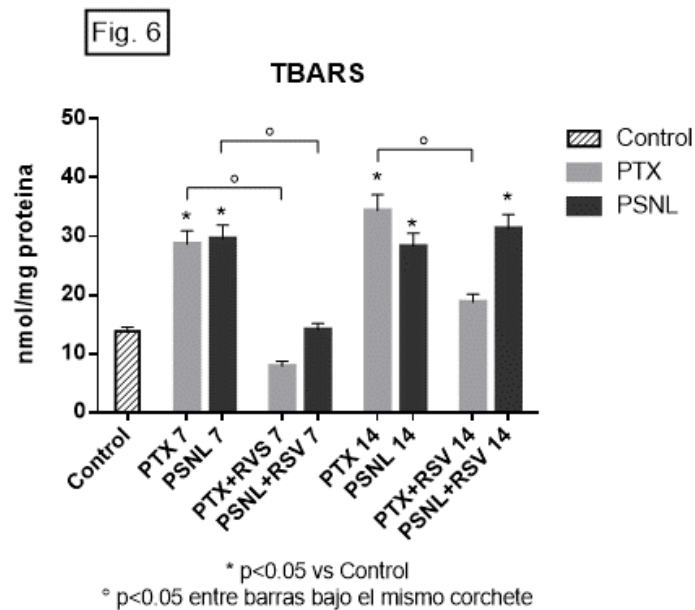


8.6.- TBARS

Los resultados se encuentran graficados en la figura 6.

PTX: PTX 7 y PTX 14 fueron estadísticamente mayores que el control. PTX+RSV 7 fue estadísticamente menor que PTX 7, pero no diferente al control. De igual modo PTX+RSV 14 fue menor que PTX 14 y no diferente al control. PTX aumento el nivel de lipoperoxidación general de la médula y la administración de RSV previno dicho cambio a los 7 y 14 días post administración de PTX.

PSNL: PSNL 7, PSNL 14 y PSNL+RSV 14 fueron estadísticamente mayores que el control sham. PSNL+RSV 7 fue estadísticamente menor que PSNL 7 y no diferente al control. PSNL 14 y PSNL+RSV 14 no presentaron diferencias significativas. PSNL aumento el nivel de lipoperoxidación general de la médula y la administración de RSV previno dicho cambio únicamente a los 7 días post cirugía. A los 14 días la administración de RSV no cambió la lipoperoxidación medular.



9.- Discusión

La neuropatía producida por la administración de PTX y por PSNL, es concordante con resultados anteriores, lo que indican la capacidad de ambos procedimientos de generar ratones neuropáticos (60, 95).

La administración de RSV, tanto a ratones neuropáticos por PTX como por PSNL, redujo significativamente la hiperalgesia térmica a los 14 días, lo que es homologable a un cuadro crónico de 2 meses, sin embargo, no fue efectivo a un periodo de 7 días post injuria, equivalente a un cuadro agudo de 1 mes. Respecto a la alodinia, la administración de RSV fue efectiva en revertirla, tanto a 7 como a 14 días. Lo anterior está en conformidad con resultados anteriores obtenidos con otros modelos de comportamiento (68, 81). Este efecto puede explicarse por el mecanismo de acción antiinflamatorio y analgésico adscrito a las estatinas. Otra alternativa para explicar estos resultados es el posible rol inhibitorio de las estatinas sobre el proceso de lipidación proteica, lo que conllevaría a la disminución de exposición de canales de membrana vinculados a la nocicepción. Dado que la RSV no fue efectiva en el periodo agudo de la hiperalgesia térmica, es posible pensar que los canales vinculados a la sensación térmica, tales como TRPV1 y TRPM8 (96), podrían verse afectados en menor medida a los 7 días. Respecto a la alodinia, una posible explicación al efecto de RSV estaría vinculada a la modulación de la interacción interneural a nivel del asta posterior de la medula que permite el relevo desde una vía mecanoceptora originada en fibras A β hacia la vía espinotalámica, nuevamente es posible plantear como explicación las acciones pleiotrópicas de las

estatinas vinculadas a la exposición de canales de membrana celular o bien al rol inhibidor de la expresión de agentes alógenos y proinflamatorios.

