



**Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid**

**Caracterización farmacológica de las
tiadiazolidinonas: inhibidores de GSK-3 β y agonistas
PPAR- γ**

Angelo Oscar da Rosa

Trabajo presentado para optar al Título de Doctor por la

Universidad Autónoma de Madrid

Tutora: Dra. Manuela García López

Índice

ABREVIATURAS	3
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. <i>Las tiadiazolidinonas (TDZD)</i>	9
1.2. <i>Glucógeno sintasa kinasa-3β (GSK-3β)</i>	9
1.3. <i>Receptor activado por el factor proliferativo derivado de peroxisomas (PPAR-γ)</i>	11
1.4. <i>Dolor</i>	11
1.6. <i>Depresión</i>	24
1.5. <i>Isquemia cerebral</i>	32
2. OBJETIVOS.....	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	46
3.1. <i>Estudios de nocicepción</i>	46
3.2. <i>Predicción farmacológica del efecto antidepresivo de las TDZDs</i>	51
3.3. <i>Estudios de neuroprotección</i>	52
3.4. <i>Análisis estadístico</i>	54
4. RESULTADOS	55
4.1. <i>Efecto antinociceptivo, antiinflamatorio, antihiperalgésico y antialodínico de las TDZDs</i>	55
4.3. <i>Efecto antidepresivo de las TDZDs</i>	73
4.1. <i>Efecto neuroprotector de las TDZDs</i>	78
5. DISCUSIÓN.....	85
5.1. <i>Propiedades analgésicas de las TDZDs</i>	85
5.3. <i>Propiedades antidepresivas de las TDZDs</i>	93
5.2. <i>Efecto neuroprotector de la TDZDs</i>	96
5.4. <i>Consideraciones finales</i>	98
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

Abreviaturas

5HT - serotonina

Acetil-COA - Acetil coenzima A

ADN - ácido desoxiribonucleico

Akt - proteína kinasa B

AMPA – ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil- 4-isoxazolepropionico (del inglés: *alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid*)

AP-1 - proteína activadora-1 (del inglés: *activator protein-1*)

ASK-1 - kinasa regulada por señal-1

ATP - adenosina trifosfato

BDNF - Factor neurotrófico derivado del encéfalo

CAMPK-II - proteína kinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina-II

CCK - colecistocinina

CGRP – péptido relacionado con el gen de la calcitonina (del inglés: *calcitonin-gene-related peptide*)

CINC-1 – quimioatractivo de neutrofilos inducido por citocinas (del inglés: *cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1*)

CO - monóxido de carbono

CoPP - protoporfirina de cobalto

COX - ciclooxigenasa

CREB - elemento de respuesta al AMP cíclico (del inglés: *cAMP response element binding protein*)

CRF - factor liberador de corticotropina

ECT - electroconvulsoterapia

ER - retículo endoplásmico

ERK1/2 - kinasa regulada por señales extracelulares 1/2

TNF - test de la natación forzada

GABA - ácido gamma amino butírico

G-CSF - factor estimulador de colonias de granulocitos

GFAP - proteína fibrilar ácida glial

GMP - guanosina monofosfato

GMPc - guanosina monofosfato ciclica

GSK-3 - glucógeno sintasa quinasa - 3

HO-1 - homoxigenasa - 1

HO-2 - homoxigenasa - 2

HPA - eje hipotálamo-pituitaria-adrenal

IL - 8 - interleucina-8

IL-1 β - interleucina-1beta

IL-6 - interleucina-6

IRE1 α/β - enzima dependiente de inositol α/β

ISRN - inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina

ISRS - inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina

JNK-1 - kinasa NH2 terminal c-Jun

KC - keracinocitos

LTP - potenciación a largo plazo

MAO - monoamina oxidasa

MAPK - proteína quinasa activada por mitógeno (del inglés: *mitogen activated protein kinase*)

MCP-1 – proteína quimioattractiva de monocitos (del inglés: *monocyte chemotactic protein-1*)

MPTP – 1-metil-4-fenil-,2,3,6-tetrahidropiridina (del inglés: *1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine*)

NAC – N-acetil-cisteína

NF κ B - factor nuclear kappa B

Nfr2 – factor relacionado al factor nuclear eritroide-2 (del inglés: *nuclear factor erythroid 2-related factor-2*)

NMDA - N-metil-D-aspartato

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintasa

NPY - neuropéptido Y

PAF – Factor activador de plaquetas (del inglés: *platelet-activating factor*)

PAG - sustancia gris periacueductal (del inglés: *periaqueductal gray matter*)

PBN - fenil-t-butilnitrona (del inglés: *Phenyl-N-tert-butylnitrona*)

PDH - piruvato deshidrogenasa

PG - prostaglandina

PGE₂ . prostaglandina E₂

PKA - proteína quinasa dependiente de AMP cíclico

PKC - proteína quinasa C

PLA₂ - fosfolipasa A₂

POG - Privación de oxígeno y glucosa

PPAR - receptor activado por el factor proliferativo derivado de peroxisoma (del inglés: *peroxisome proliferator-activated receptor*)

RIP – proteína que interacciona con el receptor (del inglés: *receptor interacting protein*)

ROS - especies reactivas de oxígeno

RxR - receptor del ácido retinoico

SCF – factor de células madre (del inglés: *stem cell factor*)

SNC - sistema nervioso central

SnPP - protoporfirina de estaño

TDZD - tiadiazolidinonas

TEMPOL - 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (del inglés: *2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl*)

TNF- α - factor de necrosis tumoral- α

TRAF-2 - TNF receptor-associated factor 2

TRPV1 – *transient receptor potential vanilloid - 1*

TTX - tetrodotoxina

Resumen

En este trabajo de investigación se ha estudiado el efecto antinociceptivo, antidepresivo y neuroprotector de tres nuevas TDZDs (NP031112, NP001111, NP031115 y el NP01139) que activan los receptores PPAR- γ e inhiben la enzima GSK-3 β .

En los modelos “in vivo” de dolor, el NP031112 mostró un efecto antinociceptivo y antiinflamatorio. El NP031112 revertió las contorsiones abdominales, producidas por la inyección i.p de ácido acético, a las dosis de 0,1 a 10 mg/kg con una inhibición máxima (IM) del $97\pm 2\%$. El NP031112 también inhibió el extravasamiento plasmático medido mediante la presencia de azul de Evans en el peritoneo, a las dosis de 1 y 10 mg/kg (IM= $91\pm 11\%$). Tras una dosis de 1 mg/kg, se produjo una inhibición de las contorsiones producidas por ácido acético desde la media hora de su administración, y dicho efecto perduró durante 10 h. Las contorsiones en el test del ácido acético no se revirtieron por el antagonista de receptores PPAR- γ GW9662, o la L-arginina, precursora del óxido nítrico, pero esta última si revirtió el efecto del inhibidor de la NOS, el L-NAMME.

El NP031112 inhibió la nocicepción inducida por el glutamato inyectado en la pata de los animales a la dosis de 1 y 10 mg/kg (IM= 59 ± 6) y la formalina a las dosis de 1 a 30 mg/kg (fase neurogénica, IM= $63\pm 6\%$) y 10 y 30 mg/kg (fase inflamatoria, IM= $68\pm 11\%$). También se empleó la administración intratecal (i.t.) de solución salina, glutamato, NMDA, AMPA, kainato, sustancia P, TNF α o IL-1 β para identificar el mecanismo antinociceptivo de este compuesto. El NP031112 (1mg/kg, i.p.) produjo una inhibición del dolor producido por glutamato, NMDA, AMPA, TNF- α , IL-1 β , pero no el producido por kainato o SP. Estos datos sugieren que el NP031112 posee un efecto antinociceptivo y antiinflamatorio al interferir con la señalización glutamatergica (NMDA y AMPA) y de las citocinas TNF α e IL-1 β . El efecto del inhibidor de la GSK-3 β AR-A014418 en el test de la formalina, administrado 6 horas antes del test, fue revertido por el pre-tratamiento con SnPP, un inhibidor de la homoxigenasa-1 (HO-1), tanto administrado intraperitonealmente como localmente en la pata de los animales. Además, este efecto se perdió en los ratones knockout para el factor de transcripción Nrf2. El efecto antinociceptivo asociado a la sobreexpresión de la HO-1 fue confirmado mediante la inducción de su sobreexpresión con el tratamiento con CoPP, un inductor de la HO-1. La sobreexpresión de la HO-1 produjo un efecto antinociceptivo en la segunda fase del test de la formalina, este efecto se perdió en los ratones knockout para Nrf2, así como la sobreexpresión de la HO-1. El tratamiento de los animales con el inhibidor de la HO-1, SnPP, localmente en la pata, 5 minutos antes del test, o i.p. 30 minutos antes, también revirtió el efecto antinociceptivo. La inducción de la HO-1

inducida por CoPP administrada durante 16 horas o AR-A014418 administrada durante 6 horas también se redujo en los animales knockout Nfr2.

Por otra parte, las ratas pretratadas con el NP031112 (10 mg/kg, i.p.) mostraron tolerancia a la hiperalgesia mecánica en la pata inducida por carragenina, PGE₂, bradicinina o PMA, pero no por la adrenalina. Cuando se midió la hiperalgesia térmica, los animales tratados con NP031112 (10 mg/kg, i.p.) mostraron una tolerancia a la hiperalgesia inducida por carragenina, bradicinina o PMA, pero no a PGE₂ o adrenalina. Además, la administración de NP031112 (1 mg/kg, i.p.) disminuyó la alodinia inducida por una ligadura del nervio ciático y tras la administración de Adyuvante Completo de Freund en la pata de los ratones, pero no el edema producido.

En el modelo de la natación forzada en ratones, un modelo que sirve para predecir el efecto de fármacos antidepresivos, el NP031112 (5 y 50 mg/kg, intraperitoneal, i.p.) y NP03115 (5 mg/kg, intraperitoneal, i.p.) produjeron una reducción del tiempo de inmovilidad cuando se administraron 30 minutos antes del test. Este efecto fue acompañado de una disminución en la locomoción en un campo abierto (5 y 50 mg/kg, i.p., respectivamente), indicando que el efecto antidepresivo no fue debido a un aumento en la actividad locomotora de los animales. El inhibidor de la GSK-3 β , AR-A014418 (9 mg/kg, i.p.) y el activador de receptores PPAR γ , la rosiglitazona (5 μ g/sitio, intracerebroventricular) produjeron el mismo efecto antidepresivo. El AR-A014418 inhibió la locomoción (9 mg/kg, i.p.), de la misma manera que las TDZDs; sin embargo, la rosiglitazona no alteró este parámetro a ninguna de las dosis evaluadas. El antagonista de los receptores PPAR- γ GW9662 revirtió el efecto antidepresivo del NP031115, del NP031112 y de la rosiglitazona. Estos resultados sugieren que el efecto antidepresivo de las TDZDs está mediado, al menos en parte, por el agonismo PPAR- γ . Además, la administración conjunta del NP031112 (0.5 mg/kg, i.p.) y el inhibidor de la recaptación fluoxetina (10 mg/kg, i.p.) produjo un efecto sinérgico en el test de la natación forzada.

Las TDZDs NP00111 y NP031112, pero no la TDZD NP01139, protegieron frente a la privación de oxígeno y glucosa (POG) en un modelo experimental en rodajas de hipocampo de ratas. Los efectos de estos compuestos se han comparado con los de la rosiglitazona (un conocido agonista PPAR- γ , 0,3- 1 μ M), el litio (un conocido inhibidor de GSK-3 β , 0,3-3mM), y el AR-A014418 (otro conocido inhibidor específico de GSK-3 β , 30-300nM). Los resultados mostraron que la rosiglitazona protege frente a la POG, a la concentración 3 μ M. Sin embargo, los fármacos inhibidores de GSK-3 β , como el litio y el AR-A014418, no protegieron las rodajas de hipocampo de la lesión producida por la POG. Los efectos protectores del NP00111,

NP031112 y la rosiglitazona se revirtieron por el antagonista de los receptores PPAR- γ , el GW9662 (3 μ M). La activación de la ERK $\frac{1}{2}$ está implicada en el efecto neuroprotector de las TDZDs. 30 minutos de preincubación con la rosiglitazona (3 μ M) o el NP00111 (10 μ M) incrementó de forma significativa la fosforilación de ERK1/2. La neuroprotección inducida por el NP00111 (10 μ M) también fue revertida por el antagonista de la ERK1/2 PD98059 (50 μ M).

En resumen, las TDZDs tienen efectos neuroprotector frente a la POG, antinociceptivo, antiinflamatorio, antihiperálgico, antialodínico y antidepresivo. Mientras el efecto antidepresivo y neuroprotector parecen depender de su acción sobre los receptores PPAR- γ , el efecto antinociceptivo parece ser completamente mediado por la inhibición de la GSK- β .

1. Introducción

1.1. Las tiadiazolidinonas (TDZD)

Las TDZD se introdujeron en el 2002 (Martinez *et al.*, 2002a) como los primeros fármacos que inhiben la enzima glucógeno sintasa kinasa-3 β (GSK-3 β) de manera no competitiva con el ATP, y como una prometedora herramienta terapéutica para la enfermedad de Alzheimer (Martinez *et al.*, 2002a). Mas adelante se observó que estos compuestos también se comportan como agonistas de los (receptores activados por el factor proliferativo derivado de peroxisoma (del inglés: *peroxisome proliferator-activated receptor*) PPAR- γ (Luna-Medina *et al.*, 2005). La vía de síntesis de estos compuestos esta basada en la reactividad del N-alkyl-S[N-clorocarbonil]amino]isotiocarbamoil cloruros con los isocianatos (Martinez *et al.*, 2002a). Estos compuestos parecen tener una selectividad por la enzima GSK-3 β , a la que inhiben con una CI₅₀ en torno de 10 μ M. Por otra parte, la enzima GSK-3 β no inhiben otras kinasas como la Cdk/ciclidinaB, CK-II, PKA o PKC, solamente a concentraciones superiores a 100 μ M (Martinez *et al.*, 2002a; Meijer *et al.*, 2004).

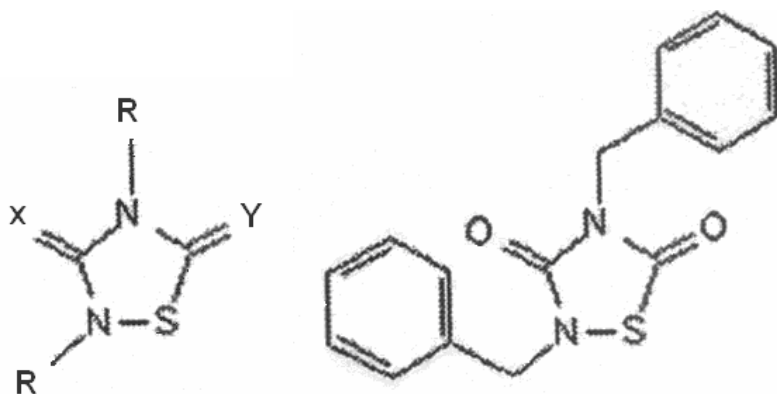


Figura 1. Formula general de las TDZDs (izquierda) y la fórmula del NP00111 (derecha).

1.2. Glucógeno sintasa kinasa-3 β (GSK-3 β)

La enzima glucógeno sintasa kinasa 3 β (GSK-3 β) es una isoforma de la proteína glucógeno sintasa kinasa que se conoce desde hace más de 20 años debido a su habilidad para fosforilar e inhibir la actividad de la enzima glucógeno sintasa (Embi *et al.*, 1980). La enzima

GSK-3 existe en tres isoformas que son GSK-3 α , GSK-3 β y GSK-3 β 2 (Grimes *et al.*, 2001). Su actividad se controla por fosforilación, así que puede ser reducida por la fosforilación de una serina en la posición 9, o puede ser aumentada por una fosforilación en una tirosina en la posición 216 (Grimes *et al.*, 2001). Numerosos estímulos como la insulina y factores de crecimiento inhiben la actividad de la GSK-3 β por medio de mecanismos intracelulares (AKT, PKA, PKC) que fosforilan la serina 9. Por otro lado, determinadas tirosina kinasas como la ZAK-1 y Fyn o aumentos en las concentraciones de calcio intracelular pueden activar la enzima a través de la fosforilación de la tirosina 216 y la proteína fosfatasa 2A a través de la defosforilación de la serina 9 (Grimes *et al.*, 2001). Recientemente se han descubierto otras facetas de la enzima GSK-3 β relacionadas con la señalización y la supervivencia celular, comprobando su papel en diversas funciones fisiológicas y en la fisiopatología de distintas enfermedades (Grimes *et al.*, 2001). Entre las dianas de la GSK-3 están la glucógeno sintasa, piruvato deshidrogenasa, acetil-CoA carboxilasa, proteína precursora del péptido β -amiloide y la proteína τ . Además, esta enzima regula la acción de factores de transcripción como el CREB, NF κ B y AP-1, lo que puede controlar la expresión de varios genes (Grimes *et al.*, 2001). Son algunos ejemplos de inhibidores de la GSK-3 β el bisindol, anilino, maleimidias, kempaullona, inrubidina, la himenialdisina, zinc, litio, AR-A014418, flavopiridol, TDZD-8, CHIR98014, y SB216763 (Meijer *et al.*, 2004).

1.3. Receptor activado por el factor proliferativo derivado de peroxisomas (PPAR- γ)

Los receptores PPAR- γ (del inglés: “peroxisome proliferator-activated receptor-gamma”) son miembros de la superfamilia de receptores que funcionan como factores de transcripción activados por ligando y regulan la expresión génica implicada en la reproducción, metabolismo, desarrollo y respuestas inmunes (Desergne y Wahli, 1999). Dentro de la familia de los PPAR existen otros dos tipos de receptores denominados PPAR- α y PPAR- δ (también llamado PPAR- β). Los tres receptores tienen distintos patrones de expresión y especificidad a ligandos (Desergne y Wahli, 1999). El ARNm de PPAR- γ se expresa en bazo, médula ósea, hígado, testículos, músculo esquelético, tejido adiposo y encéfalo (Elbrecht et al, 1996). Se cree que la señalización de los agonistas PPAR- γ está mediada por fenómenos dependientes e independientes de receptor. La activación por agonistas hace que los PPAR- γ se unan en heterodímeros en asociación al receptor del ácido 9-*cis* retinoico (RXR); éste dímero se dirige hacia el núcleo, uniéndose al ADN para regular la transcripción (Desergne y Wahli, 1999). Junto a estos efectos genómicos clásicos, los agonistas PPAR- γ tienen otras vías de señalización rápida como algunos de los agonistas de los demás receptores nucleares clásicos (Gardner et al., 2005). Por ejemplo, se ha demostrado que los agonistas PPAR- γ inducen una señal de calcio intracelular rápida que procede del retículo endoplásmico; este calcio activa la calmodulina quinasa II y a miembros de la familia de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Lennon et al., 2002).

Algunos ejemplo de agonistas de estos receptores son la pioglitazona (De Vos *et al.*, 1996), PGJ2, 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2, Δ^{12} -PGJ2, ciglitazone, troglitazone (Kliwer *et al.*, 1995), rosiglitazone (BRL49653) (Davies *et al.*, 2001) y el NP00111 (Luna-Medina *et al.*, 2005).

1.4. Dolor

1.4.1. Neurotransmisión del dolor

El dolor está incluido entre los mecanismos de control homeostático que posee el organismo, actuando como un mecanismo de alerta del cuerpo para informar que algo amenaza la integridad física y mantiene nuestra atención enfocada hasta que su causa haya sido identificada y solucionada (McMahon, 2005). Aunque molestos, los dolores de características agudas, que duran segundos, son considerados fisiológicos, así como el dolor subcrónico, que puede durar de horas a días. Mientras que el primero tiene la función de proteger inmediatamente

del estímulo, posiblemente nocivo, el dolor subagudo produce una inactividad temporal que tiene por objetivo recuperar el daño ocasionado. El dolor persistente que acompaña un daño inflamatorio o un daño en un nervio, se caracteriza por su naturaleza espontánea (no depende del estímulo), va acompañado de hiperalgesia (aumento del dolor producido por un estímulo dañino) y alodinia (la sensación de dolor ante un estímulo de baja intensidad, que normalmente no lo produce). El dolor crónico, que dura meses o años, se considera un proceso no adaptativo y sin propósito fisiológico, y por lo tanto, patológico (Millan, 1999).

La percepción del dolor es compleja e implica no solo la transducción de un estímulo nocivo, sino también procesos emocionales y cognitivos (Julius *et al.*, 2001). Así, se puede decir que el dolor es influenciado tanto por factores fisiológicos como psicológicos, y por ello, en animales solo puede ser evaluado de manera indirecta. El componente fisiológico y medible del dolor en animales se denomina nocicepción, y por ello, los modelos animales de algesia son modelos de nocicepción (Tjølsen, 1997).

En cuanto al origen del dolor, existen cuatro tipos principales de dolor: i) El “dolor nociceptivo”, que se origina tras la estimulación excesiva de los nociceptores localizados en la piel, vísceras u otros órganos. ii) El “dolor neurogénico”, que refleja el daño de tejido neuronal en la periferia o en el sistema nervioso central (“dolor central”). iii) El “dolor neuropático”, que sucede tras una disfunción o daño de un nervio o grupo de nervios. iv) El “dolor psicogénico”, que no procede de una fuente somática identificable y que puede estar reflejando factores psicológicos (Millan, 1999).

La recepción del estímulo nociceptivo a nivel periférico ocurre por estructuras específicas que son las terminaciones nerviosas de las fibras sensoriales, denominadas nociceptores que están ampliamente distribuidas en la piel, los vasos, los músculos, las articulaciones y las vísceras. La piel es responsable de transmitir la mayor parte de las informaciones nociceptivas de la periferia al SNC, pues la mayor parte de los estímulos nociceptivos son captados en este tejido. Además, los nociceptores son receptores sensibles a diferentes estímulos que pueden ser térmicos, mecánicos o químicos (Fig. 3). Además, la señalización química es probablemente la más común y la que representa las más diversas formas de generación de señal en las neuronas sensitivas (Besson, 1999; Besson *et al.*, 1987; Dray, 1997; Millan, 1999). También existen los llamados nociceptores silenciosos, que son una pequeña proporción de las fibras aferentes, las cuales normalmente no responden a estímulos; estos nociceptores pueden ser influenciados por mediadores inflamatorios, sensibilizarse y tener un actividad espontánea responder o responden a estímulos sensoriales (Julius *et al.*, 2001).

Los cuerpos celulares de las neuronas aferentes primarias están localizados en los ganglios de la raíz dorsal. El axon brota de su cuerpo celular, y se bifurca para enviar prolongaciones a la médula espinal e inervar los tejidos corporales. Los aferentes primarios se clasifican de acuerdo con criterios funcionales y anatómicos, entre ellos la velocidad de conducción, el diámetro y el grado de mielinización (Fig. 2). Las neuronas más mielinizadas, de mayor diámetro y que presentan una mayor velocidad de conducción son las fibras A β . Estas fibras responden de manera máxima al leve toque o movimiento, se encuentran básicamente en los nervios situados en la piel y en los individuos normales no contribuyen al dolor. Sin embargo, la estimulación de estas fibras puede aliviar el dolor, es lo que ocurre cuando se activan por fricción de la piel (ej. rascándose con la mano) tras alguna lesión. Por otra parte, existen otros dos tipos de aferentes primarios responsables de la transmisión de la sensación de la periferia a la médula espinal. Las fibras de pequeño y mediano diámetro dan origen a los nociceptores e incluyen las fibras C no mielinizadas y las fibras poco mielinizadas A δ , respectivamente. Estas fibras son las responsables de transmitir el estímulo nociceptivo. La conducción a través de estas fibras ocurre de manera más lenta que a través de las fibras A β (Fig. 3). Las fibras A δ transmiten la sensación de la periferia al SNC a una velocidad de 12 a 30 m/s, mientras que las fibras C, también conocidas como fibras polimodales C conducen el estímulo a una velocidad de 0,5 a 2 m/s. Existen dos clases principales de fibras A δ ; se diferencian por su respuesta a la estimulación térmica o la lesión tisular. Las fibras A δ del tipo I responden a temperaturas inferiores a 53°C, mientras que las fibras A δ del tipo II responden a temperaturas por debajo de 43°C (Cross, 1994; Julius *et al.*, 2001; Millan, 1999; Pleuvry *et al.*, 1996).


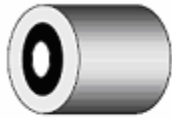

Tipos de fibras	A α y A β 	A δ (I y II) 	C 
Mielinización	Abundante	Escasa	Ausente
Diametro	10 μ m	2-6 μ m	0,4-1,2 μ m
Velocidad de conducción	30-100 m/s	1,2-30 m/s	0,5-2 m/s
Tipo de señal	Propiocepción Tacto leve	Nocicepción (t\acute{e}rmica, mec\acute{a}nica y qu\acute{i}mica)	Nocicepción (t\acute{e}rmica, mec\acute{a}nica y qu\acute{i}mica)

Figura 2. Diferentes tipos de neuronas sensoriales primarias responsables de la conducción de la señal periférica al SNC. Adaptado de Julius *et al.*, (2001).

La actividad y el metabolismo de estas fibras también se regulan ampliamente por mecanismos endógenos, como los productos de la lesión tisular y los mediadores inflamatorios (Fig. 3). Tras una lesión tisular, estos mediadores pueden ser liberados por las neuronas sensoriales y simpáticas y por las células no neuronales como las plaquetas, las células sanguíneas, los mastocitos, las células endoteliales, los fibroblastos, las células de Schwann e incluso por las células inflamatorias (Besson, 1997). Así, neurotransmisores y neuromoduladores como la sustancia P (SP), la adenosina trifosfato (ATP), el óxido nítrico (NO), las prostaglandinas (PGs), el neuropéptido Y (NPY), la colecistocinina (CCK), las neurotrofinas, la bombesina, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), los opiáceos, la somatostatina, la acetilcolina, los protones, la adenosina, la bradicinina, la histamina, la serotonina, el glutamato y otros aminoácidos excitadores pueden liberarse tras un estímulo capaz de generar lesión tisular (Fig. 3). En este sentido, la mayor parte de la activación de estas fibras está mediada por receptores específicos acoplados a cascadas de segundos mensajeros intracelulares y canales iónicos. Estos procesos de activación afectan la excitabilidad de la membrana y pueden alterar la transcripción génica, induciendo así alteraciones, a largo plazo, en

la bioquímica de las neuronas sensoriales. De esta manera, estas alteraciones pueden provocar un incremento o disminución en la producción de mediadores químicos, expresión de canales iónicos y receptores, así como la inducción de enzimas. Son muchas las sustancias que promueven la activación directa de los nociceptores (por ejemplo, bradicinina, ATP o capsaicina) provocando un dolor de naturaleza aguda. También los mediadores inflamatorios pueden producir dolor al sensibilizar los nociceptores. Esto sucede por la activación directa de proteínas kinasas intracelulares y alteraciones de la excitabilidad de la membrana, o indirectamente vía síntesis y liberación de otros mediadores celulares (por ejemplo, citocinas). Por otra parte, una excitabilidad anormal provocada por inflamación o lesión neuronal, puede inducir la aparición de nuevos canales iónicos y receptores. (Besson, 1997; Besson, 1999; Coggeshall *et al.*, 1997; Dray, 1997; Dray *et al.*, 1994; Guirimand, 1996; Millan, 1999; Raja, 1999).

