

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



**ESTUDIO EXPERIMENTAL SOBRE SULFATO DE COBRE  
COMO AGENTE ANTINOCICEPTIVO EN DOS MODELOS  
DE DOLOR NEUROPÁTICO EN RATÓN:  
CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL Y MOLECULAR**

**VICTORIA MATILDE CAZANGA REYES**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FARMACOLOGÍA**

**Director de tesis: Prof. Dra. Teresa Pelissier Serrano**

**Co-Director de tesis: Prof. Dr. Luis Constandil Córdova**

**2015**

**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 la candidata**

**VICTORIA MATILDE CAZANGA REYES**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magister en Farmacología** en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 29 de abril de 2015.

**Prof. Dra Teresa Pelissier S.**  
Director de Tesis  
Programa de Farmacología, ICBM  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dr. FERNANDO GALLARDO R.    Prof. Dr. ALEJANDRO HERNÁNDEZ K.**

**Prof. Dr. CLAUDIO LAURIDO F.**

**Prof. Dr. CLAUDIO INFANTE F.**  
Presidente Comisión

## **DEDICATORIA**

A mi madre y abuelos que ya han partido de este mundo, quienes me traspasaron el gusto por el conocimiento.

## AGRADECIMIENTOS

- A mi familia; a mi padre, hermana, tías y abuelos por su apoyo incondicional en el camino de realización de esta tesis.
- A la Dra. Teresa Pelissier con mucho aprecio, por su apoyo constante, sabiduría y gran calidad humana que permitieron la realización de este trabajo.
- Al Dr. Luis Constandil, por su excelente disposición y entrega de conocimientos a lo largo de este estudio.
- A los demás Dres. del Laboratorio de Neurobiología de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago, por su gentileza y disponibilidad.
- A Don José López por su amable disposición y su importante rol en la realización de los experimentos.
- A Cristina Arenas por su amabilidad y colaboración en el proceso de realización de esta tesis.
- A Jeffri Retamal por su participación en la realización de los experimentos moleculares.
- A la Escuela de Postgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por los conocimientos entregados y la posibilidad de realizar este Magíster.
- A los profesores del programa del Magíster en Farmacología, en especial al profesor Diego Bustamante por el entusiasmo entregado a la hora de aprender sobre Farmacología.
- A mis profesores y colegas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, donde descubrí el gusto por la investigación, que me llevó a realizar este Postgrado, en especial al Dr. Rubén Pérez y Dra. Cristina Palma.
- A mis amigos y todos aquellos que han creído en mis capacidades y realización de este trabajo de tesis.

## ÍNDICE

	<b>Pág</b>
- PORTADA.....	1
- DEDICATORIA.....	3
- AGRADECIMIENTOS.....	4
- RESUMEN.....	6
- ABSTRACT.....	7
- INTRODUCCIÓN.....	8
- HIPÓTESIS.....	23
- OBJETIVOS GENERALES.....	23
- OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	23
- MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
- RESULTADOS.....	30
- DISCUSIÓN.....	53
- CONCLUSIONES.....	57
- BIBLIOGRAFÍA.....	58
- FINANCIAMIENTO.....	67

## RESUMEN

El dolor crónico afecta a gran parte de la población, constituyendo un serio problema de salud. Por su parte, el cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), uno de los metales trazas presentes en nuestro organismo, interactúa en el sistema nervioso con distintos receptores de membrana, lo que le confiere un rol modulador en la excitabilidad neuronal. Se ha evidenciado su participación en los procesos nociceptivos, cumpliendo un rol antinociceptivo en modelos animales de dolor agudo; ya sea asociado a otros fármacos como antiinflamatorios no esteroideos, o en forma individual. Sin embargo, se tiene escasa evidencia de la participación del cobre en el dolor crónico, lo que sería de gran utilidad para considerarlo como una nueva opción de agente terapéutico útil para el tratamiento del dolor crónico. En esta tesis se investigó el rol antinociceptivo del sulfato de  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuSO}_4$ ) en el dolor crónico, utilizando dos modelos de dolor crónico neuropático en ratón: el primero, mediante sección del nervio sural y el segundo mediante ligadura parcial del nervio infraorbitario. Además, se evaluó la interacción de  $\text{Cu}^{2+}$  con un antagonista de los receptores NMDA, ketamina, para comprender mejor el mecanismo de acción del  $\text{Cu}^{2+}$  en el proceso nociceptivo, sabiendo que ketamina disminuye la hiperalgesia y alodinia presentes en el dolor crónico. Para evaluar el efecto antinociceptivo de  $\text{CuSO}_4$  y ketamina se utilizó el test de formalina intraplantar y orofacial en el ratón, evaluando como conducta nociceptiva el lamido/mordisqueo (intraplantar) y el frotamiento/“*gratage*” (orofacial) de la zona inyectada con formalina durante 45 minutos. Se midieron también los cambios a nivel molecular de un marcador proteico que comúnmente se encuentra aumentado en el dolor crónico: GFAP (proteína fibrilar ácida de la glía) frente a la administración de  $\text{Cu}^{2+}$ , en animales sanos y neuropáticos. Los resultados mostraron una disminución dosis dependiente de la conducta nociceptiva inducida por formalina frente a la administración de  $\text{CuSO}_4$ , ketamina, y la asociación de ambos, tanto en animales sanos como neuropáticos. Por otro lado, no se encontraron diferencias en la expresión de GFAP entre animales sanos y neuropáticos en ninguno de los dos modelos de neuropatía, sin embargo, se observó que la concentración espinal de GFAP en animales neuropáticos disminuye posteriormente con la administración crónica de  $\text{CuSO}_4$  por 7 días. Estos resultados son indicativos del potencial rol de  $\text{CuSO}_4$  como agente adyuvante analgésico para el tratamiento del dolor crónico.

## ABSTRACT

Chronic pain is considered an urgent public health problem that involves a high percentage of the global population. Copper ( $\text{Cu}^{2+}$ ) is one of the trace metals present in our body, which participates as an enzymatic cofactor in many essential biological processes, and in the nervous system it interacts with many membrane receptors, giving copper a modulatory role in neuronal excitability. Some studies have demonstrated copper participation in nociceptive process, showing its antinociceptive role in acute pain animal models; in association to other drugs such as non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), or individually. However, there is no evidence of copper participation in chronic pain, which would be important to consider it as a new therapeutic agent for treatment of chronic pain, associated to other drugs or individually. This study investigated the antinociceptive role of  $\text{Cu}^{2+}$  sulphate in chronic pain, using two models of chronic neuropathic pain in mice: the first one, through sural nerve transection and the second one through partial infraorbital nerve ligation. Besides,  $\text{Cu}^{2+}$  interaction with an NMDA receptor antagonist, ketamine, was evaluated to better understand the mechanism of action of  $\text{Cu}^{2+}$  in the process of nociception, considering that this NMDA antagonist decrease hyperalgesia and allodynia present in chronic pain. In order to evaluate antinociceptive effect of  $\text{Cu}^{2+}$  sulphate and ketamine, intraplantar and orofacial formalin test were performed in mice, evaluating nociceptive behavior such as licking/biting of the injected limb and rubbing/scratching of the injected orofacial area with formalin during a 45 minutes period. We also measured the molecular changes of the astrocytic marker; GFAP, that is usually over expressed in chronic pain conditions, with  $\text{Cu}^{2+}$  administration in healthy and neuropathic mice. Results showed a dose dependent decrease of the nociceptive behaviour induced by formalin with  $\text{CuSO}_4$ , and ketamine administration, and both drugs association, in healthy and neuropathic animals. We observed no differences in GFAP expression between healthy and neuropathic mice in the two models of neuropathy; however, we observed that GFAP spinal concentrations were decreased after chronic administration of  $\text{CuSO}_4$  in neuropathic animals. These results indicate the potential role of  $\text{CuSO}_4$  as an analgesic adjuvant agent for chronic pain treatment.

## INTRODUCCIÓN

El dolor ha sido definido por la IASP (*International Association for the Study of Pain*) como “una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular existente o potencial, o descrita en términos de ese daño” (Bilbeny y Paeile, 2005). Respecto al dolor en animales, este ha sido definido por la *American Veterinary Medicine Association* (AVMA) como “una experiencia sensorial y emocional aversiva, que evoca reacciones protectoras frente al daño o amenaza a la integridad de sus tejidos, dirigiendo el animal su comportamiento para evitar el daño hacia conductas de evitación aprendida y que pueden modificar rasgos de conducta especie-específicos, incluyendo comportamiento social” (Le Bars *et al.*, 2001).

El dolor agudo cumple una importante función protectora, ya que la habilidad para detectar un estímulo dañino es esencial para la sobrevivencia e integridad de los organismos (Basbaum *et al.*, 2009), sin embargo, en ciertas ocasiones el dolor puede transformarse en una enfermedad en sí mismo, como ocurre en el caso del dolor crónico (Guyton, 2002). En estos casos, la percepción de dolor puede volverse incapacitante y es necesario su tratamiento o alivio mediante fármacos analgésicos (Rang y Dale, 2012). El dolor crónico carece de valor adaptativo o funcional ya que no tiene un propósito fisiológico y por lo tanto es considerado una patología (Hernández, 2005).

El dolor crónico presenta una gran incidencia a nivel de la población mundial trayendo consecuencias negativas para los pacientes, tanto a nivel de costos económicos, como del deterioro de la calidad de vida (Breivik *et al.*, 2006, Cimmino *et al.*, 2011). A esto se le suma además las deficiencias de los tratamientos disponibles actualmente para el alivio del dolor crónico, reportando que el 40 % de los pacientes presentan un manejo inadecuado de su dolor (Breivik *et al.*, 2006).

Entre la terapia analgésica actual, se encuentran los opioides y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Rang y Dale, 2012), los que no siempre logran la efectividad deseada para el tratamiento del dolor crónico, además de presentar diversos efectos secundarios. Por lo anterior existe un interés creciente en desarrollar e identificar nuevas moléculas y descubrir nuevos mecanismos de antinocicepción para generar nuevos tratamientos para aliviar el dolor



crónico (Finnerup *et al.*, 2010). Respecto a esto, existen antecedentes que indican que ciertos minerales traza como el cobre, magnesio y zinc, presentes en nuestro organismo tienen participación en los procesos anti-nociceptivos (Gumilar *et al.*, 2012).

En la actualidad existen evidencias que muestran que el cobre tiene propiedades antinociceptivas en modelos animales de dolor agudo (Tamba *et al.*, 2013), sin embargo, se desconoce si estas propiedades antinociceptivas se mantienen frente a dolores crónicos. Por lo tanto, este estudio pretende dilucidar el posible rol antinociceptivo del cobre en un modelo de dolor crónico neuropático, lo que puede ser de gran utilidad para proponer su utilización como nuevo agente terapéutico en el tratamiento de este tipo de dolor, ya sea directamente como analgésico o como coadyuvante analgésico, es decir para potenciar el efecto de otros fármacos analgésicos.

### **Neurofisiología del dolor**

Para que un estímulo doloroso sea percibido como tal, es necesaria la existencia de una estructura que actúe como receptor (nociceptor), una sinapsis a nivel de médula espinal (en el caso de dolores corporales) o a nivel trigeminal (para dolores cráneo-faciales) y vías de conducción desde la médula espinal o tronco del encéfalo hacia otros centros de procesamiento como el bulbo, diencéfalo y corteza cerebral. Además, son necesarias vías de regulación de tipo descendentes desde los centros superiores (corteza, tálamo y núcleos reticulares) hacia la médula espinal o tronco del encéfalo, que actúan de manera inhibitoria (Paeile, 2005).

Es así como el sistema nociceptivo puede considerarse de forma general como una cadena de tres neuronas, donde la neurona de primer orden se origina en la periferia y se proyecta al asta dorsal de la médula espinal o a los núcleos sensitivos del trigémino, otra neurona de segundo orden asciende desde la médula espinal o desde el núcleo del trigémino hasta el tálamo y una neurona de tercer orden se proyecta desde el tálamo a la corteza cerebral, donde la información es organizada somato tópicamente (Riedel y Neeck, 2001). En un nivel más complejo del sistema también pueden verse involucradas una red de vías comunicantes con otras neuronas sensitivas y con vías neuronales inhibitorias descendentes que provienen

desde centros superiores, que modulan la transmisión del estímulo doloroso (Lamont *et al.*, 2000). De esta manera, el dolor fisiológico se inicia con la actividad de los nociceptores sensoriales que inervan tejidos periféricos, cuyas fibras participan en la generación de potenciales de acción. Estos potenciales de acción migran a lo largo de las aferencias primarias para llegar al sistema nervioso central en donde ocurrirá la integración del dolor (Riedel y Neeck, 2001).

Los estímulos nociceptivos (ya sean mecánicos, térmicos y químicos) son transducidos a señales biológicas (potenciales de acción), mediante receptores de membrana (nociceptores) que se encuentran en terminales nerviosos, repartidos por todo nuestro organismo, excepto en el sistema nervioso central. Los nociceptores conforman una gran variedad de receptores entre los cuales la principal familia que lo conforman son los canales iónicos del tipo receptor de potencial transitorio ó TRP, (del inglés *transient receptor potential*), y aquellos que responden a ATP como los purinoceptores P2X. Además, algunos nociceptores se encuentran acoplados a proteína G, como los pirimidinérgicos P2Y (Julius y Basbaum, 2001; Marchand *et al.*, 2005).

El potencial de acción generado por un estímulo nociceptivo viaja desde el terminal sináptico donde se origina en la periferia hasta la médula espinal a través de dos tipos de axones: las fibras A $\delta$  y C. El soma de dichas fibras se localizan en el ganglio de la raíz dorsal (DRG, del inglés *dorsal root ganglia*) y en el ganglio trigeminal en el caso del territorio facial (Basbaum *et al.*, 2009). Las fibras A $\delta$ , mielinizadas y de diámetro mediano, son responsables de la transmisión del dolor primario o rápido, el cual se describe como una sensación punzante, bien localizada, que dura sólo lo que permanece el estímulo agudo (Basbaum *et al.*, 2009). Por otro lado, las fibras C, no mielinizadas y de diámetro pequeño, son encargadas de mediar el dolor secundario o lento, una sensación dolorosa más difusa y persistente que se extiende más allá del término de un estímulo agudo (Lamont *et al.*, 2000; Basbaum *et al.*, 2009; Marchand, 2010).

Los principales neurotransmisores involucrados en el traspaso de información nociceptiva a nivel espinal, entre la primera neurona aferente y la neurona de proyección son el glutamato, la sustancia P y el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) (Riedel y

Neeck, 2001). El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio liberado por las fibras A $\delta$  y C (Guyton, 2002). Estos neurotransmisores están co-localizados en las fibras aferentes A $\delta$  y/o C, y en general actúan sinérgicamente ejerciendo efectos pronociceptivos en las neuronas postsinápticas del asta dorsal, una vez liberados por los estímulos nociceptivos periféricos. Por otro lado, en las vías nociceptivas también existen neurotransmisores inhibitorios como lo son: el GABA, glicina, noradrenalina, serotonina, encefalinas,  $\beta$ -endorfina y neuropéptido Y (Hernández, 2005).

En el asta dorsal y/o en el núcleo del trigémino, la neurona aferente primaria hace sinapsis con la neurona secundaria o de proyección, cuyos axones cruzan la médula espinal y ascienden por las vías espinotalámica (lateral) y espinoreticular (medial) hacia centros superiores, y en el caso del trigémino, la neurona de proyección ascenderá hasta el tálamo por las vías trigéminotalámicas (Sessle, 2000). Las neuronas secundarias también pueden realizar sinapsis con neuronas en diferentes núcleos del tallo encefálico incluyendo el núcleo gris periacueductal y el núcleo magno del rafe, áreas involucradas en la modulación endógena descendente del dolor (Marchand, 2010).

El dolor sólo puede ser experimentado como tal cuando el estímulo aferente nociceptivo alcanza la corteza cerebral. Durante la percepción del dolor se activa una compleja red de estructuras corticales. Mediante estudios de imágenes se han reportado cuatro estructuras corticales importantes involucradas en la percepción del dolor: la corteza somatosensorial primaria, la corteza somatosensorial secundaria, la corteza cingulada anterior y la corteza insular (Marchand, 2010). Las dos primeras están involucradas principalmente en el aspecto sensoriodiscriminador del dolor, mientras que las otras dos se encuentran asociadas con el componente afectivo del dolor. La percepción del dolor no es la misma si este se produce a nivel corporal o a nivel cráneo-facial, ya que a pesar que los fenómenos de transducción y procesamiento de la información son similares en ambos, los mecanismos de nocicepción del sistema trigeminal poseen características especiales. Esto radica en parte en que el sistema trigeminal posee una organización particular en donde los aferentes sensoriales que inervan la región cráneo-facial proyectan a través del ganglio trigeminal y convergen en el complejo trigeminal del tronco encéfalo, el cual está formado por el núcleo mesencefálico sensitivo principal y el núcleo espinal del trigémino; este último comprende el subnúcleo

*oralis*, *interpolaris* y *caudalis*. El subnúcleo *caudalis* se asemeja estructural y funcionalmente al asta dorsal de la médula espinal y el subnúcleo *oralis* también ha evidenciado su participación en los procesos nociceptivos (Craig y Dostrovsky, 1999; Sessle, 2000; Dallel *et al.*, 2003). Luego las neuronas de segundo orden proyectan desde el complejo trigeminal a niveles superiores como el tálamo mediante la vía trigéminotalámica para que posteriormente la información nociceptiva alcance la corteza cerebral (Sessle, 2000).

El sistema nociceptivo trigeminal inerva una variedad de tejidos blanco específicos como las meninges, córnea, pulpa dentaria, mucosa oral, mucosa nasal y articulación temporomandibular, lo que le otorga características fisiológicas particulares en comparación con el sistema nociceptivo espinal (Tal y Devor, 2008; Hargreaves, 2011), sin embargo, existen pocos estudios respecto a los mecanismos del sistema nociceptivo orofacial (Luccarini *et al.*, 2006) en comparación con el sistema espinal. Algunos de ellos han reportado diferencias respecto a la distribución de receptores, entre ellos el receptor de NMDA. Se sabe que existe una alta densidad de receptores NMDA en el asta dorsal de la médula espinal, sin embargo, en el sistema trigeminal la distribución de estos receptores ha sido escasamente estudiada. Algunos estudios han mostrado la existencia del receptor tipo NMDA R1 en el núcleo espinal del trigémino, con un leve predominio en el subnúcleo *caudalis* (Suazo *et al.*, 2008), otros han demostrado la existencia de actividad de receptores NMDA *in vitro* en neuronas del subnúcleo *caudalis* (Sessle, 2000) o en otros estudios se ha encontrado sólo el ARNm del receptor de NMDA a nivel del ganglio trigeminal pero no su proteína (Suazo *et al.*, 2008). Por otro lado, existe evidencia que las neuronas peptidérgicas trigeminales sufren cambios morfológicos en respuesta a injuria en tejidos, y las células trigeminales ganglionares poseen menor cantidad de fibras simpáticas, a diferencia de lo que ocurre con el sistema espinal, y además las regiones orofaciales inervadas por el nervio trigémino poseen una gran densidad de inervación (Luccarini *et al.*, 2006; Tal y Devor, 2008; Hargreaves, 2011). Otras diferencias entre el sistema nociceptivo trigeminal y espinal recaen en que el territorio orofacial de las meninges posee mayor cantidad de inervación bilateral, además las fibras que entran al núcleo sensitivo trigeminal se distribuyen ampliamente en todo el núcleo, y en el caso del sistema trigeminal la distancia entre el estímulo y la segunda neurona es muy corta (Bereiter *et al.*, 2000; Tal y Devor, 2008). Otras particularidades respecto al sistema

nociceptivo trigeminal son respecto al tipo de fibras que más predominan, ya que la razón entre fibras aferentes mielinizadas y no mielinizadas es mayor en los nervios trigeminales que espinales, siendo menor la cantidad de fibras de tipo C, lo que además da cuenta de una velocidad de conducción más rápida en el sistema de señalización nociceptiva trigeminal por un predominio de fibras de tipo A $\delta$  mielinizadas (Tal y Devor, 2008).

### **Fisiopatología dolor crónico neuropático**

El dolor crónico se puede clasificar dependiendo del mecanismo que lo origina; es así como el dolor causado por una lesión tisular persistente se conoce como dolor crónico inflamatorio, dentro de esta clasificación se encuentra la artritis. Cuando la sensación dolorosa es causada por un daño del sistema nervioso, a nivel de las fibras nerviosas o de los centros superiores, se denomina dolor crónico neuropático (Finnerup *et al.*, 2010), dentro de esta clasificación se pueden nombrar la compresión del nervio ciático, la neuralgia trigeminal, la neuropatía periférica o la neuralgia postherpética, entre otros (Campbell y Meyer, 2006). La coexistencia de ambos tipos de dolor, que se produce en ciertos casos, es conocida como dolor mixto (Baron *et al.*, 2006).

La opción terapéutica más relevante para aliviar el dolor crónico neuropático recae en el tratamiento farmacológico con opioides, pero lamentablemente los resultados son aún insatisfactorios, sin lograr un alivio suficiente para los pacientes, por lo que existe aún la necesidad de desarrollar mejores tratamientos para éstos y de considerar terapias novedosas para el tratamiento del dolor crónico neuropático (Finnerup *et al.*, 2010; Gosselin *et al.*, 2010).