Como es de esperar, PSNL creó un ambiente proinflamatorio a nivel medular que se ve reflejado en un marcado aumento de los niveles de IL-1 β . El hecho que la administración de rosuvastatina prevenga la elevación de IL-1 β estaría en concordancia con los efectos pleiotrópicos planteados para las estatinas, las cuales serían capaces de disminuir la actividad de NF- κ B y en consecuencia disminuir la transcripción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β (77, 97). El daño por PTX también logró aumentar los niveles de IL-1 β , pero a niveles menores que PSNL y la administración de RSV logró de igual forma prevenir su elevación. Se sabe que hay mecanismos de acción de los taxanos directamente involucrados con la generación de estrés oxidativos (44), pero debido al efecto pleiotrópico de las estatinas no podemos señalar si la prevención del alza de IL-1 β provocada por RSV se debe al actuar antiinflamatorio, al rol antioxidante o bien a ambos.

La pérdida de capacidad antioxidante, reflejada en la disminución de la razón GSH/GSSG, y el daño secundario a estrés oxidativo, representado por el aumento del nivel de lipoperoxidación (TBARS), fueron significativos en las neuropatías inducidas PSNL y PTX a los 7 y 14 días, lo que es biológicamente plausible debido al vínculo estrecho entre la inflamación y el estrés oxidativo (22, 80). A los 7 días la administración de rosuvastatina logró revertir la disminución en la razón GSH/GSSG y el aumento en TBARS en ambos modelos de neuropatías. A los 14 días el nivel de GSH/GSSG logró llegar a niveles por sobre lo normal en la PSNL, sin embargo,

no fue capaz de revertir dicha alza en el modelo de PTX, posiblemente eso se deba al desequilibrio redox provocado por PTX. Por otra parte, respecto a la lipoperoxidación, RSV fue capaz de revertir las alzas alcanzadas en TBARS a los 7 días en ambos modelos, no así a los 14 días, donde no fue efectiva en el modelo por PSNL. Posiblemente se deba a que la respuesta inflamatoria en PSNL es mantenida en el tiempo debido a la permanencia de un cuerpo extraño, creando un estado constante de estrés oxidativo por medio de la activación de la microglía, de los macrófagos y la estimulación de la NADPH oxidasa (22, 28). RSV produjo una efectiva prevención de la elevación de TBARS, lo que estaría de acuerdo a actividad antinociceptiva de las estatinas reportada previamente (81), que vincula su acción a la activación de iNOS, y con ello sugiriendo un rol antioxidante analgésico.

En términos generales, RSV presentó un efecto antinociceptivo, lo que está de acuerdo a la literatura respecto al estudio de las estatinas como agentes analgésicos y antiinflamatorios (66-68, 78, 79, 81, 84). De igual modo la disminución de los niveles de IL-1 β posterior a la administración de RSV es concordante con literatura disponible la fecha de la investigación (79). A pesar de existir estudios que vinculan la antinocicepción de RSV con un rol antioxidante dependiente de iNOS (81), resulta novedoso el perfil medular del estado oxidativo y de daño por lipoperoxidación aquí presentado.

10.- Conclusiones

En conclusión, la administración de una dosis única de 50mg/kg en ratones con neuropatía posee una acción antinociceptiva, moduladora de inflamación y de estrés oxidativo, capaz de revertir los efectos inducidos por la administración de PTX y por PSNL. En particular, fue capaz de revertir la alodinia en lesiones agudas y crónicas, sin embargo, solamente pudo revertir la hiperalgesia térmica crónica. A nivel medular los resultados obtenidos muestran que ambos modelos de neuropatía se relacionaron a un alza de los niveles de IL-1 β , una disminución de la capacidad antioxidante (GSH/GSSG) y un aumento de la lipoperoxidación (TBARS). La administración de RSV revirtió completamente el alza de IL-1 β en ambos modelos de neuropatía. En PSNL recuperó los niveles normales de GSH/GSSG tanto a nivel agudo como crónico y en PTX fue capaz de revertir la lipoperoxidación neuronal, tanto a nivel agudo y crónico.