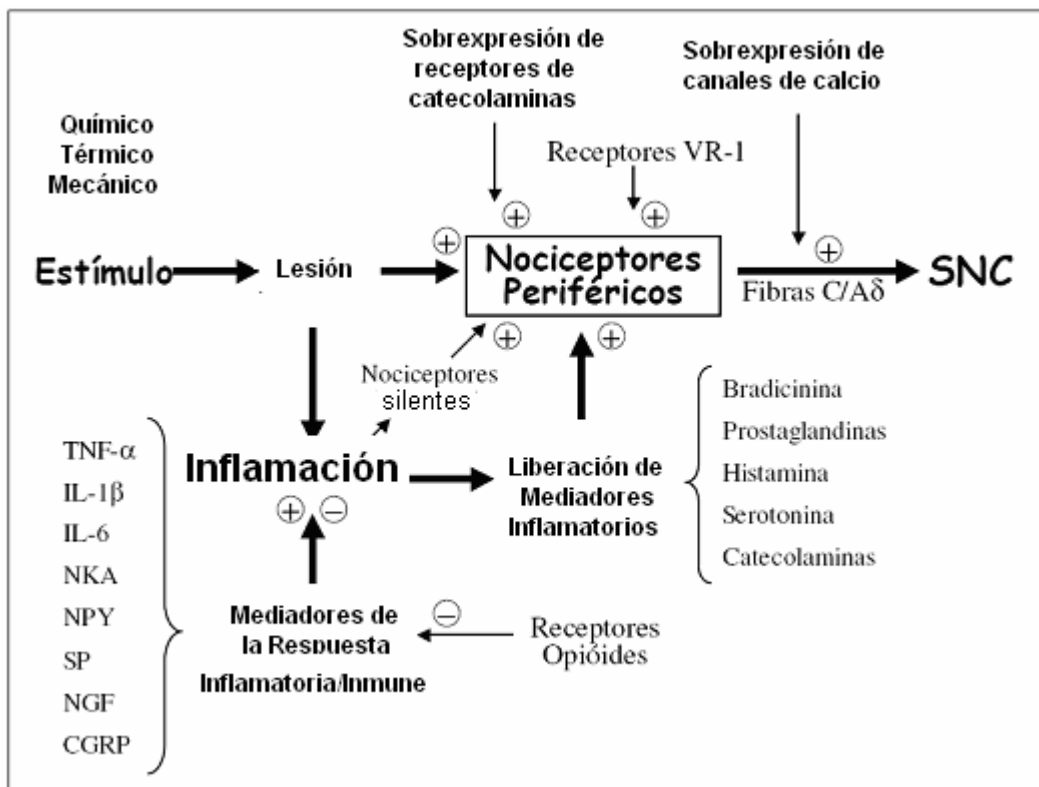


Figura 3. Factores responsables de la activación de los nociceptores periféricos. Adaptado de Hill (2001).

Los mediadores químicos liberados tras distintos estímulos hacen que la información nociceptiva sea transmitida a través de las fibras aferentes al SNC para que éste la procese y responda adecuadamente en cada situación. Inicialmente, los impulsos nociceptivos llegan a

través de los aferentes primarios en la médula espinal, más específicamente al asta dorsal, área primaria receptora de la mayor parte de las informaciones somatosensoriales (Coggeshall *et al.*, 1997). El asta dorsal de la médula es una estructura dividida en láminas. Las fibras aferentes primarias C y A δ tiene sus terminaciones principalmente en las laminas más superficiales de la lamina I (zona marginal) y lamina II (sustancia gelatinosa) (Besson *et al.*, 1987). Además, la información nociceptiva se proyecta del asta dorsal de la médula hacia el tálamo a través de neuronas sensoriales secundarias, que comprenden las vías ascendentes. Las neuronas sensoriales secundarias reciben sus señales sensoriales mediante la liberación de glutamato y SP de los aferentes primarios y, además, este proceso excitador también depende de canales de calcio y sodio, siendo los canales de calcio los principales reguladores de la liberación de neurotransmisores (Hill, 2001). Las vías ascendentes más importantes son: el tracto espinotalámico, el tracto espinoreticular y el tracto espinomesencefálico, entre otros. El organismo también posee mecanismos intrínsecos para el control del dolor, pues tras la estimulación de diferentes núcleos del tálamo, las señales se dirigen hacia la sustancia gris periaqueductal (PAG), hipotálamo, amígdala, cerebelo y diversas áreas de la corteza sensorial somática, donde la información nociceptiva es integrada con experiencias del pasado y procesada para producir la percepción del dolor y promover la respuesta adecuada que, es enviada hacia la médula espinal a través de las neuronas descendentes (Besson, 1999; Craig, 1999; Guyton, 1992; Millan, 1999).

Existe también una modulación descendente de la información nociceptiva que implica una serie de estructuras cerebrales, como he mencionado anteriormente, y sistemas de neurotransmisores entre los cuales podemos mencionar los sistemas opioide, serotoninérgico, noradrenérgico, gabaérgico, glutamatérgico, además de de los cannabinoides endógenos, entre otras. Estas vías tienen sus terminaciones en la sinapsis entre la neurona primaria y secundaria en la médula y tienen un efecto final inhibitor sobre la información ascendente (Millan, 2002).

1.4.2. Modulación farmacológica del dolor

Los fármacos más utilizados para el control del dolor desde hace más de un siglo en todo el mundo son los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Su indicación más importante es el dolor de origen inflamatorio, lo que constituye un problema médico importante en individuos

que sufren de enfermedades muy prevalentes como la artritis reumatoide, la artrosis o la migraña. El principal mecanismo descrito para estos fármacos es la inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa (COX), lo que conlleva la inhibición de la producción de prostaglandina (PG).

En 1992, se descubrió que la COX posee distintas isoformas (Serpell, 1998). Tanto la forma constitutiva COX-1, como la inducible COX-2, convierten el ácido araquidónico en PGG₂ y PGH₂, los precursores de las prostaglandinas. Estos precursores se transforman por isomerasas específicas de tejido o prostaglandina sintasas, en prostanoides, que son las prostaglandinas biológicamente activas (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} y PGI₂) y en tromboxano, los cuales actúan sobre receptores acoplados a proteínas G (*rhodopsin-like G-protein-coupled receptors*, GPCRs) (Zeilhofer *et al.*, 2006). La COX-1 produce prostanoides con una función fisiológica protectora, como por ejemplo el tromboxano para las plaquetas, la PGI₂ para la mucosa del estómago y la PGE₂ para la función renal (Serpell, 1998). Durante la inflamación, la COX-2 se puede inducir en macrófagos activados por citocinas y óxido nítrico. La toxicidad gastrointestinal, el fracaso renal y el riesgo cardiovascular son los efectos adversos más comunes de los fármacos que inhiben la COX ya que la mayor parte de estos inhibidores no diferencian las dos isoformas (Serpell, 1998).

El receptor de vaniloides TRPV1 (*Transient receptor potential vanilloid 1*), también conocido como receptor para capsaicina se ha identificado como una de las dianas importantes de las PGE₂. Los TRPV-1 se expresan en los nociceptores y funcionan como integradores de distintos estímulos nociceptivos. Por ello muchas industrias farmacéuticas están desarrollando antagonistas de este receptor como analgésicos (ej. SB366791, SB452533, A425619 y JYL1421) (Honore *et al.*, 2005; Immke *et al.*, 2006; Jakab *et al.*, 2005; Lappin *et al.*, 2006; Rami *et al.*, 2004).

Otra diana periférica para la inhibición del dolor son los canales de sodio resistentes a tetrodotoxina (TTX) Nav1.8, que se expresan exclusivamente por nociceptores primarios (Akopian *et al.*, 1996). La PGE₂ facilita la apertura de este canal cambiando la dependencia del voltaje hacia valores más hiperpolarizados y aumentando la magnitud de la corriente (Gold, 1999). En estados de dolor neuropático, además de la actividad, el número de estos receptores se encuentra aumentado (Serpell, 1998).

La carbamazipina, fenitoína, mexiletino, lignocaina a niveles terapéuticos, bloquean los canales de sodio de una manera dependiente de concentración, también disminuyen la recuperación de los canales de sodio dependientes de voltaje, inhibiendo la activación repetida de estas neuronas. La lamotrigina, el felbamato y el topiramato son capaces de bloquear el canal de sodio de una manera dependiente de la actividad. Estos agentes tendrían preferencia por los

canales de sodio activados en relación a los menos funcionales y, permitiría el bloqueo del disparo anormal de las neuronas nociceptivas. Todos estos fármacos tienen otras acciones farmacológicas a nivel central en el dolor neuropático ya que todas las neuronas, centrales y periféricas poseen canales de sodio. El valproato, un anticonvulsivante, también reduce la actividad de los canales de sodio, pero además aumenta los niveles del ácido gamma amino butírico (*gamma-aminobutyric acid*, GABA) en el SNC (Dickenson *et al.*, 2002).

En la médula espinal, en casi todas las láminas, se pueden encontrar neuronas gabaérgicas. Tanto las neuronas gabaérgicas, como las glicinérgicas están preferentemente asociadas a las neuronas aferentes de bajo umbral de disparo en la médula. Por esta razón se cree que la facilitación de los receptores de glicina y GABA en centros de procesamiento nociceptivo centrales, como en el asta dorsal en la médula, pueden revertir procesos patológicos de dolor. De hecho, el antagonismo de los receptores GABA-A con bicuculina en la médula espinal lleva a una alodinia táctil en animales despiertos; en cuanto que el midazolam, que aumenta la función gabaérgica, disminuye las respuestas evocadas por una lesión en el nervio (Dickenson *et al.*, 2002). También se ha sugerido que existe un sitio de modulación alostérica en los receptores de glicina (Zeilhofer *et al.*, 2006) hecho que hace de estos receptores una diana atractiva para desarrollar fármacos para el dolor.

Se cree que los agonistas opiáceos ejercen su efecto antinociceptivo mediante un conjunto de mecanismos centrales y periféricos. Los efectos centrales de los opiáceos se han podido determinar porque tras ser administrados a nivel central han mostrado eficacia antinociceptivos en el test de la placa caliente (*hot plate test*) o el test de retirada de la cola (*tail-flick test*) (Yaksh, 1999). Su acción a nivel periférico produce síntomas desagradables a nivel de tracto gastro intestinal. Por este motivo, muchas empresas farmacéuticas están desarrollando antagonistas que no atraviesan la barrera hemato-encefálica con la finalidad de administrarlos conjuntamente a los agonistas, para de esta manera disminuir los efectos adversos de los agonistas en la periferia y mantener sus acciones centrales. Los resultados iniciales son esperanzadores (Fakata *et al.*, 2007; Schmidt, 2001).

El óxido nítrico (NO) se sintetiza a partir de la L-arginina mediante la óxido nítrico sintasa (NOS). Existen distintas isoformas de la NOS: la NOS constitutiva es calcio dependiente y la NOS inducible (iNOS) es independiente de calcio y se induce en la inflamación por los macrófagos y la micróglia. El NO es difundible y puede sensibilizar los nociceptores a la acción de la bradicinina (ver más adelante la modulación ejercida por mediadores inflamatorios). Inhibidores de la iNOS pueden revertir el efecto nociceptivo de los agonistas de receptores de bradicinina BKB1 (Gabra *et al.*, 2004). Durante la inflamación, la iNOS está aumentada en

células inmunes aumentando la sensibilidad de las neuronas aferentes primarias (Millan, 1999). Recientemente se ha demostrado que la inhibición selectiva de la iNOS produce un efecto antinociceptivo en modelos de dolor inflamatorio y neuropático (De Alba *et al.*, 2006). La inhibición selectiva de la NOS neuronal, otra isoforma de NOS, también ejerce un efecto antinociceptivo en las dos fases del test de la formalina (Moore *et al.*, 1993).

El dolor puede modularse a través de la vía inhibitoria descendente mediante la liberación de serotonina y noradrenalina en las terminaciones pre y post-sinápticas de las interneuronas gabaérgicas y también en las terminaciones post-sinápticas de los nociceptores. La noradrenalina post-sináptica hiperpolariza (α_2) o despolariza (α_1) la mayor parte de las neuronas de la sustancia gelatinosa mediante la activación de los receptores. Presinápticamente, la noradrenalina aumenta los transmisores inhibitorios liberados de las interneuronas vía receptores α_1 y disminuye la liberación de glutamato tanto de las fibras primarias A δ como C vía receptores α_2 (Yoshimura *et al.*, 2006).

La adrenalina se utiliza clínicamente en anestesia; se inyecta en la médula conjuntamente con anestésicos locales para evitar la aclaración del anestésico local del espacio subaracnoideo mediante la constricción de los vasos sanguíneos (Concepcion *et al.*, 1984; Vaida *et al.*, 1986). La adrenalina *per se* produce analgesia cuando se administra intratecalmente en ausencia de anestésicos locales (Howe *et al.*, 1983; Reddy *et al.*, 1980), y curiosamente no altera significativamente el aclaramiento de los anestésicos locales del espacio subaracnoideo (Denson *et al.*, 1982; Denson *et al.*, 1984). Además, la clonidina, un agonista α_2 que no tiene efecto vasoconstrictor, aumenta la duración de la analgesia (Racle *et al.*, 1988). Entonces es probable que el efecto antinociceptivo de la adrenalina intratecal sea debido a una acción directa dentro del asta dorsal de la médula espinal, posiblemente mimetizando la acción de las vías eferentes noradrenérgicas. Existen muchas evidencias de que los agonistas α_2 -adrenérgicos producen un importante efecto analgésico en modelos de dolor normal y crónico en animales (Yoshimura *et al.*, 2006). Estudios comportamentales han demostrado que los adrenoceptores α_2 median la sinergia analgésica entre agonistas adrenérgicos en asociación con opioides, lo que puede ser de utilidad en el manejo del dolor clínico (Yoshimura *et al.*, 2006). Un trabajo realizado en rodajas de médula de ratas ha demostrado que este posible mimetismo de la inhibición descendente del dolor por agonistas α_2 -adrenérgicos puede estar mediado por una disminución de la liberación de capsaicina en la médula (Ueda *et al.*, 1995). Otra evidencia es que la clonidina, tiene efecto en animales en el test de la formalina en las dos fases, tanto en la de dolor por estimulación directa de los nociceptores como inflamatorio, y en un modelo de alodinia producido por la constricción del nervio ciático en ratas y gerbos (Vissers *et al.*, 2003).

La serotonina también inhibe el dolor a través de mecanismos semejantes al del agonismo α 2-adrenérgico. Conexiones descendientes provenientes tanto del núcleo del rafe como de pequeños núcleos distribuidos por la médula, inhiben la señal nociceptiva en el lugar de conexión entre la neurona aferente primaria y la neurona secundaria en la médula, en las láminas I y II. Estudios de autoradiografía han demostrado que de entre los 14 subtipos de receptores serotoninérgicos conocidos, en la médula están presentes los subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, y 5-HT₃. Al parecer, la principal contribución es de los receptores 5-HT_{1A}, hecho que permite que el 8-OH-DPAT aplicado en la médula espinal module la nocicepción en este sitio. La activación de los 5-HT_{1A} promueve la apertura de canales de K⁺ y el cierre de canales de Ca²⁺ (Yoshimura *et al.*, 2006).

Del mismo modo que los agonistas adrenérgicos y serotoninérgicos pueden ejercer un control descendiente del dolor, los antidepresivos también lo hacen, aumentando la disponibilidad de uno de estos dos o de la combinación de ellos en la médula espinal. Por ejemplo la amitriptilina (un antidepresivo tricíclico, que inhibe la recaptación de noradrenalina, serotonina y dopamina) tiene efecto en animales en el test de la formalina en las dos fases, de dolor normal e inflamatorio, y en un modelo de alodinia producido por la constricción del nervio ciático en ratas y gerbos exactamente como la clonidina (Vissers *et al.*, 2003). Este efecto parece ser más potente con las aminas terciarias (imipramina, amitriptilina, doxepina) que con las aminas secundarias (protriptilina, desipramina, nortriptilina, y amoxapina) (Chen *et al.*, 2004b).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) también pueden modular la nocicepción. Los ROS aumentan tras 5 días de estímulos nociceptivos en la región somatosensorial, un efecto que se mantiene a lo largo de 15 días, tras la interrupción del estímulo nociceptivo. La administración simultánea de antioxidantes como la vitamina C, E A o selenio con el estímulo disminuye la producción de ROS inducida por los estímulos nociceptivos. Además, la administración de analgésicos también lo hace y tiene un efecto adicional al de los antioxidantes (Rokyta *et al.*, 2003; Rokyta *et al.*, 2004). Recientemente se ha visto en modelos de neuropatía por constricción del nervio ciático a nivel lumbar y de dolor inducido por capsaicina, que hay un aumento en el número de subunidades NR1 de receptores NMDA fosforiladas en la médula. El tratamiento con el antioxidante phenyl-*N-tert*-butylnitrone (PBN) disminuye la nocicepción y la fosforilación del receptor tras solamente una hora de tratamiento (Gao *et al.*, 2007) indicando que los radicales libres podrían también estar implicados en el desarrollo del dolor crónico, tanto neuropático como de origen inflamatorio. También se ha observado que existe un aumento inmediato de los ROS en el núcleo trigeminal espinal tras una administración orofacial de formalina. La microinyección de N-acetilcisteína (NAC) en este núcleo mitiga completamente el dolor

producido por formalina (Viggiano *et al.*, 2005). Merece la pena también destacar el efecto analgésico que tienen los antioxidantes en el modelo de la formalina. La administración sistémica de fenil-*N-tert*-butilnitrona (PBN), 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxi (TEMPOL), NAC, y ácido ascórbico inhiben el dolor producido por la formalina en las dos fases del test (Hacimuftuoglu *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2005). Por otro lado, la administración intratecal de TEMPOL solo fue capaz de inhibir la segunda fase del test de la formalina y en la alodinia secundaria producida por capsaicina, lo que sugiere que los ROS probablemente estén inhibiendo la primera fase del test por un mecanismo periférico (Hacimuftuoglu *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007).

Por último, los productos de la reacción inflamatoria también pueden modular la nocicepción (Millan, 1999). Células residentes, incluyendo células dendríticas, macrófagos, linfocitos y mastocitos son componentes del tejido que tras reconocer el estímulo inflamatorio, liberan factores inflamatorios que estimulan la cascada de citocinas. Existen evidencias de que las citocinas proinflamatorias (ej. IL-1 β , TNF- α) y quimiocinas (ej. MCP-1) pueden modular directamente la actividad neuronal en distintos tipos neuronales en el sistema nervioso central y periférico. Por ejemplo, en el modelo de la nocicepción inducida por formalina se ha demostrado la participación de citocinas como TNF- α (liberada por macrófagos), IL-1 β (liberada por macrófagos, monocitos y células gliales) y IL-6 (liberada por fibroblastos) (Chichorro *et al.*, 2004; Van Damme *et al.*, 1987; Verri *et al.*, 2006) y que la nocicepción de origen inflamatorio en este modelo puede ser inhibida por anticuerpos frente a TNF- α , IL-1 β y IL-6 (Watkins *et al.*, 1997). En el SNP, la actividad espontánea anormal puede ser evocada en neuronas nociceptivas por aplicación tópica de TNF- α en axones periféricos *in vivo* o en el soma de las neuronas del espinal (Zhang *et al.*, 2007). El TNF- α puede aumentar la sensibilidad de neuronas a la estimulación por capsaicina, aumento mediado por la producción de prostaglandinas (Rampello *et al.*, 1991). Se ha demostrado que la excitabilidad neuronal por TNF- α es mediada por una vía dependiente de PKA (Zhang *et al.*, 2002). La MAPKp38 también se ha implicado en la hipersensibilidad inducida por TNF- α a estímulos mecánicos y térmicos (Schafers *et al.*, 2003).

La adición de IL-1 β a cultivos neuronales de ganglio dorsal de la médula produce la liberación de SP mediada por un incremento en la expresión de COX-2 (Inoue *et al.*, 1999). Además, en el ganglio del trigémino, la producción de una inflamación por Adyuvante completo de Freund (complete Freund's adjuvant, CFA) aumenta el número de células gliales activadas alrededor de las neuronas del ganglio, y también aumenta el número de receptores para IL-1 β (IL-1RI). Por consiguiente, la administración de IL-1 β produce mucha más excitabilidad en las

neuronas que tienen a su alrededor células satélites gliales marcadas por IL-1 y GFAP (glia activada) (Takeda *et al.*, 2007).

La quimiocina MCP-1 también sensibiliza las neuronas en el SNP, específicamente, las neuronas del ganglio de la raíz dorsal, que aumentan su excitabilidad cuando se someten a MCP-1; este efecto es mediado por una activación de canales iónicos independiente de voltaje compatibles con canales no específicos y también una inactivación de corrientes de salida, probablemente de potasio (Sun *et al.*, 2006).

Además de estos factores inflamatorios, también se ha descrito que la IL-6, las quimiocinas IL-8, CINC-1 (quimioatractivo de neutrófilos inducido por quimiocinas, del inglés, *chemokine-induced neutrophil chemoattractant-1*), KC (quimiocina derivada de queratinocitos, del inglés, *keratinocyte-derived chemokine*), IL-18 y IL-12 (liberada por neutrófilos, monocitos y células B) modulan la nocicepción (Verri *et al.*, 2006).

1.4.2. GSK-3 β , PPAR- γ , dolor e inflamación

Las TDZDs pueden inhibir la activación inflamatoria de astrocitos y microglia inducidos por lipopolisacáridos, reduciendo la presencia de TNF- α e IL-6 y la expresión de iNOS y COX-2. Por otra parte, previenen la muerte neuronal producida por sobrenadante de microglia activada, glutamato o staurosporina. Los antagonistas PPAR- γ revierten la protección promovida por las TDZDs de la muerte neuronal inducida por sobrenadante de microglia, así como la producción de nitritos y nitratos resultante de esta activación (Luna-Medina *et al.*, 2005).

El inhibidor de la GSK-3 β TDZD-8, que tiene una estructura muy similar a la de los compuestos estudiados en esta tesis, ha mostrado tener un efecto antiinflamatorio, previniendo la lesión inducida por la carragenina en el pulmón (Cuzzocrea *et al.*, 2006a), y también frente a la artritis causada por la colagenasa del tipo II en ratones (Cuzzocrea *et al.*, 2006b). Además, en trabajos recientes se ha implicado la GSK-3 β en la transmisión del dolor. El tratamiento con morfina aumenta la actividad de la GSK-3 β en la médula y los inhibidores previnieron la tolerancia a la morfina cuando se administraron intratecalmente en las ratas (Parkitna *et al.*, 2006).

En cuanto a los receptores PPAR γ , se ha mostrado recientemente que la pioglitazona, un agonista de este receptor, es eficaz frente a la hiperalgesia térmica crónica, y que además disminuye la activación de genes relacionados con la inflamación (Park *et al.*, 2007). En otro estudio, se ha demostrado que la pioglitazona inhibe selectivamente la segunda fase del dolor en

el modelo de la formalina, pero no la primera fase o el dolor en el test de la placa caliente (Oliveira *et al.*, 2007).

1.4.3. Inhibición de GSK-3 β , HO-1 y la modulación de la inflamación

La GSK-3 β controla la expresión de una enzima llamada hemoxigenasa-1 (HO-1) (Rojo *et al.*, 2006). La hemoxigenasa es una enzima limitante en la degradación del grupo prooxidante hemo en tres productos distintos: hierro, CO y biliverdina, la cual es convertida en bilirrubina (Ryter *et al.*, 2006). Recientemente, han surgido un gran número de evidencias que mencionan que la HO es importante en otras funciones fisiológicas como son la citoprotección en modelos de estrés celular (Egea, 2007; Kim *et al.*, 2005), la inflamación (Poss *et al.*, 1997) o el dolor (Li *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2000; Steiner *et al.*, 2001).

Existen dos isoformas genéticamente diferentes de la HO: la HO-1 que es inducible, y la HO-2 que es constitutiva (Ryter *et al.*, 2006). La HO-1 se expresa, en niveles que están entre bajos y no detectables, en condiciones basales en tejidos que no están implicados en el metabolismo de eritrocitos o de la hemoglobina, pero responde rápidamente a una activación transcripcional por diversos estímulos químicos y físicos (Ryter *et al.*, 2006). El sustrato natural de la HO-1, el grupo hemo, sirve de señal de alerta ante una lesión tisular; cuando se libera localmente, puede funcionar como un desencadenante natural del proceso inflamatorio. La hemina, la forma oxidada del grupo hemo, induce de manera dependiente de dosis la inducción de la HO-1, con una inducción máxima de cerca de 20 veces. Por otro lado, la HO-1 inhibe la inflamación, disminuyendo la expresión de moléculas de adhesión y como consecuencia reduciendo la adhesión de leucocitos como un mecanismo tardío de autorregulación de la inflamación (Wagener *et al.*, 2003).

El factor de transcripción Nrf2 es uno de los factores que pueden inducir la expresión de la HO-1 por el grupo hemo (Alam *et al.*, 2003). Curiosamente el Nrf2 también está implicado en el proceso de curación de heridas, siendo activado en fases tempranas de la herida por los ROS allí generados (Braun *et al.*, 2002). La protoporfirina de cobalto (CoPP), que tiene estructura similar al de la hemina, pero tiene cobalto como grupo prostético y no hierro, también puede inducir la expresión de HO-1 mediante la activación del Nrf2 (Shan *et al.*, 2006).

Existen pocos estudios relacionando la HO-1 y las señales nociceptivas. A pesar de que no existen evidencias directas de la participación de la HO-1 en la nocicepción, se ha sugerido que el CO producido por la HO podría limitar la hiperalgesia inflamatoria en la pata de ratas y que tal efecto estaría mediado por la enzima guanilato ciclasa soluble y la producción de GMPc

(Steiner *et al.*, 2001). Se ha sugerido que la HO-1 podría ser responsable de este efecto una vez que el grupo hemo, que es el sustrato de la HO, reduce la hiperalgesia inflamatoria frente a IL-1 β , que la induce, pero la producida por PGE₂, que no la sobrexpresada. Sin embargo, estos datos no son concluyentes respecto a cual de las isoformas de la HO estaría ejerciendo esta acción.