En el dolor crónico neuropático, la sinapsis espinal o trigeminal nociceptiva, sufre cambios plásticos importantes, generando la llamada sensibilización central. Este fenómeno consiste en el aumento de la excitabilidad neuronal en el asta dorsal de la médula espinal o del núcleo del trigémino, así como aumento de la eficiencia sináptica (Latremoliere y Woolf, 2009), siendo a través de este proceso que se establece un estado de hiperexcitabilidad en el sistema nervioso central llevando a un incremento de la percepción nociceptiva (Basbaum *et al.*, 2009). En términos conductuales la sensibilización central se ha asociado con fenómenos como la hiperalgesia, en la cual estímulos nociceptivos de baja intensidad producen un dolor

de alta intensidad y fenómenos como la alodinia, en donde estímulos táctiles, que normalmente no son dolorosos ahora si producen dolor (Riedel y Neeck, 2001).

Entre los mecanismos que participan de la sensibilización central que se observa en el dolor crónico se encuentran mecanismos presinápticos; en donde se puede encontrar una liberación incrementada de glutamato a raíz de un *upregulation* de la subunidad  $\alpha$ -2 $\delta$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de voltaje en los terminales aferentes (Campbell y Meyer, 2006), también por cambio de fenotipo de fibras A $\beta$  lo que causa una liberación adicional de sustancia P (Campbell y Meyer, 2006). Dentro de los mecanismos postsinápticos se encuentran la activación del receptor NMDA como consecuencia de la liberación de sustancia P, glutamato, CGRP, o ATP, llevando a la entrada de calcio intracelular lo que a su vez activa distintas vías de señalización dependientes de calcio donde participan la proteína kinasa A y C (Campbell y Meyer, 2006; Basbaum *et al.*, 2009). Otro posible mecanismo involucra un aumento del tráfico de receptores AMPA hacia la superficie celular (Harris *et al.*, 1996). Por otra parte, existen mecanismos de pérdida de la inhibición del proceso nociceptivo mediante la disminución de la expresión de receptores inhibitorios en las neuronas aferentes primarias y postsinápticas (Campbell y Meyer, 2006). Respecto a este mecanismo, estudios de injuria nerviosa han mostrado una disminución del transportador potasio-cloro KCC2, lo que resulta en un cambio del gradiente de aniones transmembrana que provoca un potencial de equilibrio menos negativo, causando que la corriente de aniones sea excitatoria en este caso. De acuerdo con esto, el *knockdown* de KCC2 ha demostrado inducir hiperalgesia (Coull *et al.*, 2003). Existe evidencia también que la injuria de nervios induce apoptosis selectiva de interneuronas GABAérgicas, llevando a un incremento de la excitabilidad neuronal (Moore *et al.*, 2002). En forma paralela a los mecanismos mencionados, otro importante fenómeno descrito en la sensibilización central es la activación de las células de la glía, específicamente la microglia y los astrocitos. En estas células se ha observado alteraciones estructurales, proliferación celular, pérdida de la capacidad de buffer, liberación de mediadores proinflamatorios o proalgésicos y neurotoxicidad (Milligan y Watkins, 2009; Gosselin *et al.*, 2010), lo que en su conjunto dan cuenta de la persistencia de la hipersensibilidad presente en el dolor crónico (Gosselin *et al.*, 2010). Específicamente, en el dolor neuropático, bajo la influencia de factores neuronales como ATP o la quimioquina *fractalkine*/CX3CL1, la microglia sufre cambios en su fenotipo

incluyendo activación de la vía p38 MAPK. Esto ocurre específicamente como consecuencia de la activación de los receptores purinérgicos P2-R, CX3CR1 y receptores de tipo Toll (TLRs, *Toll-like receptors*) de la microglia (Basbaum *et al.*, 2009). Esta microglia activada libera factores como citoquinas y BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) que a su vez refuerzan la nocicepción reduciendo la potencia de la inhibición GABAérgica, sensibilizando neuronas espinales y activando astrocitos. La microglia activada libera también citoquinas como TNF $\alpha$  (*Tumor necrosis factor  $\alpha$* ) y distintas interleuquinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, que contribuyen a la sensibilización central (Basbaum *et al.*, 2009). En consecuencia a la liberación neuronal de neuromedadores y la producción de citoquinas como TNF $\alpha$  por parte de la microglia, se suma una activación astrocitaria caracterizada por activación de la vía intracelular JNK. Como resultado de la activación astrocitaria, ocurre una disminución de la recaptación de glutamato y un aumento de la recaptación de GABA, lo que refuerza la transmisión nociceptiva. Los astrocitos reactivos liberan además citoquinas como CCL2 que participan en la pérdida de la inhibición GABAérgica (Gosselin *et al.*, 2010). Respecto a la activación astrocitaria, distintos estudios han demostrado la sobreexpresión de una proteína marcadora específica de la actividad astrocitaria; GFAP (del inglés: *glial fibrillary acidic protein*) en modelos animales de injuria nerviosa, lo que es indicativo de la activación de astrocitos que se desarrolla durante el dolor neuropático (Garrison *et al.*, 1994; Cao y Zhang, 2008).

### **Modelos experimentales de dolor en animales**

Los modelos en animales permiten el estudio de diferentes procesos fisiopatológicos, entre estos el dolor. Para esto deben ser reproducibles, poseer sensibilidad y realizarse de manera homogénea para obtener resultados con las menores variaciones posibles (Le Bars *et al.*, 2001).

Los modelos animales de dolor permiten reproducir condiciones fisiológicas en las que los seres humanos experimentan dolor para poder evaluar el efecto analgésico de diferentes fármacos, representando condiciones de dolor fisiológico (agudo), inflamatorio y neuropático (crónico) en el animal y evaluando la nocicepción mediante cambios de conducta determinados (Álvarez y Paeile, 2005). Sin embargo, estos modelos animales presentan ciertas

limitaciones, como son la variabilidad debida a distintos factores que pueden alterar la conducta nociceptiva, como el tipo de animal (especie, género, edad), o variables del diseño experimental (temperatura ambiental, cantidad de horas luz, etc.), razón por la cual es importante mantener las condiciones de experimentación con la mayor homogeneidad posible (Álvarez y Paeile, 2005).

Uno de los primeros modelos de neuropatía fue el desarrollado por Bennet y Xie (1988), mediante injuria por constricción utilizando 4 ligaduras laxas alrededor del nervio ciático en ratas con catgut crómico (CCI, *chronic constriction injury*), lo que generó estrangulamiento de las fibras nerviosas y conductas indicativas de hiperalgesia, alodinia y dolor espontáneo mediante la disminución del umbral al frío, calor y estímulos mecánicos, permitiendo reproducir condiciones similares a las neuropatías por compresión de nervios en humanos. Posteriormente, Seltzer *et al.* en 1990 modificaron la técnica anterior por medio de una ligadura parcial apretada en un tercio o la mitad del nervio ciático de la rata (PSL; *partial sciatic ligation*) utilizando seda en vez de catgut para la ligadura, debido a la inflamación causada por el catgut. En el año 2000, Decosterd y Woolf realizaron una ligadura apretada con seda con transección posterior del nervio tibial y peroneal común, dejando intacto al nervio sural (SNI, *Spared nerve injury*). Este modelo resultó en un intenso y duradero aumento de la sensibilidad mecánica y térmica frente al frío y calor. En 2011, Constandil *et al.* realizaron una sección de la rama sural del nervio ciático obteniendo una hiperalgesia de la pata lesionada que persistió por más de un mes sin ningún daño motor.

Por otro lado, para el estudio del dolor neuropático trigeminal, Vos *et al.* (1994) realizaron la ligadura laxa total del nervio infraorbitario mediante ligaduras de catgut, provocando una constricción crónica a este nervio (IoN-CCI, *Infraorbital nerve chronic constriction injury*) en ratas. Los primeros días observaron un aumento de acicalamiento en la zona inervada por el nervio, y posterior al día 15 se produce un aumento de la respuesta nociceptiva frente a estímulos mecánicos. En el año 2008, Xu *et al.* realizaron la ligadura del nervio infraorbitario en el ratón, ya que anteriormente estos modelos se habían realizado sólo en ratas. Ellos realizaron una ligadura parcial mediante abordaje extraoral (pIONL, *partial infraorbital nerve ligation*) utilizando seda. Este modelo ocasionó cambios a nivel conductual como alodinia mecánica y cambios morfológicos a nivel del tronco encefálico, evidenciándose



también activación microglial y astrocitaria en la médula caudal ipsilateral a la lesión nerviosa. Posteriormente, Álvarez *et al.* (2011), modificaron la técnica de abordaje para la ligadura del nervio infraorbitario en el ratón, practicándola desde la cavidad bucal y transformándola en una técnica prácticamente incruenta con los mismos resultados.

En este trabajo de tesis se evaluó la hiperalgesia térmica y alodinia en los animales neuropáticos, utilizando la técnica de sección del nervio sural y la técnica de ligadura parcial de la rama infraorbitaria del nervio trigémino mediante abordaje intraoral en ratones.

### **Ión Cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ )**

Los elementos traza, micronutrientes u oligoelementos son minerales provenientes de la dieta que están presentes en el organismo en muy pequeñas cantidades y cumplen un rol de gran importancia, esencial para la vida. Un mineral se considera elemento traza cuando su concentración es inferior a 100 mg por kg de peso. Entre los elementos traza se encuentran el Fe, F, Mg, Zn, Si y Cu, y en nuestro organismo estos se encuentran mayormente como cationes divalentes. Los elementos traza están involucrados en numerosos procesos biológicos como diferentes reacciones enzimáticas y procesos metabólicos (Gaetke y Chow, 2003). El cobre, como catión divalente ( $\text{Cu}^{2+}$ ), es el tercer elemento traza proveniente de la dieta, más abundante después del zinc y hierro, y se encuentra presente en diversos tejidos, siendo sus concentraciones más altas en cerebro e hígado (Gaetke y Chow, 2003). El ión cobre puede adoptar en el organismo distintos estados redox, ya sea un estado oxidado, cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) o reducido, cuproso ( $\text{Cu}^+$ ) (Gaetke y Chow, 2003; Tapiero *et al.*, 2003).

### **Rol fisiológico del cobre**

El ión cobre es un componente estructural de numerosas proteínas, actuando como cofactor de distintas enzimas participantes de numerosos procesos vitales (Kim *et al.*, 2008). El  $\text{Cu}^{2+}$  es requerido para las funciones catalíticas y estructurales de enzimas involucradas en procesos biológicos requeridos para el crecimiento, desarrollo y mantención del organismo, como son la defensa antioxidante, donde participa la superóxido dismutasa (SOD), en la respiración celular (citocromo c oxidasa), y en la síntesis de catecolaminas (dopamina- $\beta$ -hidroxilasa) (Gaetke y Chow, 2003; Tapiero *et al.*, 2003). Otras enzimas dependientes del

$\text{Cu}^{2+}$  son tirosinasas, angiogeninas, lisina oxidasa, entre otras (Tapiero *et al.*, 2003; Mathie *et al.*, 2006).

Las concentraciones de iones cobre libre en el plasma sanguíneo humano se han descrito en valores del orden de 0.1 pM (Tapiero *et al.*, 2003). El cobre se acumula en el cerebro, y sus concentraciones en el fluido cerebro espinal son del orden de 70  $\mu\text{M}$  (Mathie *et al.*, 2006), sin embargo, los valores de cobre en la hendidura sináptica que han sido descritos son más altos, de 100  $\mu\text{M}$  (Kardos *et al.*, 1989), y en las enfermedades neurodegenerativas estos valores pueden aumentar a 400  $\mu\text{M}$  (Litwin *et al.*, 2013). Por lo tanto, el ión cobre no sólo está presente en zonas definidas del cerebro, sino que es almacenado y liberado en la hendidura sináptica después de estimulación eléctrica, alcanzando concentraciones del rango micromolar (Kardos *et al.*, 1989). Mediante tinción histológica se ha evidenciado también localización de  $\text{Cu}^{2+}$  en las terminales sinápticas de neuronas del *locus coeruleus* (Sato *et al.*, 1994). Estas evidencias sugieren que el  $\text{Cu}^{2+}$  es un elemento traza esencial que estaría participando como molécula de señalización en el sistema nervioso y como modulador de la excitabilidad neuronal (Aedo *et al.*, 2007).

En el sistema nervioso central, el transporte de cobre se lleva a cabo por las ATPasas transportadoras de cobre (González-Guerrero y Argüello, 2008), estando específicamente involucradas la ATP7A y ATP7B en la distribución del cobre (Puig y Thiele, 2002).

### **Modulación de la actividad neuronal por $\text{Cu}^{2+}$**

Los mayores factores de actividad neuronal que son modulados por el  $\text{Cu}^{2+}$  son la eficiencia sináptica y la excitabilidad neuronal.

**a) Eficiencia sináptica y  $\text{Cu}^{2+}$ : participación de distintos receptores en el sistema nervioso.** La modulación de la eficiencia sináptica es mediada por la interacción del  $\text{Cu}^{2+}$  con sistemas enzimáticos involucrados en la síntesis de neurotransmisores como catecolaminas, péptidos opioides y neuropéptidos (Kim *et al.*, 2008). También por la modulación del  $\text{Cu}^{2+}$  sobre canales iónicos activados por ligando como los receptores  $\text{GABA}_A$  (Trombley y Sheperd 1996; Mathie *et al.*, 2006), los receptores purinérgicos (Mathie *et al.*, 2006) y receptores de glutamato (Vlachova *et al.*, 1996; Weiser y Wienrich, 1996). Respecto al receptor  $\text{GABA}_A$

existen algunos estudios que indican que el  $\text{Cu}^{2+}$  actúa bloqueando este receptor, suprimiendo reversiblemente el flujo inducido por GABA con una concentración efectiva 50 de 16  $\mu\text{M}$ , de manera no competitiva (Narahashi *et al.*, 1994) y no voltaje dependiente (Trombley y Sheperd, 1996). Otros estudios muestran que concentraciones nanomolares de  $\text{Cu}^{2+}$  inducen un bloqueo lento y reversible de la corriente del receptor  $\text{GABA}_A$ , que puede ser removida por zinc (Sharonova *et al.*, 2000).

Respecto a los receptores purinérgicos, se ha estudiado que los iones cobre en concentraciones de 1 a 10  $\mu\text{M}$  inhiben la actividad de los receptores homoméricos  $\text{P2X}_7$  (Virginio *et al.*, 1997; Coddou *et al.*, 2002). Además, el efecto bifásico observado después de la aplicación de ATP en oocitos de *Xenopus laevis* que expresan el purinoreceptor  $\text{P2X}_4$  de rata, fue inhibido por la administración de cobre en concentraciones entre 1-300  $\mu\text{M}$ . Estos resultados indican que el cobre modula la actividad del receptor purinérgico  $\text{P2X}_4$ , lo cual sería relevante en el caso de la existencia de una sinapsis con actividad persistente de estos receptores a nivel de médula espinal (Acuña-Castillo *et al.*, 2000; Coddou *et al.*, 2002; Coddou *et al.*, 2003). Otros estudios indican que el cobre potencia la actividad de los receptores purinérgicos  $\text{P2X}_2$  (Xiong *et al.*, 1999).

En lo que respecta a los receptores de glutamato se ha demostrado que el cobre reduce la eficacia de kainato en el receptor AMPA y los receptores AMPA/kainato son bloqueados por  $\text{Cu}^{2+}$  en un rango bajo de  $\mu\text{M}$  (Weiser y Weinrich, 1996). En cuanto a los receptores NMDA es conocido que el  $\text{Cu}^{2+}$  es un potente inhibidor de éstos, sin conocerse aún el sitio de unión a este receptor (Trombley y Sheperd, 1996; Vlachova *et al.*, 1996; Weiser y Weinrich, 1996). Khosravani *et al.* (2008) han propuesto un nuevo mecanismo de inhibición de los receptores NMDA por parte de  $\text{Cu}^{2+}$  basándose en la interacción del cobre con una proteína priónica celular ( $\text{PrP}^c$ ), sin embargo, en ausencia de  $\text{PrP}^c$ , el  $\text{Cu}^{2+}$  en concentraciones micromolares puede inhibir el receptor NMDA (Stys *et al.*, 2012). Además, otros hallazgos recientes indican que ratones knock-out para  $\text{PrP}^c$  muestran aumento del dolor inflamatorio, facilitación de la sensibilización central y nocicepción incrementada (Gadotti y Zamponi, 2011).

### **b) Excitabilidad neuronal y Cu<sup>2+</sup>: participación de canales iónicos activados por voltaje.**

La modulación de la excitabilidad neuronal es mediada por interacciones con distintos miembros de la familia de los canales iónicos activados por voltaje, incluyendo canales de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> (Mathie *et al.*, 2006). Respecto a los canales iónicos de K<sup>+</sup>, existe evidencia que el Cu<sup>2+</sup> extracelular es un potente inhibidor de los canales de K<sup>+</sup>; BK y Shaker. Esta respuesta no fue observada con otros cationes bivalentes lo que sugiere que el Cu<sup>2+</sup> se une a un sitio selectivo. Morera *et al.* (2003) obtuvieron evidencia donde el Cu<sup>2+</sup> en concentraciones de 20 μM o superior inducía una disminución tiempo y concentración dependiente en la probabilidad de apertura del canal de K<sup>+</sup> sensible a voltaje y dependiente de calcio de alta conductancia (BKCa). Por otro lado, se ha demostrado que el Cu<sup>2+</sup> activa los canales K2P, involucrados en establecer el potencial de reposo, y actúa específicamente sobre TREK-1 con una EC<sub>50</sub> de 3 μM (Gruss *et al.*, 2004). También existe evidencia que el Cu<sup>2+</sup> modifica la actividad de los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje. En el estudio de Chen *et al.* (2011), se demostró que el Cu<sup>2+</sup> extracelular es un potente inhibidor de los canales de Na<sup>+</sup> epiteliales humanos (ENaCs) y se une a múltiples sitios. Por otro lado, Delgado *et al.* (2006) observaron que el Cu<sup>2+</sup> en rango micromolar causó una inhibición dosis dependiente de la corriente de entrada del canal de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> y que esta inhibición ocurrió a concentraciones inferiores que con otros cationes como Zn<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup>, indicando que los sitios moduladores en el canal de sodio poseen mayor afinidad por el Cu<sup>2+</sup> que por Zn<sup>2+</sup> o Ni<sup>2+</sup>.

En cuanto a los canales de calcio activados por voltaje, se han obtenido evidencias que el ión cobre produce un bloqueo de los tres canales de Ca<sup>2+</sup> tipo T que han sido clonados, mostrando una mayor afinidad por los canales Ca<sub>v</sub>3.2 (Jeong *et al.*, 2003). Por otro lado, los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo -N y L fueron particularmente sensibles al bloqueo por cobre en células híbridas de glioma de rata y neuroblastoma de ratón (Kasai y Neher, 1992). En 2001, Horning y colaboradores observaron que el Cu<sup>2+</sup> en una concentración de 30 μM produjo una inhibición de un 52% en el cultivo primario de neuronas del bulbo olfatorio de ratas. Esto es interesante ya que el bulbo olfatorio de mamíferos tiene una de las mayores concentraciones de cobre y zinc en el sistema nervioso central (Ono y Cherian, 1999). Por otra parte, Yu *et al.* (2008) describen el rol del Cu<sup>2+</sup> como cofactor de la enzima superóxido dismutasa, la cual actúa como captadora y detoxificadora de radicales libres.

## Cobre y dolor agudo

Los antecedentes anteriores nos indican que el  $\text{Cu}^{2+}$  tiene participación en la modulación de la excitabilidad neuronal y eficiencia sináptica, lo que tendría consecuencias en el proceso de nocicepción afectando procesos como la sensibilización central que ocurre en el desarrollo del dolor crónico. El  $\text{Cu}^{2+}$  podría modular de forma inhibitoria la excitabilidad neuronal y la eficiencia sináptica de las neuronas que participan en la vía nociceptiva, contribuyendo en su conjunto a la producción de la analgesia y/o antinocicepción. Sin embargo, los antecedentes anteriores provienen de estudios realizados mayormente *in vitro* y debido a que los efectos que ejerce el  $\text{Cu}^{2+}$  ocurren en diversas moléculas y receptores a nivel neuronal es difícil precisar sus mecanismos a nivel conductual y fisiológico.

Respecto a la modulación del dolor, existen antecedentes del efecto antinociceptivo del  $\text{Cu}^{2+}$  mayormente en dolor agudo, en pruebas conductuales (Blahova *et al.*, 1994; Tamba *et al.*, 2013). También existen resultados experimentales que prueban que la asociación de AINEs con  $\text{Cu}^{2+}$  mejora la actividad analgésica de cada fármaco por separado, reduciendo los efectos colaterales indeseados en humanos y animales (Cini *et al.*, 2007; Agotegaray *et al.*, 2010). Estudios en ratas utilizando preparaciones basadas en  $\text{Cu}^{2+}$  mostraron ser tan eficiente como la morfina o mostraron un efecto antinociceptivo mayor al asociarse con antiinflamatorios no esteroideos, posiblemente a través de una activación de receptores opioides dependientes de  $\text{Cu}^{2+}$  (Okuyama *et al.*, 1987). En un estudio reciente, Tamba *et al.* (2013), mostraron que la administración intraperitoneal de concentraciones crecientes de cloruro de cobre (0.5, 1.0, 2.0 mg/kg) y de sulfato de cobre (0.5 y 1.0 mg/kg) produjeron un efecto antinociceptivo de aproximadamente un 28.6% en las pruebas *hot plate* y *tail flick*, y 57.28% en el *writhing test*; además, las sales de  $\text{Cu}^{2+}$  mostraron efectos en las pruebas de conducta espontánea en jaula de actividad evidenciando un efecto ansiolítico. Gumilar *et al.* (2012) realizaron un estudio de asociación entre dos complejos de  $\text{Cu}^{2+}$ :  $\text{Cu}_2(\text{fen})_4(\text{dmf})_2$  y  $\text{Cu}_2(\text{fen})_4(\text{caf})_2$ , y de fenoprofeno, un antiinflamatorio no esterooidal, mostrando que estos agentes antinociceptivos eran más potentes que la sal de fenoprofeno en modelos de dolor agudo de formalina y *writhing test*, y al mismo tiempo observaron un incremento de las propiedades antinociceptivas de  $\text{Cu}^{2+}$  al ser administrados en asociación con el fenoprofeno en ratones. Estos resultados demuestran los marcados efectos antinociceptivos de las sales de

$\text{Cu}^{2+}$  en modelos termoalgésicos y quimioalgésicos agudos. Recientemente, El Gammal *et al.* (2014), evidenciaron el efecto analgésico de un complejo de cobre, siendo mayor que el efecto de piroxicam, en un modelo de ratas artríticas.