Este estudio demuestra las actividades como agente antinociceptivo y antiinflamatorio de RSV, sugiriendo un rol que involucra la reducción de la expresión de la citoquina pro inflamatoria IL-1 β y mediante un control del estado redox celular que mantiene balanceados los mecanismos antioxidantes y previene la lipoperoxidación.

11.- Bibliografía.

1. Treede R-D, Jensen TS, Campbell J, Cruccu G, Dostrovsky J, Griffin J, et al. Neuropathic pain Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*. 2008;70(18):1630-5.
2. Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain, 1994. IASP Press.13(15):198.
3. Hansson P. Neuropathic pain: clinical characteristics and diagnostic workup. *European Journal of Pain*. 2002;6(SA):47-50.
4. Max MB. Clarifying the definition of neuropathic pain. *Pain*. 2002;96(3):406-7.
5. Jensen TS, Sindrup SH, Bach FW. Test the classification of pain: reply to Mitchell Max. *Pain*. 2002;96(3):407-8.
6. Backonja M-M. Defining neuropathic pain. *Anesthesia & Analgesia*. 2003;97(3):785-90.
7. Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Archives of neurology*. 2003;60(11):1524-34.
8. Cruccu G, Anand P, Attal N, Garcia-Larrea L, Haanpää M, Jørum E, et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment. *European Journal of Neurology*. 2004;11(3):153-62.
9. Baron R, Binder A, Wasner G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *The Lancet Neurology*. 2010;9(8):807-19.
10. Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*. 2008;136(3):380-7.
11. O'Connor AB. Neuropathic pain. *Pharmacoeconomics*. 2009;27(2):95-112.
12. Torrance N, Smith BH, Watson MC, Bennett MI. Medication and treatment use in primary care patients with chronic pain of predominantly neuropathic origin. *Family practice*. 2007;24(5):481-5.

13. Smith B, Lee J, Price C, Baranowski A. Neuropathic pain: a pathway for care developed by the British Pain Society. *British journal of anaesthesia*. 2013;111(1):73-9.
14. Pasero C. Pathophysiology of neuropathic pain. *Pain Management Nursing*. 2004;5:3-8.
15. Devor M. Ectopic discharge in A β afferents as a source of neuropathic pain. *Experimental brain research*. 2009;196(1):115-28.
16. Dubový P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 2011;193(4):267-75.
17. Gilron I, Baron R, Jensen T, editors. *Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment*. Mayo Clinic Proceedings; 2015: Elsevier.
18. Perry V, Brown M, Gordon S. The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. *The Journal of experimental medicine*. 1987;165(4):1218-23.
19. Inoue K, Tsuda M. Microglia and neuropathic pain. *Glia*. 2009;57(14):1469-79.
20. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *Journal of anatomy*. 1999;194(1):1-14.
21. Cámara-Lemarroy C, Guzmán-de La Garza F, Fernández-Garza N. Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(5):314-24.
22. Clark AK, Old EA, Malcangio M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *J Pain Res*. 2013;6:803-14.
23. Matzner O, Devor M. Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels. *Journal of neurophysiology*. 1994;72(1):349-59.
24. Van Zundert J, Harney D, Joosten EA, Durieux ME, Patijn J, Prins MH, et al. The role of the dorsal root ganglion in cervical radicular pain: diagnosis, pathophysiology, and rationale for treatment. *Regional anesthesia and pain medicine*. 2006;31(2):152-67.