La HO-2 se ha implicado en la nocicepción en la médula. Experimentos con doble tinción han demostrado que un alto porcentaje de núcleos positivos para la proteína Fos, después de la administración de formalina, se localizaban dentro de células positivas para HO-2 (Li *et al.*, 2001a). La HO-2 participa en el dolor inflamatorio y neuropático (Li *et al.*, 2003) y la producción de CO mediada por HO-2 parece estar relacionada con la transmisión glutamatérgica (Li *et al.*, 2002b). Ratones knockout de HO-2 sienten menos dolor en el modelo de la formalina en la primera y segunda fases del test (Li *et al.*, 2004a). Además, su inhibición en la médula mejora el efecto de la morfina (Li *et al.*, 2001b); por tanto, parece que la HO-2 esta implicada en el proceso de tolerancia a los opiáceos (Liang *et al.*, 2003).

1.6. Depresión

1.6.1. La enfermedad

Desde Hipócrates, alrededor del año 400 aC, la depresión ya era conocida como melancolía, y ya en estos tiempos, los síntomas principales de la enfermedad eran conocidos de la misma manera que hoy en día (Cordás, 2002). La depresión es un gran problema de salud pública. Se presenta y caracteriza por manifestaciones y síntomas similares en distintos países, grupos culturales o status-económicos (Spiegel, 1996). El promedio de edad en el que se diagnóstica la depresión ha disminuido drásticamente en los últimos años: de los 40-50 años ha pasado a los 25-35 años de edad (Nemeroff *et al.*, 2002).

La depresión puede desarrollarse en estadios tempranos de la vida y durar hasta su fin, perjudicando las ocupaciones y funciones sociales de los individuos acometidos por la enfermedad y afectando la calidad de sus vidas (Spiegel, 1996). Su prevalencia es alarmante en la sociedad actual, con una prevalencia durante el curso de la vida entre 15 y 17% (Ebmeier *et al.*, 2006) y con un riesgo de suicidio cerca de 20 veces superior al de la población general (Osby *et al.*, 2001), llegando a un porcentaje entre los individuos con depresión del 15% (Musselman *et al.*, 1998). Además, los individuos deprimidos tienen entre 1,58 y 2,07 veces mayor riesgo de morir en comparación con sujetos no deprimidos (Ebmeier *et al.*, 2006).

A pesar de la gravedad y elevada prevalencia de esta enfermedad, el tratamiento de la depresión consiste en un verdadero reto. En España, solamente el 42,6% de los pacientes con depresión recibieron la atención médica necesaria en los 12 meses previos y apenas un tercio de

los tratamientos realizados en España han satisfecho el criterio mínimo de adecuación (Fernandez *et al.*, 2006).

Los síntomas clínicos de la depresión pueden ser producidos por enfermedades neurológicas, enfermedades clínicas o por fármacos (depresión secundaria), o pueden ser idiopáticos (depresión primaria). La depresión puede ocurrir como un único episodio, o ser una enfermedad recurrente (Goodwin, 1990).

La depresión mayor se caracteriza por ser un trastorno heterogéneo, con varios sub-tipos y, es improbable, que todos los síntomas sean producidos por una disfunción en una única área cerebral. De hecho, se ha demostrado repetidas veces que muchas regiones cerebrales se encuentran alteradas en los individuos con depresión, como el giro cingulado anterior, la corteza orbitofrontal, la corteza dorsolateral, el estriado, el lóbulo temporal medial y el hipocampo (Campbell *et al.*, 2004; Drevets, 2000; Ebert *et al.*, 1996; Ebmeier *et al.*, 2006; Videbech *et al.*, 2004).

Tal vez de entre todas las alteraciones del sistema nervioso central (SNC) mencionadas en la depresión, las del hipocampo sean las más aceptadas. El tamaño del hipocampo se reduce en individuos deprimidos en comparación con los hipocampos de individuos normales (Ebmeier *et al.*, 2006; Sheline *et al.*, 1996). La duración de la enfermedad, la recurrencia, la resistencia al tratamiento y antecedentes de acoso sexual pueden estar asociados a cambios en el hipocampo. Las atrofas en el hipocampo también se han descrito en excombatientes que han sufrido de estrés post-traumático. Estudios en animales sugieren que un aumento de los corticoides conlleva a un daño excitotóxico en el hipocampo y una menor neurogénesis. El hecho más relevante es que se ha comprobado que los antidepresivos pueden revertir estos daños (Ebmeier *et al.*, 2006).

También se han observado alteraciones en el flujo sanguíneo y en el metabolismo de la glucosa en los lóbulos frontal y temporal así como en los ganglios de la base en individuos con depresión (Soares *et al.*, 1997).

La depresión mayor está clasificada dentro de los trastornos del humor, que incluyen los trastornos unipolares (trastornos depresivos) y trastornos bipolares (enfermedad maníaca depresiva). Los trastornos unipolares se caracterizan por no presentar antecedentes de episodios maníacos como los trastornos bipolares (American Psychiatry Association, 2002).

Los criterios para el diagnóstico de la depresión mayor se basan en sus síntomas:

1. Humor deprimido la mayor parte del tiempo, casi todos los días;
2. Disminución marcada en el interés o placer en todas o casi todas las actividades (anedonia);
3. Aumento o disminución marcada de peso o apetito;
4. Insomnio o hipersomnio casi todos los días;
5. Agitación o retardo psicomotor;
6. Fatiga o falta de energía casi todos los días;
7. Sentimientos de culpa o desvalía

excesivos; 8. Disminución en la capacidad de concentración y pensamiento; 9. Pensamientos recurrentes de muerte, ideas o tentativas de suicidio y sentimientos de desesperanza. Para que cumplan los criterios de depresión mayor el individuo debe presentar: i) un total de cinco síntomas, con duración mínima de dos semanas; ii) uno entre los dos primeros síntomas anteriormente mencionados (American Psychiatry Association, 2002).

Además de estos síntomas, existen algunas alteraciones íntimamente asociadas a la depresión, como son las cardiovasculares, las cerebro-vasculares, músculo-esqueléticos, metabólicos, las pulmonares y síntomas como dolores crónicos que están presentes en aproximadamente el 50% de los individuos con depresión (Kumar *et al.*, 2002; von Knorring *et al.*, 1984). También pueden presentar síndromes de ansiedad general, ansiedad social, del pánico, obsesivo compulsivo y de estrés post-traumático (Nemeroff *et al.*, 2002).

Existe un consenso general que la depresión puede resultar de la disfunción de varios neurotransmisores o sistemas metabólicos. La hipótesis monoaminérgica sugiere que la depresión resulta de una deficiencia de serotonina o noradrenalina, o incluso, de receptores deficientes (Mann *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 2001). Varios antidepresivos aumentan la concentración de serotonina o noradrenalina en la hendidura sináptica, pues bloquean la recaptación de serotonina, noradrenalina o de ambos neurotransmisores (Baldessarini, 1996). La transmisión dopaminérgica también se ha implicado en la fisiopatología de la depresión (Rampello *et al.*, 1991). Entre otros síntomas, los síndromes depresivos se caracterizan por la pérdida de la capacidad de sentir placer y por la pérdida de la motivación. Los antidepresivos aumentan la transmisión dopaminérgica en el sistema mesolímbico, la cual es crucial en los sistemas de motivación y recompensa (D'Aquila *et al.*, 2000). Más recientemente los receptores NMDA y la vía de la L-arginina-óxido nítrico han sido implicados en la fisiopatología de la depresión. Los individuos deprimidos poseen niveles elevados de glutamina intraplaquetaria lo que sugiere una alteración en el ciclo del glutamato y glutamina (Levine *et al.*, 2000). Poseen también un aumento en la actividad de la enzima arginasa, que puede modular la generación de óxido nítrico (NO) y, muestran niveles alterados de nitrato en la sangre, que sugieren una alteración en la producción de NO en la depresión (Elgun *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001).

Un dato consistente respecto a la implicación de los receptores NMDA en la patología de la depresión consiste en el hecho de que el tratamiento con cetamina, un antagonista no competitivo de receptores NMDA, produce una mejora en el cuadro de depresión en humanos (Berman *et al.*, 2000; Kudoh *et al.*, 2002).

Se ha demostrado también que la depresión esta acompañada por una activación sistémica del sistema inmune o una respuesta inflamatoria con la implicación de células

fagocíticas (monocitos, neutrófilos), activación de células T, proliferación de células B, aumento de la secreción de prostaglandinas, aumento en la producción de interleucinas IL-1 β e IL-6 por células mononucleadas sanguíneas. Se cree que estas alteraciones podrían estar relacionadas con las alteraciones en la producción de la serotonina, en el eje HPA (Maes, 1995). De hecho, el colexib, un antiinflamatorio que inhibe la COX-2, ha producido efectos satisfactorios en ensayos clínicos en pacientes con depresión (Muller *et al.*, 2006).

1.6.2. Sistema de neurotransmisores y modulación de la depresión

Tanto la terapia electroconvulsiva (ECT) como la psicoterapias y los medicamentos antidepresivos han demostrado cierta eficacia en el tratamiento de la depresión (Nemeroff *et al.*, 2002).

La ECT, a pesar de ser antigua, no está del todo abandonada. En depresiones graves con riesgo de suicidio, con características psicóticas y en gestantes, la ECT es una buena opción. La ECT consiste en el paso de una corriente eléctrica a través del cerebro para producir una convulsión generalizada en el SNC mediante anestesia y relajación muscular (Isenberg, 2000). Dentro de los efectos conocidos de la ECT, los principales son: aumento de la transmisión dopaminérgica en la corteza pre-frontal y estriado, conjuntamente, con una disminución de la sensibilidad de los autoreceptores dopaminérgicos; aumento de la transmisión serotoninérgica y aumento de la fijación a los receptores 5-HT₂ en la corteza; antagonismo muscarínico; inhibición de la potenciación a largo plazo (LTP) inducida por receptores NMDA en el hipocampo; desensibilización β -adrenérgica y aumento del recambio de noradrenalina y de la sensibilidad del receptor α 1-adrenérgico (Isenberg, 2000).

Los antidepresivos son fármacos empleados para tratar la depresión por sus acciones beneficiosas sobre el humor (Nemeroff *et al.*, 2002). Pueden también ser utilizados para el tratamiento de otras enfermedades como la anorexia nerviosa, la bulimia, la ansiedad, la catalepsia, la narcolepsia, el déficit de atención, la hiperactividad, el trastorno obsesivo compulsivo, el pánico, el estrés post-traumático, la enuresis, la migraña, el tabaquismo, las náuseas quimioterápicas, el dolor crónico, la úlcera péptica y la urticaria (Matos e Sousa, 1999).

Los antidepresivos pueden actuar modulando la depresión mediante la inhibición de la enzima MAO (monoamina oxidasa) o los sistemas de recaptación de las monoaminas (principalmente noradrenalina y serotonina, y en menor intensidad, dopamina), como es el caso de los antidepresivos tricíclicos. También pueden ser inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) o de la recaptación de noradrenalina (ISRN) (Nemeroff *et al.*, 2002).

Sin embargo, la medicación antidepresiva necesita avanzar en tres aspectos: i) **eficacia**: tras 6-8 semanas algunos pacientes no responden de manera alguna al tratamiento y apenas el 35-45% de los individuos tratados, con las dosis habituales de los antidepresivos más comunes, retornan a los niveles pre-mórbidos, sin ningún síntoma depresivo; aunque un número más elevado (más que 80%) muestran respuestas parciales (Nemeroff *et al.*, 2002). ii) **tolerabilidad**: La principal variable relacionada a la no adhesión al tratamiento antidepresivo son los efectos colaterales (MacGillivray *et al.*, 2003; Sleath *et al.*, 2003). Los efectos colaterales más frecuentes, que probablemente son secundarios a los efectos anticolinérgicos, son la sedación, las alteraciones cognitivas y las alteraciones sub-clínicas de la memoria. El aumento de peso es inducido principalmente por los antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la MAO y litio. Se cree que del 5 al 20% de los individuos tratados con antidepresivos sufren de hipomanía. Existen aún los efectos resultantes del bloqueo muscarínico como boca seca, visión turbia, constipación y dificultad para orinar (Matos e Sousa, 1999). Los antidepresivos de última generación, como los ISRS o ISRN, al contrario de los tricíclicos y los inhibidores de la MAO, tienen la ventaja de que su “sobredosis” no es letal, son mejor tolerados y no producen efectos cardíacos adversos. Pero, poseen sus propios efectos secundarios como la disfunción sexual (Nemeroff *et al.*, 2002), dolores de cabeza, náuseas y pérdida de peso (Rudorfer *et al.*, 1989). iii) **velocidad del tratamiento**: La respuesta a los antidepresivos no suele ser rápida y ocurre entre la segunda y la cuarta semana de tratamiento (Manji *et al.*, 2003). Esta respuesta lenta, de los antidepresivos actuales, hace de la acción rápida un atributo deseable a los nuevos agentes terapéuticos (Nemeroff *et al.*, 2002). De esta manera, estudios pre-clínicos con nuevos antidepresivos o con moduladores de la depresión son importantes.

Además de los inhibidores de la recaptación de monoaminas y de los inhibidores de la enzima MAO, existe una gama muy grande de fármacos, en fases pre-clínicas, capaces de modular los efectos de los antidepresivos. Los antagonistas de los receptores 5-HT_{1A}, como el pindolol, aumentan o aceleran los efectos de antidepresivos en estudios preclínicos y clínicos (Artigas *et al.*, 2001; Artigas *et al.*, 1996). La administración previa de pindolol también es capaz de aumentar el efecto de los ISRS en ratas, pero no altera el efecto de los antidepresivos tricíclicos (Redrobe *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha sugerido que los antagonistas de receptores 5-HT_{1A} no aumentan o disminuyen el efecto de la fluoxetina (ISRS) o befloxtona (un inhibidor de la MAO) en ratas (Moser *et al.*, 1999). Estudios pre-clínicos en ratas también demostraron que los agonistas 5-HT_{1A} pueden ser una posible alternativa para el tratamiento de la depresión *per se* (Cervo *et al.*, 1987); también pueden potenciar el efecto de los antidepresivos tricíclicos e ISRN, pero no los de la fluoxetina y otros ISRS (Redrobe *et al.*, 1996). Estudios farmacológicos

han demostrado que los antagonistas de receptores 5-HT₂ son capaces de potenciar, en tests pre-clínicos, el efecto antidepresivo de la imipramina (tricíclico) y desipramina (inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina), pero no el efecto de los ISRS, como la fluoxetina o el citalopram en ratones (Redrobe *et al.*, 1997).

Fármacos con acción antagonista de los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT₃ también potencian el efecto de los ISRS en tests pre-clínicos (Redrobe *et al.*, 1997; Redrobe *et al.*, 1996).

Recientemente, a partir de estudios pre-clínicos y clínicos se ha sugerido que compuestos que reducen la transmisión de los receptores NMDA poseen propiedades antidepresivas, y que el tratamiento con antidepresivos puede tener un impacto sobre la función de los receptores NMDA (Petrie *et al.*, 2000; Skolnick, 1999; Skolnick, 2002; Trullas *et al.*, 1990).

Por otra parte, se ha observado que los inhibidores de la óxido nítrico sintasa (NOS) ejercen efectos antidepresivos en modelos animales de depresión (da Silva *et al.*, 2000; Harkin *et al.*, 2003; Harkin *et al.*, 1999; Volke *et al.*, 2003; Yildiz *et al.*, 2000). Además, el tratamiento con inhibidores de la NOS aumenta la liberación de serotonina en la corteza frontal de ratas (Smith *et al.*, 2000) y la serotonina endógena parece ser importante para el efecto antidepresivo de inhibidores de la NOS, como el 7-nitroindazol (Harkin *et al.*, 2003). Estudios *in vitro* han mostrado que la serotonina endógena, la dopamina y el tratamiento con antidepresivos como citalopram, paroxetina y imipramina disminuyen la actividad de la NOS en el hipocampo (Wegener *et al.*, 2003; Wegener *et al.*, 2000). También el tratamiento con inhibidores de la guanilato ciclasa soluble, enzima que es activada por el NO, produce un efecto antidepresivo en modelos animales (Eroglu *et al.*, 1997; Heiberg *et al.*, 2002). Pero, la implicación de la vía de la L-arginina-óxido nítrico y la depresión está lejos de sencilla, ya que el tratamiento con la L-arginina, un precursor del NO (sustrato de la NOS), también produjo un efecto antidepresivo en modelos de depresión en ratones, sugiriendo que el NO puede ser un modulador dual de la depresión (da Silva *et al.*, 2000).

Los opioides endógenos también han sido implicados en los trastornos depresivos, ya que se ha encontrado un aumento en el número de receptores opioides en el SNC de víctimas de suicidios con depresión (Gabilondo *et al.*, 1995). Los antidepresivos son conocidos por influenciar la liberación de péptidos opioides, tales como las β-endorfinas (Sawynok *et al.*, 2001) y se ha demostrado que existen niveles altos de opioides endógenos y de sus receptores en áreas límbicas implicadas en la regulación del humor (Waksman *et al.*, 1986). De esta manera, el efecto terapéutico de algunos antidepresivos, principalmente en la depresión severa, podría estar relacionado con la regulación del sistema opioide (Schreiber *et al.*, 2002). En ratones se ha demostrado que la naloxona (un antagonista no selectivo de receptores opioides) es capaz de

revertir el efecto antidepresivo del extracto hidroalcohólico de *Siphocampylus verticillatus* en el test de la suspensión de la cola (Rodrigues *et al.*, 2002). Otro estudio más reciente, demostró que el antagonista de receptores kappa-opioides, nor-binaltorfimina, produce un efecto antidepresivo en el test de la natación forzada en ratas (Mague *et al.*, 2003).

El sistema noradrenérgico está implicado en muchos procesos fisiológicos y psicológicos, incluyendo la modulación del humor (Schramm *et al.*, 2001). Varios estudios han demostrado alteraciones en la transmisión noradrenérgica en la depresión (Charney, 1998; Wong *et al.*, 2001). De este modo, la noradrenalina tiene un papel importante en la fisiopatología de la depresión y en el mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos (Charney, 1998; Ressler *et al.*, 1999; Ressler *et al.*, 2000). El antagonismo de los receptores α_2 -adrenérgicos participa en la acción de los compuestos con acción antidepresiva, como en el caso de la mirtazipina, aumentando la liberación noradrenérgica y serotoninérgica a través de su acción sobre auto-receptores o hetero-receptores (Gupta *et al.*, 2003). Además, los antagonistas de receptores α_2 -adrenérgicos poseen un mayor efecto en deprimidos que en individuos normales, aumentando la actividad del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA). La activación de receptores α_2 -adrenérgicos post-sinápticos normalmente inhibe el eje HPA, sugiriendo una hipersensibilidad de estos receptores en individuos con depresión (Price *et al.*, 1986). Los receptores α_1 -adrenérgicos también pueden estar implicados en el efecto de antidepresivos por varios motivos: i) el antagonista prazosin revierte el efecto antidepresivo de compuestos, tales como el extracto de *Siphocampylus verticillatus* en el TNF en ratones (Rodrigues *et al.*, 2002). ii) la administración crónica de mirtazipina (inhibidor dual de recaptación de NA y 5-HT) aumenta la respuesta comportamental (locomoción y agresividad) y bioquímica de los receptores α_1 -adrenérgicos (Rogoz *et al.*, 2002b). iii) la reboxetina (ISRN sin ninguna afinidad por receptores de neurotransmisores) administrada crónicamente también aumenta la respuesta comportamental (locomoción y agresividad) de los receptores α_1 -adrenérgicos (Rogoz *et al.*, 2002a).

Otros estudios han propuesto que una función dopaminérgica reducida está implicada en la fisiopatología de la depresión (D'Aquila *et al.*, 2000; Rampello *et al.*, 1991). Baldessarini (Baldessarini, 1996) describe que diferentes compuestos que afectan directamente los niveles de dopamina o receptores dopaminérgicos presentan actividad antidepresiva. El tratamiento con los antidepresivos aumenta la liberación de dopamina en varias áreas del encéfalo (D'Aquila *et al.*, 2000; Tanda *et al.*, 1996; Tanda *et al.*, 1994) y aumenta la transmisión dopaminérgica principalmente en el sistema mesolímbico, induciendo una mejora en los síntomas de la depresión, tal como la anhedonia (D'Aquila *et al.*, 2000). Por tanto, el efecto de los antidepresivos

sobre la transmisión dopaminérgica parece tener un papel importante en el su efecto terapéutico. En un estudio reciente, se sugirió que la inmovilidad en el TNF está asociada a la neurotransmisión dopaminérgica en la corteza pre-frontal medial (Espejo *et al.*, 1999).

La adenosina es otro modulador probable de la depresión; existen trabajos sugiriendo que produce un efecto depresogéno y que un antagonistas de receptores A2A poseen de acción antidepresiva (El Yacoubi *et al.*, 2001; Minor *et al.*, 1994a; Minor *et al.*, 1994b). Así, en pacientes con depresión mayor se ha comprobado que la función del receptor A2A está comprometida en sus plaquetas (Berk *et al.*, 2001). Curiosamente, tanto la adenosina, como los agonistas de receptores A1 y A2 producen acción antidepresiva en el TNF en ratones (Kaster *et al.*, 2004; Kaster *et al.*, 2005a; Kaster *et al.*, 2005b).

Por otra parte, los antagonistas de la sustancia P (Maubach *et al.*, 1999) y antagonistas de receptores del factor liberador de corticotrofina (CRF) también se han sugerido como posibles dianas para dearrollar nuevos antidepresivos (Nemeroff *et al.*, 2002).

1.6.3. Antidepresivos y neuroprotección

Las vías de señalización intracelular de la proteína kinasa C (PKC), proteína kinasa A (PKA) y proteína kinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK-II) han sido implicadas en la acción de los antidepresivos. El tratamiento con varios antidepresivos altera la traslocación de estas proteínas reguladas por segundos mensajeros, provocando una alteración en el nivel de fosforilación de sus substratos en compartimentos celulares diferentes (Nestler *et al.*, 1989). Por último, se ha sugerido que las vías de señalización celular implicadas en la supervivencia y muerte celular están implicadas en las acciones de los antidepresivos, incluyendo la proteína de unión responsiva al AMPc (CREB), factor neurotrófico derivado del encéfalo (BDNF), la proteína antiapoptótica Bcl-2 y proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPKs); lo que podría explicar el retardo en el efecto de los antidepresivos de 6 a 8 semanas (Manji *et al.*, 2001). De hecho, medicamentos con diferentes mecanismos de acción utilizados para el tratamiento de la depresión como la fluoxetina (Sanchez *et al.*, 2001), la cetamina (Engelhard *et al.*, 2003; Proescholdt *et al.*, 2001), el valproato (Pan *et al.*, 2005) y el litio (Aghdam *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2002a) poseen propiedades neuroprotectoras, influenciando en el proceso de muerte neuronal. Varios fármacos con acción antidepresiva en modelos animales (Cervo *et al.*, 1987; Eckeli *et al.*, 2000); (Harkin *et al.*, 2003; Krocza *et al.*, 2001; Rosa *et al.*, 2003; Zomkowski *et al.*, 2002; Zomkowski *et al.*, 2005) también poseen un efecto neuroprotector, como la agmatina (Olmos *et*

al., 1999), el GMP (Malcon *et al.*, 1997), el zinc (Brocardo *et al.*, 2007; Matsushita *et al.*, 1996), el 7-nitroindazol (Castagnoli *et al.*, 1999) o el 8-OH-DPAT (Melena *et al.*, 2000).

1.6.4. GSK-3 β , PPAR- γ y depresión

La enzima GSK-3 β se ha implicado en el mecanismo de acción de los moduladores del humor como el litio y el valproato (Cheng *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002) así como en la transmisión serotoninérgica. La serotonina (5-HT), la fluoxetina y los agonistas de receptores 5-HT_{1A} aumentan la fosforilación de la serina 9 con la consecuente inhibición de la GSK-3 β (Li *et al.*, 2004). Por otro lado, el AR-A014418, un inhibidor específico de la GSK-3 β , tiene efecto antidepresivo en el modelo de la natación forzada (TNF) en ratas (Gould *et al.*, 2004). El L801-*mts*, un nuevo péptido inhibidor de la GSK-3 también tiene efecto antidepresivo en este mismo test, pero en ratones (Kaidanovich-Beilin *et al.*, 2004).

En lo que concierne a los receptores PPAR- γ y depresión, muy poco se sabe hasta ahora, pero podrían ser importantes en la modulación de la depresión una vez que están expresados en el hipocampo, una región del cerebro muy relacionada con la fisiopatología de la depresión (Krishnan *et al.*, 1991) y su agonismo inhibe la enzima GSK-3 β en neuronas (Inestrosa *et al.*, 2005).

Además, en la depresión existe un fuerte componente inflamatorio (Maes, 1995) que podría ser beneficiado de el efecto antiinflamatorio ejercido por el agonismo de los PPAR- γ .

1.5. Isquemia cerebral

1.5.1. Fisiopatología de la isquemia cerebral

Los accidentes cerebrovasculares son la segunda causa más común de muerte en el mundo (Murray *et al.*, 1997) y 1/6 de todos los humanos sufriremos al menos un accidente cerebrovascular en nuestra vida (Seshadri *et al.*, 2006). Además, son la causa más frecuente que conlleva a la discapacidad; aproximadamente 1/3 de los pacientes que sobreviven más de 6 meses se vuelven dependientes de los demás (Warlow, 1998). El aumento creciente en la expectativa de vida hace que los accidentes cerebro vasculares sean actualmente, y sigan siendo, la entidad patológica que presenta más desafíos científicos y terapéuticos (Durukan *et al.*, 2007).

La isquemia contribuye con un 80% de todos los casos de accidentes cerebro vasculares, y resulta generalmente de una oclusión embólica o trombótica de una arteria cerebral importante

(con mucha frecuencia es la arteria cerebral media o sus ramificaciones) (Durukan *et al.*, 2007), que alcanza un bajo flujo sanguíneo que desestabiliza el funcionamiento normal del cerebro, así como el mantenimiento de sus unidades fundamentales, neuronas y glia en regiones vulnerables (Schwartz-Bloom *et al.*, 2001).

En el cerebro de un humano normal existen muchos billones de neuronas que forman una red compleja y que ejercen varias funciones, como la memoria y el aprendizaje, que necesitan la supervivencia y la plasticidad de estas neuronas. Como las neuronas son células post-mitóticas, ellas deben sobrevivir un largo periodo de vida, y prevalecer frente a muchos factores estresantes, valiéndose de muchos mecanismos autoprotectores, para así, mantener sus funciones. Un mecanismo autoprotector representativo en el cerebro es el mediado por los factores neurotróficos o citocinas que actúan en las conexiones entre neuronas o neuronas y glia (Fields *et al.*, 2002; Hama *et al.*, 2004; Haydon, 2001). La neurogénesis puede también ser considerada uno de estos mecanismos autoprotectores. La existencia de células madre en el cerebro adulto se descubrió hace no mucho tiempo (Cameron *et al.*, 1998), y su papel fisiológico viene siendo discutido en relación a la formación de circuitos neuronales (Shors *et al.*, 2001) y neuroprotección frente a daños cerebrales (Magavi *et al.*, 2000; Prochiantz, 2000). Un tercer mecanismo de autoprotección podría ser considerado el cambio del tipo de muerte celular (Fujita *et al.*, 2003a; Fujita *et al.*, 2003b). Tras un daño isquémico en el cerebro, inicialmente ocurre una necrosis en el núcleo del infarto (ver **Figura 4**), mientras que la apoptosis ocurre varios días después en la región alrededor del núcleo, en la región llamada de penumbra (Dirnagl *et al.*, 1999). Las células necróticas inducen un daño secundario a las células vecinas, mientras que células apoptóticas no lo hacen. En este sentido, un cambio en el modo de muerte celular de necrosis a apoptosis podría tener un papel autoprotector, para frenar una invasión de muerte celular en el cerebro.