Otra evidencia de las propiedades analgésicas del cobre es un caso clínico reportado en la literatura. Una mujer de 46 años con mielopatía (lesión en médula espinal) presentaba deficiencia de cobre en el fluido cerebroespinal y parestesia dolorosa, la que fue revertida al quinto día de tratamiento con cobre (2 mg de sulfato cúprico iv/día por cinco días) (Schleper y Stuerenburg, 2001).

### **Cobre y dolor crónico**

En cuanto al rol del cobre en el dolor crónico, existe poca información respecto a su efecto antinociceptivo, surgiendo por lo tanto la necesidad de más estudios y evidencia experimental al respecto. Existe un estudio de Jacka *et al.* (1983) donde se evaluó la eficacia antinociceptiva del salicilato de cobre en un modelo de ratas artríticas, observándose efectos antinociceptivos y reducción de la inflamación al ingerir dosis orales de salicilato de cobre señalando el posible rol como agente analgésico del  $\text{Cu}^{2+}$ .

Considerando todos los antecedentes antes planteados nuestro estudio pretende evaluar el efecto de la administración de  $\text{CuSO}_4$  en dos modelos de dolor crónico de tipo neuropático y poder establecer las implicancias a nivel molecular de esta administración para poder comprender mejor los mecanismos fisiológicos implicados en los efectos analgésicos del cobre. De esta manera se espera dilucidar más sobre los procesos mediante los cuales el  $\text{Cu}^{2+}$  regula la transmisión nociceptiva en la médula espinal para así poder considerar al  $\text{Cu}^{2+}$  como posible agente terapéutico en el tratamiento del dolor crónico.

## **HIPÓTESIS**

El sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), administrado en forma aguda y crónica tiene efectos antinociceptivos en modelos de dolor neuropático espinal y trigeminal así como cambios moleculares asociados al dolor crónico, efecto que se potencia al asociarlo a ketamina.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar a nivel conductual y molecular, las propiedades antinociceptivas de la administración aguda y crónica de  $\text{CuSO}_4$  y su interacción con ketamina en dos modelos de dolor neuropático en el ratón.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estudiar el efecto antinociceptivo de la administración aguda intraperitoneal de  $\text{CuSO}_4$  en animales sanos y en dos modelos animales de dolor neuropático:
  - a. Dolor neuropático espinal, producido por sección del nervio sural evaluado mediante el test de la formalina intraplantar.
  - b. Dolor neuropático trigeminal, producido por ligadura parcial de la rama infraorbitaria del nervio trigémino, evaluado por el test de la formalina orofacial.
2. Evaluar la posible interacción de  $\text{CuSO}_4$  con un antagonista no competitivo del receptor NMDA, ketamina, mediante un análisis isoblográfico tanto en animales sanos como neuropáticos, para tratar de dilucidar su mecanismo antinociceptivo.
3. Evaluar la duración del efecto antinociceptivo de la administración aguda de  $\text{CuSO}_4$  en el modelo de neuropatía espinal y trigeminal.
4. Evaluar el efecto antinociceptivo de la administración crónica de  $\text{CuSO}_4$ .
5. Evaluar si ambas neuropatías producen cambios relacionados con la activación glial, (expresión de GFAP), utilizando la técnica de Western blot y si la administración crónica de  $\text{CuSO}_4$  modifica esta expresión.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Lugar:**

Los estudios conductuales fueron realizados en el Laboratorio de Neurofarmacología del Dolor Agudo y Crónico, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, y las pruebas moleculares se desarrollaron en el Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile.

### **Animales:**

Los experimentos de este estudio fueron realizados en ratones (*Mus musculus*) machos CF-1, de 28-33 g de peso. Los animales fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 hrs. con alimentación y agua *ad-libitum*. En este estudio se utilizaron animales sanos y animales neuropáticos desarrollados mediante sección del nervio sural o ligadura parcial del nervio infraorbitario.

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y se realizaron de acuerdo a las recomendaciones éticas de la Asociación Internacional del Estudio del Dolor (Zimmermann, 1983) y a la Guía de Cuidados y Utilización de animales de laboratorio preparada por el National Institute of Health (NIH, USA). El número de animales utilizados fue reducido al mínimo necesario. Antes de cada estudio conductual los animales fueron habituados en el laboratorio por un período de dos horas.

### **Protocolo Experimental:**

**Modelo de neuropatía por sección del nervio sural:** La sección del nervio sural se realizó en base a una modificación del método descrito por Decosterd y Woolf (2000). Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral 400 mg/kg vía intraperitoneal en una solución al 7%. Luego se rasuró el miembro posterior derecho a nivel del nervio ciático y se procedió a hacer



una incisión en la piel de aproximadamente 1 cm. Se debridó el subcutáneo y el músculo hasta encontrar el nervio ciático. Se siguió su recorrido hasta la división del nervio en tres ramas: el sural, el peroneal común y el tibial. Se separó la rama del nervio sural y se seccionó a dos milímetros de su nacimiento; luego se suturó por planos con seda 5-0.

**Modelo de neuropatía por ligadura del nervio infraorbitario:** La ligadura del nervio infraorbitario se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Álvarez *et al.* (2011). Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de hidrato de cloral al 7% (400 mg/kg). La cirugía se desarrolló con ayuda de microscopio óptico. Se realizó una incisión a nivel del margen gingivobucal del hocico del ratón, delante del primer molar con ayuda de un bisturí. Luego, se separaron los dos planos con el fin de encontrar el nervio infraorbitario derecho sobre el cual se realizó una ligadura parcial apretada con hilo seda 5/0. La incisión se suturó posteriormente con un punto de la misma seda.

Inmediatamente posterior a la cirugía, en ambos modelos, los ratones recibieron una inyección de 5 mg/kg de ketoprofeno como analgésico postoperatorio vía subcutánea. Los animales se utilizaron 14 días después de la cirugía para permitir la instauración y estabilización de la neuropatía. Solo aquellos animales que presentaron una disminución del umbral doloroso de al menos 15%, permanecieron en los estudios. Los animales neuropáticos fueron comparados a controles de animales sanos. No se emplearon animales sham ya que en experimentos anteriores se había demostrado que estos no presentaban diferencias con los animales sanos.

### **Estudios conductuales (Test Algesimétricos)**

**Test de *hot plate*:** Para el estudio de la hiperalgesia térmica se utilizó el test nociceptivo de *hot plate* o plancha caliente, el cual permitió evaluar la instauración de la neuropatía por sección del nervio sural. El Test de *hot plate* descrito por Woolfe y McDonald (1944), consiste en observar la conducta nociceptiva de ratones al colocarlos sobre una superficie calentada a una determinada temperatura. En el presente estudio la temperatura se fijó en 50°C y se utilizó un tiempo de *cut off* máximo de 30 segundos que permitió determinar el tiempo de latencia en segundos que permanece el ratón sobre el *hot plate* hasta que demuestra una conducta nociceptiva como lamido, mordisqueo, sacudida de patas o saltos. El

test de *hot plate* se realizó en ratones sanos y neuropáticos. Las mediciones fueron hechas previo a la cirugía y a los 3, 7, 10 y 14 días post-cirugía.

**Estudio de la alodinia al frío:** Para determinar la instalación de la neuropatía trigeminal se midió la alodinia por frío (Álvarez *et al.*, 2011) en los ratones antes de la cirugía, y los días 3, 7, 10 y 14 post-cirugía. Una vez concluido el periodo de adaptación se evaluó el comportamiento de los animales al aplicar en forma tópica, 20  $\mu$ L de una solución de acetona al 90%, sobre la zona de las vibrisas derechas correspondiente a la zona de la ligadura del nervio infraorbitario en el caso de los animales neuropáticos y en la misma zona a los animales controles, mediante una jeringa Hamilton con aguja 25 G de punta roma para no herir al ratón. Una vez depositada la solución, los animales fueron reubicados en el cilindro de plexiglás y se observó su comportamiento nociceptivo de frotamiento/*gratage* durante un período de 5 minutos. La conducta que se evaluó fue el acicalamiento orofacial simétrico y asimétrico, como por ejemplo, frotamiento/*gratage* focalizado en la zona de las vibrisas con la pata anterior o posterior ipsilateral a la lesión (Luccarini *et al.*, 2006). El test de la acetona se realizó en animales sanos y neuropáticos.

**Test de la formalina:** Los test de formalina utilizados se basaron en el test de la formalina intraplantar propuesto por Zhao *et al.* (2003) y el test orofacial, descrito por Luccarini *et al.* (2006). Se inyectaron 20  $\mu$ L de formalina al 2% para los animales sanos y al 0.25% para los animales neuropáticos vía subcutánea en la superficie plantar de la pata posterior derecha. Los animales neuropáticos fueron inyectados con 0.25% y no con 2% de formalina debido a que con 2% los animales quedan paralizados por el dolor (*freezing*) y no se pueden estudiar. Para los animales del modelo de neuropatía trigeminal, la formalina se inyectó vía subcutánea en la región central de las vibrisas derechas del ratón de la misma manera, en una concentración al 2% para los animales sanos y al 0.25% para los animales neuropáticos. Posteriormente cada animal fue colocado en un cilindro de plexiglás para contabilizar en segundos la conducta de lamido/mordisqueo para la región del nervio sural o frotamiento/*gratage* para la región orofacial, durante un período de observación de 45 min. subdividido en períodos de 5 min. Esta conducta fue ejecutada con el miembro anterior o posterior ipsilaterales al sitio de inyección. El test de la formalina se llevó a cabo en ratones sanos y en aquellos que tenían instaurada la neuropatía (Álvarez *et al.*, 2011). La evolución

temporal de la respuesta nociceptiva se estudió determinando las Fases I y II del test y el tiempo total de observación, las que se establecieron de acuerdo a las diferencias estadísticas observadas en el tiempo de frotamiento/*gratage* respecto a un grupo control inyectado con suero fisiológico (formalina 0%).

### **Análisis isobolográfico**

La evaluación de la interacción entre cobre y ketamina, antagonista de los receptores NMDA, se llevó a cabo mediante un análisis isobolográfico (Tallarida *et al.*, 2001). El isobolograma es un método gráfico que consiste en el cálculo de la dosis teórica aditiva para cada nivel de efecto y su comparación estadística con la dosis de la combinación que produce el mismo efecto experimentalmente. Dosis equiefectivas de ambos fármacos individuales se requieren para calcular la dosis esperada en la asociación. La interacción entre ambos fármacos se estudió mediante administración de proporciones de la DE<sub>50</sub> de CuSO<sub>4</sub> y ketamina. El isobolograma fue construido conectando la DE<sub>50</sub> calculada para CuSO<sub>4</sub> (abscisa) con la DE<sub>50</sub> calculada para ketamina (ordenada) para obtener una línea de aditividad. La región gráfica en donde se localiza el valor experimental (DE<sub>50</sub> experimental) en relación al valor teórico (aditividad teórica DE<sub>50</sub>) determina el tipo de interacción. Si el valor se localiza bajo la línea de aditividad y es estadísticamente diferente del valor teórico, el tipo de interacción es sinérgica o supraaditiva (efecto es mayor que la suma de los efectos individuales de los fármacos); si se localiza cerca de la línea de aditividad y no es estadísticamente diferente del valor teórico, la interacción es simple aditividad (el efecto es igual a la suma de cada fármaco); en cambio, si el valor experimental se localiza por sobre la línea de aditividad y es estadísticamente diferente del valor teórico, se trata de una interacción de antagonismo o subaditividad (Tallarida *et al.*, 2001).

### **Administración de fármacos**

Los fármacos se administraron por vía intraperitoneal, excepto cuando se insertó subcutáneamente una bomba de administración continua *ALZET*. A los grupos controles se les administró suero fisiológico al 0.9 %. El CuSO<sub>4</sub> se administró en dosis crecientes de 0.1, 0.3, 1 y 3 mg/kg y la ketamina (Imalgene®) en dosis de 0.3, 1, 3 y 10 mg/kg por vía intraperitoneal tanto a los ratones control como con dolor neuropático.

## **Evaluación de la actividad de la glía mediante la cuantificación de la proteína GFAP en la médula espinal, en respuesta a la administración de CuSO<sub>4</sub>.**

El efecto a nivel molecular de la administración crónica de cobre se estudió cuantificando la expresión de la proteína GFAP, mediante Western Blot. Los estudios se realizaron a los 7 y 14 días posteriores a la inducción de neuropatía ya sea mediante sección del nervio sural o por ligadura parcial del nervio infraorbitario. Los animales fueron sacrificados por sobredosis de uretano al 20%.

En el caso de los animales con neuropatía por sección del nervio sural se extrajo médula espinal correspondiente al segmento T12-L1 tomando muestra de la hemi médula, y en los animales con neuropatía por ligadura parcial del nervio infraorbitario se extrajo la muestra a partir del tronco encéfalo. Los tejidos fueron almacenados a -20°C para la posterior determinación de GFAP mediante Western Blot.

Para realizar el Western Blot, los segmentos de la médula espinal fueron suspendidos en buffer de lisis 50 µL (137mM NaCl, 20 mM Tris, Triton-X100 1%, pH 8,0 con cocktail inhibidor de proteasas, (Complete, Roche)). La suspensión fue homogenizada con homogenizador (Ultra Turrax; Biospec) en hielo y centrifugada por 5 min a 3000 g. La cuantificación de proteína se realizó mediante el método BCA (Pierce) y los sobrenadantes fueron almacenados a -20°C. Para SDS/PAGE, se tomaron 50 µg de proteína total y se mezclaron con buffer de carga (0,125 M Tris-HCL, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0,2 M DTT, 0,02% azul de bromofenol, pH 6,8), calentado a 95°C por 5 min, y cargados en geles de poliacrilamida al 12%. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente durante dos horas a 80 V. Las bandas fueron electro transferidas a membranas de nitrocelulosa, aplicando una corriente de 350 mA. La inmunodetección se realizó utilizando anticuerpos primarios monoclonal anti-GFAP. Las membranas fueron bloqueadas con solución de leche al 5% e incubadas con el anticuerpo primario a 4°C en agitador durante la noche. Al día siguiente se lavaron las membranas con Buffer Tris pH 7,4 TBS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Jackson Laboratories). Las bandas fueron procesadas con luminol (ECL, Pierce) y reveladas mediante film de rayos X (Kodak).

## **Expresión de los resultados**

Los resultados obtenidos se expresaron como la cantidad de segundos correspondientes a la conducta nociceptiva respecto al control previo a la inyección de suero, CuSO<sub>4</sub> o ketamina y también antes y después de la inducción de la neuropatía. Los resultados por grupo se expresaron como la media  $\pm$  error estándar (SEM), para grupos de animales que fluctuaron entre 5 a 6 por grupo.

## **Procesamiento estadístico de datos**

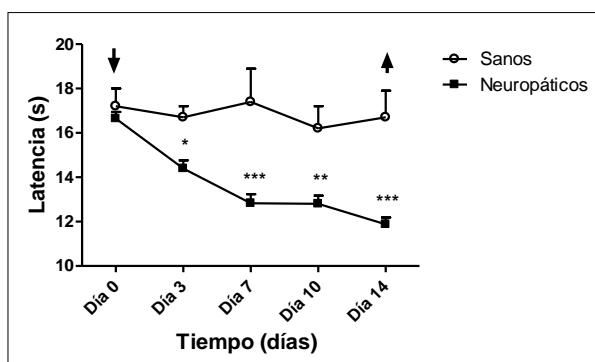
Para comparaciones estadísticas de los datos obtenidos, se utilizó la prueba t de Student y se realizó un test de ANOVA de una vía, o de medidas repetidas, según corresponda, seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Para los resultados, el nivel de significancia se estableció en  $p < 0.05$  y se graficó de la siguiente forma:  $p < 0.05 = *$ ,  $p < 0.01 = **$ , y  $p < 0.001 = ***$ . Se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0 para los análisis estadísticos.

## RESULTADOS

### 1. Efecto antinociceptivo del sulfato de cobre sobre ratones con neuropatía espinal

#### Desarrollo y evaluación de la neuropatía espinal (sección del nervio sural)

**Evaluación nociceptiva térmica (*test de hot plate*):** Antes de inducir la neuropatía, se registraron los umbrales nociceptivos térmicos (*test de hot plate*) determinados por los tiempos de latencia en segundos (día 0 previo a la cirugía) de todos los ratones. Luego los animales se dividieron en dos grupos, el grupo que sufriría la sección del nervio sural y el grupo sanos. Los ratones fueron evaluados en el test de *hot plate* los días 3, 7, 10 y 14 posterior a la cirugía. Los ratones con neuropatía del nervio sural mostraron umbrales significativamente menores que los ratones sanos, observándose el umbral más bajo entre los días 7 a 14 post-cirugía (Fig. 1).

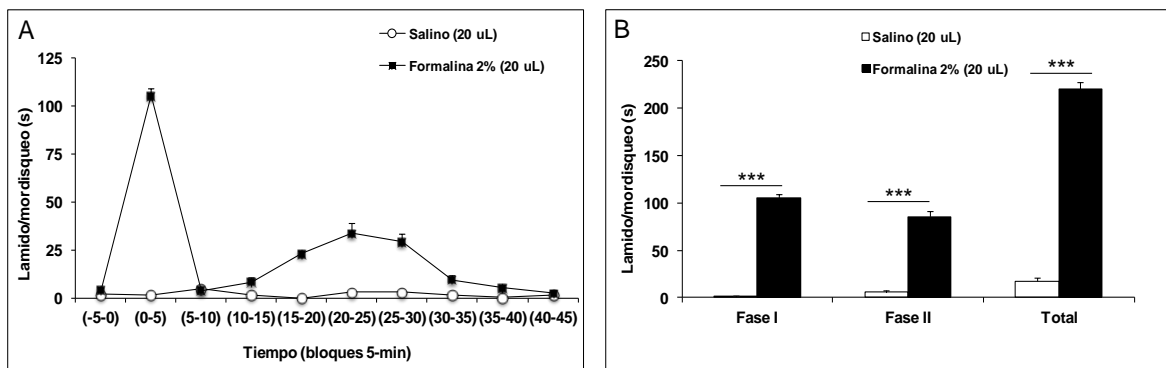


**Fig. 1.** Efecto de la sección del nervio sural en la evolución temporal del umbral nociceptivo térmico en ratones. Los valores son el promedio  $\pm$  SEM (n= 6 para el grupo sano y n=69 para el grupo neuropático). ANOVA de medidas repetidas seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\*p<0.05; \*\*p<0.01;\*\*\*p<0.001).

#### **Evaluación nociceptiva química (*test de formalina*)**

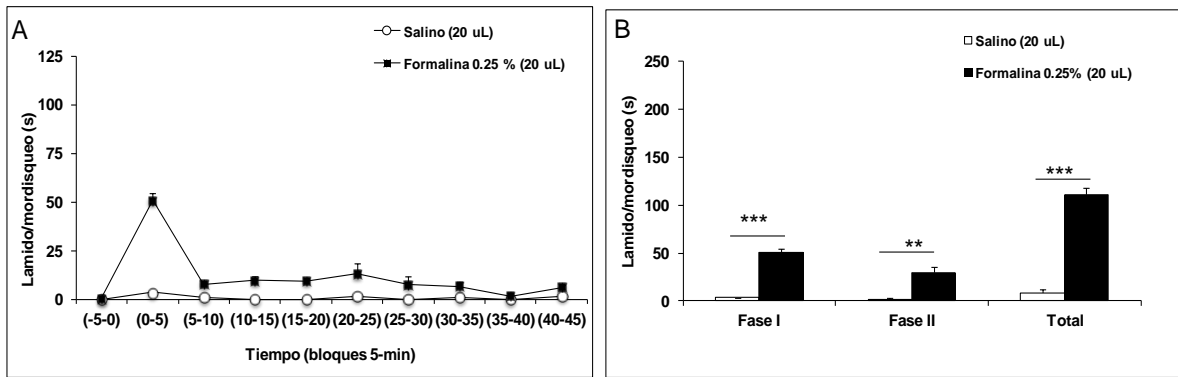
**Ratones sanos:** La administración intraplantar de 20  $\mu$ L de salino produjo una conducta de lamido y mordisqueo en la Fase I de  $1.7 \pm 0.2$  s, en la Fase II:  $6.0 \pm 1.7$  s, y en el Tiempo Total de observación la respuesta fue de  $17.7 \pm 3.3$  s (n=6). La administración de formalina intraplantar al 2% en 20  $\mu$ L produjo una conducta nociceptiva de lamido y mordisqueo (n=7), en la Fase I de  $105.4 \pm 4.0$  s, en la Fase II de  $85.9 \pm 5.9$  s y para el Tiempo Total de observación se obtuvo un efecto nociceptivo de  $220.9 \pm 6.9$  s. El efecto nociceptivo inducido por formalina fue significativamente diferente de salino en las Fase I (p<0.001), Fase II (p<0.001) y Tiempo Total (p<0.001). Ambos grupos de animales recibieron suero fisiológico

subcutáneo para poder compararlos con la posterior administración de los fármacos en el curso temporal de la respuesta nociceptiva (Fig. 2A) y en las diferentes fases del test de formalina (Fig. 2B).