25. Beydoun A, Backonja M-M. Mechanistic stratification of antineuralgic agents. *Journal of pain and symptom management*. 2003;25(5):S18-S30.
26. Takeda M, Tsuboi Y, Kitagawa J, Nakagawa K, Iwata K, Matsumoto S. Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. *Mol Pain*. 2011;7(5):8069-7.
27. Woolf CJ. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life sciences*. 2004;74(21):2605-10.
28. Tsuda M. Microglia in the spinal cord and neuropathic pain. *Journal of Diabetes Investigation*. 2016;7(1):17-26.
29. Lee S, Zhao YQ, Ribeiro-da-Silva A, Zhang J. Distinctive response of CNS glial cells in oro-facial pain associated with injury, infection and inflammation. *Mol Pain*. 2010;6(1):79.
30. Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in 'small'glia. *Trends in neurosciences*. 2005;28(2):101-7.
31. Kim HK, Park SK, Zhou J-L, Tagliabatella G, Chung K, Coggeshall RE, et al. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain*. 2004;111(1-2):116-24.
32. Viggiano A, Monda M, Viggiano A, Viggiano D, Viggiano E, Chiefari M, et al. Trigeminal pain transmission requires reactive oxygen species production. *Brain research*. 2005;1050(1-2):72-8.
33. Guedes RP, Dal Bosco L, Teixeira CM, Araújo AS, Llesuy S, Belló-Klein A, et al. Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord. *Neurochemical research*. 2006;31(5):603-9.
34. Hassler SN. Reactive Oxygen Species and Lipid Peroxidation Products Contribute to Neuropathic Pain in Chronic Spinal Cord Injured Rats 2016.
35. Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *European journal of pharmacology*. 2001;429(1-3):23-37.
36. Wang Z-Q, Porreca F, Cuzzocrea S, Galen K, Lightfoot R, Masini E, et al. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004;309(3):869-78.

37. Leal AD, Qin R, Atherton PJ, Haluska P, Behrens RJ, Tiber CH, et al. North Central Cancer Treatment Group/Alliance trial N08CA—the use of glutathione for prevention of paclitaxel/carboplatin-induced peripheral neuropathy: A phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Cancer*. 2014;n/a-n/a.
38. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*. 2014;24(10):R453-R62.
39. Hassler SN, Johnson KM, Hulsebosch CE. Reactive oxygen species and lipid peroxidation inhibitors reduce mechanical sensitivity in a chronic neuropathic pain model of spinal cord injury in rats. *Journal of neurochemistry*. 2014;131(4):413-7.
40. Byers M, Bonica J. Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity. *Bonica's Management of Pain 3rd ed* Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins. 2001:26-72.
41. Dworkin RH, O'Connor AB, Audette J, Baron R, Gourlay GK, Haanpää ML, et al., editors. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clinic Proceedings*; 2010: Elsevier.
42. Sioka C, Kyritsis AP. Central and peripheral nervous system toxicity of common chemotherapeutic agents. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2009;63(5):761-7.
43. Windebank AJ, Grisold W. Chemotherapy-induced neuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2008;13(1):27-46.
44. Areti A, Yerra VG, Naidu V, Kumar A. Oxidative stress and nerve damage: role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. *Redox biology*. 2014;2:289-95.
45. Velasco R, Bruna J. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: an unresolved issue. *Neurología (English Edition)*. 2010;25(2):116-31.
46. Park S, Krishnan A, Lin C, Goldstein D, Friedlander M, Kiernan M. Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies. *Current medicinal chemistry*. 2008;15(29):3081-94.