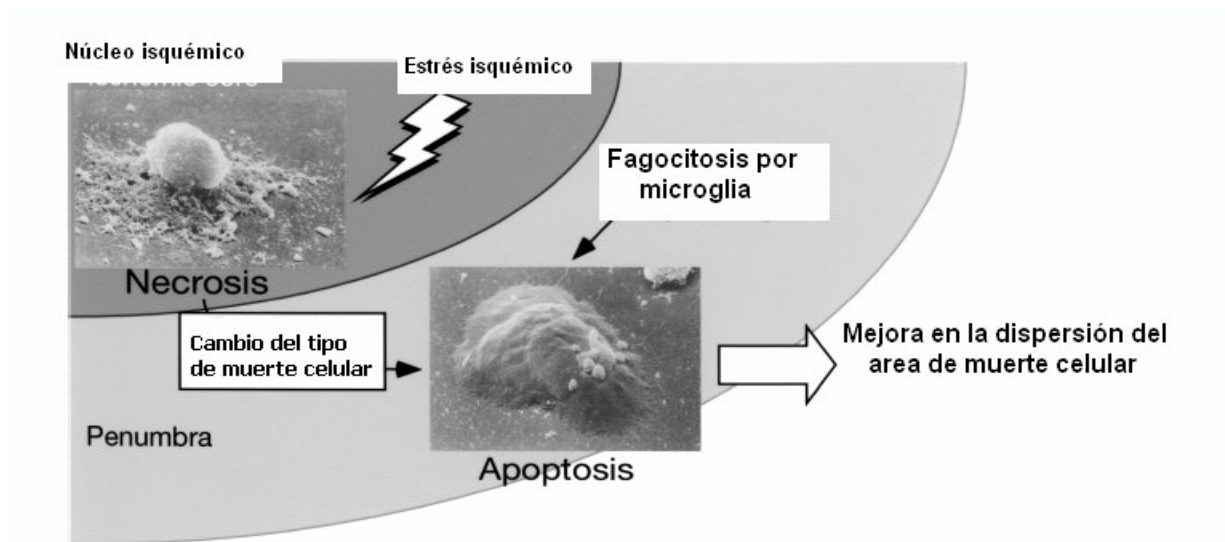


Figura 4. Modelo de la autoprotección mediante el cambio en el modo de muerte celular de neuronas en el cerebro isquémico. Una vez que estas neuronas liberan sustancias citotóxicas, como el glutamato y el potasio, otras neuronas de alrededor del núcleo del infarto tienden a morir por necrosis. Entretanto, parece ser que tras un infarto, estas neuronas pueden liberar sustancias todavía no identificadas, que inhibirían la necrosis, mediante la inducción de apoptosis. De esta manera las neuronas en la zona de penumbra se mueren por apoptosis. Una vez que las células apoptóticas son fagocitadas por la microglia, este mecanismo podría frenar la muerte por necrosis (Ueda *et al.*, 2004).

Esto tiene mucho sentido si pensamos que las células necróticas liberan muchas sustancias excitotóxicas como el potasio y el glutamato. (Ueda *et al.*, 2004). Curiosamente, algunos de los productos de la excitotoxicidad liberados al medio como el propio potasio, glutamato, o los ROS generados en la mitocondria parecen ser neuroprotectores frente a un estímulo por sobrecarga de calcio, tipo la veratridina, la activación del NMDA y AMPA o la propia isquemia mediante un preconditionamiento (Liang *et al.*, 2005; Marini *et al.*, 2007; Orozco *et al.*, 2006). Tal vez la diferencia de concentraciones, así como el tiempo en el que están sometidas a estos posibles agentes tóxicos sea lo que determina la muerte o el desencadenamiento de mecanismos de protección (o cambio en el modo de muerte celular) distintamente en el núcleo de infarto o en la penumbra. Una clara demostración de este mecanismo de cambio de necrosis a apoptosis es el hecho de que neuronas privadas de suero en cultivo muestran una muerte necrótica, y cuando son sometidas a altas concentraciones de glucosa, lo que se observa es un cambio a apoptosis, un evento mediado por la activación de la PKC y a un incremento en la expresión de Bax y Bid, dos proteínas proapoptóticas, pero sin cambios en la cantidad o expresión de Bcl-2, una proteína antiapoptótica. Este efecto no ocurre cuando se las tratan las células con piruvato en vez de glucosa; en este caso las neuronas son protegidas sin que ocurra el cambio en el modo de muerte celular (Hamabe *et al.*, 2003).

Aunque la apoptosis sea o no un mecanismo autoprotector inicial en el cerebro, evitando la necrosis desenfrenada, la pérdida de muchas neuronas en la reperfusión es la consecuencia final del seguimiento de esta apoptosis. Por este motivo, sería extremadamente beneficioso rescatar tanto las neuronas en fase inicial de necrosis como las que han entrado en apoptosis.

El cerebro es dependiente, casi exclusivamente, del flujo constante de glucosa y oxígeno para la producción de energía, porque no tiene suficientes reservas de energía; dicha privación ocurre en cuestión de minutos. La primera consecuencia de la reducción en el flujo sanguíneo es la interrupción en el suministro de oxígeno y glucosa, lo que induce la acumulación de lactato vía la glicólisis anaerobia. La acidosis puede empeorar la formación de ROS, interferir con la síntesis proteica y empeorar el daño isquémico (Mergenthaler *et al.*, 2004; Siesjo *et al.*, 1993).

La depleción de energía lleva a un mal funcionamiento de las bombas iónicas Na^+/K^+ -ATPasas, y Ca^{2+}/H -ATPasas; el transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ funciona de manera inversa. Como resultado de todo ello, los niveles de potasio aumentan en el medio extracelular y los de sodio, calcio y cloruro aumentan en el medio intracelular; Esta alteración en la homeostasia de los iones ocasiona el subsiguiente edema citotóxico. Otra consecuencia del cambio incontrolado en las concentraciones de iones es la pérdida del potencial de membrana, y tanto las neuronas como la glia entran en la llamada despolarización anóxica (Durukan *et al.*, 2007).

Tras la despolarización anóxica, los aminoácidos excitadores, principalmente el glutamato, se liberan al medio extracelular desde las neuronas presinápticas, aún en las fases tempranas de la isquemia. Además, la activación de los receptores NMDA, AMPA y receptores metabotrópicos llevan a un aumento intracelular del calcio, aumentando conjuntamente el edema celular y los procesos desencadenados por la sobrecarga intracelular de calcio (Dirnagl *et al.*, 1999).

El daño neuronal que ocurre en el núcleo del infarto tras una isquemia cerebral se ha atribuido desde hace tiempo a esta hiperestimulación de los receptores de glutamato (Choi, 1996). Sin embargo, en cultivos organotípicos de rodajas de hipocampo, en condiciones normales, la excitotoxicidad inducida por glutamato es débil probablemente porque los astrocitos puedan recaptar fácilmente el glutamato liberado. En situaciones de anoxia, el glutamato puede ser extremadamente tóxico si no puede ser recaptado por los transportadores de glutamato de la glia ya que no hay una producción de ATP (Arias *et al.*, 1999). Este daño excitatorio ha sido originalmente atribuido a una prolongada apertura del receptor de glutamato del sub-tipo NMDA y el resultante acúmulo intracelular de calcio que esto conlleva (Durukan *et al.*, 2007).

Existen evidencias tanto *in vitro* como *in vivo* de que un aumento intracelular del calcio es el mediador del daño neuronal inducido por la isquemia (Choi, 1995). La elevación del calcio

intracelular desencadena una serie de eventos que incluyen la activación de enzimas como la fosfolipasa A₂, proteasas y endonucleasas, la acumulación de eicosanoides (ácidos grasos insaturados), la generación de especies reactivas de oxígeno y la ruptura de la función mitocondrial. Tradicionalmente se defiende que la mayor entrada de calcio durante la isquemia se da post-sinápticamente por los receptores NMDA. La activación del receptor NMDA puede estimular la fosfolipasa A₂ (PLA₂) y generar ácido araquidónico (Dumuis *et al.*, 1993). Tanto el ácido araquidónico como sus metabolitos, como las prostaglandinas y los tromboxanos, se acumulan en el hipocampo y corteza cerebral durante la reperfusión (Gaudet *et al.*, 1980). Estos compuestos son muy susceptibles a peroxidación por ROS, que se acumulan por la ruptura del potencial de membrana mitocondrial, reducción del ATP y mal funcionamiento de los mecanismos de defensa durante la isquemia. Además, la PLA₂ metaboliza los fosfolípidos de membrana y sus productos, siendo ácidos grasos libres y lisofosfolípidos, pueden funcionar como detergentes en la membrana celular, promoviendo más daño. Los ácidos grasos libres pueden también inhibir la fosforilación oxidativa y regular el funcionamiento de canales iónicos y el factor activador de plaquetas (PAF); este factor se produce a partir del ácido araquidónico, activando e induciendo la agregación de leucocitos (Farooqui *et al.*, 1997).

La excitotoxicidad inducida por el glutamato es dependiente del calcio extracelular (Arias *et al.*, 1999). Sin embargo, esta dependencia también ocurre durante la excitotoxicidad inducida por el agonismo AMPA, un efecto que no puede ser bloqueado por antagonistas NMDA como el MK-801, y por lo tanto, independiente de la activación secundaria de los receptores NMDA. Los receptores del subtipo AMPA/kainato se creía que eran muy permeables a sodio y poco al calcio, pero la caracterización molecular posterior ha revelado que la permeabilidad al calcio de los receptores AMPA y kainato dependen de las subunidades que forman el receptor (Dravid *et al.*, 2003).

Por este motivo, el antagonismo aislado del receptor NMDA no parece ser la mejor estrategia terapéutica para frenar la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad. De hecho, la co-aplicación de antagonistas AMPA y NMDA revierte la excitotoxicidad del glutamato al mismo nivel que la retirada del calcio extracelular y parece ser superior a la administración de antagonistas NMDA o AMPA por separado (Arias *et al.*, 1999).

1.5.2. Tipos de muerte neuronal

La muerte celular por apoptosis tiene mecanismos y morfología diferente de la necrosis, aunque en algunos aspectos se defiende que forman un continuo (ver **Figura 5**). El dato que

parece ilustrar más claramente el componente apoptótico del fenómeno de muerte neuronal tardía en la isquemia es el hecho que las neuronas de la capa CA1 del hipocampo sobreviven al daño agudo, pero se mueren en un plazo de 48 a 72 horas tras la isquemia. Otro hecho igualmente relevante es que la inhibición de la síntesis de proteínas disminuye la muerte neuronal tardía en esta capa CA1 en el hipocampo, indicando claramente una muerte apoptótica en este periodo (Choi, 1996).

La apoptosis puede ser desencadenada desde la mitocondria, la activación de los llamados receptores de muerte o desde el retículo endoplásmico por el llamado estrés reticular (ER) (Ueda *et al.*, 2004). La mitocondria parece desempeñar un papel importante en la apoptosis inducida por la isquemia seguida de reperfusión. Habitualmente, un incremento del calcio intramitocondrial puede estimular el funcionamiento de las deshidrogenasas y, de esta manera estar controlando la producción de energía por la mitocondria (Gunter *et al.*, 2000). Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, durante la isquemia existe una sobrecarga de calcio producida por la hiperactivación de los distintos receptores de glutamato y apertura de canales de calcio dependientes de voltaje ocasionada por la despolarización anóxica (Muramatsu *et al.*, 2007). La mitocondria posee mecanismos de transporte específicos para el calcio, pudiendo entrar por el uniportador, y bombeado hacia fuera por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Gunter *et al.*, 2000). El intercambiador se satura cuando los niveles de calcio en la mitocondria aumentan demasiado, pero el uniportador no es saturable con el incremento extracelular de calcio. La consecuencia es que cuando la concentración extramitocondrial de Ca^{2+} aumenta demasiado, la mitocondria ya no puede regular la concentración de calcio interna, y por lo tanto, se sobrecarga de este catión (Gunter *et al.*, 2000).

En condiciones fisiológicas, esta sobrecarga puede suceder sin ningún daño mitocondrial. Sin embargo, cuando la sobrecarga va acompañada de la combinación de otros factores celulares (el estrés oxidativo, concentraciones altas de fosfatos o bajas concentraciones de adenina) la mitocondria entra en un estado llamado de permeabilidad transitoria. El estado de permeabilidad transitoria de la mitocondria consiste en la apertura de un poro en la membrana interna, conocido como MPTP (del inglés, *mitochondria permeability transition pore*), ocasionando una permeabilidad no específica de la membrana para cualquier molécula menor que 1.5 kDa (Halestrap, 2006). Si esta situación no es revertida, lleva a la muerte neuronal por necrosis debido a un fallo energético (Halestrap, 2006). En una situación de isquemia con reperfusión, el periodo de isquemia lleva a una bajada drástica en los niveles de ATP/ADP, la depleción de adenina y la formación de ácido láctico, y el consiguiente descenso del pH intracelular. La célula

intenta revertir esta situación utilizando el intercambiador Na^+/H^+ , y la célula se llena de Na^+ , pero como el ATP está comprometido, el Na^+ no puede ser bombeado hacia fuera.

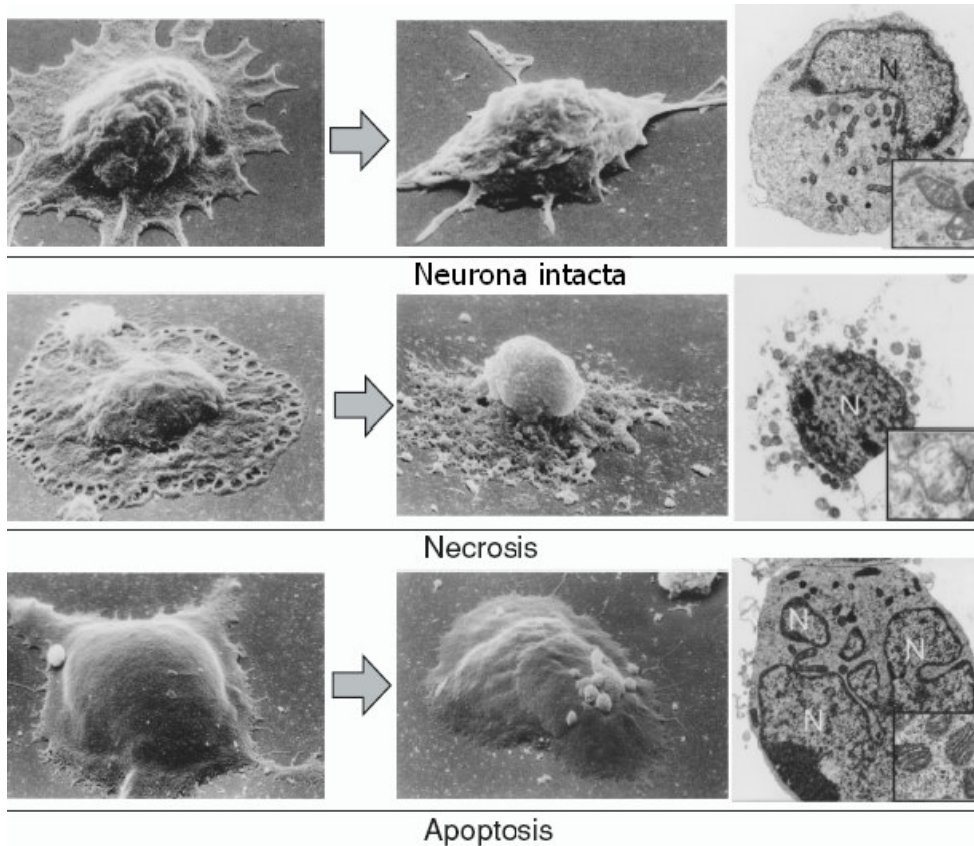


Figura 5. Diferencias morfológicas entre necrosis y apoptosis a través de microscopía electrónica por barrido observada a las 6 h (panel de la izquierda) o 12 h (panel central) tras el comienzo del cultivo y microscopía electrónica por transmisión. La observación por trasmisión observada a las 12 h (panel al centro) tras el inicio del cultivo. El panel de la derecha demuestra un aumento de la mitocondria. La células normales son neuronas en cultivo con suero, las necróticas están cultivadas sin suero y las apoptóticas sin suero más una alta concentración de glucosa. Adaptado de (Ueda *et al.*, 2004).

El resultado es que la célula se llena de calcio mediante la reversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. En la reperfusión, el exceso de calcio encuentra la mitocondria nuevamente con energía y oxígeno disponibles, lo que lleva a la formación de los radicales libres. En este momento se reúnen condiciones extremadamente favorables para la apertura del poro, pero hay un factor que todavía lo inhibe, el pH. Un pH bajo inhibe la formación del MPTP de manera potente, entonces las condiciones serían perfectas solamente si esta exigencia fuera cumplida mediante la pérdida del ácido láctico acumulado. De hecho, la apertura del MPTP tras una isquemia no ocurre sino tras 2 minutos de reperfusión, cuando el pH ha vuelto a las condiciones normales (Halestrap *et al.*, 2004). Una fuerte indicativo de que el MPTP puede ser importante en la reperfusión viene del hecho que la inhibición de la formación del MPTP con ciclosporina A, nuevos análogos de ciclosporina A (Muramatsu *et al.*, 2007) u otros mecanismos que lo impidan (Halestrap *et al.*, 2004), como por ejemplo la administración de piruvato, que puede actuar

disminuyendo drásticamente la producción de radicales actuando como un secuestrador y manteniendo un pH más bajo durante la reperfusión, aparte de ser un sustrato de la respiración celular (Stanley *et al.*, 2005). Otra estrategia para inhibir la formación del MPTP es la inhibición del intercambiador Na^+/H^+ con cariporida (Javadov *et al.*, 2005). De hecho los ratones transgénicos para la isoforma NHE1 de Na^+/H^+ tienen menos lesión frente a la POG seguida de re-oxigenación y menor liberación del citocromo C de la mitocondria (Luo *et al.*, 2006a). La cariporida disminuye la entrada de Na^+ y consecuentemente de Ca^{2+} durante la isquemia y disminuye la recuperación del pH durante la reperfusión (Karmazyn *et al.*, 2001). El preconditionamiento isquémico también inhibe la formación del MPTP (Christophe *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). El preconditionamiento parece inhibir la formación del poro al reducir la sobrecarga de Ca^{2+} y la producción de ROS, probablemente mediante la activación de los canales de K^+ mitocondriales sensibles a ATP (Christophe *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006).

La consecuencia de esta apertura del poro de transición sería la liberación del citocromo c, y otras moléculas relacionadas con la apoptosis como el AIF, Smac/DIABLO, EndoG y HtrA2/Omi, la consecuente activación de la caspasa 3 y la ejecución de la apoptosis a través de la fragmentación del ADN (Halestrap *et al.*, 2004; Ueda *et al.*, 2004). Siguiendo esta línea de razonamiento, es de esperar que los inhibidores de caspasas sean neuroprotectores frente a la lesión apoptótica inducida en modelos de isquemia como la privación de oxígeno y glucosa y, de hecho, lo son (Gottron *et al.*, 1997).

Las conocidas proteínas de la familia Bcl-2 pueden regular la apoptosis positiva o negativamente mediante una regulación de la apertura del MPTP (ver **Figura 6**). Dentre ellas se encuentran Bax y Bak que la estimulan y Bcl-2 y Bcl-xL que la inhiben cuando son sobreexpresadas (Ueda *et al.*, 2004). Muchas otras proteínas de esta familia regulan la apertura del poro, por ejemplo Bad y Bim, que pueden estimular la apertura del poro cuando se unen a Bcl-2 o Bcl-xL (Tsujimoto, 2002). La proteína Bad puede ser modulada por fosforilación de Akt, una kinasa que controla una de las vías más conocidas de supervivencia celular y que es activada por muchos factores de crecimiento, y cuando se desfosforila pierde esta interacción con Bcl-2 y Bcl-xL (Shimizu *et al.*, 2000; Ueda *et al.*, 2004) La proteína Bim, cuando se desfosforila, se secuestra por los microtúbulos, y cuando es fosforilada se desasocia de ellos. En este estado, es transportada a la mitocondria y se dimeriza con Bcl-xL (Ueda *et al.*, 2004). Es interesante notar que el dominio BH4 de la proteína Bcl-xL previene la muerte celular inducida por la disfunción mitocondrial, incluyendo la isquemia cardíaca, cuando se inyecta intraperitonealmente (Sugioka *et al.*, 2003).

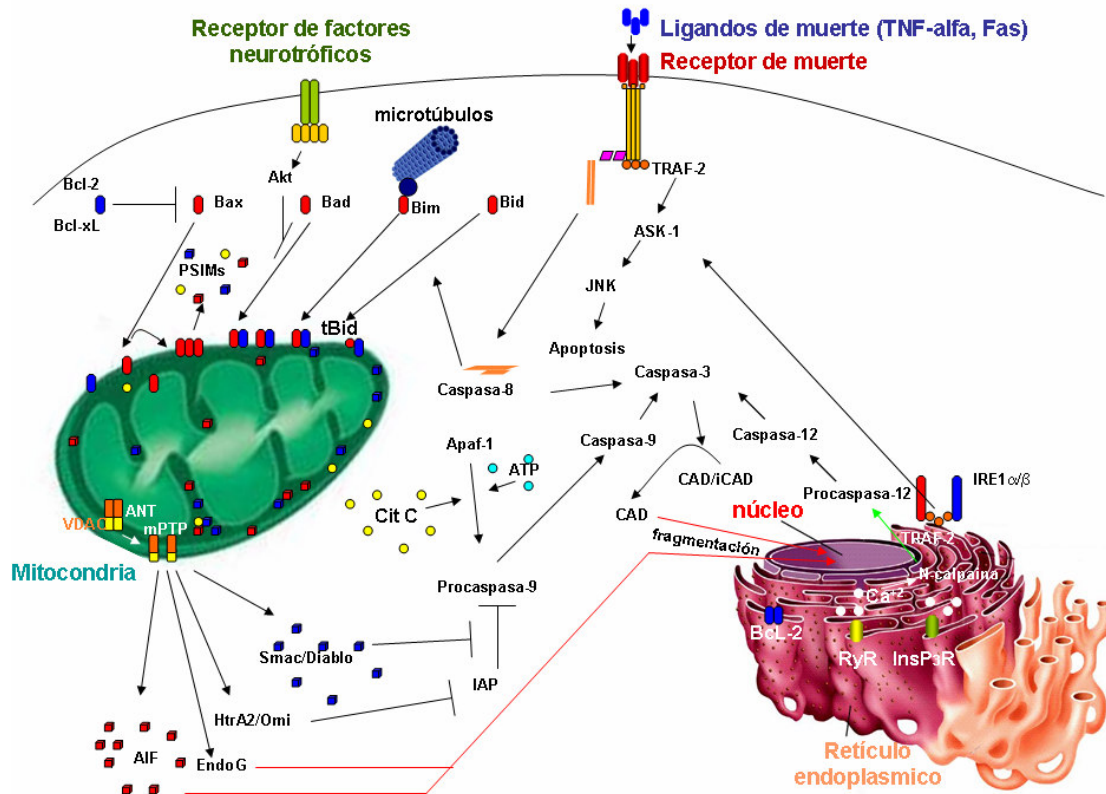


Figura 6. Mecanismos propuestos para las 3 vías principales de apoptosis. Abreviaturas: PSIMs (proteínas solubles intermembrana), AIF (Factor inductor de apoptosis, del inglés: apoptosis inducing factor), cyt. c (citocromo c, del inglés: cytochrome c), tBid (proteína Bid trucada, del inglés: truncated Bid), Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1), VDAC (canal de aniones dependiente de voltaje, del inglés: voltage-dependent anion channel), ANT (adenine nucleotide translocase), TRAF-2 (Factor asociado al receptor TNF-2, del inglés: tumor necrosis factor receptor-associated factor-2), RyR (Receptores de rianodina, del inglés: ryanodine receptor/ Ca^+ channel), JNK (kinasa c-jun, del inglés: c-jun kinase) (Ueda *et al.*, 2004).

Otro mecanismo que desencadena la apoptosis es la activación de los receptores de muerte Fas y $\text{TNF}\alpha$ -1, que están implicados en las señales de muerte inducida por ligandos como el Fas o $\text{TNF}\alpha$, mediante los dominios proteicos de muerte FADD, RIP y TRADD, seguido de la activación de la caspasa-8 y caspasa-3. Recientemente se ha demostrado que la activación de los receptores de muerte puede activar la vía mitocondria mediante la formación de Bid trucada (tBid), concretamente se produce el clivaje parcial de Bid. La estimulación de los receptores de muerte también regulan la señal de la kinasa regulada por señal-1 (signal-regulating kinase 1, ASK-1) a través de RIP y TRAF-2, que a su vez está asociada a la activación de la kinasa Jun N-terminal kinase (JNK) que es independiente de la caspasa 3 (Ueda *et al.*, 2004).

El tercer mecanismo que puede desencadenar la apoptosis proviene del retículo endoplásmico. El estrés reticular, inducido por la salida de calcio de su interior, induce el acúmulo de proteínas aberrantes en su interior. Estas proteínas ocasionan el clivaje de $\text{IRE1}\alpha/\beta$ y de la caspasa-12 (caspasa-4 en humanos). Cuando se activa el $\text{IRE1}\alpha/\beta$ se produce la

oligomerización de TRAF-2, que conlleva a la apoptosis por activación de la JNK. La activación de la caspase-12 está asociada con la activación de la caspasa-3 (Ueda *et al.*, 2004).

1.5.4. Tratamiento de la isquemia cerebral

Existe la idea general entre los clínicos, de que todo funciona en animales perfectamente, pero que nada llega a ser satisfactorio cuando llega a la clínica (O'Collins *et al.*, 2006). Hasta ahora, se han estudiado fármacos de distintos orígenes, algunos de ellos de fuentes que nos pueden parecer incluso exóticas, como por ejemplo el veneno de una víbora de Malasia, bebidas ceremoniales de la Polinesia, extracto de ajo envejecido, péptidos de caracoles marinos (O'Collins *et al.*, 2006). El análisis extensivo de 1.026 tratamientos distintos ha sugerido que hasta la actualidad se han testado cerca de 1.000 tratamientos farmacológico y no farmacológicos en distintos modelos animales relacionados con la isquemia y 114 en ensayos clínicos. De estos, 97 han sido testados tanto en humanos como en modelos animales, y sorprendentemente, la eficacia de estos fármacos en los dos casos parece no diferenciar y ningún mecanismo de acción se destaca a los demás cuando analizado estadísticamente. Esto plantea la cuestión de si se están eligiendo los fármacos con mejor perfil terapéutico para los ensayos clínicos, ya que muchos de los fármacos estudiados en la clínica no han llegado a ser tan eficaces como en los modelos animales; de hecho algunos de ellos ni siquiera han pasado por la preclínica (O'Collins *et al.*, 2006).