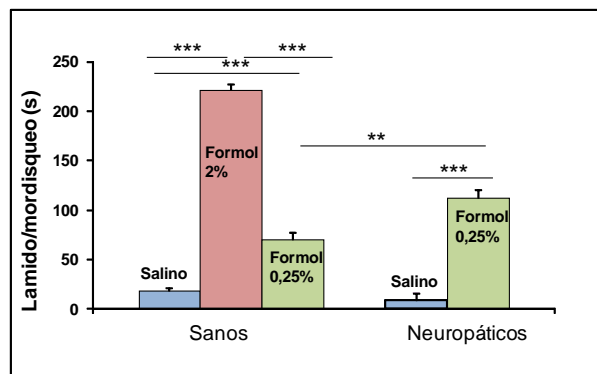
**Fig. 2. A.** Curso temporal del tiempo de lamido/mordisqueo expresado en segundos, observado con la administración de salino sin y con formalina en ratones sanos. **B.** Respuesta nociceptiva medida por tiempo de lamido/mordisqueo en la Fase I (0-5 min.), Fase II (15-30 min.) y Tiempo Total de observación (0-45 min.) de salino, sin y con formalina (\*\*\*) $p < 0.001$  en ratones sanos.

**Ratones neuropáticos:** En los animales neuropáticos la administración intraplantar de 20  $\mu$ L de salino produjo una conducta de lamido y mordisqueo en la Fase I de  $3.5 \pm 0.2$  s, en la Fase II:  $1.5 \pm 0.2$  s, y en el Tiempo Total de observación la respuesta fue de  $8.5 \pm 0.7$  s ( $n=5$ ). La administración de formalina intraplantar al 0.25% en 20  $\mu$ L produjo una conducta nociceptiva de lamido y mordisqueo, que fue contabilizada de acuerdo a las fases descritas previamente. Para un total de 8 animales, en la Fase I se obtuvo un efecto nociceptivo de  $50.6 \pm 2.1$  s, en la Fase II de  $29.6 \pm 5.3$  s y para el Tiempo Total de observación un efecto nociceptivo de  $111.5 \pm 9.5$  s. El efecto nociceptivo inducido por formalina fue significativamente diferente de salino en las Fase I ( $p < 0.001$ ), Fase II ( $p < 0.01$ ) y el Tiempo Total ( $p < 0.001$ ). Ambos grupos de animales recibieron salino subcutáneo para poder compararlo con la posterior administración de los fármacos en el curso temporal de la respuesta nociceptiva (Fig. 3A) y en las diferentes fases del test de formalina (Fig. 3B).



**Fig. 3. A.** Curso temporal del tiempo de lamido/mordisqueo expresado en segundos, observado con la administración de salino sin y con formalina. **B.** Respuesta nociceptiva medida por tiempo de lamido/mordisqueo en la Fase I (0-5 min.), Fase II (15-30 min.) y Tiempo Total de observación (0-45 min.) de salino, sin y con formalina en ratones neuropáticos (\*\*p<0.01; \*\*\*p< 0.001).

Se comparó el efecto de la administración de formalina al 0.25%, en ratones sanos y neuropáticos, obteniéndose una mayor respuesta nociceptiva de lamido/mordisqueo en los neuropáticos:  $111.5 \pm 9.5$  s en comparación con una respuesta de  $69.8 \pm 7.5$  s en los ratones sanos ( $p<0.01$ ) ( $n=8$ ). La respuesta nociceptiva inducida por formalina fue significativamente diferente de salino, tanto en animales sanos como neuropáticos ( $p<0.001$ ) ( $n=6$ ). La concentración de formalina al 2% en los animales sanos fue significativamente diferente de la concentración de formalina al 0.25% ( $p<0.001$ ) ( $n=7$ ), y en animales neuropáticos no fue utilizada ya que produjo una conducta de tipo *freezing* que no permite ser cuantificada (Fig. 4).

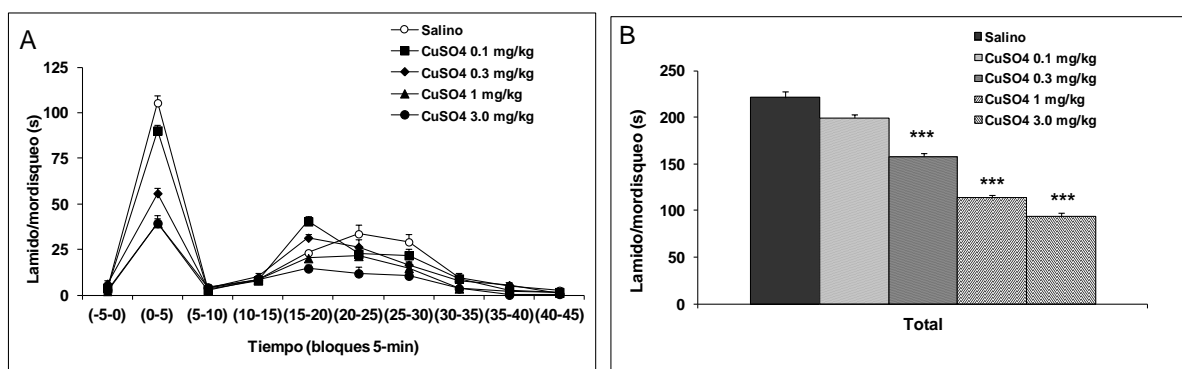


**Fig. 4.** Efecto de la administración de las diferentes concentraciones de formalina en ratones sanos y neuropáticos, expresados como tiempo de lamido/mordisqueo del Tiempo Total de observación del test de formalina intraplantar (\*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001).



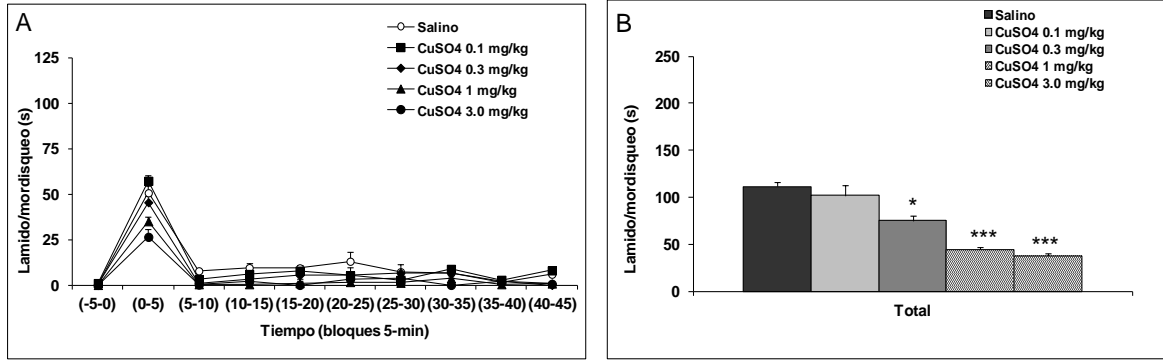
## Efecto antinociceptivo de la administración de CuSO<sub>4</sub> en el test de la formalina intraplantar

**Ratones sanos:** La administración de CuSO<sub>4</sub> produjo en los animales sanos una disminución dosis dependiente de la conducta nociceptiva inducida por formalina 2% (Fig. 5A y 5B). Para el Tiempo Total de observación con las dosis de CuSO<sub>4</sub> de 0.1, 0.3, 1 y 3 mg/kg, se obtuvieron respuestas nociceptivas de  $199.0 \pm 4.0$  s (NS),  $157.8 \pm 4.4$  s ( $p < 0.001$ ),  $113.6 \pm 4.7$  s ( $p < 0.001$ ) y  $93.1 \pm 3.3$  s ( $p < 0.001$ ), respectivamente ( $n=5$ ), siendo las tres dosis más altas significativamente distintas al control con salino que fue de  $220.9 \pm 6.9$  s.



**Fig. 5.** A. Curso temporal del efecto de salino y CuSO<sub>4</sub> en el tiempo de lamido/mordisqueo expresado en segundos en animales sanos. B. Efecto de salino y CuSO<sub>4</sub> en el Tiempo Total de observación expresado en segundos en animales sanos. ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\*\*\*) $p < 0.001$ ).

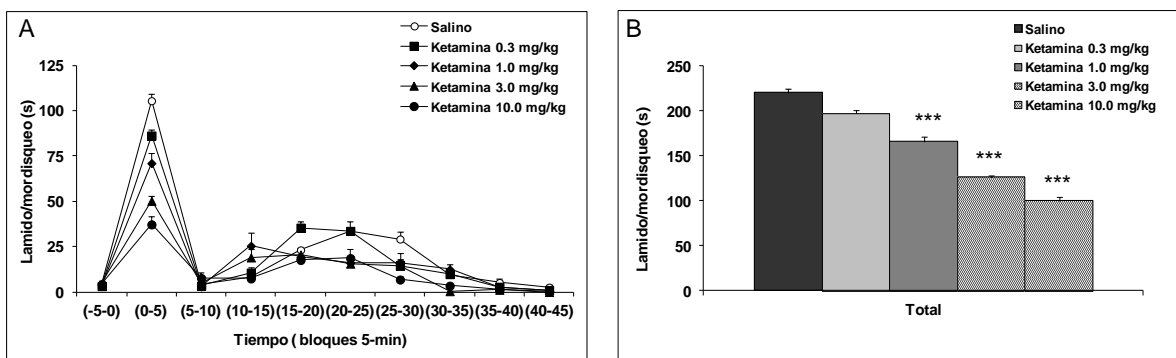
**Ratones neuropáticos:** La administración de CuSO<sub>4</sub> en los animales neuropáticos produjo una disminución dosis dependiente de la conducta nociceptiva de lamido/mordisqueo inducida por formalina 0.25% (Fig. 6A y 6B). Para el Tiempo Total de observación del test de formalina intraplantar con las dosis de CuSO<sub>4</sub> de 0.1, 0.3, 1 y 3 mg/kg, se obtuvieron respuestas nociceptivas de  $101.8 \pm 6.7$  s (NS),  $75.0 \pm 7.9$  s ( $p < 0.05$ ),  $44.4 \pm 2.2$  s ( $p < 0.001$ ) y  $37.8 \pm 5.0$  s ( $p < 0.001$ ), respectivamente ( $n=5$ ), siendo las tres dosis más altas significativamente distintas respecto al control que fue de  $111.5 \pm 9.5$  s.



**Fig. 6. A.** Curso temporal del efecto de salino y CuSO<sub>4</sub> en el tiempo de lamido/mordisqueo expresado en segundos en animales neuropáticos. **B.** Tiempo Total de observación del efecto de salino y CuSO<sub>4</sub> expresado en segundos en animales neuropáticos. ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\*p< 0.05; \*\*\*p< 0.001).

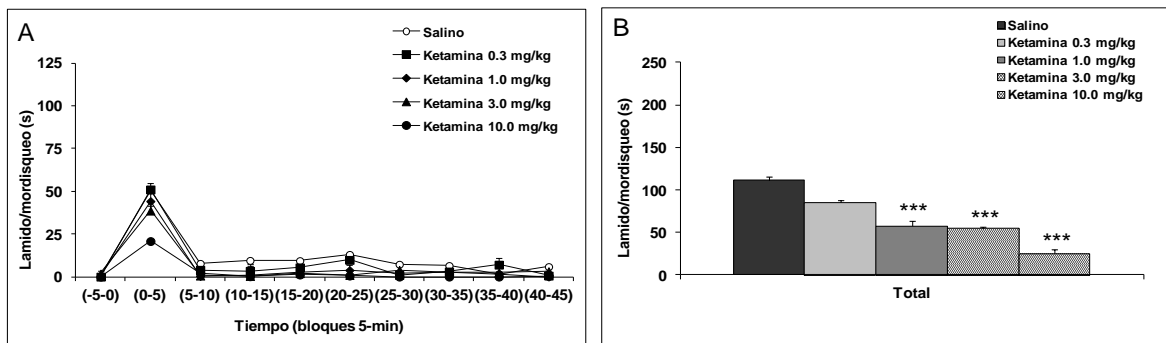
### Efecto antinociceptivo de la administración de ketamina en el test de la formalina intraplantar

**Ratones sanos:** La administración de ketamina produjo una disminución dosis dependiente de la conducta nociceptiva de lamido/mordisqueo (Fig. 7A y 7B) en animales sanos. Para el Tiempo Total de observación del test de formalina intraplantar con las dosis de ketamina de 0.3, 1, 3 y 10 mg/kg se obtuvieron respuestas nociceptivas de  $197.4 \pm 6.9$  s (NS),  $166.0 \pm 10.6$  s ( $p < 0.001$ ),  $126.2 \pm 4.2$  s ( $p < 0.001$ ) y  $100.2 \pm 6.2$  s ( $p < 0.001$ ), respectivamente (n=5), siendo las tres dosis más altas significativamente distintas respecto al control.



**Fig. 7. A.** Curso temporal del efecto de salino y ketamina en el tiempo de lamido/mordisqueo expresado en segundos en animales sanos. **B.** Tiempo Total de observación de salino y ketamina expresado en segundos en animales sanos. ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\*\*p< 0.001).

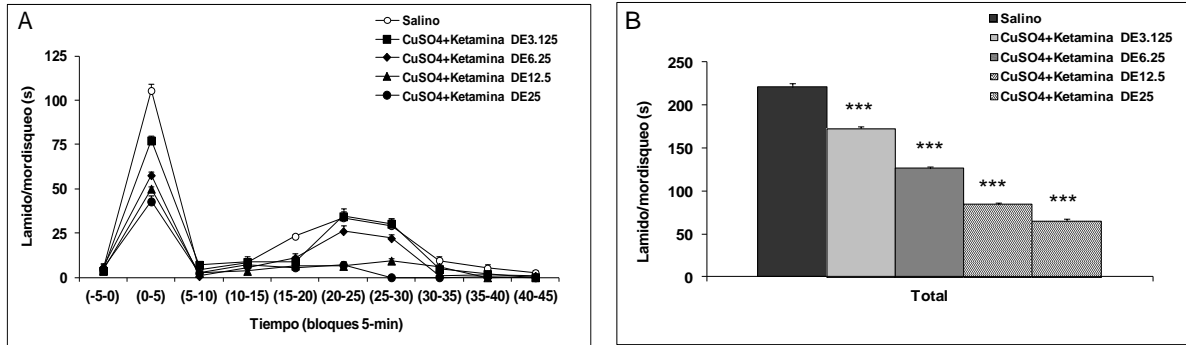
**Ratones neuropáticos:** La administración de ketamina en animales neuropáticos produjo una disminución dosis dependiente de la conducta nociceptiva de lamido/mordisqueo (Fig. 8A y 8B). Para el Tiempo Total de observación del test de formalina intraplantar con las dosis de ketamina de 0.3, 1, 3 y 10 mg/kg se obtuvieron respuestas nociceptivas con 5 animales por grupo de  $85.2 \pm 4.5$  s (NS),  $57.7 \pm 1.8$  s ( $p < 0.001$ ),  $54.6 \pm 1.8$  s ( $p < 0.001$ ) y  $25.2 \pm 1.3$  s ( $p < 0.001$ ), respectivamente, siendo las tres dosis más altas significativamente distintas respecto al control.



**Fig. 8.** A. Curso temporal del efecto de salino y ketamina en el tiempo de lamido/mordisqueo expresado en segundos en animales neuropáticos. B. Tiempo Total de observación del efecto de salino y ketamina expresado en segundos. ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\*\*\*) $p < 0.001$ ).

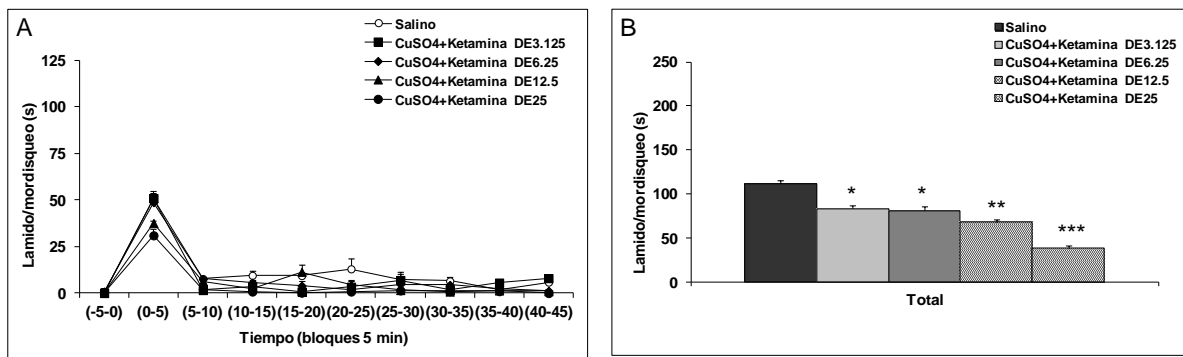
### Efecto antinociceptivo de la administración de la asociación CuSO<sub>4</sub>/Ketamina en el test de formalina intraplantar

**Ratones sanos:** La administración de la asociación de CuSO<sub>4</sub> y ketamina en animales sanos en proporciones equiefectivas de la dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) del total de efecto observado durante 45 minutos, produjo una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva (Fig. 9A y 9B). Para el Tiempo Total de observación, la asociación CuSO<sub>4</sub>/ketamina en proporción de un 1/16 de la DE<sub>50</sub> produjo una respuesta nociceptiva de  $172.8 \pm 8.8$  s ( $p < 0.001$ ), para 1/8, 1/4, y 1/2 de la DE<sub>50</sub> se obtuvieron valores de lamido/mordisqueo de  $126.2 \pm 5.6$  s ( $p < 0.001$ ),  $84.6 \pm 6.3$  s ( $p < 0.001$ ) y  $65.0 \pm 3.8$  s ( $p < 0.001$ ), respectivamente, (n=5), todos ellos significativamente diferentes del control.



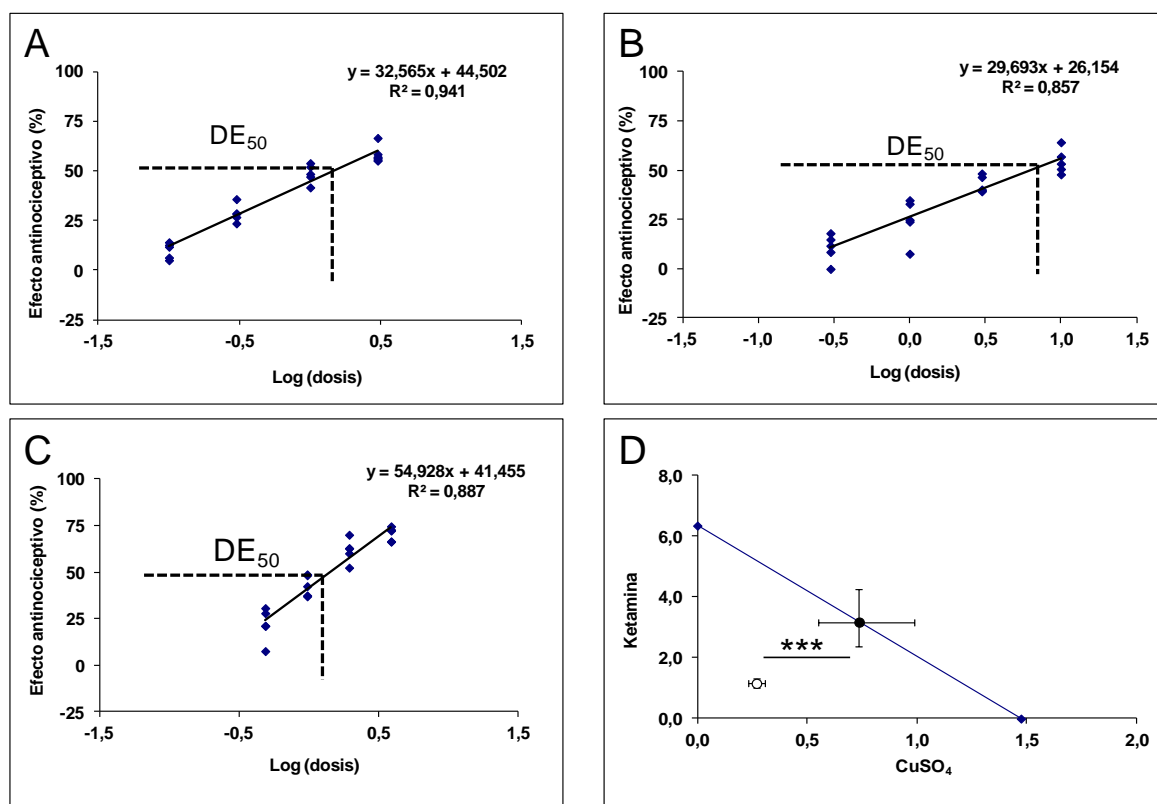
**Fig. 9. A.** Curso temporal del efecto de salino y de la asociación de CuSO<sub>4</sub>/ketamina en el tiempo de lamido/mordisqueo expresado en segundos en animales sanos. **B.** Tiempo Total de observación del efecto de salino y CuSO<sub>4</sub>/ketamina expresado en segundos. ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\*\*\*) p < 0.001).