47. Cata J, Weng H, Lee B, Reuben J, Dougherty P. Clinical and experimental findings in humans and animals with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Minerva anesthesiologica*. 2006;72(3):151.
48. Balayssac D, Ferrier J, Descoeur J, Ling B, Pezet D, Eschalier A, et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathies: from clinical relevance to preclinical evidence. *Expert opinion on drug safety*. 2011;10(3):407-17.
49. Wolf S, Barton D, Kottschade L, Grothey A, Loprinzi C. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. *European journal of cancer*. 2008;44(11):1507-15.
50. Rowinsky E, Eisenhauer E, Chaudhry V, Arbuck S, Donehower R, editors. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Seminars in oncology*; 1993.
51. McDonald ES, Windebank AJ. Cisplatin-Induced Apoptosis of DRG Neurons Involves Bax Redistribution and Cytochrome*c* Release But Not fas Receptor Signaling. *Neurobiology of disease*. 2002;9(2):220-33.
52. Pacharinsak C, Beitz A. Animal models of cancer pain. *Comparative medicine*. 2008;58(3):220.
53. Markman M, Mekhail TM. Paclitaxel in cancer therapy. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2002;3(6):755-66.
54. Authier N, Gillet J-P, Fialip J, Eschalier A, Coudore F. Description of a short-term Taxol[®]-induced nociceptive neuropathy in rats. *Brain research*. 2000;887(2):239-49.
55. Gornstein E, Schwarz TL. The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions. *Neuropharmacology*. 2014;76:175-83.
56. Cliffer KD, Siuciak JA, Carson SR, Radley HE, Park JS, Lewis DR, et al. Physiological characterization of taxol-induced large-fiber sensory neuropathy in the rat. *Annals of neurology*. 1998;43(1):46-55.
57. Wood AJ, Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (taxol). *New England Journal of Medicine*. 1995;332(15):1004-14.

58. Persohn E, Canta A, Schoepfer S, Traebert M, Mueller L, Gilardini A, et al. Morphological and morphometric analysis of paclitaxel and docetaxel-induced peripheral neuropathy in rats. *European journal of cancer*. 2005;41(10):1460-6.
59. Peters CM, Jimenez-Andrade JM, Jonas BM, Sevcik MA, Koewler NJ, Ghilardi JR, et al. Intravenous paclitaxel administration in the rat induces a peripheral sensory neuropathy characterized by macrophage infiltration and injury to sensory neurons and their supporting cells. *Experimental neurology*. 2007;203(1):42-54.
60. Nishida K, Kuchiiwa S, Oiso S, Futagawa T, Masuda S, Takeda Y, et al. Up-regulation of matrix metalloproteinase-3 in the dorsal root ganglion of rats with paclitaxel-induced neuropathy. *Cancer science*. 2008;99(8):1618-25.
61. Flatters SJ, Bennett GJ. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. *Pain*. 2006;122(3):245-57.
62. Kaley TJ, DeAngelis LM. Therapy of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *British journal of haematology*. 2009;145(1):3-14.
63. Pachman D, Barton D, Watson J, Loprinzi C. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2011;90(3):377-87.
64. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(16):1685-95.
65. Wassmann S, Laufs U, Müller K, Konkol C, Ahlbory K, Bäumer AT, et al. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002;22(2):300-5.
66. Kumar V, Guruprasad B, Wahane V. Atorvastatin exhibits anti-inflammatory and anti-oxidant properties in adjuvant-induced monoarthritis. *Inflammopharmacology*. 2010;18(6):303-8.
67. Santodomingo-Garzón T, Cunha T, Verri W, Valério D, Parada C, Poole S, et al. Atorvastatin inhibits inflammatory hypernociception. *British journal of pharmacology*. 2006;149(1):14-22.

68. Ghaisas MM, Dandawate PR, Zawar SA, Ahire YS, Gandhi SP. Antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory activities of atorvastatin and rosuvastatin in various experimental models. *Inflammopharmacology*. 2010;18(4):169-77.
69. Barsante MM, Roffê E, Yokoro CM, Tafuri WL, Souza DG, Pinho V, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. *European journal of pharmacology*. 2005;516(3):282-9.
70. Ferro D, Parrotto S, Basili S, Alessandri C, Violi F. Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;36(2):427-31.
71. Dinarello CA. Anti-inflammatory agents: present and future. *Cell*. 2010;140(6):935-50.
72. Ridker PM, Danielson E, Fonseca F, Genest J, Gotto Jr AM, Kastelein J, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(21):2195.
73. McCarey DW, McInnes IB, Madhok R, Hampson R, Scherbakova O, Ford I, et al. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2004;363(9426):2015-21.
74. Tang T-T, Song Y, Ding Y-J, Liao Y-H, Yu X, Du R, et al. Atorvastatin upregulates regulatory T cells and reduces clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of lipid research*. 2011;52(5):1023-32.
75. Liao JK. Effects of statins on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition beyond low-density lipoprotein cholesterol. *The American journal of cardiology*. 2005;96(5):24-33.
76. Schönbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors statins as antiinflammatory agents? *Circulation*. 2004;109(21 suppl 1):II-18-II-26.
77. Satoh M, Takahashi Y, Tabuchi T, Minami Y, Tamada M, Takahashi K, et al. Cellular and molecular mechanisms of statins: an update on pleiotropic effects. *Clinical Science*. 2015;129(2):93-105.