Entre los fármacos que han llegado a la clínica se encuentran los antagonistas NMDA y AMPA, agonistas GABA, inhibidores de canales de calcio y sodio, sequestradores de radicales libres, inhibidores de la NOS, inmunosupresores, inhibidores de la adhesión y proliferación de leucocitos, factores de crecimiento, antiapoptóticos, antiplaquetario, anticoagulantes, trombolíticos, antifibrinogénicos, percursores de componentes de membrana, hiperosmóticos acompañados del tratamiento no farmacológico con hipotermia (O'Collins *et al.*, 2006; Schabitz *et al.*, 2006). A pesar de ello, los trombolíticos son hoy los únicos fármacos autorizados para el tratamiento de la isquemia (Adams, 2001).

Debido a la compleja fisiopatología de la isquemia cerebral, nuevas alternativas terapéuticas para el ictus siguen evaluándose en modelos animales. Algunos ejemplos son la galantamina, olanzepina, risperidona, monociclina y dos citocinas hematopoiéticas, la G-CSF y la SCF.

La galantamina, un fármaco utilizado actualmente para el tratamiento del Alzheimer, es un modulador alostérico de los receptores nicotínicos con una actividad bloqueante moderada

sobre la acetilcolinesterasa, mantiene su efecto neuroprotector incluso cuando se administra 3 h después de inducir la isquemia cerebral global en los animales, además, dicha neuroprotección se correlaciona con una mejora funcional de los animales (Ji *et al.*, 2007; Lorrio *et al.*, 2007).

La olanzepina y la lamotrigina son dos antiepilépticos, que pueden disminuir el tamaño del infarto en modelos de isquemia focal en animales (Smith *et al.*, 1995; Yulug *et al.*, 2006b).

La risperidona, un antipsicótico que antagoniza los receptores D2 y 5-HT₂, también ha demostrado ser neuroprotector frente a la oclusión permanente de la arteria cerebral media (Yulug *et al.*, 2006a).

La minociclina, una tetraciclina de segunda generación, posee propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas y antioxidantes y se ha visto que puede proteger frente a la isquemia cerebral *in vivo* a través de la inhibición de NOS, IL-1 β y PGE₂ (Cho *et al.*, 2007).

Otro mecanismo novedosos de neuroprotección, es la utilización del factor estimulante de colonias de granulócitos (*Granulocyte-colony stimulating factor*, G-CSF), una citosina hematopoiética que ha demostrado ser neuroprotectora mediante la activación de distintas vías de señalización como la Jak-Stat3, que aumenta la expresión de Bcl-2 y Bcl-xL, la vía de ERK 1/2 y la vía de la PI3K-Akt. Además, puede promover la diferenciación de las células madre neurales a neuronas, y poseer un efecto antiinflamatorio por interferir en la expresión de la iNOS, IL-1 β y interferon-1 γ y protege frente a la excitotoxicidad del glutamato (Solaroglu *et al.*, 2006). En un trabajo muy prometedor, la administración G-CSF o el factor de células madre (*stem cell factor*) aumentaron la neurogénesis cuando se administraron, por separado o en combinación, del día 11 al 16 tras la isquemia focal. Las dos citocinas en combinación produjeron también una mejora en la coordinación motora y la memoria cuando se inyectaron conjuntamente por vía subcutánea a partir de las 24 h de la isquemia hasta el día 10, o incluso del día 11 al 20 tras la isquemia (Kawada *et al.*, 2006).

Aunque el incremento de calcio citosólico sea uno de los mecanismos responsables por la muerte neuronal en la isquemia, existe evidencia de que los incrementos sostenidos entre 50 y 200 nM pueden desencadenar señales neuroprotectoras. De hecho, la entrada a través de la estimulación de los receptores NMDA (Gonzalez-Zulueta *et al.*, 2000), o utilizando ionóforos como la ionomicina (Bickler *et al.*, 2004) o liberación de calcio desde el retículo endoplásmico con isoflurano o frutosa-1,6-fosfato (Bickler *et al.*, 2005; Donohoe *et al.*, 2001; Fahlman *et al.*, 2002) han mostrado efectos neuroprotectores o preconditionantes frente a la POG. Esto hace pensar que la cantidad de calcio es más relevante, en este caso, que su origen, y en estas concentraciones produce estas señales neuroprotectores mediante la activación de quinasas como

la ERK ½ y/o PI3K/Akt (Bickler *et al.*, 2004; Bickler *et al.*, 2005; Donohoe *et al.*, 2001; Fahlman *et al.*, 2002). El fenómeno de condicionamiento viene siendo estudiado extensivamente; la mayor crítica a este tipo de abordaje es el momento del condicionamiento, pero se ha demostrado que el condicionamiento post isquemia con periodos muy corto de isquemia y reperfusión son neuroprotectores frente a la muerte neuronal inducida por la reperfusión, un mecanismo mediado por la activación de la vía PI3K-Akt (Rehni *et al.*, 2007).

1.5.3. GSK-3β, PPAR-γ y neuroprotección

Por su participación en el metabolismo celular y en el control de numerosas funciones celulares, la GSK-3β puede influenciar la muerte neuronal de varias maneras y, tal vez, este sea el motivo por el cual está implicada en la fisiopatología de muchas enfermedades del SNC en las cuales hay pérdida neuronal. Algunos ejemplos de estas enfermedades son la enfermedad de Alzheimer, la isquemia cerebral, la depresión o la enfermedad de Parkinson (Chen *et al.*, 2004a; Chen *et al.*, 1999; Gould *et al.*, 2004; Gould *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2004; Kwok *et al.*, 2005). La exposición al péptido β-amiloide aumenta la actividad de la GSK-3β en neuronas hipocámpales y disminuye los niveles de acetilcolina (ACh) por inhibir la actividad de la piruvato deshidrogenasa (PDH), la cual es responsable de la conversión del piruvato a acetil-CoA, un precursor para la síntesis de la ACh y ATP (Hoshi *et al.*, 1996). Estudios en líneas neuronales demostraron que la sobreexpresión del dominante inactivo de la GSK-3β previene la apoptosis (Bhat *et al.*, 2000) y que la sobreexpresión de una forma activa de la GSK-3β es suficiente para inducir muerte neuronal (Hetman *et al.*, 2000). Aunque el mecanismo exacto por el cual la GSK-3β facilita la muerte neuronal aún está por aclarar, existe evidencia de que sea un mecanismo anterior a la activación de la caspasa-3 (Bhat *et al.*, 2002). La correlación directa entre el aumento de la expresión o actividad de la GSK-3β y la hiperfosforilación de la proteína τ (una característica fundamental en la patología del Alzheimer) también ha sido sugerida. Por ejemplo, animales transgénicos que sobreexpresan la GSK-3β tienen niveles aumentados de fosforilación de τ y se postula que esta sobreexpresión es letal para los embriones (Brownlee *et al.*, 1997). En el caso de ratones que sobreexpresan condicionalmente la GSK-3β, estos tienen un aumento en la fosforilación de la proteína τ y una neurodegeneración generalizada (Lucas *et al.*, 2001).

En estudios relacionados con la isquemia cerebral, se ha demostrado que los inhibidores de la GSK-3β son protectores tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. La pre-incubación con un

inhibidor específico de la GSK-3 β , el Chir025, redujo la muerte celular en cultivos de neuronas de hipocampo tras la exposición al glutamato. En este mismo trabajo, la muerte producida por la privación de oxígeno y glucosa también fue reducida por el tratamiento con el Chir025 por 24 horas incluyéndola POG (Kelly *et al.*, 2004). También la incubación durante 7 días con SB-216763 o el SB-415286, dos inhibidores selectivos de GSK-3 β , protegieron frente la lesión producida por agonistas NMDA y no NMDA (Facci *et al.*, 2003). Además, el pre-tratamiento con estradiol durante 7 días ha demostrado ser neuroprotector en cultivos organotípicas de rodajas de hipocampo sometidas a POG, por un mecanismo que implica la activación de la Akt y la consecuente inhibición de la GSK-3 β (Cimarosti *et al.*, 2005).

En estudios *in vivo* también se ha demostrado el efecto neuroprotector de los inhibidores de la GSK-3 β frente la isquemia o modelos de lesión que se correlacionan con esta. Recientemente se ha demostrado que la GSK-3 β se activa por la hipoxia y que tanto la imipramina (un antidepresivo tricíclico), como el litio o el valproato (estabilizadores del humor) impiden su desfosforilación y la consecuente inhibición de la GSK-3 β (Roh *et al.*, 2005). El antagonista GSK-3 β , Chir025 reduce el volumen de infarto en ratas sometidas a una isquemia focal con reperfusión (Kelly *et al.*, 2004). En otro trabajo, el mantenimiento del cerebro a 33 grados durante 10 minutos antes de una isquemia global en ratas disminuyó la expresión de la GSK-3 β a las 24 o 72 horas después de la isquemia (Kelly *et al.*, 2005). Estos estudios *in vitro* e *in vivo* confirman que la GSK-3 β participa en la supervivencia neuronal y por lo tanto, su relevancia en el estudio de enfermedades neurodegenerativas o en donde haya una muerte neuronal.

La activación de los receptores PPAR- γ también ejercen un efecto sobre la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas o frente a alguno de sus principales agentes patológicos en la enfermedad de Alzheimer, la encefalitis autoinmune, la esclerosis lateral amiotrófica, y la isquemia cerebral (Breidert *et al.*, 2002; Collino *et al.*, 2006; Feinstein *et al.*, 2002; Kiaei *et al.*, 2005). Un estudio reciente ha demostrado que estos receptores se expresan en el hipocampo y que su agonismo puede proteger frente a la toxicidad del β -amiloide (Inestrosa *et al.*, 2005). Otros estudios han comprobado la eficacia de los agonistas de este receptor en modelos de excitotoxicidad (Zhao *et al.*, 2006), la OGD (Wang *et al.*, 2006) e isquemia *in vivo*, reduciendo el estrés oxidativo y la inflamación mediada por la COX-2, MAPKp38 y NF κ B tras un proceso isquémico (Collino *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2006b; Pereira *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005), incluyendo su agonista endógeno prostaglandina J2 que también es protector frente a la isquemia (Lin *et al.*, 2006).

2. Objetivos

El objetivo general de esta tesis ha sido identificar las propiedades antinociceptivas, antidepresivas y neuroprotectoras de tres nuevas TDZDs, el NP00111, NP031112 y NP031115.

De forma más concreta, los objetivos han sido:

I. Evaluación del efecto analgésico de las TDZSs en distintos modelos de dolor “in vivo”

1. Determinar si la TDZD NP031112, el inhibidor de GSK-3 β AR-A014418 y el agonista PPAR- γ rosiglitazona poseen un efecto antinociceptivo
2. Determinar el mecanismo antinociceptivo de la TDZD NP031112
3. Evaluar el efecto antialodínico de la TDZD NP031112
4. Evaluar el efecto antihiperalgésico de la TDZD NP031112

II. Evaluación del efecto antidepresivo de las TDZDs “in vivo”

5. Estudiar el efecto antidepresivo de las TDZDs NP031112, NP031115, del inhibidor de GSK-3 β AR-A014418 y el conocido agonista PPAR- γ rosiglitazona en el test de natación forzada en ratones
6. Determinar la participación de los receptores PPAR- γ en el efecto antidepresivo de las TDZDs NP031112, NP031115

III. Evaluación del efecto neuroprotector de las TDZDs en un modelo de isquemia cerebral “in vitro”

7. Determinar si el NP031112, NP00111 y NP01139 protegen frente la lesión inducida por POG en rodajas de hipocampo de rata y, comparar sus efectos con los de los inhibidores de GSK-3 β el litio y el AR-A014418, así como, con el agonista PPAR- γ rosiglitazona.
8. Dilucidar el mecanismo neuroprotector de las nuevas TDZDs en este modelo agudo de isquemia.

3. Materiales y métodos

3.1. Estudios de nocicepción

Test de las contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético

Se ha empleado el test de las contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético de acuerdo con el método descrito anteriormente (Le Bars *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 1999). La respuesta nociceptiva se indujo mediante la inyección intraperitoneal de ácido acético (0,6%) diluido en solución salina (0,9%). Tras la inyección de ácido acético los ratones se observaron en cilindros de cristal individuales y el número de contorsiones abdominales se cuantificó durante un período de 20 minutos.

Test de la formalina

El procedimiento utilizado es esencialmente el mismo al descrito anteriormente (Santos *et al.* 1999; Rosa *et al.* 2005). Los ratones Swiss recibieron una inyección de 20 μ l de una solución de formalina al 2.5% (0.92% formaldehído) disuelta en solución salina (0,9% NaCl) e inyectada intraplantarmente (i.pl.) en la superficie ventral de la pata derecha trasera. Después de la inyección i.pl. de formalina, los animales se dispusieron en un cilindro de cristal de 20 cm de diámetro y se cuantificó el tiempo que el animal se lamió la pata con un cronómetro. Los animales se observaron del minuto 0 al 5 para la fase neurogénica y del minuto 15 al 30 para la fase inflamatoria; el tiempo total que los animales lamieron la pata durante las distintas fases se consideró como el parámetro de nocicepción.

Nocicepción inducida por glutamato intraplantar

Los ratones Swiss recibieron una inyección de 20 μ l de una solución de glutamato (100 nmoles/pata) disuelta en solución salina (0,9% NaCl), inyectada intraplantarmente (i.pl.) en la superficie ventral de la pata derecha trasera. Después de la inyección i.pl. de glutamato, los animales se dispusieron en un cilindro de cristal de 20 cm de diámetro y el tiempo en el que el animal se lamió la pata fue registrado con un cronómetro. Los animales se observaron durante 15 minutos y el tiempo total que los animales lamieron la pata se consideró como el parámetro de nocicepción (Beirith *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2005).

Nocicepción inducida por agonistas selectivos de los receptores glutamatérgicos y de sustancia P

Con la finalidad de obtener información respecto a la implicación de los receptores glutamatérgicos y de la sustancia P (SP) en los mecanismos antinociceptivos de las TDZDs, se evaluó la actividad antinociceptiva de estos fármacos sobre la nocicepción inducida por la inyección intratecal de agonistas glutamatérgicos y SP en ratones de acuerdo con el método anteriormente descrito (Scheidt et al., 2002). La respuesta nociceptiva se indujo mediante la inyección intratecal de 5 μ l de SP (0,1 nmol/sitio), trans-ACPD (50 nmol/sitio), AMPA (AMPA, 135 pmol/sitio), glutamato (175 nmol/sitio), kainato (110 pmol/sitio) o NMDA (200 pmol/sitio). Tras la inyección de las diferentes sustancias, los ratones se observaron en cilindros de cristal individuales y el tiempo en que el animal permaneció lamiendo o mordiendo la región posterior del cuerpo se cuantificó y se consideró como indicativo de nocicepción durante los períodos apropiados para cada sustancia: glutamato (3 min); NMDA e sustancia P (5 min); AMPA (1 min); kainato (4 min) y trans-ACPD (15 min).

Nocicepción inducida por citocinas inflamatorias

Con el objeto de determinar si ciertas citocinas inflamatorias podrían estar implicadas en el mecanismo antinociceptivo de las TDZDs, se evaluó la actividad antinociceptiva del NP031112 sobre la nocicepción inducida por la inyección intratecal de TNF- α e IL-1 β . La respuesta nociceptiva se indujo mediante la inyección intratecal de 5 μ l de TNF- α (0,1 pg/sitio) e IL-1 β (1 pg/sitio). Tras la inyección de las diferentes sustancias, los ratones se observaron en cilindros de cristal individuales y se cuantificó el tiempo que el animal permanecía lamiendo o mordiendo la región posterior del cuerpo durante un periodo de 15 minutos.

Influencia del sistema óxido nítrico-L-arginina sobre el efecto de las TDZDs

Con la finalidad de evidenciar la participación del sistema óxido nítrico-L-arginina sobre la actividad antinociceptiva de las TDZDs, los animales fueron pre-tratados con L-arginina (precursor de óxido nítrico, 600 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes de administrar el NP031112 o la L-NOARG (inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, 75 mg/kg, i.p.) tal como se ha descrito anteriormente (Santos et al., 1999). Después del tratamiento de los animales se analizó una posible reversión del efecto antinociceptivo de los diferentes fármacos en relación a la nocicepción ocasionada por el ácido acético.

Participación de los receptores PPAR- γ en el efecto antinociceptivo de los inhibidores de la GSK-3 β

Para evaluar la participación de los receptores PPAR- γ sobre la actividad antinociceptiva de las TDZDs, los animales fueron pre-tratados con GW9662 (antagonista selectivo de los receptores PPAR- γ , 1 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes de la administración del NP031112 o rosiglitazona (agonista PPAR- γ , 1 mg/kg, i.p.). Después de los diferentes tratamientos, se analizó la posible reversión del efecto antinociceptivo de los diferentes fármacos en relación a la nocicepción ocasionada por el ácido acético.

Efecto de pre-tratamiento de los animales con CoPP en el test de la formalina

Para determinar la participación de la HO-1 en el efecto antinociceptivo de los inhibidores de la GSK-3 β , primeramente se evaluó la hipótesis de que la propia HO-1 pudiera estar ejerciendo un efecto antinociceptivo “per se”. Para ello, se trataron ratones Swiss con vehículo o con el inductor de la HO-1 portoporfirina de cobalto (CoPP, 5 mg/kg, i.p.) a la concentración de 5 mg/kg por la vía intraperitoneal. Tras 6 horas del tratamiento se inyectaron los animales con formalina en la pata para someterlos al test de la formalina ya se ha descrito anteriormente.

Inhibición de la HO-1 mediante el tratamiento con SnPP vía intraperitoneal sobre el efecto antinociceptivo de la CoPP

Se trataron ratones Swiss con portoporfirina de cobalto (CoPP, 5 mg/kg, i.p.) o vehículo (0.9 % de solución salina, animales control) en un volumen constante de 10 ml/kg vía i.p. 24 h antes de ser evaluados en el test de la formalina. Se eligió el tratamiento con CoPP para sobreexpresar la HO-1 ya que existen datos previos en la literatura que apoyan que el tratamiento con CoPP durante 24 h puede inducir potentemente la HO-1, sin cambios en la HO-2 (Parfenova *et al.*, 2005).

Inhibición de la HO-1 mediante el tratamiento con SnPP vía intraplantar sobre el efecto antinociceptivo de la CoPP y AR-A014418

Los animales fueron tratados con SnPP (400 nmol/20 μ l) inyectado directamente en la pata del animal 5 minutos antes del test de la formalina. En aquellos experimentos que se utilizó la CoPP, para inducir la sobreexpresión de HO-1, los animales se dividieron también en cuatro grupos: el primer grupo fue tratado con solución salina i.p. 24 h antes del test, otro grupo fue tratado con CoPP (5 mg/kg, i.p.) 24 antes de ser evaluados, y los otros dos grupos fueron tratados como los dos primeros grupos, pero 5 minutos antes del test se inyectaron con SnPP intraplantar. Todos los grupos fueron tratados con formalina al 2.5% inmediatamente antes del test.

Para evaluar la posible participación de la HO-1 en el efecto antinociceptivo del AR-A014418 (un inhibidor de la GSK-3 β) en el test de la formalina, los ratones Swiss se dividieron en cuatro grupos: el primer grupo fue tratado con solución salina i.p. 24 h antes del test, otro grupo fue tratado con AR-A014418 (1-10 mg/kg, i.p.) 24 antes de ser testados, y los otros dos grupos fueron tratados como los dos primeros grupos, pero 5 minutos antes del test se inyectaron con SnPP intraplantar. Todos los grupos fueron tratados con formalina 2,5% inmediatamente antes del test.

Implicación del factor de transcripción Nrf2 en la sobreexpresión de la HO-1 inducida por CoPP en células HEK

Las células embrionarias de riñón HEK 293T fueron cultivadas en medio DMEN (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 80 μ g/ml de gentamicina. Los ensayos de luminiscencia se hicieron en células HEK293T con la expresión del vector ARE-LUC y pEF- Δ Nrf2(DN) (Dr. J. Alam, Departamento de Genética Molecular, Ochsner Clinic Foundation, New Orleans, LA) y pGL3basic (Promega). Las células HEK293T se sembraron y cultivaron en placas de 24 pocillos (75.000 por pocillo), a las 16 h se trasfectaron con fosfato cálcico, usando reactivos de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Las células se trataron con 10 μ M de CoPP o 30 μ M de SnPP en medio con bajo contenido de suero (0.5% suero fetal bovino) durante 16h. A continuación se lisaron y se sometieron al ensayo de luciferasa con un kit de ensayo de luciferasa (Promega) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. Las unidades relativas de luminiscencia fueron medidas en un luminómetro BG1 Optocomp I, GEM Biomedical lunimometer (Sparks, NV).

Implicación del factor de transcripción Nrf2 en el efecto antinociceptivo producido por el tratamiento con CoPP

Con la finalidad de verificar la participación del factor de transcripción Nrf2 en el mecanismo antinociceptivo de la CoPP se han utilizado ratones knock-out de Nrf2. Tanto el C57JBl/6J control como el knock-out Nrf2 fueron tratados con CoPP (5 mg/kg, i.p.) 24 antes del test. Para los ensayos con animales C57JBl/6J se utilizó solución de formalina a 5.0% (1,84% formaldehído) disuelto en solución salina para obtener una respuesta igual a la de los animales Swiss. Las diferencias entre cepas, en el test de formalina, han sido descritas con anterioridad en la literatura (Mogil et al. 1996).

Cuantificación de proteínas por western blot del tejido muscular de la pata de los ratones tratados con CoPP o AR-A014418 en el test de la formalina

Al finalizar el experimento se sacrificaron los animales por dislocación cervical y el tejido muscular de la pata trasera contra-lateral a la inyectada con formalina fue homogenizado en 100 µl de tampón de lisis mantenido en hielo (1% Nonidet P-40, 10% glicerol, 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 µg/ml leupeptina, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoride, 20 mM NaF, 1 mM pirofosfato sódico, y 1 mM Na₃VO₄). La proteína (30 µg) del lisado fue corrida en un gel SDS-PAGE y transferidas a membranas Immobilon-P (Millipore Corp.). Las membranas se incubaron con los anticuerpos anti-HO-1 (1:1000) (Chemicon) y anti-β-actin (1:100000) (Sigma). Los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (1:10000) fueron utilizados para detectar las proteínas mediante un aumento en la quimioluminiscencia

Inmunohistoquímica y análisis de la HO-1 en las patas de los ratones tratados con CoPP o AR-A014418 y evaluados en el test de la formalina

Los animales C57J/6J control y knock-out para Nrf2 fueron tratados con CoPP o vehículo y a las 24 h fueron anestesiados inmediatamente después del test de la formalina con 3% de isoflurano en oxígeno bajo respiración espontánea y sacrificados por perfusión con solución salina seguida por la disección con 4% de paraformaldehído en 0.1 mol/L de tampón fosfato fresco con pH 7,4. El músculo del muslo de las patas traseras fue embebido en parafina antes de ser seccionado en un microtomo rotatorio (Shandon AS-325-Retraktion) en cortes de 5 µm que se utilizaron para la inmunohistoquímica. Después de la deparafinación y rehidratación, el tejido muscular de la pata trasera fue sumergido en 0,01 mol/L de tampón citrato pH 6.0 y hervidos durante 20 min. Los cortes se bloquearon con 1.5% de albúmina de suero bovino (BSA) e incubados durante 48 h con el anticuerpo primario (anti-homoxigenasa-1, Chemicon, 1:50). Los corte fueron inmersos en 3% H₂O₂ y anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:200) seguido de 0.06% dediaminobenzidina, 0.2% H₂O₂. Los controles negativos

se incubaron de igual manera que los anteriores pero sin el anticuerpo primario. Todos los cortes fueron contra-teñidos con hematoxilina.

Participación del factor de transcripción Nrf2 en el efecto antinociceptivo de los inhibidores de la GSK-3 β

Con la finalidad de ver la participación del factor de transcripción Nrf2 en el efecto antinociceptivo de los inhibidores de la GSK-3 β , tanto los C57JBL/6J control como los knock-out Nrf2 se trataron con vehículo o el AR-A014418 a la concentración de 10 mg/kg por la vía intraperitoneal. Tras 6 horas del tratamiento se inyectaron los animales con formalina en la pata para someterlos al test de la formalina tal como se ha descrito anteriormente.

3.2. Predicción farmacológica del efecto antidepresivo de las TDZDs

Test de la natación forzada (TNF)

El método utilizado ha sido el método desarrollado por Porsolt en 1977 (Porsolt *et al.*, 1977) con algunas modificaciones descritas posteriormente (Petit-Demouliere *et al.*, 2005). Se han utilizado ratones Swiss machos, con un peso de 30-40g, mantenidos a 22-27°C con libre acceso a agua y comida, y con un ciclo claro-oscuro de 12:12 h (7:00-19:00h). Todas las manipulaciones fueron realizadas entre las 9:00 e 17:00 h, siendo cada animal utilizado solamente una vez por prueba. Los ratones fueron forzados individualmente a nadar en un cilíndrico abierto (diámetro 10 cm., altura 25 cm), con 19 cm de agua a 25 \pm 1 °C. El tiempo total de inmovilidad durante 6 min fue medido como se ha descrito anteriormente. El animal fue considerado inmóvil cuando flota o hace movimientos necesarios solamente para mantener su cabeza por encima del agua. Los antidepresivos reducen el tiempo de inmovilidad en este test (Porsolt *et al.*, 1977).

Test del campo abierto

Para excluir la posibilidad de que un eventual efecto antidepresivo, o sea, una disminución de la inmovilidad en el TNF sea debido a un aumento en la actividad locomotora, los ratones fueron sometidos a una sesión de campo abierto durante 6 minutos tal como se ha descrito previamente en la literatura (Rodrigues *et al.*, 1996; Rosa *et al.*, 2003). Brevemente, el

test se realizó en una caja de madera de 40x60x50 cm, con el suelo dividido en 12 cuadrados iguales. El número de cruzamientos fue el parámetro usado para evaluar la actividad locomotora.

Administración de los fármacos

El NP031112, el NP031115, la fluoxetina y el AR-A014418 fueron inyectados por la vía intraperitoneal 30 minutos antes del test. La rosiglitazona se administró por vía intracerebroventricular 15 minutos antes del test. El antagonista PPAR- γ GW9662 fue co-administrado 15 minutos antes del test en el caso de la rosiglitazona o 15 minutos antes de los demás tratamientos en el caso de los fármacos administrados vía intraperitoneal.