**Ratones neuropáticos:** La administración de la asociación de CuSO<sub>4</sub> y ketamina en proporciones equiefectivas de la DE<sub>50</sub> del total de efecto observado en animales neuropáticos, produjo una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva (Fig. 10A y 10B). Para el tiempo total de observación, la asociación CuSO<sub>4</sub>/ketamina en proporción de un 1/16 de la DE<sub>50</sub> produjo una respuesta nociceptiva de 82.8 ± 3.6 s (p < 0.05), para 1/8, 1/4, y 1/2 de la DE<sub>50</sub> se obtuvieron valores de lamido/mordisqueo de 80.8 ± 6.0 s (p < 0.05), 67.6 ± 8.4 s (p < 0.01) y 38.2 ± 4.4 s (p < 0.001), respectivamente, (n=5), todos ellos significativamente diferentes del control.



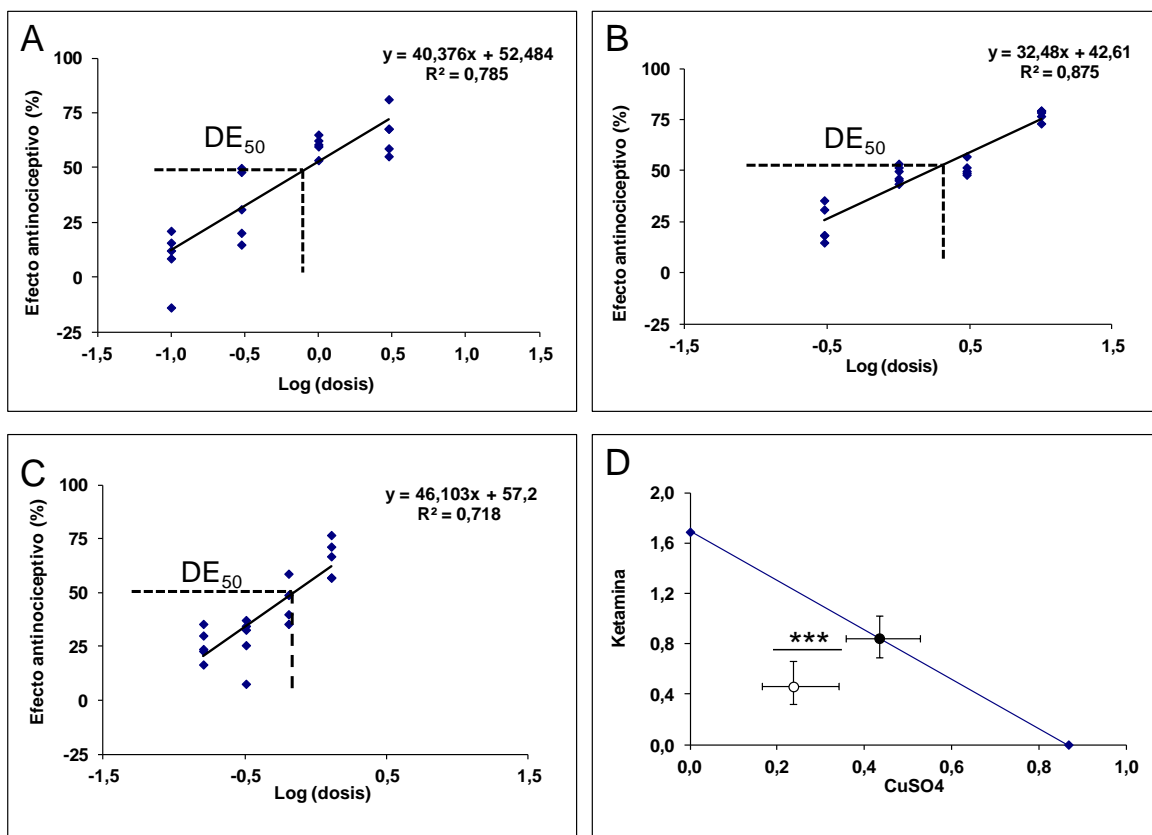
**Fig. 10. A.** Curso temporal del efecto de salino y de la asociación de CuSO<sub>4</sub>/ketamina en el tiempo de lamido/mordisqueo expresado en segundos en animales neuropáticos. **B.** Tiempo Total de observación del efecto de salino y CuSO<sub>4</sub>/ketamina expresado en segundos en animales neuropáticos. ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001).

**Cálculo DE<sub>50</sub>:** A partir de los datos de efecto antinociceptivo obtenidos con las distintas dosis crecientes de CuSO<sub>4</sub> y ketamina administrada en animales sanos, se realizó el cálculo de la DE<sub>50</sub>, la que para CuSO<sub>4</sub> fue de 1.48 mg/kg con un intervalo de confianza de 95% entre 1.21 mg/kg y 1.79 mg/kg y la DE<sub>50</sub> para ketamina fue de 6.36 mg/kg con un intervalo de confianza de 95% entre 4.10 mg/kg y de 9.86 mg/kg (Fig. 11A y 11B). Se calculó la DE<sub>50</sub> de la combinación de CuSO<sub>4</sub> y ketamina. Esta fue de 1.43 mg/kg con un intervalo de confianza de 95% entre 1.24 mg/kg y de 1.65 mg/kg (Fig. 11C). Al realizar el análisis isoblográfico para analizar la posible interacción entre CuSO<sub>4</sub> y ketamina, en el test intraplantar se observó un efecto supraaditivo de esta asociación en relación a la administración de cada fármaco por separado, ya que el punto experimental difiere significativamente del área de aditividad ( $p < 0.001$ ), con un índice de interacción de 0.365 (Fig. 11D).



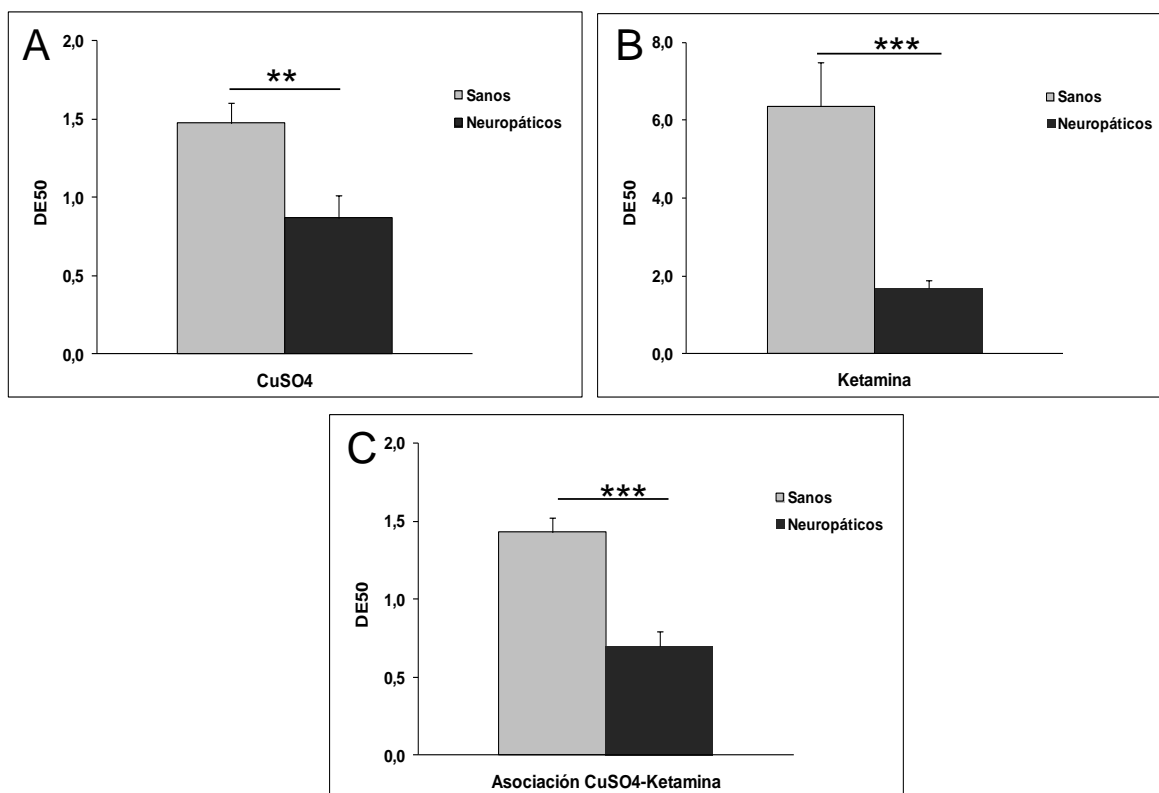
**Fig. 11.** Curvas dosis- respuesta del efecto antinociceptivo de (A) CuSO<sub>4</sub>, (B) ketamina, (C) CuSO<sub>4</sub>/ketamina en animales sanos expresado en log de la dosis. Con línea punteada las DE<sub>50</sub>. D. Isoblograma representativo de la interacción CuSO<sub>4</sub>/ketamina en animales sanos, para el Tiempo Total de observación del test de formalina intraplantar. El círculo lleno representa el punto de aditividad teórica de la mezcla, y el círculo vacío corresponde al punto experimental. Prueba t de student (\*\*\*) $p < 0.001$ .

Un estudio similar se realizó para los animales neuropáticos, donde la  $DE_{50}$  para el  $CuSO_4$  fue de 0.87 mg/kg con un intervalo de confianza de 95% entre 0.58 mg/kg y 1.29 mg/kg y la  $DE_{50}$  para ketamina que fue de 1.69 mg/kg con un intervalo de confianza de 95% entre 1.34 mg/kg y 2.14 mg/kg (Figura 12A y 12B). Se calculó la  $DE_{50}$  de la combinación de  $CuSO_4$  y ketamina. Esta fue de 0.70 mg/kg con un intervalo de confianza de 95% entre 0.49 mg/kg y 1.00 mg/kg (Fig. 12C). Al realizar el análisis isoblográfico se observó un efecto supraaditivo de esta asociación en relación a cada fármaco por separado ( $p < 0.001$ ), con un índice de interacción de 0.546 (Fig. 12D).



**Fig. 12.** Curvas dosis- respuesta del efecto antinociceptivo de (A)  $CuSO_4$ , (B) ketamina, (C)  $CuSO_4$ /ketamina en animales neuropáticos expresado en log de la dosis. Con línea punteada las  $DE_{50}$ . D. Isoblograma representativo de la interacción  $CuSO_4$ /ketamina en animales neuropáticos, para el Tiempo Total de observación del test de formalina intraplantar. El círculo lleno representa el punto de aditividad teórica de la mezcla, y el círculo vacío corresponde al punto experimental. Prueba t de student (\*\*\*) $p < 0.001$ ).

Tanto las ED<sub>50</sub> del CuSO<sub>4</sub> como la ketamina mostraron ser estadísticamente diferentes entre los animales sanos respecto a los neuropáticos (Fig. 13A y 13B respectivamente). Esta misma diferencia entre los animales sanos y neuropáticos queda de manifiesto cuando se comparó la asociación entre CuSO<sub>4</sub> y ketamina, mostrando que los mismos efectos antinociceptivos se obtienen con menores concentraciones de cobre y ketamina en animales neuropáticos (p<0.001) (Fig. 13C).

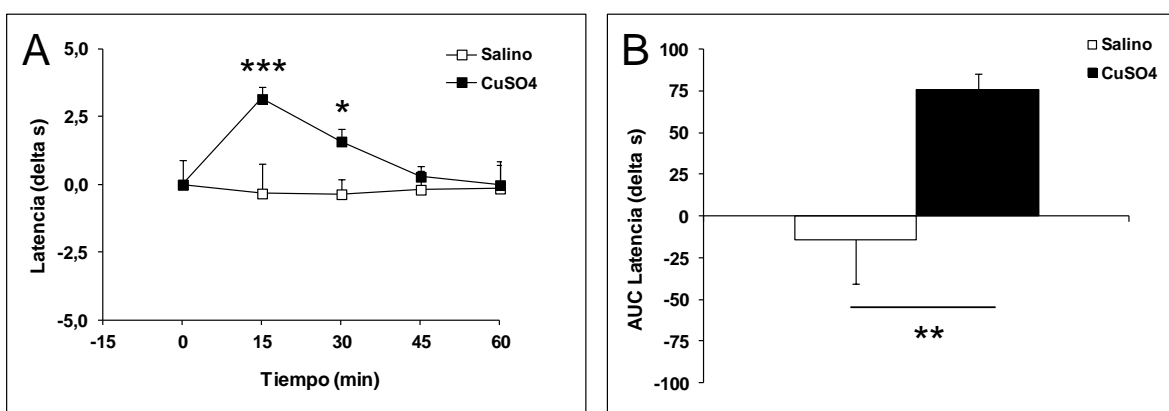


**Fig. 13.** Efecto antinociceptivo de la administración de **A.** CuSO<sub>4</sub> (DE<sub>50</sub> =1.48 mg/kg vs 0.87 mg/kg); **B.** Ketamina (DE<sub>50</sub> = 6.36 mg/kg vs 1.69 mg/kg) y **C.** CuSO<sub>4</sub>/ketamina (DE<sub>50</sub> = 1.43 mg/kg vs 0.70 mg/kg) en ratones sanos y neuropáticos en el test de formalina intraplantar. Comparaciones estadísticas mediante t de student (\*\* p<0.01; \*\*\*p<0.001).

### **Duración del efecto antinociceptivo del sulfato de cobre evaluado en el test de *hot plate***

Se estudió la duración del efecto del sulfato de cobre en ratones con neuropatía espinal realizada mediante sección del nervio sural y los animales se evaluaron mediante el *test de hot plate*. La evaluación se realizó como se describió anteriormente. El día 14 post-cirugía se administró CuSO<sub>4</sub> 0.87 mg/kg i.p. y se realizaron mediciones sucesivas mediante *hot plate* a

los 15, 30, 45 y 60 min. post administración de  $\text{CuSO}_4$ . Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo con  $\text{CuSO}_4$  a los 15 minutos ( $p < 0.001$ ) y 30 minutos ( $p < 0.05$ ) post-administración del tratamiento (Figura 14 A). El área bajo la curva de los datos obtenidos entre el grupo de salino y  $\text{CuSO}_4$  mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) ( $n=6$ ) (Fig. 14B).



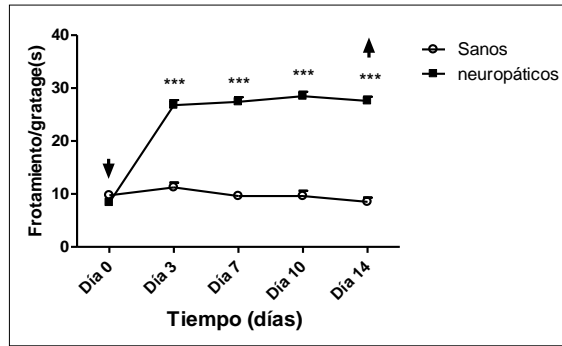
**Fig. 14. A.** Duración del efecto de la administración de la  $\text{DE}_{50}$  de  $\text{CuSO}_4$  en el transcurso del tiempo, con los valores de latencia correspondientes al delta en segundos. ANOVA de medidas repetidas seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni ( $*p < 0.05$ ;  $***p < 0.001$ ). **B.** Área bajo la curva obtenida con la administración de la  $\text{DE}_{50}$  de  $\text{CuSO}_4$  durante 60 minutos. Prueba t de student ( $**p < 0.01$ ).

## 2. Efecto antinociceptivo del sulfato de cobre sobre ratones con neuropatía trigeminal

### Desarrollo y evaluación de la neuropatía trigeminal (ligadura parcial del nervio infraorbitario)

**Evaluación nociceptiva térmica (test de alodinia al frío):** Antes de inducir la neuropatía, se midió la alodinia al frío mediante el test de acetona al 90%, determinado por los tiempos de frotamiento/*gratage* en segundos (día 0, previo a la cirugía), de todos los ratones. Posteriormente los animales se dividieron en dos grupos, el grupo que sufrirían la ligadura del nervio infraorbitario y de aquellos que no (sanos). No hubo diferencias significativas entre ellos. Los ratones sanos y operados fueron evaluados en el test de alodinia al frío los días 3, 7, 10 y 14 posteriores a la cirugía. Los ratones con neuropatía del nervio infraorbitario mostraron respuestas nociceptivas significativamente mayores que aquellas de los ratones sanos ( $p < 0.001$ ) (Fig. 15).

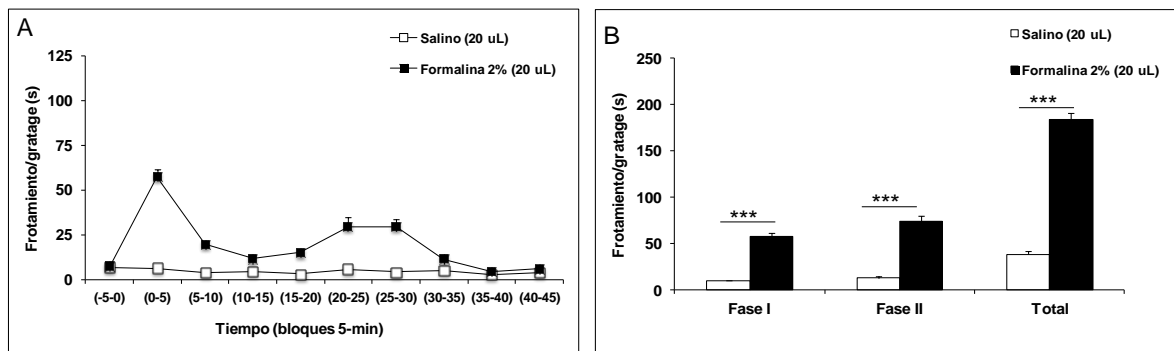




**Fig. 15.** Efecto de la ligadura parcial del nervio infraorbitario en la evolución temporal de la alodinia producida por frío. Los valores son el promedio  $\pm$  SEM ( $n=8$  para el grupo sano,  $n=73$  para el grupo neuropático). ANOVA de medidas repetidas seguido de test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\*\*\*) $p<0.001$ ).

### Evaluación nociceptiva química (*test de formalina*):

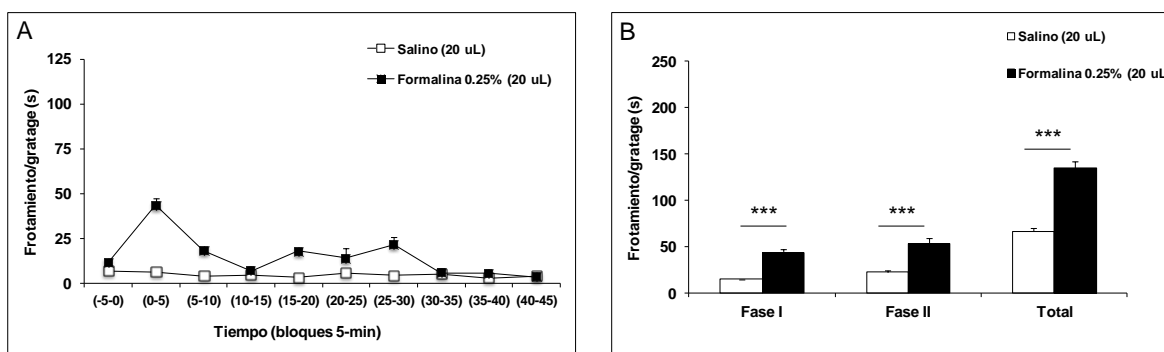
**Ratones sanos:** La administración orofacial de 20  $\mu$ L de salino produjo una conducta de frotamiento y *gratage* en la Fase I de  $9.8 \pm 1.4$  s, en la Fase II:  $12.8 \pm 1.7$  s, y en el Tiempo Total de observación de  $38.5 \pm 1.9$  s ( $n=5$ ). La administración de formalina orofacial al 2% produjo una conducta nociceptiva de frotamiento y *gratage* (Fig. 16A) ( $n=6$ ), en la Fase I de  $57.3 \pm 4.9$  s, en la Fase II de  $73.8 \pm 3.6$  s y para el Tiempo Total de observación de  $183.5 \pm 9.7$  s. (Fig. 16B). El efecto nociceptivo inducido por formalina fue significativamente diferente al de suero fisiológico en las Fase I ( $p<0.001$ ), Fase II ( $p<0.001$ ) y el Tiempo Total ( $p<0.001$ ).



**Fig. 16. A.** Curso temporal del tiempo de frotamiento/*gratage* expresado en segundos, observado con la administración de suero fisiológico 0.9 % sin y con formalina. **B.** Respuesta nociceptiva medida por tiempo de frotamiento/*gratage* en la Fase I (0-5 min.), Fase II (15-30 min.) y Tiempo Total de observación (0-45 min.) de salino, sin y con formalina (\*\*\*) $p<0.001$ ).

Ambos grupos de animales sanos recibieron suero fisiológico subcutáneo para poder compararlos con la administración de los fármacos en el curso temporal de la respuesta nociceptiva y en las diferentes fases del test de formalina.

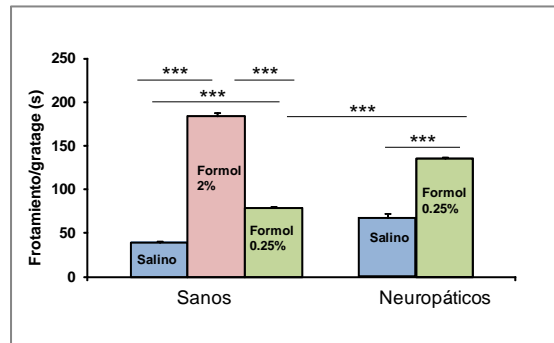
**Ratones neuropáticos:** En los animales neuropáticos la administración orofacial de 20  $\mu$ L de salino produjo una conducta de frotamiento/*gratage* en la Fase I de  $14.6 \pm 0.5$  s, en la Fase II:  $22.6 \pm 3.9$  s, y en el Tiempo Total de observación de  $66.6 \pm 5.4$  s (n=5). La administración de formalina orofacial al 0.25% en 20  $\mu$ L produjo una conducta nociceptiva de frotamiento/*gratage*, para un total de 5 animales, en la Fase I de  $43.2 \pm 0.8$  s, en la Fase II de  $53.0 \pm 2.8$  s y para el Tiempo Total de observación de  $134.8 \pm 2.6$  s. El efecto nociceptivo inducido por formalina fue significativamente diferente de salino en las Fase I ( $p < 0.001$ ), Fase II ( $p < 0.001$ ) y el Tiempo Total ( $p < 0.001$ ). Ambos grupos de animales recibieron suero fisiológico subcutáneo para poder compararlos con la administración de los fármacos en el curso temporal de la respuesta nociceptiva (Fig. 17A) y en las diferentes fases del test de formalina (Fig. 17B).