78. Pan H-C, Yang D-Y, Ou Y-C, Ho S-P, Cheng F-C, Chen C-J. Neuroprotective effect of atorvastatin in an experimental model of nerve crush injury. *Neurosurgery*. 2010;67(2):376-89.
79. Shi XQ, Lim TK, Lee S, Zhao YQ, Zhang J. Statins alleviate experimental nerve injury-induced neuropathic pain. *Pain*. 2011;152(5):1033-43.
80. Austin PJ, Moalem-Taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *Journal of neuroimmunology*. 2010;229(1):26-50.
81. Noriega V, Sierralta F, Prieto JC, Zanetta P, Miranda HF. Nitridergic Modulation of the Antinociceptive Activity of Rosuvastatin in Mice. *Pharmacology & Pharmacy*. 2014;5:61.
82. Nieto FR, Entrena JM, Cendán CM, Pozo ED, Vela JM, Baeyens JM. Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice. *Pain*. 2008;137(3):520-31.
83. Malmberg AB, Basbaum AI. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain*. 1998;76(1):215-22.
84. Miranda HF, Noriega V, Olavarria L, Zepeda RJ, Sierralta F, Prieto JC. Antinociception and Anti-Inflammation Induced by Simvastatin in Algesiometric Assays in Mice. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2011;109(6):438-42.
85. Jasmin L, Kohan L, Franssen M, Janni G, Goff JR. The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. *Pain*. 1998;75(2):367-82.
86. Miranda H, Puig M, Romero M, Prieto J. Effects of tramadol and dexketoprofen on analgesia and gastrointestinal transit in mice. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2009;23(1):81-8.
87. Terada T, Hara K, Haranishi Y, Sata T. Antinociceptive effect of intrathecal administration of taurine in rat models of neuropathic pain. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie*. 2011;58(7):630-7.

88. Hara K, Haranishi Y, Kataoka K, Takahashi Y, Terada T, Nakamura M, et al. Chlorogenic acid administered intrathecally alleviates mechanical and cold hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *European journal of pharmacology*. 2013.
89. Pitcher GM, Ritchie J, Henry JL. Paw withdrawal threshold in the von Frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands. *Journal of neuroscience methods*. 1999;87(2):185-93.
90. Kagari T, Doi H, Shimozato T. The importance of IL-1 beta and TNF-alpha, and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *J Immunol*. 2002;169(3):1459-66.
91. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry*. 1976;74(1):214-26.
92. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*. 1978;52:302-10.
93. Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 7th edn Boston. MA: Brooks/Cole, Cengage Learning. 2011.
94. Shuaib M. *A Comparison of Power of Normality Tests: Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors, Anderson-Darling and Jarque-Bera Tests*: University of Dhaka; 2015.
95. Miranda HF, Noriega V, Zepeda R, Zanetta P, Prieto-Rayó J, Prieto JC, et al. Antinociceptive Synergism of Gabapentin and Nortriptyline in Mice with Partial Sciatic Nerve Ligation. *Pharmacology*. 2015;95(1-2):59-64.
96. Tominaga M, Caterina MJ. Thermosensation and pain. *Journal of neurobiology*. 2004;61(1):3-12.
97. Jain MK, Ridker PM. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nature reviews Drug discovery*. 2005;4(12):977-87.