3.3. Estudios de neuroprotección

Para evaluar el posible efecto neuroprotector de los compuestos de este estudio hemos seleccionado un modelo “in vitro” de isquemia cerebral tal como se describe a continuación:

Modelo de POG en rodajas de hipocampo de rata

Estos experimentos se realizaron con ratas Sprague-Dawley procedentes de una colonia de nuestro estabulario. Las ratas se anestesiaron con barbital sódico (69 mg/kg, i.p.). A continuación, se decapitaron y se extrajeron los cerebros que fueron rápidamente sumergidos en una solución Krebs bicarbonato (con alto magnesio y sacarosa y bajo calcio) enfriada previamente y, cuya composición, en mM, es la siguiente: NaCl 120, KCl 2, CaCl₂ 0.5, NaHCO₃ 26, MgSO₄ 10, KH₂PO₄ 1,18, glucosa 11 y sacarosa 200. Todas las soluciones fueron pre-burbujeadas con 95% O₂/5% CO₂ (carbógeno) o 95% N₂/5% CO₂ (nitrógeno) para mantener la oxigenación o anoxia, respectivamente. Los hipocampos se disecaron rápidamente y se colocaron en un bloque de agar verticalmente, inmerso en una pequeña cámara sumergida en hielo y en Krebs bicarbonato continuamente oxigenado. Con un vibratomo (Leica; Heidenberg, Germany) se cortaron rodajas de 350 micras de espesor. Inmediatamente, las rodajas del hipocampo se transfirieron a tubos conteniendo la misma solución sin sacarosa, y se burbujearon con carbógeno durante una hora para estabilizarlas (ver cuadro de abajo). En cada experimento individual se evaluaron cinco grupos. Dependiendo del experimento, estos grupos se distribuyeron en tres concentraciones de un compuesto o el agonista, antagonista y agonista más antagonista además del control y del POG (grupo de rodajas sometidas a privación de glucosa y

oxígeno sin tratamiento). Las rodajas se preincubaron durante 30 minutos en solución de Krebs normal conteniendo (en mM): NaCl 120, KCl 2, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 26, MgSO₄ 1.19, KH₂PO₄ 1.18 y glucosa 11. La privación de glucosa y oxígeno se indujo burbujando nitrógeno y sustituyendo la glucosa por 2-desoxiglucosa (ver Figura 7). La viabilidad de las rodajas se evaluó midiendo la liberación de la enzima LDH en el líquido extracelular (Sobrado et al., 2004).

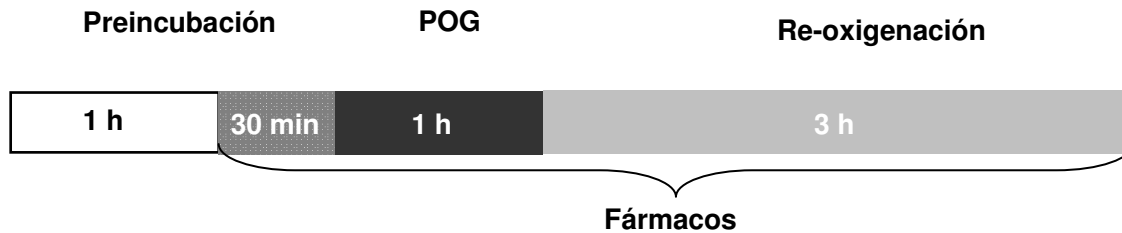


Figura 7. Protocolo experimental de la POG. Las rodajas se sometieron a un periodo de estabilización de 1 hora, seguidos de preincubación de 30 minutos, 1 hora de POG e 3 de re-oxigenación. Las rodajas control se mantuvieron burbujeadas con carbógeno durante todo el experimento. Los fármacos se añadieron 30 minutos antes de inducir la POG tal como se indica en la figura.

Medida de la LDH extracelular

La cantidad de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio extracelular sirvió como indicador de muerte celular, y se midió en un espectrofotómetro usando un kit comercial (Cytotoxicity Cell detection kit, Roche-Boehringer Manhein) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El principio del test consiste en un ensayo enzimático, la LDH es una enzima intracelular, y cuando la encontramos en el medio extracelular nos indica una ruptura de la membrana celular convirtiéndose así en un indicador de muerte celular. En un primer paso el NAD⁺ es reducido a NADH/H⁺ al catalizar el lactato al piruvato. En el segundo paso el catalizador diaforasa transfiere el H/H⁺ del NADH/H⁺ a la sal de tetrazolio, que se reduce a formazan de color rojo (ver Figura 8), que tiene una absorbancia máxima a 500 nm. La lectura de la LDH se hace pasados 30 minutos desde que se añade las soluciones a las muestras del medio extracelular en un lector de placas ELISA de Labsystems modelo iEMS.

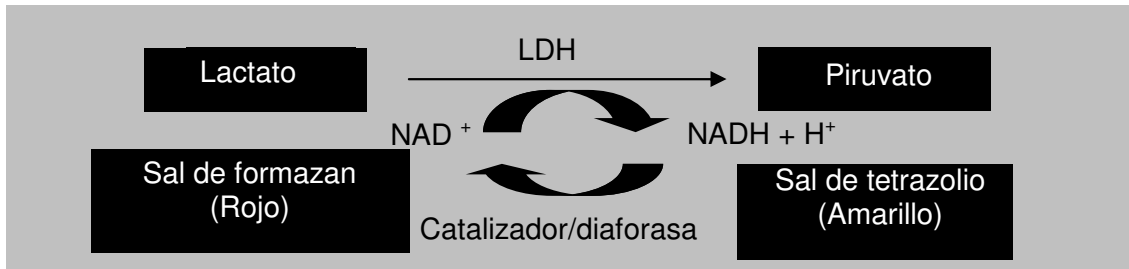


Figura 8. Medida de la LDH extracelular como medida de viabilidad celular.

Cuantificación de proteínas por western blot de rodajas de hipocampo de ratas

Se realizaron rodajas siguiendo los mismos protocolos empleados en los experimentos de neuroprotección, hasta el final de la hora de preincubación. Tras este periodo, las rodajas se homogenizaron en 100 μ l de tampón de lisis mantenido en hielo (1% Nonidet P-40, 10% glicerol, 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 μ g/ml leupeptina, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoride, 20 mM NaF, 1 mM pirofosfato sódico, y 1 mM Na₃VO₄). La proteína (30 μ g) del lisado fue corrida en un gel SDS-PAGE y transferidas a membranas Immobilon-P (Millipore Corp.). Las membranas se incubaron con anticuerpos anti-ERK1/2 (1:1000) o ERK total (1:10000). Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (1:10000) fueron utilizados para detectar las proteínas mediante un aumento en la quimioluminiscencia

3.4. Análisis estadístico

Las comparaciones entre los grupos se ha realizado usando un test *t* o ANOVA de una o dos vías seguida de un test *post hoc* de Duncan cuando fuera necesario. Valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Todos los procedimientos estadísticos se han realizado con el programa *Statistica Software* versión 6.0.

4. Resultados

4.1. Efecto antinociceptivo, antiinflamatorio, antihiperalgésico y antialodínico de las TDZDs

Efecto antinociceptivo y antiinflamatorio del NP031112 en el test del ácido acético

En la **Figura 9** se puede observar que la administración de NP031112 produjo una disminución concentración dependiente en las contorsiones inducidas por ácido acético; dicho efecto fue estadísticamente significativo a las concentraciones de 0,1, 1 y 10 mg/kg, i.p. y la $DI_{50}=0,38$ (0,3-0,5) mg/kg, i.p. y la I_{Max} (inhibición máxima) = $97\pm 2\%$.

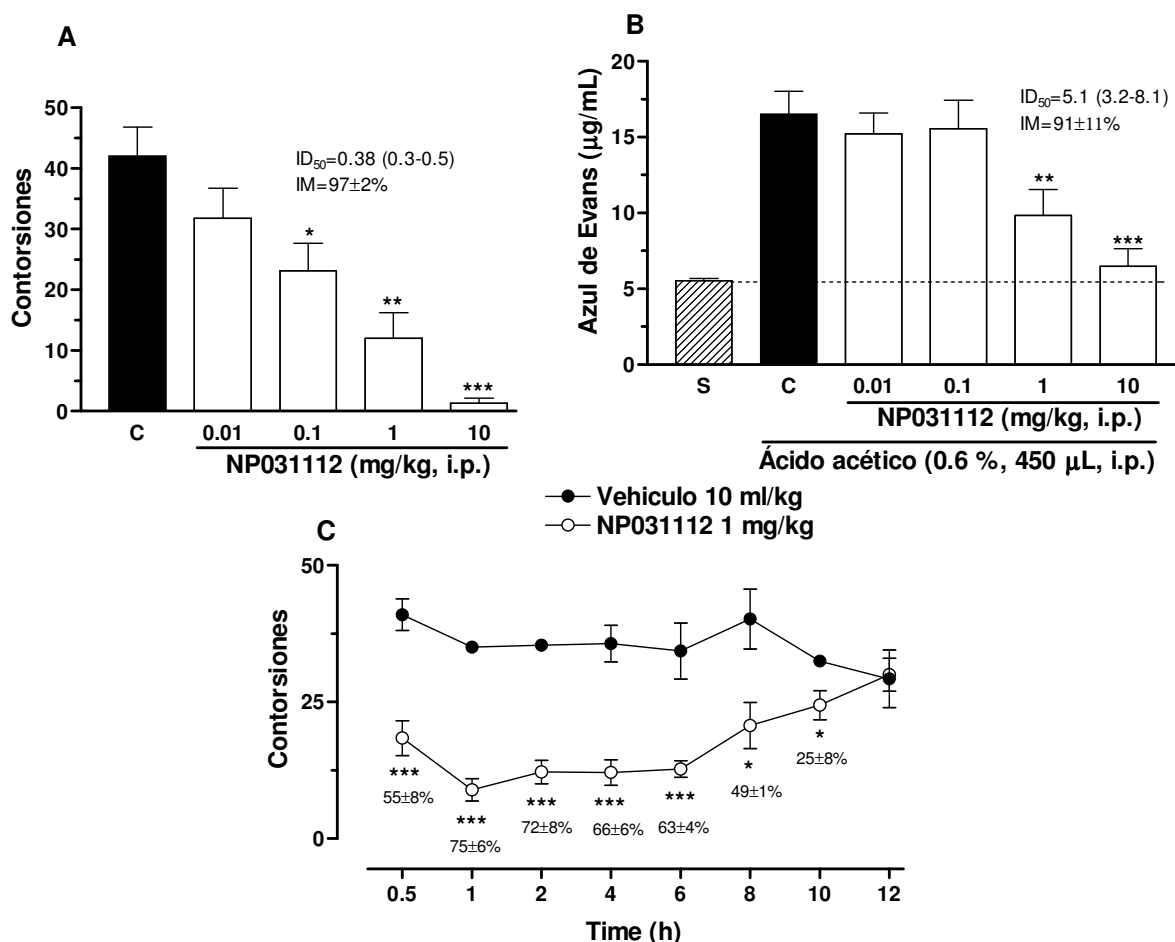


Figure 9. A) Contorsiones inducidas por ácido acético (0,6 %, 450 μl , i.p.) en animales controles (C) inyectados con vehículo (10 ml/kg, i.p.) o con el NP031112 (0,01-10 mg/kg) 30 minutos antes del test. B) Presencia de Azul de Evans en el peritoneo de animales tratados con solución salina (S, barras rayadas), o ácido acético (0,6 %, 450 μl , i.p., barras negras y blancas) en ausencia o presencia de NP031112 (0,01-10 mg/kg) durante 60 minutos. C) Curva temporal de una única dosis de NP031112 (1 mg/kg) en el test del ácido acético. Los animales fueron tratados en el tiempo 0 y evaluados a los 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas inmediatamente después de la inyección de ácido acético. Los valores representan el promedio \pm el error estándar del promedio. * $P<0,01$, ** $P<0,05$ y *** $P<0,001$ respecto al control tratado solamente con ácido acético (n=6-11).

Además, se puede observar que en los animales tratados con el NP031112 (1-10 mg/kg, i.p.) hubo una menor presencia del Azul de Evans en el peritoneo, con una $DI_{50}=5,1$ (3,2-8,1) mg/kg, i.p. y la $I_{Max}=91\pm 11$ % (**Figura 9B**). El efecto antinociceptivo del NP031112 persistió durante 10 horas (ver **Figura 9C**) tras una única dosis (1 mg/kg, i.p.). Estos resultados indican que el NP031112 tiene propiedades antinociceptivas de larga duración tras una dosis única y, que también posee un efecto antiinflamatorio.

Efecto antinociceptivo del AR-A014418 y de la rosiglitazona en el test del ácido acético

La **Figura 10** muestra el número de contorsiones inducidas por ácido acético en animales tratados con el inhibidor de la GSK-3 β AR-A014418 o el agonista PPAR- γ rosiglitazona.

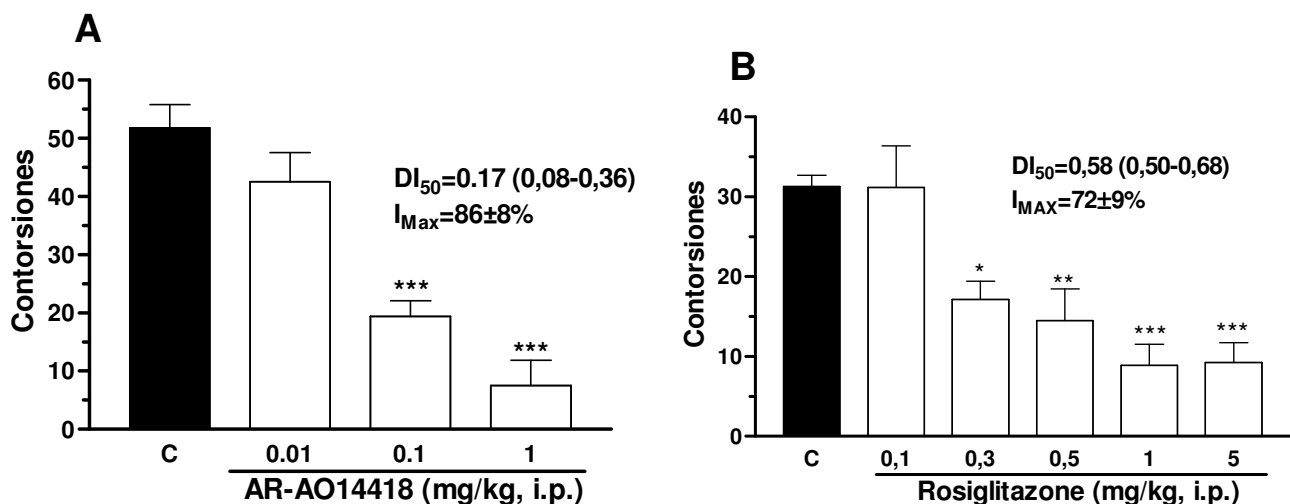


Figura 10. Contorsiones inducidas por ácido acético (0,6 %, 450 μ l, i.p.) en animales controles (C) inyectados con vehículo (10 ml/kg, i.p.) o con A) AR-A014418 (0,01-1 mg/kg) o B) Rosiglitazona (0,01-5 mg/kg) 30 minutos antes del test. *P<0,01, **P<0,05 y ***P<0,001 respecto al control tratado solamente con ácido acético (n=6-12).

Como se puede observar en la **Figura 10A**, la administración de AR-A014418 produjo una disminución concentración-dependiente en las contorsiones inducidas por ácido acético, siendo significativo para las concentraciones de 0,01, 0,01 y 1 mg/kg, i.p. $DI_{50}= 0.17$ (0,08-0,36) mg/kg, i.p. y la I_{Max} (inhibición máxima) = $86\pm 8\%$. La rosiglitazona también redujo el número de contorsiones inducidas por el ácido acético (**Figura 10B**), siendo este efecto significativo para las concentraciones de 0,3, 0,5, 1 y 5 mg/kg, i.p. La $DI_{50}=0,58$ (0,50-0,68) mg/kg, i.p. y la $I_{Max} =72\pm 9$ %.

Efecto del pre-tratamiento con D-arginina o L-arginina sobre el efecto antinociceptivo del NP031112 o L-NOARG en el test del ácido acético

La **Figura 11** muestra el efecto del pre-tratamiento con L-arginina o D-arginina sobre el efecto antinociceptivo del inhibidor de la NOS L-NOARG y el NP031112 frente a la nocicepción inducida por ácido acético.

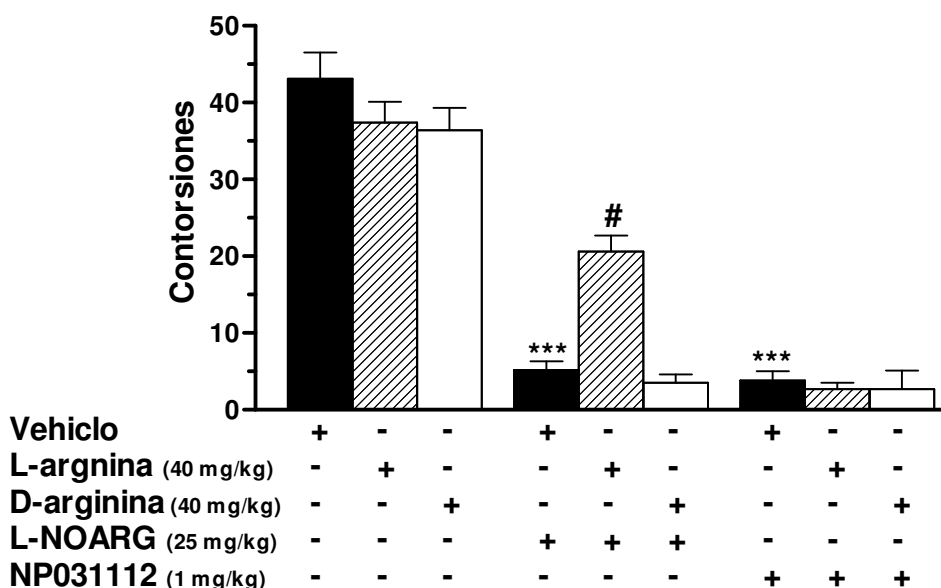


Figura 11. Efecto del pretratamiento con L-arginina o D-arginina sobre el efecto antinociceptivo del NP031112 o del inhibidor de la NOS LNOARG (25 mg/kg, i.p.) en el test del ácido acético. Los animales fueron pretratados con vehículo (10 ml/kg, i.p.), L-arginina (40 mg/kg, i.p.) o D-arginina (40 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes de la administración del vehículo (1 mg/kg, i.p.), L-NOARG (25 mg/kg, i.p.) o el NP031112 (1 mg/kg, i.p.). 30 minutos más tardes se inyectó el ácido acético (0,6 %, 450 µl, i.p.) y se evaluaron los animales. Los valores representan el número total de contorsiones en 20 minutos y están expresados como promedio ± el error estándar del promedio. ***P<0,001 respecto al control tratado solamente con ácido acético (n=6-12). #P<0,05 respecto al grupo tratado solamente con la L-NOARG.

Como se puede observar la administración de NP031112 y L-NOARG ocasionaron una disminución en las contorsiones inducidas por ácido acético. El efecto del L-NOARG, pero no del NP031112 fue parcialmente revertido por la administración de la L-arginina. El isómero inactivo D-arginina no mostró ningún efecto. Estos datos sugieren que la vía de la L-arginina-NOS no está implicada en el efecto antinociceptivo del NP031112.

Efecto del pretratamiento con el antagonista de receptores PPAR- γ GW9662 sobre el efecto antinociceptivo del NP031112 y rosiglitazona en el test del ácido acético

La **Figura 12** muestra el efecto del GW9662 sobre el efecto antinociceptivo del rosiglitazona(A) o NP031112 (B) en el test del ácido acético en ratones. Como se puede observar la administración de NP031112 o rosiglitazona produjeron una disminución en las contorsiones inducidas por ácido acético. El efecto de la rosiglitazona, pero no el del NP031112 fue revertido por la administración del GW9662. Estos datos sugieren que la activación de los receptores PPAR- γ es importante para el efecto antinociceptivo de la rosiglitazona, pero no para la del NP031112.

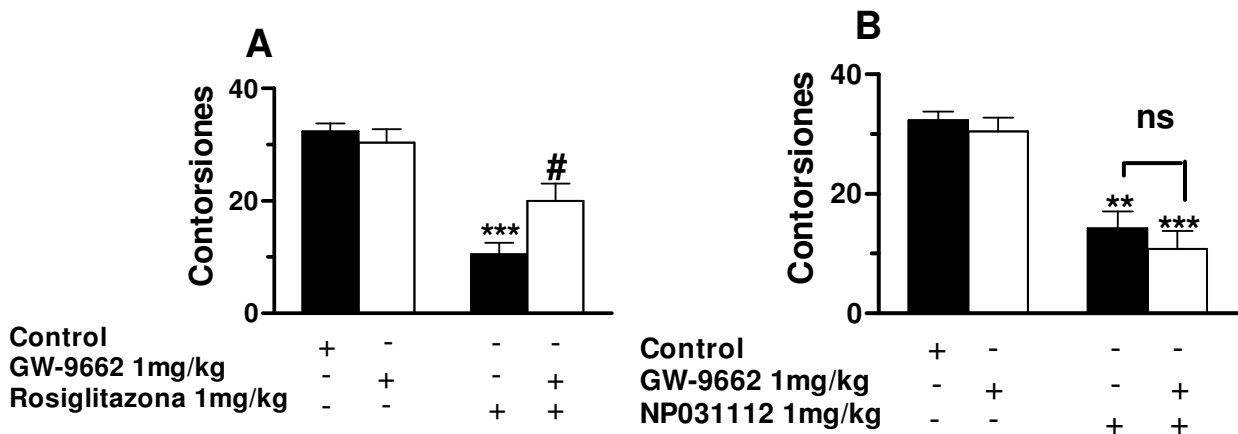


Figura 12. Efecto del pretratamiento con el antagonista PPAR- γ sobre el efecto antinociceptivo del NP031112 o de la rosiglitazona en el test del ácido acético. Los animales fueron pretratados con vehículo (10 ml/kg, i.p.) o GW9662 (1 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes de administrar la rosiglitazona (A, 1 mg/kg, i.p.) o el AR-A014418 (B, 1 mg/kg, i.p.), 30 minutos más tarde se inyectó el ácido acético (0,6 %, 450 μ l, i.p.) y se evaluaron los animales. Los valores representan el número total de contorsiones en 20 minutos y están representados como promedio \pm el error estándar del promedio. ** $P < 0,05$ y *** $P < 0,001$ respecto al control tratado solamente con ácido acético. # $P < 0,05$ respecto al grupo tratado solamente con la rosiglitazona (n=6-12).

Efecto antinociceptivo del NP031112 en el test de la formalina

Como se puede observar en la **Figura 13**, en la primera fase del test de la formalina (**Figure 13A**) el tratamiento de los animales con el NP031112 disminuyó el tiempo que los animales permanecieron lamiendo la pata cuando se compararon con los animales controles, en forma concentración-dependiente; dicho efecto fue significativo a las dosis de 1, 10 y 30 mg/kg, i.p. La DI_{50} fue de 7,1 (5,9-8,6) mg/kg, i.p. y la $I_{Max} = 63 \pm 6$ %. En la segunda fase del test (**Figure 13B**), el tratamiento con el NP031112 también disminuyó el tiempo de lamida de manera

concentración dependiente, siendo significativa para las concentraciones de 10 y 30 mg/kg, i.p. La DI_{50} en este caso fue de 11,5 (7,0-19,0) mg/kg, i.p. y la $I_{Max}=68\pm 11\%$.

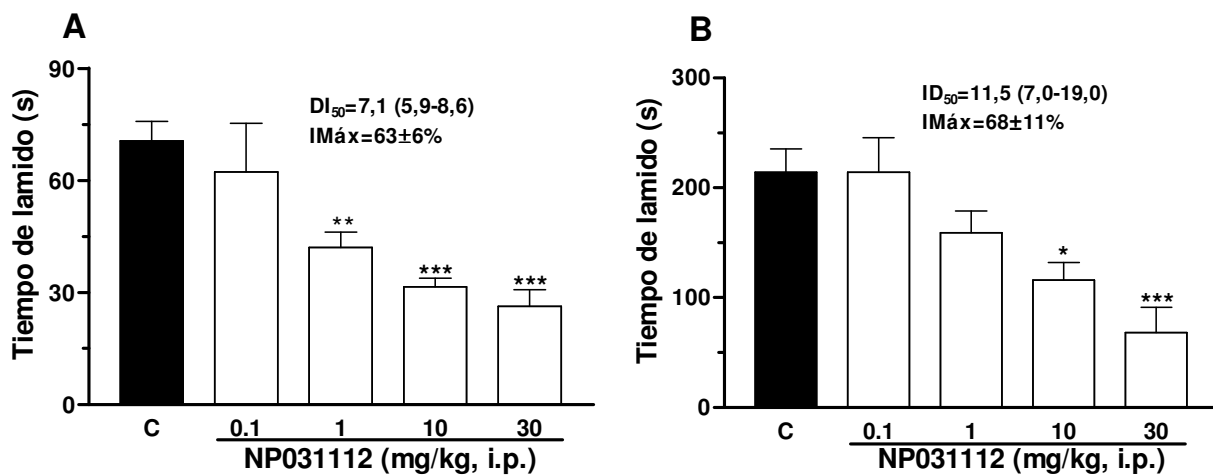


Figura 13. Efecto del NP031112 (0,0-30 mg/kg, i.p.) en el tiempo de lamidas inducido por la formalina durante la primera (A) y la segunda fase (B) del test. Los valores representan el tiempo total que los animales están lamando la pata inyectada y se están representados como el promedio \pm el error estándar del promedio de $n=8-12$ animales. ** $P<0,05$ y *** $P<0,001$ respecto al control tratado solamente con formalina.

Efecto antinociceptivo del NP031112 frente a la nocicepción inducida por glutamato administrado por vía intraplantar e intratecal y la nocicepción inducida por agonistas glutamatérgicos o sustancia P intratecal

Como se puede observar en la **Figura 14** la administración de NP031112 por vía i.p. (0,1–10 mg/kg), media hora antes del test del glutamato intraplantar, también mostró un efecto antinociceptivo dosis dependiente. El valor DI_{50} calculado fue de 4,74 (3,0–7,4) mg/kg y la $I_{max} = 59\pm 6\%$. La concentración de 1 mg/kg, i.p., 30 minutos antes del test, también revirtió el efecto del de glutamato, el NMDA, el AMPA y el kainato administrados intratecalmente con inhibiciones de 45 ± 16 , 76 ± 10 y $51\pm 9\%$ respectivamente, pro no de la sustancia P. Curiosamente, el efecto de t-ACPD fue incrementado tras la administración de NP031112.