**Fig. 17. A.** Curso temporal del tiempo de frotamiento/*gratage* expresado en segundos, observado con la administración de suero fisiológico 0.9 % sin y con formalina en animales neuropáticos. **B.** Respuesta nociceptiva medida por tiempo de frotamiento/*gratage* en la Fase I (0-5 min.), Fase II (15-30 min.) y Tiempo Total de observación (0-45 min.) de salino, sin y con formalina en ratones neuropáticos (\*\* $p < 0.001$ ).

Se comparó el efecto de la administración de formalina al 0.25%, en ratones sanos con la misma concentración de formalina que en animales neuropáticos, obteniéndose una mayor respuesta nociceptiva en animales neuropáticos en el Tiempo Total de observación ( $134.8 \pm 2.6$  s) comparado con  $78.8 \pm 5.1$  s obtenido en los animales sanos ( $p < 0.001$ ) (n=5). La

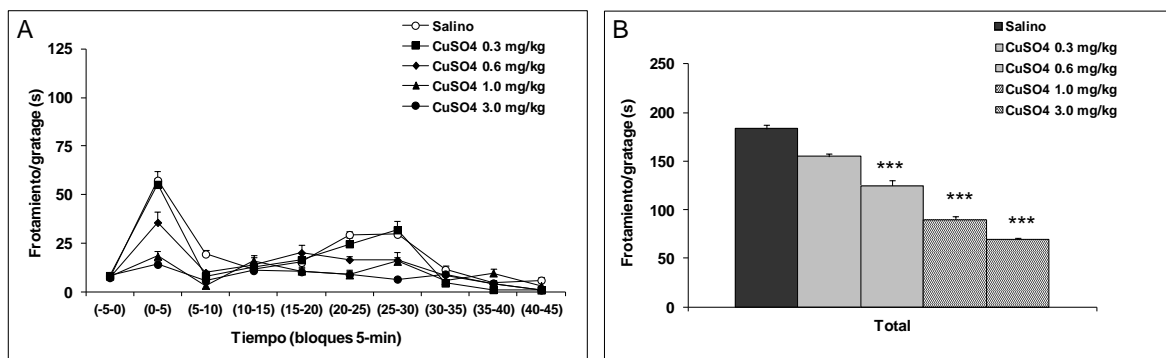
respuesta nociceptiva inducida por formalina fue significativamente diferente de salino, tanto en animales sanos como neuropáticos ( $p < 0.001$ ) ( $n = 5$ ). La concentración de formalina al 2% en los animales sanos fue significativamente diferente de la concentración de 0.25% ( $p < 0.001$ ) ( $n = 6$ ), y en animales neuropáticos no fue utilizada ya que produjo una conducta de tipo *freezing* que no permite ser cuantificada (Fig. 18).



**Fig. 18.** Efecto de la administración de las diferentes concentraciones de formalina en ratones sanos y neuropáticos, expresados como tiempo de frotamiento/*gratage* del Tiempo Total de observación del test de formalina orofacial (\*\* $p < 0.001$ ).

### Efecto antinociceptivo de la administración de sulfato de cobre en el test de la formalina orofacial

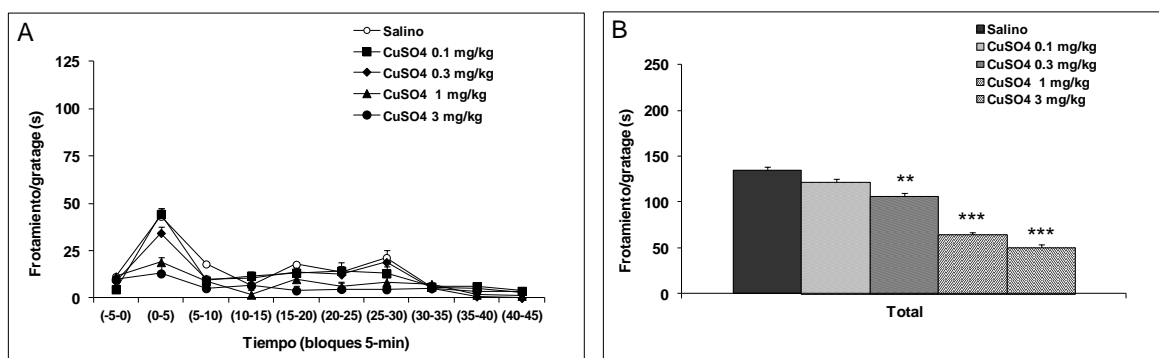
**Ratones sanos:** La administración de  $\text{CuSO}_4$  produjo en animales sanos una disminución dosis dependiente de la conducta nociceptiva de frotamiento/*gratage* inducida por formalina (Fig. 19A y 19B).



**Fig. 19. A.** Curso temporal del tiempo de frotamiento/*gratage* expresado en segundos, observado con la administración de salino y las diferentes dosis de  $\text{CuSO}_4$ . **B.** Disminución dosis dependiente del frotamiento/*gratage* observado con la administración de salino y  $\text{CuSO}_4$  en el Tiempo total de observación. ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\*\* $p < 0.001$ ).

Para el Tiempo Total de observación, las dosis de  $\text{CuSO}_4$  de 0.3, 0.6, 1 y 3 mg/kg, produjeron respuestas nociceptivas en segundos de  $155.0 \pm 5.6$  s (NS),  $125.0 \pm 11.0$  s ( $p < 0.001$ ),  $90.4 \pm 6.8$  s ( $p < 0.001$ ) y  $69.8 \pm 5.2$  s ( $p < 0.001$ ), respectivamente ( $n=5$ ), siendo las tres dosis más altas significativamente distintas respecto al control que fue de  $183.5 \pm 9.7$ s.

**Ratones neuropáticos:** La administración de  $\text{CuSO}_4$  en los animales neuropáticos produjo una disminución dosis dependiente de la conducta nociceptiva de frotamiento/*gratage* inducida por formalina 0.25% (Fig. 20A y 20B). Para el Tiempo Total de observación se obtuvieron respuestas nociceptivas en segundos para las dosis de  $\text{CuSO}_4$  de 0.1, 0.3, 1 y 3 mg/kg, de  $122.2 \pm 6.7$  s (NS),  $106.4 \pm 1.7$  s ( $p < 0.01$ ),  $64.4 \pm 5.4$  s ( $p < 0.001$ ) y  $50.6 \pm 7.1$  s ( $p < 0.001$ ), respectivamente ( $n=5$ ), siendo las tres dosis más altas significativamente distintas respecto al control que fue de  $134.8 \pm 2.6$  s.

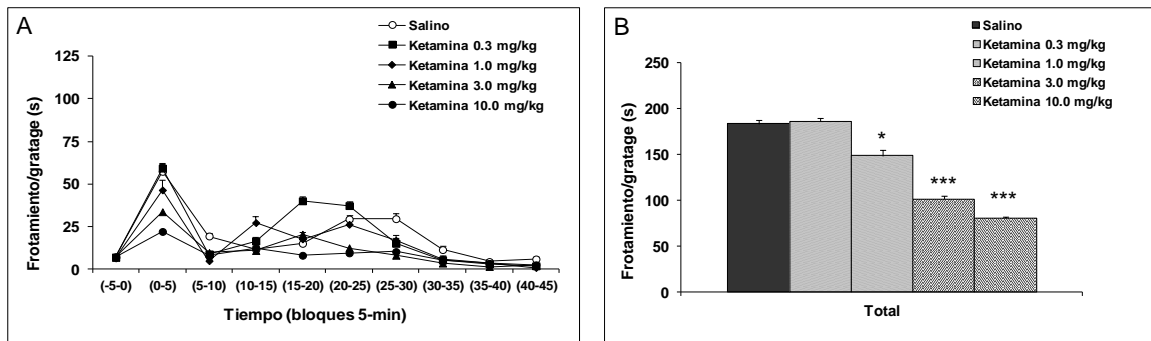


**Fig. 20.** **A.** Curso temporal del tiempo de frotamiento/*gratage* expresado en segundos, observado con la administración de salino y las diferentes dosis de  $\text{CuSO}_4$ . **B.** Disminución dosis dependiente del tiempo de frotamiento/*gratage* observado con la administración de suero fisiológico y las distintas dosis de  $\text{CuSO}_4$  en el Tiempo Total de observación. ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

### Efecto antinociceptivo de la administración de ketamina en el test de la formalina orofacial

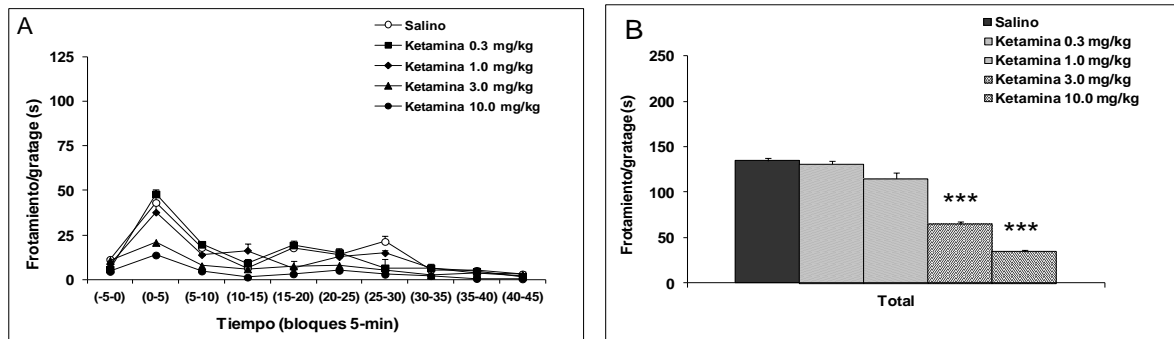
**Ratones sanos:** La administración de ketamina produjo una disminución dosis dependiente de la conducta nociceptiva de frotamiento/*gratage* (Fig. 21A y 21B) en animales sanos. Para el Tiempo Total de observación del test de formalina orofacial se obtuvieron respuestas nociceptivas con las dosis de ketamina de 0.3, 1, 3 y 10 mg/kg de  $186.6 \pm 7.8$  s (NS),  $148.8 \pm$

4.0 s ( $p < 0.05$ ),  $101.6 \pm 4.4$  s ( $p < 0.001$ ) y  $80.4 \pm 4.2$  s ( $p < 0.001$ ), respectivamente ( $n=5$ ), siendo las tres dosis más altas significativamente distintas respecto al control.



**Fig. 21. A.** Curso temporal del tiempo de frotamiento/*gratage* expresado en segundos, observado con la administración de salino y las diferentes dosis de ketamina en animales sanos. **B.** Disminución dosis dependiente de la conducta nociceptiva observada con la administración de salino y las distintas dosis de ketamina en el Tiempo Total de observación. ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

**Ratones neuropáticos:** La administración de ketamina en animales neuropáticos produjo una disminución dosis dependiente de la conducta nociceptiva de frotamiento/*gratage* (Fig. 22A y 22B).



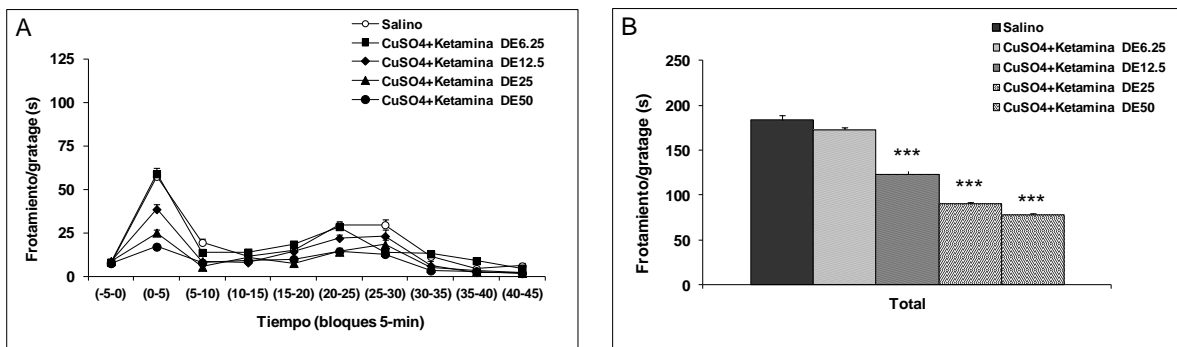
**Fig. 22. A.** Curso temporal del tiempo de frotamiento/*gratage*, observado con la administración de salino y las diferentes dosis de ketamina en animales neuropáticos. **B.** Efecto dosis dependiente de la conducta nociceptiva observada con la administración de salino y las distintas dosis de ketamina en el Tiempo Total de observación. ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\*\*\* $p < 0.001$ ).

Para la fase total de observación las dosis de ketamina de 0.3, 1, 3 y 10 mg/kg produjeron en el test de la formalina orofacial, respuestas nociceptivas de  $131.2 \pm 8.2$  s (NS),

115.2 ± 5.6 s (NS), 64.8 ± 3.1 s (p< 0.001) y 34.6 ± 1.6 s (p< 0.001), respectivamente (n=5), siendo las dos dosis más altas significativamente distintas respecto al control.

### Efecto antinociceptivo de la administración de la asociación CuSO<sub>4</sub>/ketamina en el test de formalina orofacial

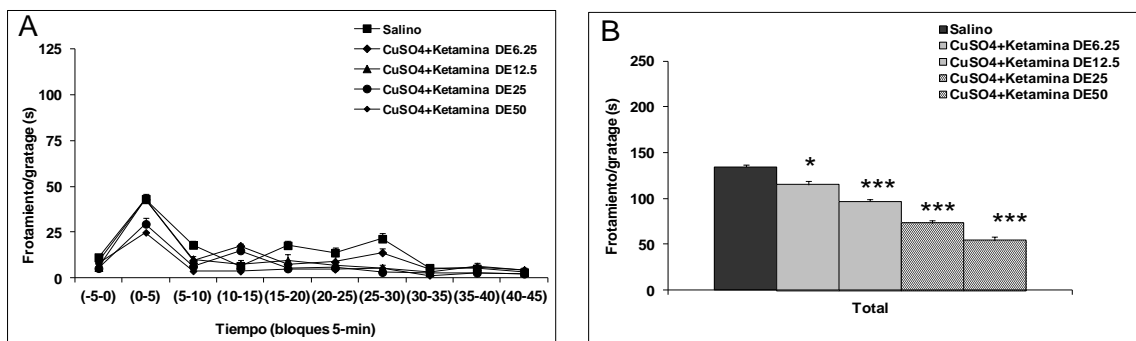
**Ratones sanos:** La administración de la asociación de CuSO<sub>4</sub> y ketamina en proporciones equiefectivas de la dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>), en animales sanos produjo una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva (Fig. 23A y 23B). Para el Tiempo Total de observación, la asociación CuSO<sub>4</sub>/ketamina en proporción de un 1/8 de la DE<sub>50</sub> produjo una respuesta nociceptiva de 172.8 ± 5.0 s (NS), para 1/4, 1/2, y la DE<sub>50</sub> se obtuvieron valores de frotamiento/*gratage* de 123.4 ± 6.4 s (p<0.001), 90.3 ± 8.1 s (p<0.001) y 77.9 ± 5.1 s (p<0.001), respectivamente, (n=5), siendo las tres dosis más altas significativamente diferentes del control.



**Fig. 23. A.** Curso temporal del tiempo de frotamiento/*gratage*, observado con la administración de salino y las diferentes dosis en proporciones de la DE<sub>50</sub> de la asociación de CuSO<sub>4</sub> y ketamina en ratones sanos. **B.** Efecto dosis dependiente de la conducta nociceptiva observada con la administración de salino y las distintas dosis en proporciones de la DE<sub>50</sub> de la asociación de CuSO<sub>4</sub> y ketamina en el Tiempo Total de observación. ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\*\*\*p< 0.001).

**Ratones neuropáticos:** La administración de la asociación de CuSO<sub>4</sub> y ketamina en animales neuropáticos en proporciones equiefectivas de la dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>), produjo una disminución dosis-dependiente de la respuesta nociceptiva (Fig. 24A y 24B). Para el Tiempo Total de observación, la asociación CuSO<sub>4</sub>- ketamina en proporción de un 1/8 de la DE<sub>50</sub> produjo una respuesta nociceptiva de 115.3 ± 6.0 s (p<0.05), para 1/4, 1/2, y la DE<sub>50</sub> se

obtuvieron valores de frotamiento/*gratage* de  $96.7 \pm 2.9$  s ( $p < 0.001$ ),  $73.0 \pm 1.4$  s ( $p < 0.001$ ) y  $54.0 \pm 4.3$  s ( $p < 0.001$ ), respectivamente, ( $n=7$ ), todos ellos significativamente diferentes del control.

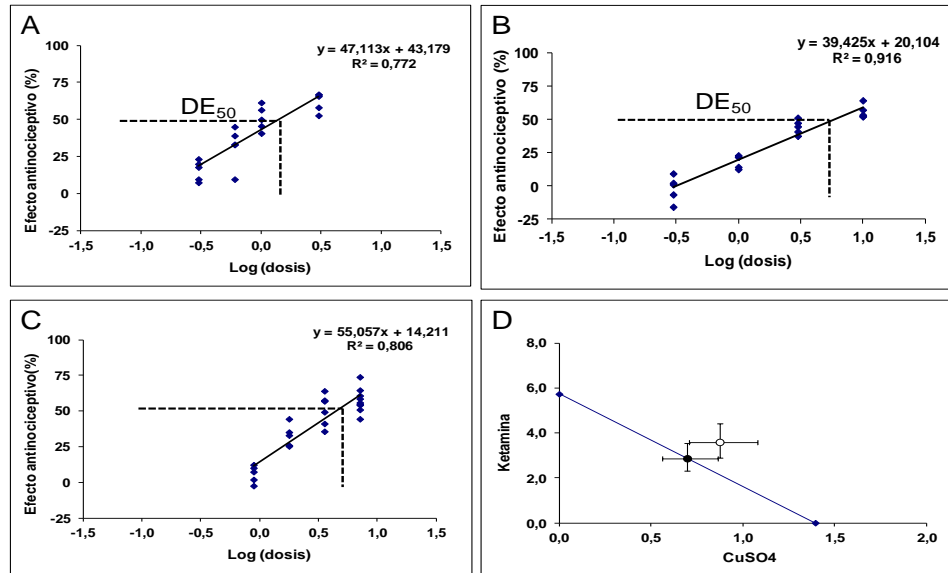


**Fig. 24.** A. Curso temporal del tiempo de frotamiento/*gratage*, observado con la administración de salino y las diferentes dosis en proporciones de la DE<sub>50</sub> de la asociación de CuSO<sub>4</sub> y ketamina. B. Disminución dosis dependiente de la conducta nociceptiva observada con la administración de salino y las distintas dosis en proporciones de la DE<sub>50</sub> de la asociación de CuSO<sub>4</sub> y ketamina en el Tiempo Total de observación. ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

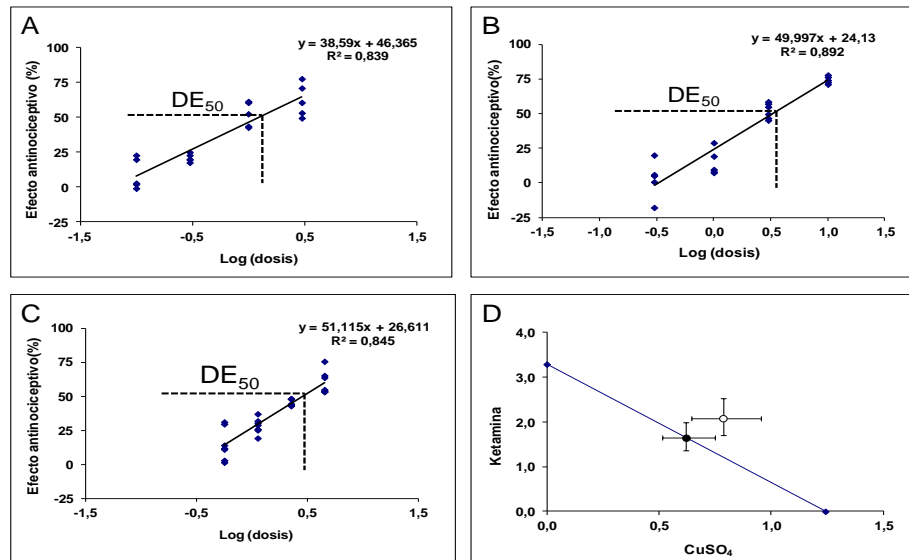
**Cálculo DE<sub>50</sub>:** A partir de los datos de efecto antinociceptivo obtenidos con las distintas dosis crecientes de CuSO<sub>4</sub> y ketamina, se realizó el cálculo de la DE<sub>50</sub>, la que para CuSO<sub>4</sub> fue de 1.40 mg/kg con un intervalo de confianza de 95% entre 1.02 mg/kg y 1.91 mg/kg y la DE<sub>50</sub> para ketamina fue de 5.73 mg/kg con un intervalo de confianza de 95% entre 4.26 mg/kg y de 7.72 mg/kg (Fig. 25A y 25B). Se calculó la DE<sub>50</sub> de la combinación de CuSO<sub>4</sub> y ketamina. Esta fue de 4.47 mg/kg con un intervalo de confianza de 95% entre 3.62 mg/kg y de 5.51 mg/kg (Fig. 25C). Al realizar el análisis isoblográfico se observó un efecto de tipo aditivo de esta asociación en relación a cada fármaco por separado (NS), con un índice de interacción de 1.254 (Fig. 25D).

Un estudio similar se realizó para los animales neuropáticos, donde la DE<sub>50</sub>, para CuSO<sub>4</sub> fue de 1.24 mg/kg con un intervalo de confianza de 95% entre 0.85 mg/kg y 1.82 mg/kg y la DE<sub>50</sub> para ketamina fue de 3.29 mg/kg con un intervalo de confianza de 95% entre 2.55 mg/kg y de 4.26 mg/kg (Fig. 26A y 26B). Se calculó la DE<sub>50</sub> de la combinación de CuSO<sub>4</sub> y ketamina. Esta fue de 2.87 mg/kg con un intervalo de confianza de 95% entre 2.36 mg/kg y de 3.49 mg/kg (Fig. 26C). Al realizar el análisis isoblográfico se observó un efecto

de tipo aditivo de esta asociación en relación a cada fármaco por separado (NS), con un índice de interacción de 1.265 (Fig. 26D).



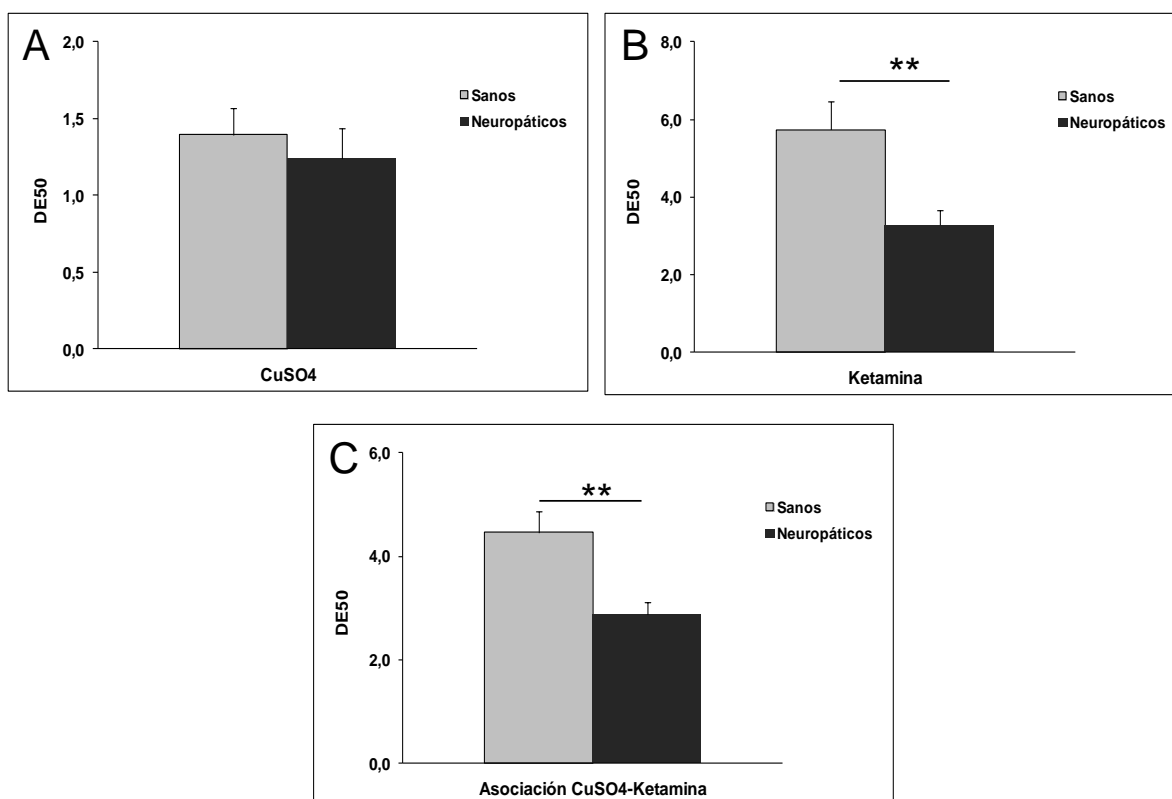
**Fig. 25.** Curvas dosis- respuesta del efecto antinociceptivo de (A) CuSO<sub>4</sub>, (B) ketamina, (C) CuSO<sub>4</sub>/ketamina en log de la dosis en animales sanos. Con línea punteada las DE<sub>50</sub>. **D.** Isoblograma de la interacción CuSO<sub>4</sub>/ketamina, para el Tiempo Total de observación del test de formalina. El círculo lleno representa el punto de aditividad teórica de la mezcla, y el círculo vacío corresponde al punto experimental. Prueba t de student (NS).



**Fig. 26.** Curvas dosis- respuesta del efecto antinociceptivo de (A) CuSO<sub>4</sub>, (B) ketamina, (C) CuSO<sub>4</sub>/ketamina en log de la dosis en animales neuropáticos. Con línea punteada las DE<sub>50</sub>. **D.** Isoblograma de la interacción CuSO<sub>4</sub>/ketamina, para el Tiempo Total de observación del test de formalina. El círculo lleno representa el punto de aditividad teórica de la mezcla, y el círculo vacío corresponde al punto experimental. Prueba t de student (NS).



La acción antinociceptiva de cobre en animales sanos comparada a animales neuropáticos no dio resultados estadísticamente diferentes al comparar las  $DE_{50}$  del  $CuSO_4$  (Fig. 27A). Si hubo diferencias estadísticas al comparar las  $DE_{50}$  de la ketamina entre animales sanos y neuropáticos (27B), y las  $DE_{50}$  de la asociación  $CuSO_4$ /ketamina (Fig 27C), con una significancia de  $p < 0.01$ .

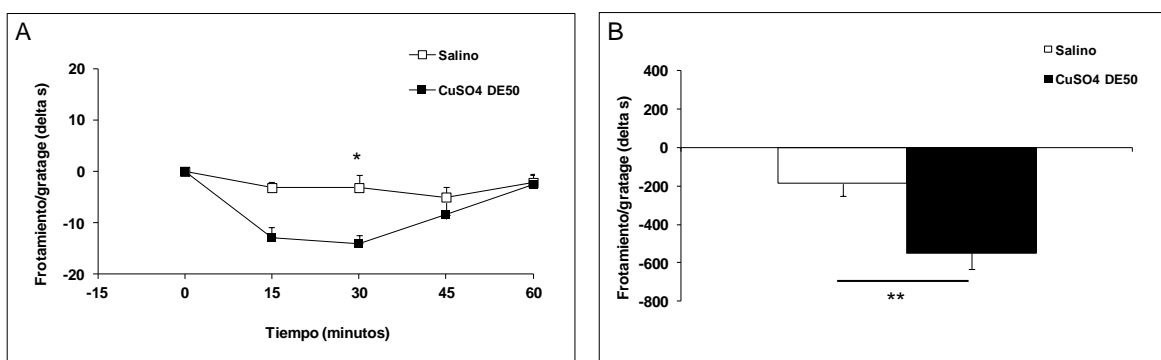


**Fig. 27.** A. Efecto antinociceptivo de la administración de  $CuSO_4$  en ratones sanos y neuropáticos en el test de formalina orofacial ( $DE_{50} = 1.40$  mg/kg vs 1.24 mg/kg). B. Efecto antinociceptivo de la administración de ketamina en ratones sanos y neuropáticos ( $DE_{50} = 5.73$  mg/kg vs 3.29 mg/kg). C. Efecto antinociceptivo de la administración de la asociación  $CuSO_4$ - ketamina en ratones sanos y neuropáticos ( $DE_{50} = 4.47$  mg/kg vs 2.87 mg/kg). Comparaciones estadísticas mediante t de student (\*\*  $p < 0.01$ ).

### **Duración del efecto antinociceptivo del sulfato de cobre evaluado en el test de alodinia al frío.**

Se estudió la duración del efecto del  $CuSO_4$  en ratones con neuropatía trigeminal realizada mediante ligadura parcial del nervio infraorbitario. Se realizaron las mismas mediciones mediante test de acetona orofacial previo a la cirugía y a los 3, 7, 10 y 14 días para

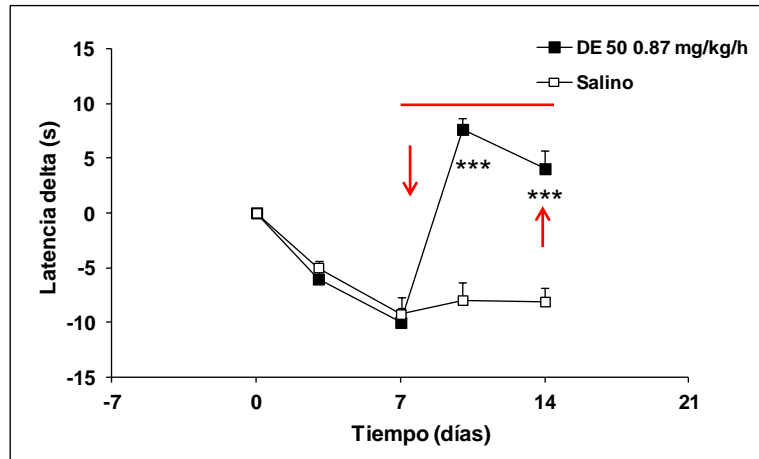
evaluar la instauración de la neuropatía. Los animales fueron utilizados al día 14 para el experimento y se realizaron mediciones sucesivas mediante test de acetona al 90% cada 15 minutos para evaluar la evolución de los tiempos de frotamiento/*gratage*, en el transcurso del tiempo, en ratones con salino y otro grupo con la DE<sub>50</sub> de CuSO<sub>4</sub> correspondiente a los animales neuropáticos (1.24 mg/kg) y se encontraron diferencias significativas con el grupo salino a los 30 minutos de medición (Fig. 28 A). El área bajo la curva de los delta obtenidos entre el grupo de salino y con CuSO<sub>4</sub> mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) (n= 6) (Fig. 28B).



**Fig. 28. A.** Duración del efecto de la administración de la DE<sub>50</sub> de CuSO<sub>4</sub> en el transcurso del tiempo expresado como delta en segundos de la respuesta de frotamiento/*gratage* en el test de formalina orofacial. ANOVA de medidas repetidas seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\* $p < 0.05$ ). **B.** Área bajo la curva expresada en delta en segundos de la respuesta de frotamiento/*gratage*, obtenida con la administración de la DE<sub>50</sub> de CuSO<sub>4</sub>. Prueba t de student (\*\* $p < 0.01$ ).

### 3. Evaluación del efecto antinociceptivo de la administración crónica de CuSO<sub>4</sub> en el modelo de neuropatía espinal.

Se estudió el efecto antinociceptivo de la administración crónica de CuSO<sub>4</sub> mediante la infusión por bombas *Alzet* en ratones con neuropatía espinal a través del test de *hot plate*. Se observó un aumento del tiempo de latencia, expresado como delta en segundos, entre los días 7 y 14 post-cirugía, días en los que los animales recibieron la dosis de CuSO<sub>4</sub> en forma crónica, correspondiente a la DE<sub>50</sub> (0.87 mg/kg/h) (Fig. 29).

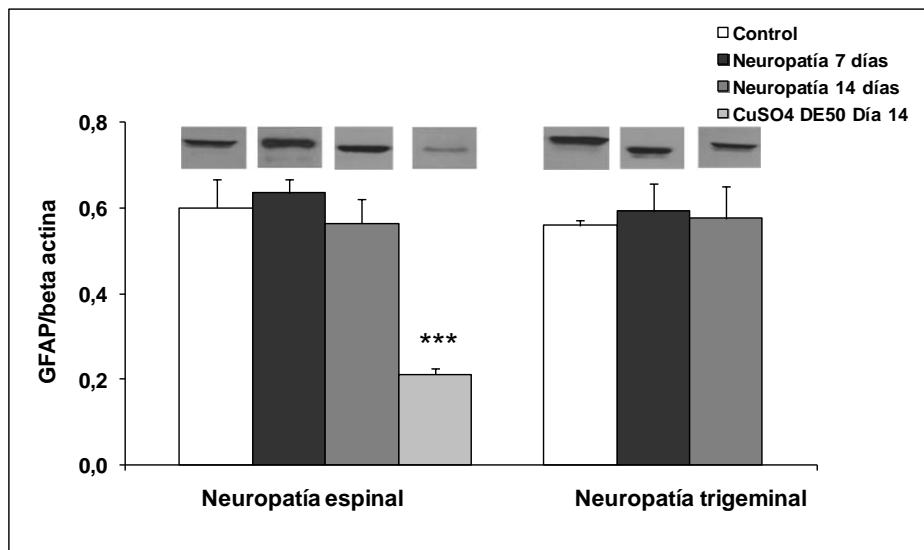


**Fig. 29.** Efecto antinociceptivo de la administración crónica de la DE<sub>50</sub>/h de CuSO<sub>4</sub> en el test de *hot-plate*. La línea roja indica el tiempo que la bomba *Alzet* entregó el CuSO<sub>4</sub>. Anova de medidas repetidas seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\*\*\*) $p < 0.001$ .

#### 4. Medición de la actividad glial mediante la cuantificación de la proteína GFAP en los dos modelos neuropáticos y con la administración crónica de CuSO<sub>4</sub> en el modelo de neuropatía espinal.

Se estudió la expresión del marcador astrocitario GFAP en ratones con neuropatía espinal y trigeminal realizando la cuantificación a partir de médula espinal y tronco encéfalo, respectivamente, a los 7 y 14 días post-cirugía. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos controles y los animales neuropáticos (NS) (n= 6).

Posteriormente, se estudió el efecto de la administración crónica mediante bomba *Alzet* de la DE<sub>50</sub> (0.87 mg/kg/h) de CuSO<sub>4</sub> entre el día 7 y 14 post cirugía sobre la expresión de GFAP en ratones con neuropatía espinal y se observó una disminución estadísticamente significativa de la expresión de GFAP en las muestras de médula espinal extraídas el día 14 post cirugía ( $p < 0.001$ ) (n=8) (Fig. 30).



**Fig. 30.** Expresión de la proteína GFAP en la médula espinal y tronco encéfalo de animales con neuropatía espinal y trigeminal, respectivamente. Muestras obtenidas a los 7 y 14 días post cirugía. Efecto del  $\text{CuSO}_4$  administrado crónicamente. ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni (\*\*\*) $p < 0.001$ ).

## DISCUSIÓN

El  $\text{Cu}^{2+}$  ha sido estudiado y ha mostrado evidencias de cumplir un rol antinociceptivo en el dolor agudo, sin embargo, en el dolor crónico su participación ha sido escasamente estudiada. El presente trabajo permitió conocer más sobre la participación del  $\text{Cu}^{2+}$  en dos modelos animales de dolor crónico neuropático.

Los presentes resultados mostraron que el  $\text{CuSO}_4$  fue capaz de producir un efecto antinociceptivo dosis dependiente en ambos modelos de dolor neuropático utilizados en el estudio. Lo mismo ocurrió para ketamina y la asociación de ambos fármacos. Esto está de acuerdo a lo esperado ya que es sabido que ketamina al ser un antagonista NMDA actúa disminuyendo la hiperalgesia y alodinia presentes en el dolor crónico (Hocking *et al.*, 2007). El efecto antinociceptivo mostrado por el  $\text{CuSO}_4$  coincide también con lo obtenido en otros estudios como el de Tamba *et al.* (2013) y Gumilar *et al.* (2012), donde también se obtuvieron efectos antinociceptivos de parte del  $\text{Cu}^{2+}$  ya sea en la forma de sales de cobre o como complejos que incluyen  $\text{Cu}^{2+}$  en su composición.

Respecto a la interacción entre  $\text{CuSO}_4$  y ketamina, se obtuvo un efecto de sinergia en el modelo intraplantar, tanto para animales sanos como neuropáticos, lo que da cuenta que a nivel espinal se produce una potenciación del efecto de ambos fármacos, probablemente mediante la interacción de ketamina con el receptor NMDA y a la acción de  $\text{CuSO}_4$  que bloquea este mismo receptor probablemente en otro sitio de unión que ketamina, y posiblemente debido a la acción del  $\text{CuSO}_4$  sobre otros receptores del sistema nervioso involucrados en el dolor crónico como los canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y también receptores GABA, AMPA y purinérgicos P2X4 y P2X7. Por otro lado, en el modelo orofacial se observó sólo un efecto aditivo entre ambos fármacos. Estas distintas interacciones obtenidas mediante isoblograma entre ambos modelos dan cuenta de las diferencias existentes entre el sistema nociceptivo espinal y trigeminal, respecto a la distribución de receptores y mecanismos participantes (Hargreaves *et al.*, 2011). Ya que a pesar que a menudo se ha tendido a relacionar de manera homóloga el sistema trigeminal y espinal, se sabe a raíz de distintos estudios que existen diferencias entre ambos sistemas, a ejemplo, ciertas porciones del

subnúcleo caudalis del núcleo espinal trigeminal están organizadas de manera distinta que el sistema espinal (Bereiter *et al.*, 2000).

Por otro lado, a nivel trigeminal donde se obtuvo una interacción aditiva entre CuSO<sub>4</sub> y ketamina, sus efectos serían de simple sumación posiblemente debido a una distinta localización de receptores y diferencias entre los mecanismos nociceptivos en los que están involucrados estos fármacos (Rang y Dale, 2012; Tallarida, 2001).

Respecto al efecto antinociceptivo obtenido mediante las DE<sub>50</sub>, se puede afirmar que tanto CuSO<sub>4</sub> y ketamina, y la asociación de ambos tuvieron una mayor potencia en la condición neuropática en comparación con los animales sanos, lo que sería indicativo de una mayor sensibilidad a los fármacos bajo esta condición, probablemente debido a las condiciones específicas de activación de receptores, vías de fosforilación, liberación de citoquinas y activación microglial y astrocitaria, que se dan en el dolor neuropático (Basbaum *et al.*, 2009).

Respecto a los porcentajes de efecto antinociceptivo del CuSO<sub>4</sub> obtenidos en el presente estudio estos fueron superiores a los obtenidos por Tamba *et al.* (2013), ya que se obtuvo porcentajes de antinocicepción de hasta 66.1% en el test de formalina intraplantar, mientras que en el test orofacial se obtuvieron porcentajes de hasta 62.5%. En el estudio de Tamba *et al.* (2013) se obtuvieron efectos antinociceptivos de hasta 28.6% en el *hot plate* y *Tail Flick test* y de 57.28% en el *Writhing test*. Al comparar con el estudio de Gumilar *et al.* 2012, quienes estudiaron el efecto antinociceptivo de dos complejos de cobre, en el test de formalina ambos complejos presentaron una marcada inhibición de la respuesta nociceptiva que fue superior a la mostrada por fenoprofeno en forma individual. En el *Whriting test* los complejos de cobre también demostraron un potente efecto antinociceptivo con porcentajes de inhibición de 89.7% y 92.1% versus un 45.2% para la sal de fenoprofeno.

Los presentes resultados obtenidos mostraron que el efecto antinociceptivo del CuSO<sub>4</sub> tiene una duración significativa hasta los 30 minutos aproximadamente, al ser administrado en forma aguda por vía intraperitoneal, en ambos modelos de dolor neuropático, lo que es comparable al estudio de Tamba *et al.* 2013, quienes obtuvieron en el test de *hot plate* valores

de latencia significativos hasta los 30 minutos al administrar cloruro de cobre en ratones en forma aguda.

Respecto a la caracterización molecular del efecto de  $\text{CuSO}_4$  en nuestros experimentos no se evidenció una sobreexpresión del marcador de astrocitos GFAP, en ninguna de las dos neuropatías, espinal o trigeminal ni a los 7 ni a los 14 días post-cirugía, a diferencia de lo que ha sido descrito en otros estudios como el de Garrison *et al.*, 1994, donde se ha evidenciado una sobreexpresión de GFAP en animales neuropáticos, lo que es indicativo de la activación de astrocitos en la condición de dolor neuropático (Gosselin *et al.*, 2010). Sin embargo, se observó una disminución de la expresión de GFAP en los animales con neuropatía espinal que recibieron administración continua de  $\text{CuSO}_4$  durante 7 días, lo que sería indicativo de la disminución de la actividad glial en estos animales, contribuyendo con esto al proceso de antinocicepción y disminución de los procesos de facilitación del dolor (Milligan y Watkins, 2009). Esta disminución de la expresión de GFAP podría atribuirse al efecto que estaría ejerciendo el  $\text{Cu}^{2+}$  a nivel de la glía, específicamente de los astrocitos, posiblemente modulando su actividad y en este caso produciendo una disminución de su activación (Halassa *et al.*, 2006).

En lo que concierne a los efectos patológicos del cobre, estos se producen generalmente en presencia de alteraciones genéticas específicas que producen la acumulación del cobre en el organismo. El organismo en condiciones normales, es capaz de regular estrechamente las concentraciones fisiológicas de  $\text{Cu}^{2+}$ , por lo cual la administración de  $\text{Cu}^{2+}$  como parte de tratamiento analgésico no debería suponer un riesgo en ese sentido, pudiendo por lo tanto, considerarse el sulfato de cobre como un potencial agente adyuvante en la terapia analgésica. Gumilar *et al.* (2012) estudiaron los riesgos de toxicidad del  $\text{Cu}^{2+}$  como complejo en un modelo en ratones y no reportaron alteraciones significativas en los parámetros de evaluación de toxicidad.