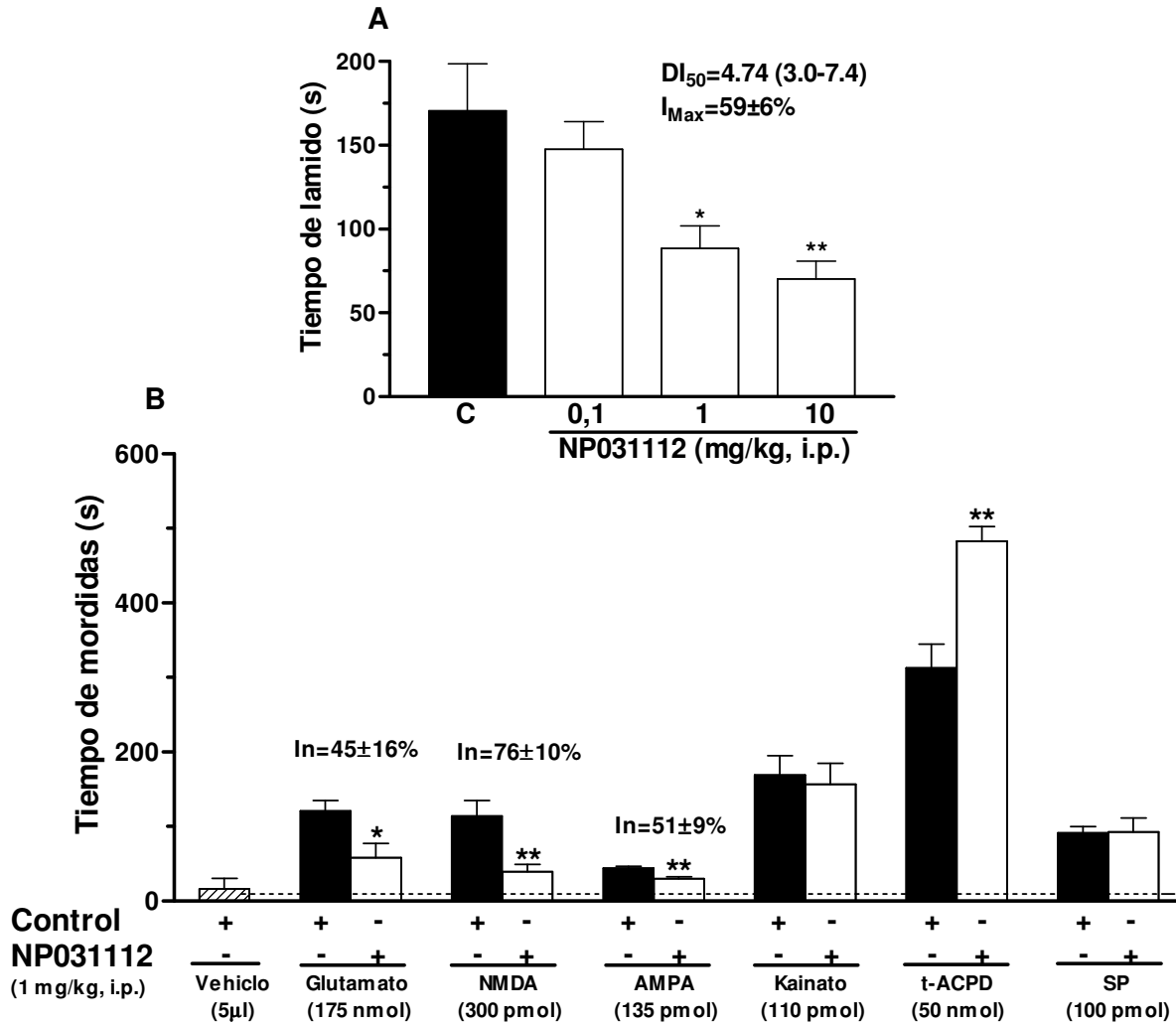


Figura 14. A). Efecto del NP031112 (0,1–10 mg/kg) administrado i.p. sobre la nocicepción inducida por glutamato inyectado en la pata trasera de ratones. Los valores representan el promedio \pm el error estándar del promedio (n=8-10). Los controles están indicados por la letra C. *P < 0.05, y **P < 0.01 cuando fueron comparados con el grupo control. B) Efecto del NP031112 (1 mg/kg) administrado i.p. sobre la nocicepción inducida por glutamato, NMDA, AMPA, kainato, trans-ACPD o sustancia P (SP) administrados intratecalmente en ratones. Cada barra representa una n=8, los valores representan el promedio \pm el error estándar del promedio. Los asteriscos representan la significancia respecto al grupo control; *P < 0.05, **P < 0.01.

Efecto antinociceptivo del NP031112 frente a la nocicepción inducida por las citocinas TNF- α y IL-1 β administradas por la vía intratecal

La **Figura 15** muestra el efecto de la administración i.p. de distintas dosis de NP031112 sobre el efecto nociceptivo del TNF- α (100fg/i.t.) o IL-1 β (1 pg/i.t.) administrados intratecalmente en ratones. El NP031112 produjo un efecto antinociceptivo frente a estas dos citocinas inflamatorias a las concentraciones de 1 y 10 mg/Kg para la TNF- α o 10 y 30 mg/Kg

para la IL-1 β . La DI₅₀ fue de 3,5 mg/Kg (1,8-6,6) y 15,0 mg/Kg (11,8-19,0) para la TNF- α o IL-1 β , respectivamente. Estos datos sugieren que el NP031112 bloquea la señalización inducida por estas dos citocinas en la médula espinal.

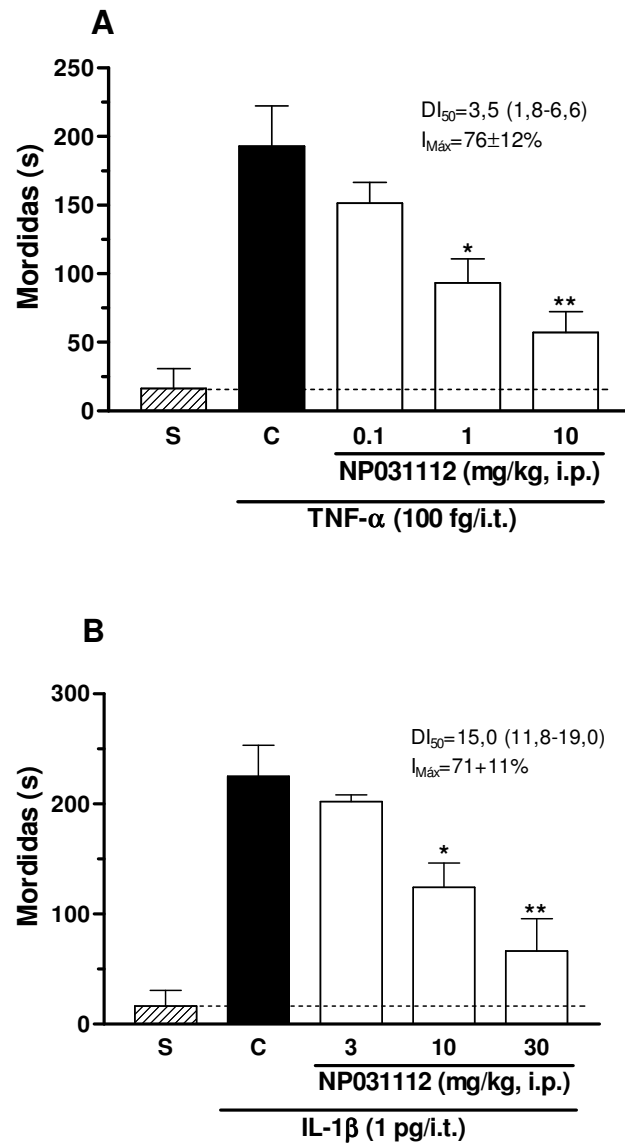


Figura 15. Efecto del NP031112 (0,1-10 mg kg) administrado intraperitonealmente sobre la nocicepción inducida por TNF- α (A) o IL-1 β (B) administrados intratecalmente en ratones. Cada barra representa una n=7-8, los valores representan el promedio \pm el error estándar del promedio. Los asteriscos representan la significancia respecto al grupo control; *P < 0.05 y **P < 0.01.

Efecto antinociceptivo del NP031112 frente a la hiperalgesia térmica inducida por la administración intraplantar de carragenina, prostaglandina E₂ (PGE₂), bradicinina, PMA o adrenalina.

La **Figura 16** muestra el efecto de la administración i.p. del NP031112 frente a la hiperalgesia térmica inducida por la administración intraplantar de carragenina, prostaglandina E₂ (PGE₂), bradicinina, PMA o adrenalina. Como se puede observar, el NP031112 fue capaz de revertir la hiperalgesia inducida por carragenina, PMA o bradicinina, pero no la inducida por adrenalina o PGE₂. Estos datos sugieren que el NP031112 tiene un efecto antihiperalgésico frente a la inflamación inducida por carragenina, PMA y bradicinina, pero no por adrenalina o PGE₂ cuando el estímulo es térmico.

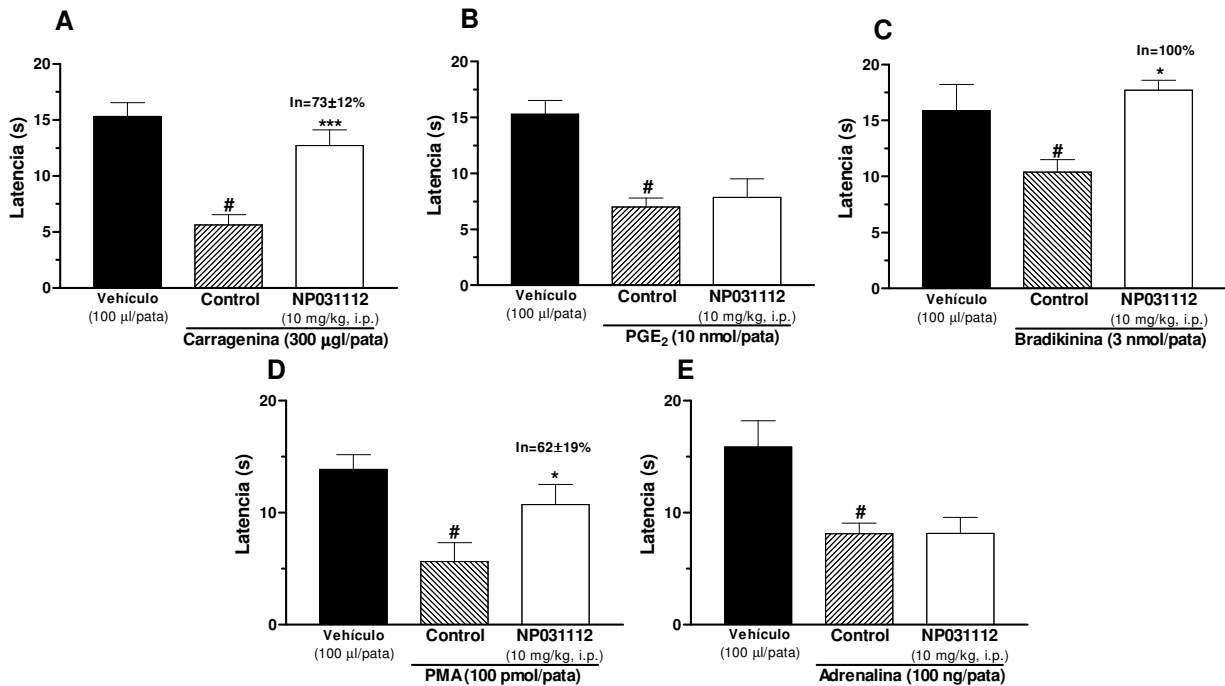


Figura 16. Efecto de la administración i.p. de NP031112 frente a la hiperalgesia térmica inducida por la administración intraplantar con carragenina, prostaglandina E₂ (PGE₂), bradicinina, PMA o adrenalina. Los valores están expresados como promedio ± errores estándar del promedio; n = 8 ratas por grupo. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 respecto al Control y #P < 0.001 respecto al vehículo, ANOVA seguida del Newman-Keuls test.

Efecto del NP031112 frente a la hiperalgesia mecánica inducida por la administración intraplantar de carragenina, prostaglandina E2 (PGE2), bradicinina, PMA o adrenalina.

La **Figura 17** representa el efecto de la administración i.p. de NP031112 frente a la hiperalgesia mecánica inducida por la administración intraplantar de carragenina, prostaglandina E₂ (PGE₂), bradicinina, PMA o adrenalina. El tratamiento con NP031112 revirtió la hiperalgesia mecánica inducida por la inyección intraplantar de carragenina, PGE₂, PMA, bradicinina, pero no la inducida por adrenalina. Estos datos sugieren que el NP031112 tiene un efecto antihiperálgico frente a la inflamación inducida por carragenina, PGE₂, PMA, bradicinina, pero no por adrenalina cuando el estímulo es mecánico.

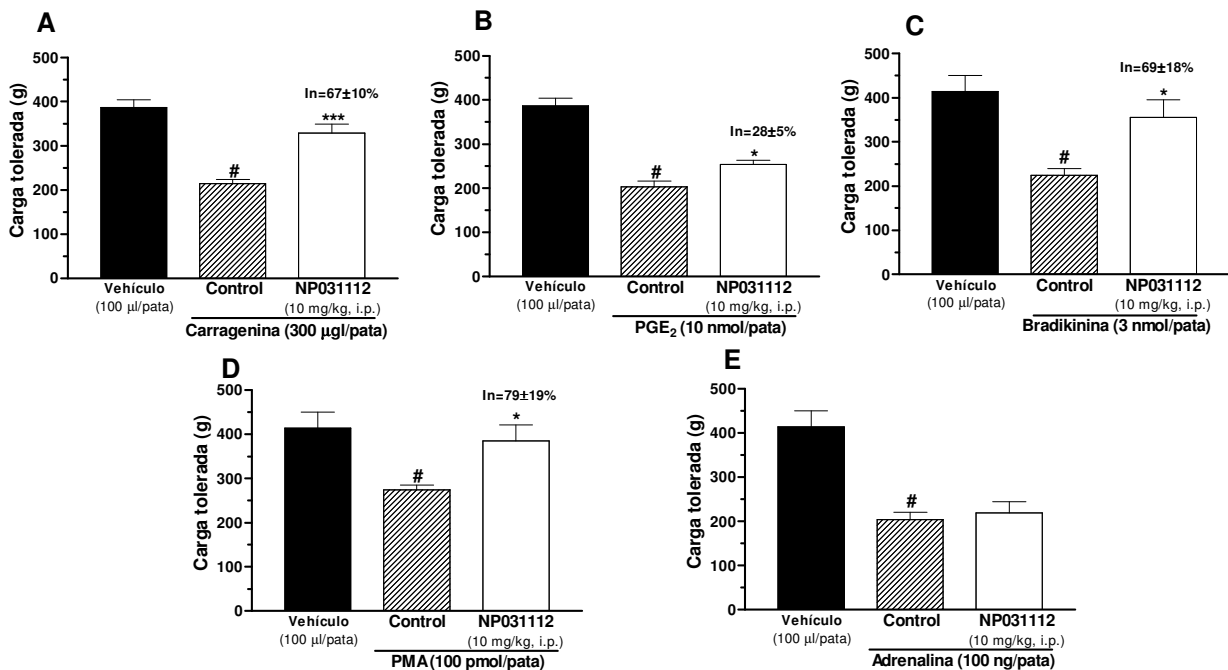


Figura 17. Efecto de la administración i.p. de NP031112 frente a la hiperalgesia mecánica inducida por la administración intraplantar de carragenina, prostaglandina E₂ (PGE₂), bradicinina, PMA o adrenalina. Los valores están expresados como promedio ± errores estándar del promedio; n = 8 ratas por grupo. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 respecto al control y #P < 0.001 respecto al vehículo, ANOVA seguidas del Newman-Keuls test.

Efecto del NP031112 frente a la inflamación inducida por CFA

La inyección intraplantar de CFA ocasionó una alodinia mecánica de larga duración (**Figura 18A**). El tratamiento agudo con el NP031112 (1 mg/kg, i.p.) disminuyó significativamente la alodinia mecánica inducida por CFA. También se puede observar en la **Figura 18B**, que la administración del NP031112 no produjo ninguna alteración en el edema inducido por la administración de CFA.

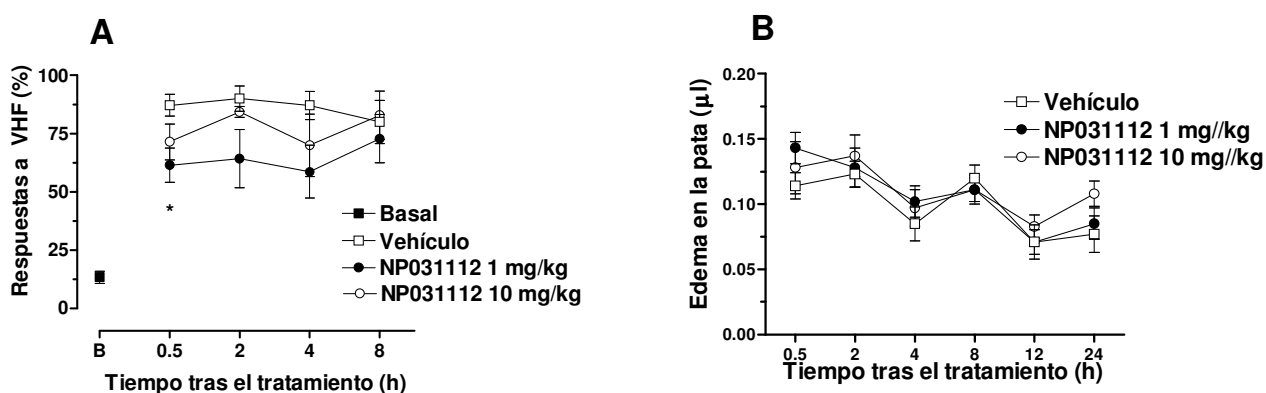


Figura 18. Efecto de la administración de NP031112 (1-10 mg/kg, i.p.) sobre la alodinia mecánica medida como respuestas al filamento de Vonfrey (VHF) (A) y en la formación de edema en la pata (B) de de ratones inyectados con CFA (complete Freund's adjuvant). Los valores están expresados como promedio \pm errores estándar del promedio; n = 8 ratones por grupo *P < 0.05 respecto al control.

Efecto del NP031112 en la alodinia mecánica inducida por la constricción parcial del nervio ciático en ratones

La constricción parcial del nervio ciático produce una alodinia mecánica ipsilateral (en la pata inyectada) de larga duración. El tratamiento agudo con el NP031112 (10 mg/kg, i.p.) disminuyó de forma significativamente las respuestas de retirada de la pata (**Figura 19**). Esta inhibición se observó tras 30 minutos de una única dosis de NP031112 y se mantuvo durante 24 h. Estos resultados sugieren que el NP031112 tiene un efecto antineuropático en este modelo de constricción del nervio ciático de muy larga duración.

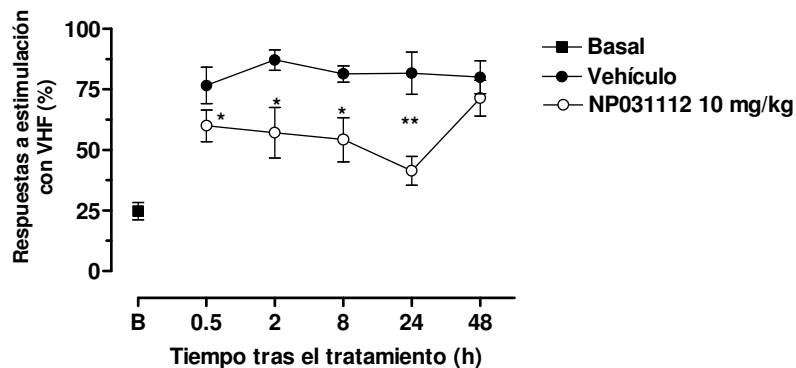


Figura 19. Efecto del NP031112 frente la alodinia mecánica inducida por compresión del nervio ciático en respuesta a 10 aplicaciones de 0.6 g VFH. Los valores han sido tomados de los ratones antes de ser operados (■), operados y tratados con vehículo (●), o operados y tratados con el NP031112 10 mg/kg, i.p. (○) 7 días después de la cirugía. Los valores corresponden a los promedios \pm errores estándar del promedios; $n = 8$ ratones por grupo. Los asteriscos representan la significancia respecto al grupo tratado con vehículo; * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$.

Efecto del pre-tratamiento de los animales con CoPP en el test de la formalina

Para evaluar si la inducción HO-1 pudiera producir un efecto antinociceptivo en ratones inyectados con formalina en la pata, los animales fueron tratados con CoPP 5 mg/kg, i.p 24 h antes del test de la formalina. En paralelo, un grupo control fue inyectado i.p con solución salina, 10 ml/kg. El tiempo que los animales lamieron la pata inyectada con la formalina durante la primera fase fue de 75.8 ± 7.8 segundos y 69.5 ± 10.52 segundos para el control y el grupo CoPP, respectivamente (**Figura 20A**); la diferencia entre estos valores fue estadísticamente significativa. Sin embargo, cuando los animales fueron evaluados durante la segunda fase (**Figura 20B**) de esta prueba, el tiempo lamiendo la pata inyectada con formalina fue reducido de 311.4 ± 41.1 segundos en los controles a 173.8 ± 23.0 segundos en los ratones tratados con CoPP. Por lo tanto, estos resultados sugirieron que la inducción de la HO-1 por CoPP reduce cerca de un 45 % la nociception inducida por la formalina durante la segunda fase del test de la formalina.

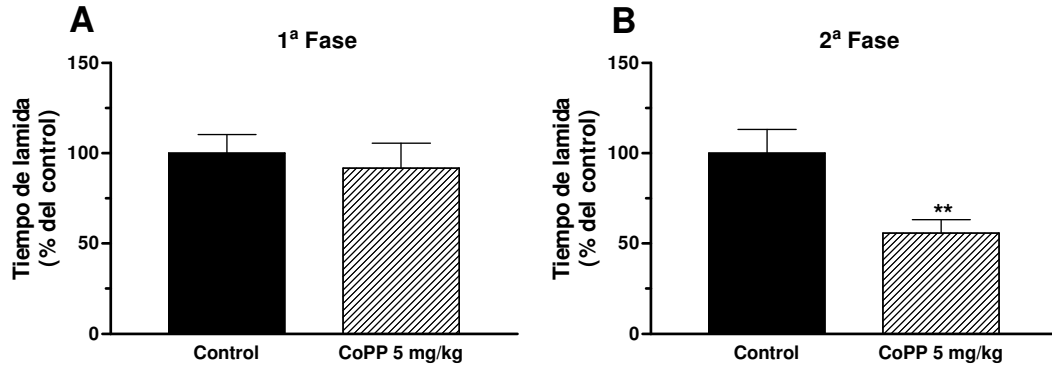


Figura 20. Efecto del tratamiento de ratones con CoPP (5 mg/kg, i.p.) sobre el tiempo de lamidas inducido por formalina en la primera (A) y segunda fases (B) del test. Los valores representan el tiempo total de lamida de la pata inyectada y se representan como el promedio \pm el error estándar del promedio de n=5-8 animales. **P<0,05 respecto al control tratado solamente con formalina.

La inhibición de la HO-1 mediante el tratamiento con SnPP vía intraperitoneal previene el efecto antinociceptivo de la CoPP

Con la finalidad de determinar si la inducción de HO-1 por CoPP es responsable del efecto antinociceptivo en el test de la formalina, se evaluaron animales pre-tratados con el inhibidor de la HO-1 SnPP, en presencia o ausencia del inductor de la HO-1 CoPP (**Figura 21**).

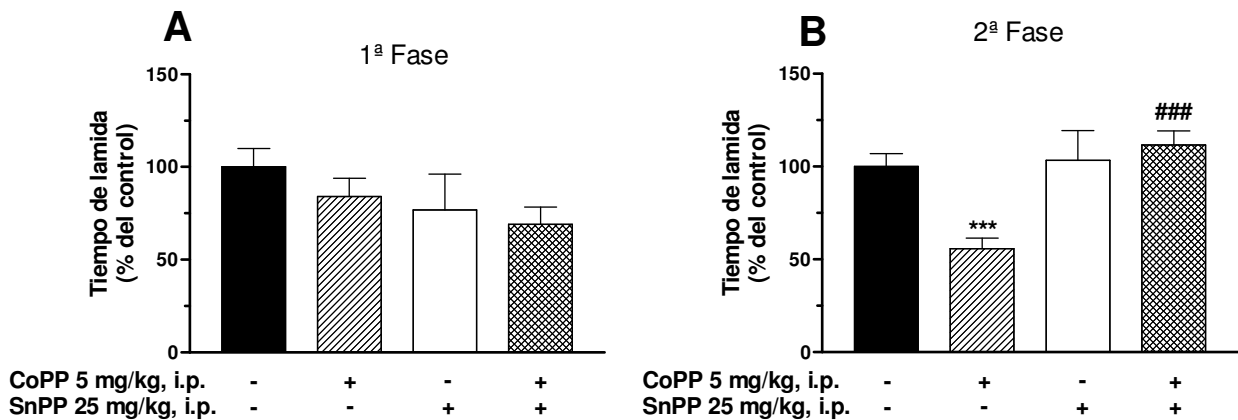


Figura 21. Efecto del tratamiento i.p.l de los ratones con SnPP (25 mg/kg, i.p.) sobre el efecto antinociceptico del pretratamiento con CoPP (5 mg/kg, i.p.) en la primera fase (A) y en la segunda fase (B) del test de la formalina. Los valores están expresados como promedios \pm error estándar del promedio. (n=5-10). ***P<0,001 respecto al control tratado solo con vehículo. ### P<0,001 respecto al grupo tratado solamente con CoPP.

Para estos experimentos, los animales fueron divididos en cuatro grupos: el primer grupo fue tratado con solución salina i.p. 24 h antes del test, otro grupo fue tratado con CoPP (5 mg/kg, i.p.) 24 antes de ser evaluados, y los otros dos grupos fueron tratados como los dos primeros, pero 30 minutos antes del test, se inyectó SnPP (25 mg/kg, i.p.). La SnPP sola no produjo ningún efecto en ninguna de las fases del test de la formalina. En los animales tratados con CoPP, la SnPP no alteró el tiempo que los animales pasaron lamiendo la pata durante la primera fase pero si revirtió completamente el efecto antinociceptivo durante la segunda fase del test.

La inhibición de la HO-1 mediante el tratamiento con SnPP, vía intraplantar, previene el efecto antinociceptivo de la CoPP y del inhibidor de la GSK-3 β AR-A014418

Como puede observarse en la **Figura 22A** ninguno de los tratamientos modificó la primera fase del test. Sin embargo, durante la segunda fase del test (**Figura 22B**), los animales tratados con CoPP (5 mg/kg, i.p.) 24 antes, lamieron menos la pata inyectada con formalina y la SnPP (400 nmol/20 μ l) administrada localmente revirtió completamente el efecto antinociceptivo de la CoPP. Estos resultados sugieren que la HO-1 ejerce su efecto antinociceptivo en la segunda fase del test de la formalina y a nivel periférico.