Finalmente, creemos que los resultados obtenidos son indicativos del potencial que poseen las sales de cobre, específicamente el sulfato de cobre para ser una opción terapéutica adyuvante de bajo costo en el tratamiento del dolor crónico neuropático. Considerando además investigaciones en curso del laboratorio en donde se está estudiando el efecto antinociceptivo

del  $\text{CuSO}_4$  asociado a analgésicos como tramadol, y metadona, es posible esperar un posible efecto potenciador del cobre junto a otros analgésicos para poder utilizarlo como adyuvante en la terapia del dolor crónico, basándose para esto en que las sales de cobre poseen un efecto inhibitorio significativo sobre los mecanismos espinales que participan de la sensibilización central.

Serán necesarias a futuro, otras investigaciones para dilucidar el rol antinociceptivo del  $\text{CuSO}_4$  asociado a otros AINEs como metamizol o paracetamol, para poder respaldar las hipótesis planteadas anteriormente. También es de interés caracterizar a nivel electrofisiológico la acción de las sales de cobre en modelos de dolor neuropático para dilucidar si su efecto antinociceptivo ocurre a nivel de la médula espinal, así como también poder seguir investigando la posible sobreexpresión del marcador GFAP en condiciones de neuropatía, y si la administración crónica de  $\text{CuSO}_4$  revierte a nivel de médula espinal la sobreexpresión de este y otros marcadores moleculares de dolor neuropático tales como la subunidad NR2B del receptor NMDA, BDNF, IL-1B, entre otros.



## CONCLUSIONES

- La administración de  $\text{CuSO}_4$ , ketamina y la asociación de ambos produce un efecto antinociceptivo dosis dependiente en el tiempo total de observación del test de formalina intraplantar y orofacial.
- La interacción entre  $\text{CuSO}_4$  y ketamina produce un efecto de tipo supraaditivo o sinérgico en el test de la formalina intraplantar.
- La interacción entre  $\text{CuSO}_4$  y ketamina produce un efecto de tipo aditivo en el test de la formalina orofacial.
- La duración del efecto de la administración de  $\text{CuSO}_4$  en animales neuropáticos fue estadísticamente significativa hasta los 30 min en ambos modelos.
- La administración de  $\text{CuSO}_4$  en forma crónica produjo un efecto antinociceptivo.
- No se evidenció una sobreexpresión de la proteína GFAP en los animales neuropáticos, a los 7 o 14 días post-cirugía.
- La administración crónica de  $\text{CuSO}_4$  produjo una disminución significativa de la expresión de GFAP en animales con neuropatía espinal.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña-Castillo, C.; Morales, B. and Huidobro-Toro, J.P. Zinc and copper modulate differentially the P2X<sub>4</sub> receptor. *J. Neurochem.* 74: 1529-1537, 2000.
2. Aedo, F.; Delgado, R.; Wolff, D. and Vergara C. Copper and zinc as modulators of neuronal excitability in a physiologically significant concentration range. *Neurochem. Int.* 50: 591-600, 2007.
3. Agotegaray, M.A.; Boeris, M.A. and Quinzani O.V. Significant Anti-Inflammatory Properties of a Copper(II) Fenoprofenate Complex Compared with its Parent Drug. Physical and Chemical Characterization of the Complex. *J. Braz. Chem. Soc.* 21: 2294-2301, 2010.
4. Álvarez, P.; Paeile, C. Medición experimental del dolor. En: Paeile, C, Bilbeny, N. *El Dolor: de lo molecular a lo clínico.* 3era edición, Mediterráneo, Santiago, 702 p. 2005.
5. Álvarez, P.; Brun, A.; Labertrandie, A., López, J.; Correa, A.; Constandil, L.; Hernández, A. and Pelissier, T. Antihyperalgesic effects of clomipramine and tramadol in a model of posttraumatic trigeminal neuropathic pain in mice. *J. Orofac. Pain.* 25: 354-363, 2011.
6. Baron, R.; Binder, A. and Wasner, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol.* 9: 807-819, 2006.
7. Basbaum, A.; Bautista, D.M.; Scherrer, G.; Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139: 267-284, 2009.
8. Bennett, G.J. and Xie, Y-K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87-107, 1988.
9. Bereiter, D.A.; Hirata, H.; Hu, J.W. Trigeminal subnucleus caudalis: beyond homologies with the spinal dorsal horn. *Pain* 88: 221-224, 2000.
10. Bilbeny, N, Paeile, C. Definición, clasificación y semiología. En: Paeile, C., Bilbeny, N. *El dolor: de lo molecular a lo clínico.* 3<sup>era</sup> edición, Mediterráneo, Santiago, 2005, 23p.
11. Blahova, M.; Tumova, I.; Sokolik, J.; Gallasova, M. and Svec P. Anti-inflammatory activity of aqua(aryloxyacetato)copper-(II) complexes. *Pharmazie* 49: 373-374, 1994.
12. Brevik, H.; Collett, B.; Ventafridda, V.; Cohen, R. and Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life and treatment. *Eur. J. Pain* 10: 287-333, 2006.

13. Campbell, J.N.; and Meyer, R.A. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*. 52: 77-92, 2006.
14. Cao, H. and Zhang, Y. Spinal glial activation contributes to pathological pain states. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32: 972-983, 2008.
15. Chen, J.; Myerburg, M.M.; Passero, C.J.; Winarski, K.L. and Sheng, S. External  $\text{Cu}^{2+}$  inhibits human epithelial  $\text{Na}^+$  channels by binding at a subunit interface of extracellular domains. *J. Biol. Chem.* 286: 27436-27446, 2011.
16. Cimmino, M.; Ferrone, C. and Cutolo, M. Epidemiology of chronic musculoskeletal pain. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 25: 173-183, 2011.
17. Cini, R.; Tamasi, G.; Defazio, S. and Hursthouse, M.B. Unusual coordinating behavior by three non-steroidal anti-inflammatory drugs from the oxicam family towards copper(II). Synthesis, X-ray structure for copper(II)–isoxicam,–meloxicam and –cinnoxicam-derivative complexes, and cytotoxic activity for a copper(II)–piroxicam complex. *J. Inorg. Biochem.* 101: 1140-1152, 2007.
18. Coddou, C.; Morales, B. and Huidobro-Toro, J.P. Neuromodulator role of zinc and copper during prolonged ATP applications to  $\text{P2X}_4$  purinoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 472: 49-56, 2003.
19. Coddou, C.; Villalobos, C.; González, J.; Acuña-Castillo, C.; Loeb, B.; and Huidobro-Toro, J.P. Formation of carnosine-Cu(II) complexes prevents and reverts the inhibitory action of copper in  $\text{P2X}_4$  and  $\text{P2X}_7$  receptors. *J. Neurochem.* 80: 626-633, 2002.
20. Constandil, L.; Aguilera, R.; Goich, M.; Hernández, A.; Álvarez, P.; Infante, C.; Pelissier, T. Involvement of spinal cord BDNF in the generation and maintenance of chronic neuropathic pain in rats. *Brain Res. Bull.* 86: 454-459, 2011.
21. Coull, J.A.M.; Boudreau, D.; Bachand, K. ; Prescott, S.A. ; Nault, F. ; Sik, A. ; De Koninck, P. and De Koninck, Y. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*. 424: 938-942, 2003.
22. Craig, A.D. and Dostrovsky, J.O. Medulla to thalamus. En: Wall, P.D. and Melzack, R. (Eds.). *Textbook of pain*. Fourth edition, Churchill Livingstone, Londres, Inglaterra, 1999. pp. 183-214.

23. Dallel, R.; Villanueva, L.; Woda, A.; Voisin, D. Neurobiologie de la douleur trigéminal. *Médecine Sciences*. 19: 567-574, 2003.
24. Decosterd, I. and Woolf, C.J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*. 87: 149-158, 2000.
25. Delgado, R.; Vergara, C. and Wolff, D. Divalent cations as modulators of neuronal excitability: emphasis on copper and zinc. *Biol. Res*. 39: 173-82, 2006.
26. El-Gammal, O.A.; Elmorsy, E.A. and Sherif, Y.E. Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic effects of Cu(II) and Zn(II) complexes derived from 2-(naphtalen-1-yloxy)-N'-(1-(pyridine-2-1)ethylidene) acetohydrazide. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*. 120: 332-339, 2014.
27. Finnerup, N.B.; Sindrup, S.H. and Jensen, T.S. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain*. 150: 573-581, 2010.
28. Gadotti, V.M.; Bonfield, S.P.; Zamponi, G.W. Depressive-like behaviour of mice lacking cellular prion protein. *Behav. Brain Res*. 227: 319-323, 2012.
29. Gaetke, L. and Chow, C. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 189: 147-163, 2003.
30. Garrison, C.J.; Dougherty, P.M. and Carlton, S.M. GFAP expression in lumbar spinal cord of naïve and neuropathic rats treated with MK-801. *Exp. Neurol*. 129: 237-243, 1994.
31. González-Guerrero, M. and Argüello, J.M. Mechanism of Cu<sup>+</sup>-transporting ATPases: soluble Cu<sup>+</sup> chaperones directly transfer Cu<sup>+</sup> to transmembrane transport sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105: 5992-5997, 2008.
32. Gosselin, R.D.; Suter, M.R.; Ji, R.R. and Decosterd I. Glial cells and chronic pain. *Neuroscientist*. 16: 519-531, 2010.
33. Gruss, M.; Mathie, A.; Lieb, W.R. and Franks, N.P. The two-pore- domain K<sup>+</sup> channels TREK-1 and TASK-3 are differentially modulated by copper and zinc. *Mol. Pharmacol*. 66: 530-537, 2004.
34. Guide for the care and use laboratory animals of laboratory animals. Eighth Edition. The National Academies Press 500 Fifth Street, NW Washington, DC 20001. <http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>

35. Gumilar, F.; Agotegaray, M.; Bras, C.; Gandini, N.A.; Minetti, A. and Quinzani O. Antinociceptive activity and toxicity evaluation of Cu(II)-fenoprofenate complexes in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 675: 32-39, 2012.
36. Guyton, Arthur C. y Hall, John E. *Tratado de fisiología médica*. 10<sup>a</sup> edición, McGraw Hill, México D.F, 2002, pp. 669-681.
37. Halassa, M.M.; Fellin, T. and Haydon, P.G. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol. Med.* 13: 54-63, 2007.
38. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14, 1984.
39. Hargreaves, K.M. Orofacial pain. *Pain.* 152: S25-S32, 2011.
40. Harris, J.A.; Corsi, M.; Quartaroli, M., Arban, R. and Bentivoglio, M. Upregulation of spinal glutamate receptors in chronic pain. *Neuroscience.* 74: 7-12, 1996.
41. Hernández, A. Neurotransmisores/neuromoduladores del dolor a nivel espinal: Procesamiento y modulación nociceptiva en el asta dorsal. En: Paeile, C. y Bilbeny, N. *El dolor: de lo molecular a lo clínico*. 3<sup>era</sup> edición, Mediterráneo, Santiago, 2005, 53p.
42. Hocking, G.; Visser, E.J.; Schug, S.A.; and Cousins, M.J. Ketamine: Does life begin at 40? *Pain Clinical Updates.* 15: 1-6, 2007.
43. Horning, M.S.; and Trombley, P.Q. Zinc and copper influence excitability of rat olfactory bulb neurons by multiple mechanisms. *J. Neurophysiol.* 86: 1652– 1660, 2001.
44. Hunskaar, S. and Hole, K. S. Hunskaar, K. Hole. The formalin test in mice - dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. *Pain*, 30: 103–114, 1987.
45. Jacka, T.; Bernard, C.C. and Singer, G. Copper salicylate as an anti-inflammatory and analgesic agent in arthritic rats. *Life Sci.* 32: 1023-1030, 1983.
46. Jeong, S.W.; Park, B.G.; Park, J.Y.; Lee, J.W. and Lee, J.H. Divalent metals differentially block cloned T-type calcium channels. *Neuroreport.* 14: 1537-1540, 2003.
47. Julius, D. and Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 413: 203-210, 2001.
48. Kardos, J.; Kovács, I.; Hajós, F.; Kálmán, M. and Simonyi, M. Nerve endings from rat brain tissue release copper upon depolarization. A possible role in regulating neuronal excitability. *Neurosci. Lett.* 103: 139-144, 1989.

49. Kasai, H. and Neher, E. Dihydropyridine-sensitive and N-conotoxinsensitive calcium channels in mammalian neuroblastoma-glioma cell line. *J. Physiol.* 448: 161– 188, 1992.
50. Khosravani, H.; Zhang, Y.; Tsutsui, S.; Hameed, S.; Altier, C.; Hamid, J.; Chen, L.; Villemaire, M.; Ali, Z.; Jirik, F.R. and Zamponi, G.W. Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J. Cell Biol.* 181: 551-565, 2008.
51. Kim, B.E.; Nevitt, T. and Thiele, D.J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat. Chem. Biol.* 4: 176-185, 2008.
52. Lamont, L.A.; Tranquilli, W.J. and Grimm, K.A. Physiology of Pain. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 30: 703-723, 2000.
53. Latremoliere, A. and Woolf, C. Central sensitization: A generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J. Pain.* 10: 895-926, 2009.
54. Le Bars, D.; Gozariu, M. and Cadden, S. Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews* 53: 597-652, 2001.
55. Litwin, T.; Gromadzka, G.; Szpak, G.M.; Jabłonka-Salach, K.; Bulska, E. and Członkowska, A. Brain metal accumulation in Wilson's disease. *J. Neurol. Sci.* 329: 55-58, 2013.
56. Luccarini, P.; Childeric, A.; Gaydier, A.M.; Voisin, D. and Dallel, R. The orofacial formalin test in the mouse: A behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. *J. Pain.* 7: 908-914, 2006.
57. Ma, Z.; Wong, K.Y. and Horrigan, F.T. An extracellular Cu<sup>2+</sup> binding site in the voltage sensor of BK and Shaker potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 131: 483-502, 2008.
58. Marchand, F.; Perretti, M. and McMahon S.B. Role of the immune system in chronic pain. *Neuroscience.* 6: 521-532. 2005.
59. Marchand, S. Applied Pain Neurophysiology. En: Beaulieu, P.; Lussier, D.; Porreca, F.; and Dickenson, A. *Pharmacology of Pain.* IASP Press, Seattle, USA, 2010. pp 3-23.
60. Mathie, A.; Sutton, G.; Clarke, C. and Veale, E. Zinc and copper: pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. *Pharmacol. Ther.* 111: 567-583, 2006.
61. Maynard, C.J.; Bush, A.I.; Masters, C.L.; Cappai, R. and Li, Q. Metals and amyloid-h in Alzheimer's disease. *Int. J. Exp. Path.* 86: 147– 159, 2005.

62. Mercer, J.F. Menkes syndrome and animal models. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 1022S-1028S, 1998.
63. Milligan, E.D. and Watkins, L.R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10: 23-36, 2009.
64. Moore, K.A.; Kohno, T.; Karchewski, L.A.; Scholz, J.; Baba, H. and Woolf, C.J. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J. Neurosci.* 22: 6724-6731, 2002.
65. Morera, F.J.; Wolff, D. and Vergara, C. External copper inhibits the activity of the large-conductance calcium- and voltage-sensitive potassium channel from skeletal muscle. *J. Membr. Biol.* 192: 65-72, 2003.
66. Narahashi, T.; Ma, J.Y.; Arakawa, O.; Reuveny, E. and Nakahiro, M. GABA receptor-channel complex as a target site of mercury, copper, zinc, and lanthanides. *Cell Mol. Neurobiol.* 14: 599-621, 1994.
67. Okuyama, S.; Hashimoto, S.; Aihara, H.; Willingham, W.M. and Sorenson, J.R. Copper complexes of non-steroidal antiinflammatory agents: analgesic activity and possible opioid receptor activation. *Agents Actions* 21: 130-144, 1987.
68. Ono, S. and Cherian, M.G. Regional distribution of metallothionein, zinc, and copper in the brain of different strains of rats. *Biol. Trace. Elem. Res.* 69: 151-159, 1999.
69. Paeile, C. Algunas consideraciones de las vías aferentes y eferentes del estímulo nervioso. En: Paeile, C. y Bilbeny, N. *El dolor: de lo molecular a lo clínico*. 3<sup>era</sup> edición, Mediterráneo, Santiago, 2005. 43p.
70. Predki, P.F. and Sarkar, B. Effect of replacement of "zinc finger" zinc on estrogen receptor DNA interactions. *J. Biol. Chem.* 267: 5842-5846, 1992.
71. Puig, S. and Thiele, D.J. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 171-180, 2002.
72. Purchase, R. The treatment of Wilson's disease, a rare genetic disorder of copper metabolism. *Sci. Prog.* 96: 19-32, 2013.
73. Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Flower, R.J. and Henderson. G. *Farmacología*. 7<sup>a</sup> edición, El Sevier, Barcelona, España, 2012.

74. Riedel, W. and Neeck G. Nociception, pain and antinociception: current concepts. *Z. Rheumatol.* 60: 404-415, 2001.
75. Sato, M.; Ohtomo, K.; Daimon, T.; Sugiyama, T. and Iijima K. Localization of copper to afferent terminals in rat locus ceruleus, in contrast to mitochondrial copper in cerebellum. *J. Histochem. Cytochem.* 42: 1585-1591, 1994.
76. Scheinberg, I.H. and Sternlieb, I. Wilson disease and idiopathic copper toxicosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 842S-845S, 1996.
77. Schleper, B. and Stuerenburg, H.J. Copper deficiency-associated myelopathy in a 46-year-old woman. *J. Neurol.* 248: 705-706, 2001.
78. Seltzer, Z.; Dubner, R. and Shir, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43: 205-218, 1990.
79. Sessle, B.J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit. Rev. Oral Bio. Med.* 11: 57-91, 2000.
80. Sharonova, I.N.; Vorobjev, V.S. and Haas, H.L. Interaction between copper and zinc at GABA(A) receptors in acutely isolated cerebellar Purkinje cells of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 130: 851-856, 2000.
81. Strausak, D.; Mercer, J.F.; Dieter, H.H.; Stremmel, W. and Multhaup, G. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res. Bull.* 55: 175-185, 2001.
82. Stys, P.K.; You, H. and Zamponi, G.W. Copper-dependent regulation of NMDA receptors by cellular prion protein: implications for neurodegenerative disorders. *J. Physiol.* 590:1357-1368, 2012.
83. Suazo, I.C.; Cantín, M.G.; Zavando, D.A. Análisis de la densidad de receptores tipo NMDA R1 en el núcleo espinal de trigémino humano. *Rev. Soc. Esp. Dolor.* 15: 371-376, 2008.
84. Tal, M. and Devor, M. Anatomy and neurophysiology of orofacial pain. En: *Orofacial pain and headache*, 1ª edición, El Sevier, 2008. pp. 19-44.
85. Tallarida, R.J. Drug synergism: its detection and applications. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298: 865-872, 2001.



86. Tamba, B.I.; Leon, M.M. and Petreus, T. Common trace elements alleviate pain in an experimental mouse model. *J. Neurosci. Res.* 91: 554-561, 2013.
87. Tapiero, H.; Townsend, D. and Tew, K. Trace elements in human physiology and pathology. *Copper. Biomed. Pharmacother.* 57: 386-398, 2003.
88. Trombley, P.Q.; Horning, M.S. and Blakemore, L.J. Carnosine modulates zinc and copper effects on amino acid receptors and synaptic transmission. *Neuroreport.* 9: 3503-3507, 1998.
89. Trombley, P.Q. and Shepherd, G.M. Differential modulation by zinc and copper of amino acid receptors from rat olfactory bulb neurons. *J. Neurophysiol.* 76: 2536– 2546, 1996.
90. Valko, M.; Morris, H. and Cronin, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12: 1161–1208, 2005.
91. Virginio, C.; Church, D.; North, R.A. and Surprenant, A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X<sub>7</sub> receptor. *Neuropharmacol.* 36: 1285– 1294, 1997.
92. Vlachova, V.; Zemkova, H. and Vyklicky, L. Jr. Copper modulation of NMDA responses in mouse and rat cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 8: 2257– 2264, 1996.
93. Vos, B.P.; Strassman, A.M.; Maciewicz, R.J. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J. Neurosci.* 14: 2708-2723, 1994.
94. Weiser, T. and Wienrich, M. The effects of copper ions on glutamate receptors in cultured rat cortical neurons. *Brain Res.* 742: 211 – 218, 1996.
95. Woolfe, G. and MacDonald, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 80: 300-307, 1944.
96. Xiong, K.; Peoples, R.W.; Montgomery, J.P.; Chiang, Y.; Stewart, R.R.; Weight, F.F. and Li, C. Differential modulation by copper and zinc of P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>4</sub> receptor function. *J. Neurophysiol.* 81: 2088-2094, 1999.

97. Xu, M.; Aita, M.; Chavkin, C. Partial infraorbital nerve ligation as a model of trigeminal nerve injury in the mouse: behavioral, neural, and glial reactions. *J. Pain.* 9: 1036-1048, 2008.
98. Yu, W.R.; Jiang, H.; Wang, J and Xie, J.X. Copper ( $\text{Cu}^{2+}$ ) induces degeneration of dopaminergic neurons in the nigrostriatal system of rats. *Neurosci. Bull.* 24: 73–78, 2008.
99. Zhao, C.-S.; Tao, Y.-X.; Tall, J.M.; Donovan, D.M.; Meyer, R.A. and Raja, S.N. Role of  $\mu$ -opioid receptors in formalin-induced pain behavior in mice. *Exp. Neurol.* 184: 839-845, 2003.
100. Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16: 109-110, 1983.

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis ha sido financiada por el Proyecto Fondecyt N° 1120952