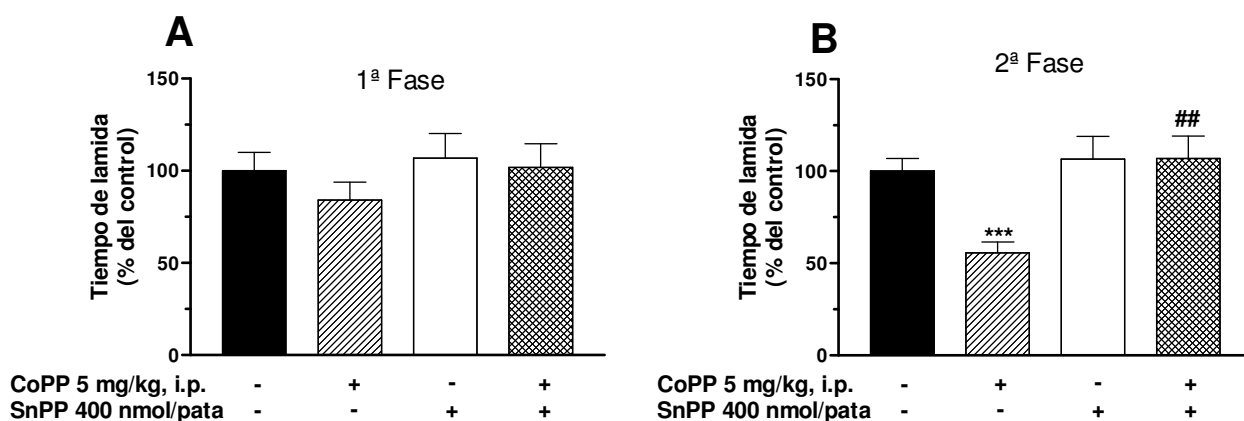


Figura 22. Efecto del tratamiento intraplantar de los ratones con SnPP (400 nmol/pata, i.pl.) sobre el efecto antinociceptivo del pretratamiento con CoPP (5 mg/kg, i.p.) en la primera fase (A) y segunda fase (B) del test de la formalina. Los valores están expresados como promedios \pm error estándar del promedio. (n=6-10). ***P<0,001 respecto al control tratado solo con vehículo. ## P<0,01 respecto al grupo tratado solamente con CoPP.

La administración del inhibidor de GSK-3 β AR-A014418 vía i.p., 6 horas antes del test, ocasionó un efecto antinociceptivo en la primera fase del test de la formalina, siendo significativo para las dosis de 1 y 10 mg/kg (**Figura 23A**). La administración local de SnPP (400

nmol/20 μ l) revirtió completamente el efecto antinociceptivo del AR-A014418. Sin embargo, durante la segunda fase del test (**Figura 23B**), los animales tratados con AR-A014418 lamieron menos la pata inyectada con formalina solamente a la dosis mas altas de AR-A014418; la SnPP (400 nmol/20 μ l) administrada localmente en la pata, revirtió completamente el efecto antinociceptivo del AR-A014418. Estos resultados sugieren que la inhibición de la GSK-3 β promueve la inducción de la HO-1 localmente, y que esta inducción explicaría, al menos, una parte del efecto del fármaco.

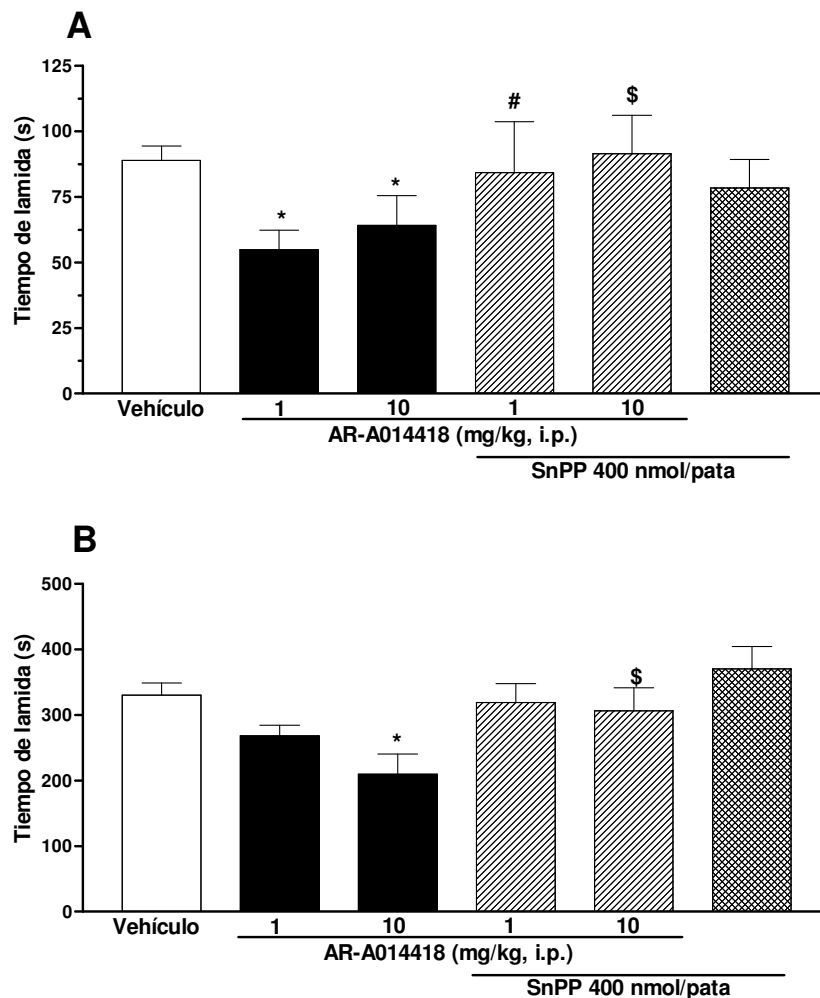


Figura 23. Efecto del tratamiento intraplantar de los ratones con SnPP (400 nmol/pata, i.pl.) sobre el efecto antinociceptivo del pretratamiento con AR-A014418 (1-10 mg/kg, i.p.) en la primera fase (A) y en la segunda fase (B) del test de la formalina. Los valores están expresados como promedios \pm error estándar de los promedios. (n=6-12). *P<0,05 respecto al control tratado solo con vehículo. # P<0,05 respecto al grupo tratado solamente con 1 mg/kg de AR-A014418. \$ P<0,05 respecto al grupo tratado solamente con 10 mg/kg de AR-A014418.

La sobreexpresión de la HO-1 inducida por CoPP esta relacionada con el factor de transcripción Nrf2

Antes de hacer experimentos *in vivo* con los animales transgénicos para el factor de transcripción Nrf2, y sabiendo que la HO-1 es regulada principalmente por transcripción, se determinó el efecto de la CoPP o la SnPP en la regulación de la expresión de la HO-1 usando una construcción de luciferasa reportera que lleva tres secuencias en tandem del la HO-1 en el elemento de respuesta antioxidante de ratón ARE-LUC (del inglés Antioxidant Response Element). Las células HEK293T se transfectaron transitoriamente con ARE-LUC o con un vector control sin el promotor (pGL3basic) y se trataron con 10 μ M CoPP o 30 μ M SnPP durante 16h.

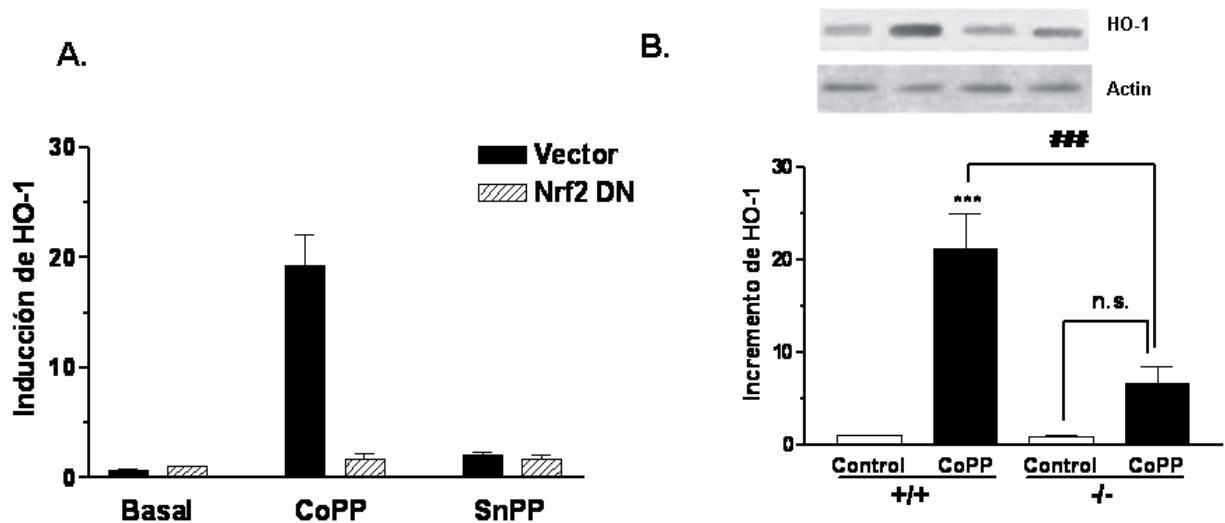


Figura 24. A) El mutante dominante negativo de Nrf2 previene la regulación del promotor de la HO-1 por la CoPP. Las células HEK293T fueron co-transfectadas con un gen reportero de luciferasa llevando la región promotora de 15-Kb del la región 5' del promotor del gen de la HO-1 de ratón (p15-LUC) o con el vector sin el promotor (pGL3b, control) y el dominante negativo de Nrf2 (Δ Nrf2(DN)) o el vector vacío. Después de 16 h de la transfección, las células se trataron con 10 μ M CoPP o 30 μ M SnPP durante 16h. B) Western blot demostrando la inducción de la HO-1 en ratones tratados con CoPP (5mg/kg, i.p.) o vehículo durante 16h antes del test de la formalina. Calle 1. Animales control tratados solamente con formalina en la pata. Calle 2. Animales control tratados con CoPP y formalina. Calle 3. Ratones knockout Nrf2 tratados solamente con formalina en la pata. Calle 4. Ratones knockout Nrf2 tratados con CoPP y formalina. Los resultados en las graficas representan el promedio \pm error estándar de dos experimentos independientes. *** P < 0.001 respecto al control tratado con vehículo y formalina. ### P < 0.001 respecto al animal control tratado con CoPP y formalina.

Como se ilustra en la **Figura 24A**, el tratamiento con CoPP, pero no con SnPP, indujo un incremento de 20 veces en la actividad de la luciferasa cuando se compara con el vector transfectado

con el vector sin promotor. Para identificar el factor de transcripción implicado en la inducción de la HO-1 se co-transfectaron células HEK293T con el plásmido reportero de luciferasa ARE-LUC o pGL3basic con un vector de expresión para un dominante negativo de Nrf2, pEFΔNrf2(DN). La actividad se bloqueó con la sobreexpresión del dominio de dimerización bZIP de Nrf2 (ΔNrf2(DN)) que compete con el Nrf2 endógeno por la heterodimerización. La activación del promotor con CoPP se revirtió completamente en las células co-transfectadas con el pEFΔNrf2(DN). En conjunto, estos resultados muestran que la CoPP induce la expresión de la HO-1 mediante la regulación del elemento de respuesta a antioxidantes (ARE) de manera dependiente de Nrf2.

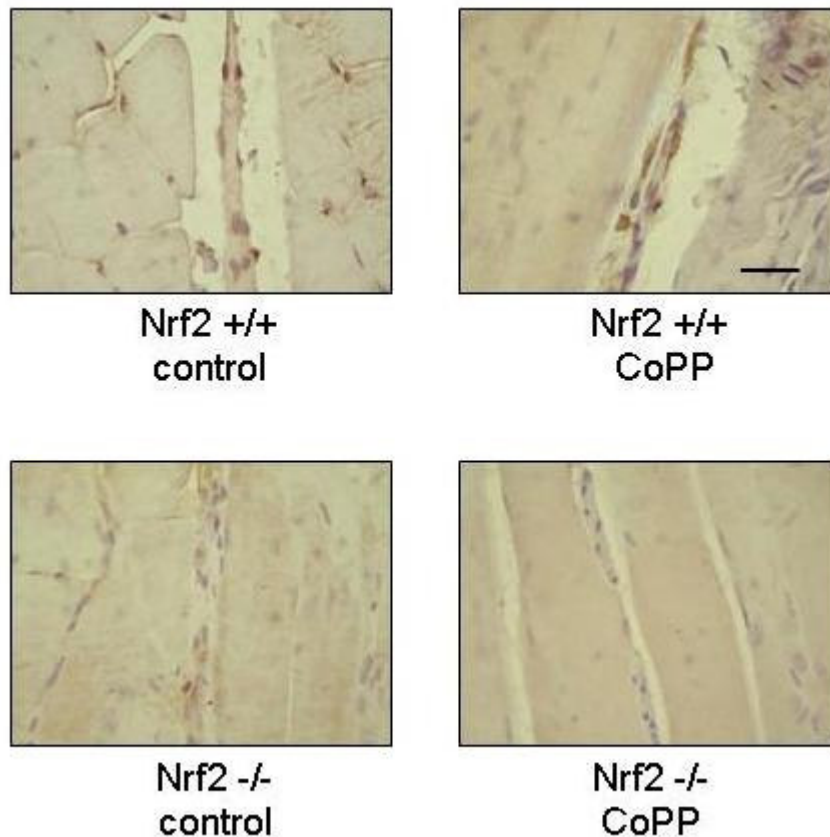


Figura 25. Inmunohistoquímica frente a HO-1 realizada en cortes del muslo de la pata trasera de ratones tratados con vehículo o CoPP (5mg/kg, trasera i.p.) 24 antes del test de la formalina. A) corte histológico de ratones control C57JBl/6J sin tratamiento. B) C57JBl/6J control tratados con CoPP, C) Nrf2 control sin tratamiento D) Nrf2 knockout tratados con CoPP. Las células positivas para HO-1 son las células marrones alargadas. Todos los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina-eosina.

Para verificar si el tratamiento con CoPP está realmente sobreexpresando la HO-1 vía Nrf2, se disecaron la superficies plantares de las patas de los animales Nrf2 +/+ y Nrf2-/- tratados o no con la CoPP y se cuantificó la HO-1 por western-blot. La **Figura 24B** demuestra que el tratamiento de los ratones con una única dosis de 5 mg/kg CoPP, i.p. aumentó en 20 veces la expresión de la HO-1 24 h después del tratamiento. El mismo tratamiento en los animales knock-out para Nrf2 produjo un incremento mucho menor, cerca de 4 veces. Mediante técnicas de inmunocitoquímica, también se pudo observar un incremento en el número de células positivas para HO-1 en secciones de músculo de la pata de los animales control tratados con CoPP respecto a los tratados suero salino. Esta células positivas para HO-1 no se encontraron en los animales knock-out para Nrf2 tratados con suero salino, y fueron muy escasas en los animales tratados con CoPP (**Figura 25**). La morfología de las células positivas para la HO-1 muestra un tamaño pequeño, forma alargada e irregular y se encuentran infiltrando el tejido muscular; estas características son compatibles con células inflamatorias.

La sobreexpresión de la HO-1 inducida por AR-A014418 esta relacionada el factor de transcripción Nrf2

La **Figure 26** demuestra que el tratamiento de los ratones con una única dosis de 10 mg/kg AR-A014418, i.p. 6 horas antes del sacrificio produce una inducción de la HO-1 en la pata. El mismo tratamiento en los animales knock-out para Nrf2 no produjo ningún incremento.

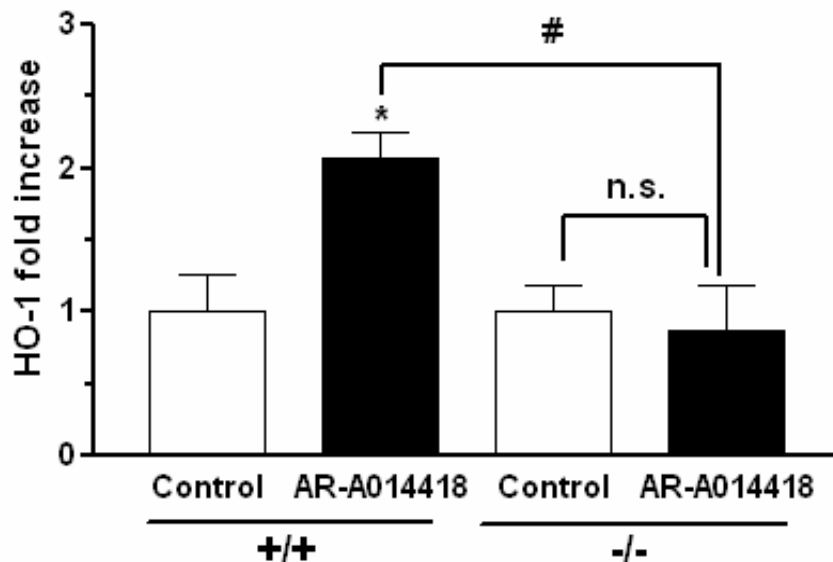


Figura 26. Western blot demostrando la inducción de la HO-1 en ratones tratados con AR-A014418 (10 mg/kg, i.p.) o vehiculo durante 24h antes del test de la formalina. Calle 1. Animales control tratados solamente con formalina en la pata. Calle 2. Animales control tratados con AR-A014418 y formalina. Calle 3. Ratones knockout Nrf2 tratados solamente con formalina en la pata. Calle 4. Ratones knockout Nrf2 tratados con AR-A014418 y

formalina. Los resultados en las graficas representan el promedio \pm error estándar de dos experimentos independientes. * $P < 0.05$ respecto al control tratado con vehículo y formalina. # $P < 0.05$ respecto al animal control tratado con AR-A014418 y formalina.

El efecto antinociceptivo de la inducción de la HO-1 por la CoPP no se produce en los ratones knock-out Nrf2

Una vez comprobado que la inducción de la HO-1 por la CoPP es vía Nrf2 se utilizaron ratones knock-out Nrf2 para determinar si el efecto antinociceptivo de la inducción de la HO-1 por el tratamiento con la CoPP estaba relacionado con este factor de transcripción. Los resultados se representados en la **Figura 27**. En los animales control C57JBl/6J, se observaron patrones similares a los encontrados en los animales *Swiss*; la CoPP (5 mg/kg, i.p.) no modificó el tiempo que los animales estuvieron lamiendo la pata en la primera fase del test de la formalina, pero redujo significativamente este valor durante la segunda fase del test de la formalina. Sin embargo, en los animales knock-out Nrf2, el efecto antinociceptivo de la CoPP en la segunda fase del test de la formalina se perdió completamente, indicando que este factor de transcripción está mediando el efecto antinociceptivo de la CoPP.

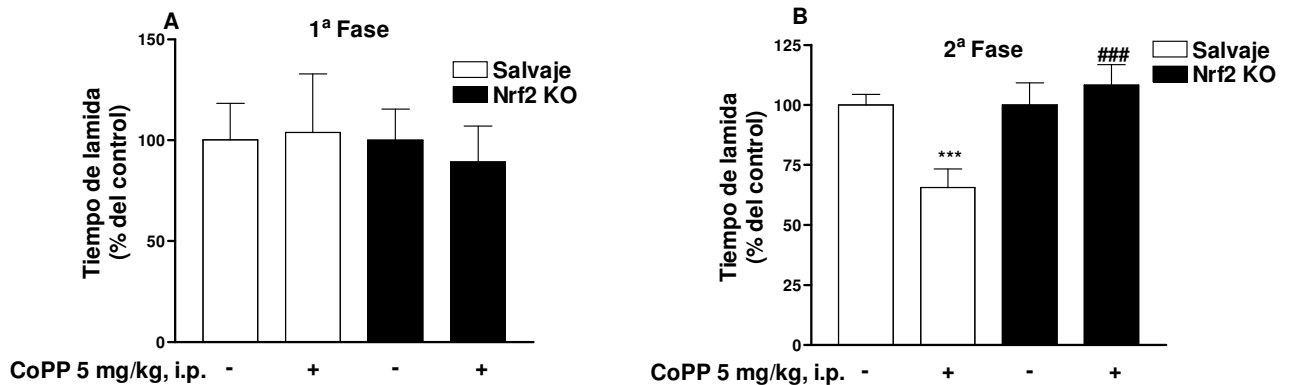


Figura 27. Efecto del tratamiento i.p. de los ratones control (barras blancas) o knockout Nrf2 (barras rayadas) con CoPP (5 mg/kg, i.p.) en la primera (A) y segunda (B) fase del test de la formalina. Los valores están expresados como promedios \pm error estándar de los promedios. (n=5-8). *** $P < 0,001$ respecto al control tratado solo con vehículo y formalina. ### $P < 0,001$ respecto al grupo KO control tratado con CoPP y formalina.

4.3. Efecto antidepresivo de las TDZDs

Efecto del NP031112 en el test de la natación forzada

En la **Figura 36** se puede observar que la administración de NP031112 produce una disminución concentración dependiente en el tiempo de inmovilidad en el test de la natación forzada (ver **Figura 36A**) cuando se administra 30 minutos antes del test, siendo significativo para las concentraciones de 0,5 y 5 mg/kg, i.p. Además, los animales tratados con el NP031112 (50 mg/kg, i.p.) mostraron menos movilidad en el test del campo abierto (**Figura 36B**). Estos resultados indican que el NP031112 posee propiedades antidepresivas y que dicho efecto no se puede explicar por una alteración locomotora de los animales.

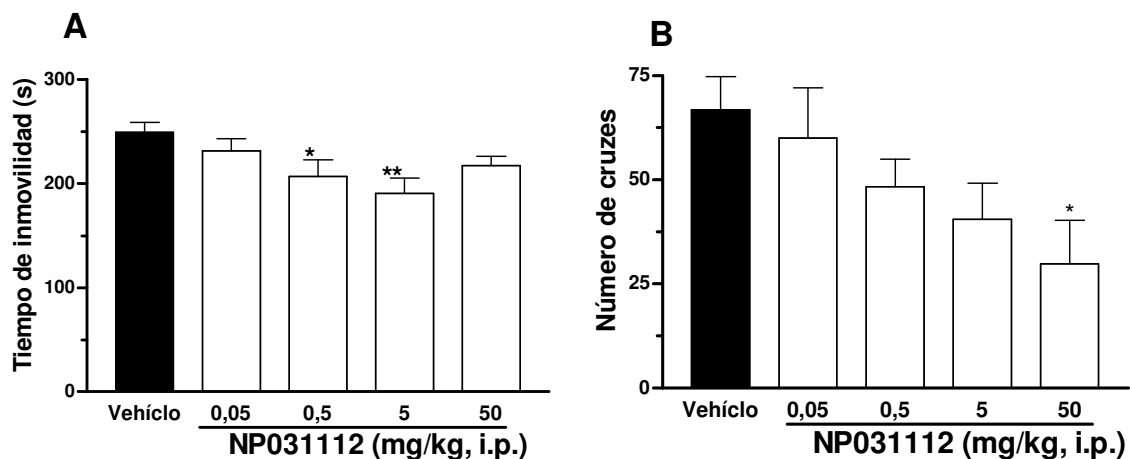


Figura 36. Efecto del tratamiento de ratones con vehículo (10 ml/kg, i.p.) o NP031115 (0,05-50 mg/kg) 30 minutos antes del test de la natación forzada (A) o el test del campo abierto (B). Los valores corresponden al promedio \pm error estándar del promedio. (n=6-12). *P<0,05 y **P<0,01 respecto al control tratado solamente con vehículo.

Efecto del NP031115 en el test de la natación forzada

Así como con el NP031112, la administración del NP031115 30 minutos antes del test (ver **Figura 37A**), también mostró un efecto antidepresivo en el test de la natación forzada en ratones, siendo significativo para la concentración de 5 mg, kg, i.p. En el test del campo abierto, la administración del NP031115 produjo una disminución en la conducta locomotora de los animales cuando fueron tratados con la dosis de 5 mg/kg, i.p. (ver **Figura 37B**). Estos datos indican que el NP031115 tiene propiedades antidepresivas y que ese efecto no se puede explicar por una alteración locomotora de los animales.

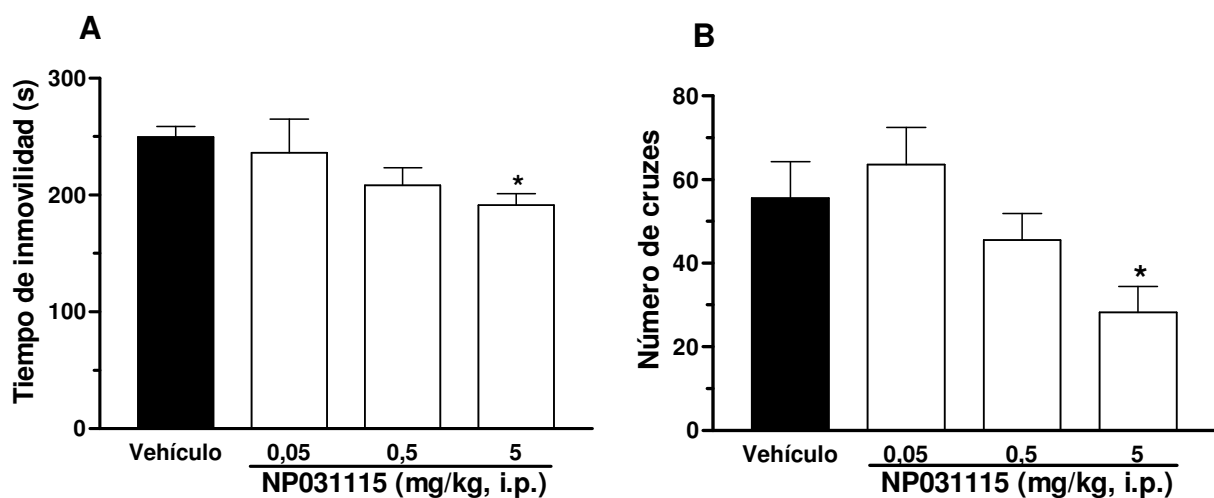


Figura 37. Efecto del tratamiento de ratones con vehículo (10 ml/kg, i.p.) o NP031112 (0,05-50 mg/kg) 30 minutos antes del test de la natación forzada (A) o el test del campo abierto (B). Los valores corresponden al promedio \pm error estándar del promedio. (n=6-13). *P<0,05, respecto al control tratado solamente con vehículo.

Efecto del AR-A014418 en el test de la natación forzada

En la **Figura 38** se puede ver como la administración del inhibidor de la GSK-3 β AR-A014418, 30 minutos antes del test, (ver **Figura 38A**) causa un efecto antidepresivo en el test de la natación forzada en ratones, siendo significativo para la concentración de 9 mg, kg, i.p.

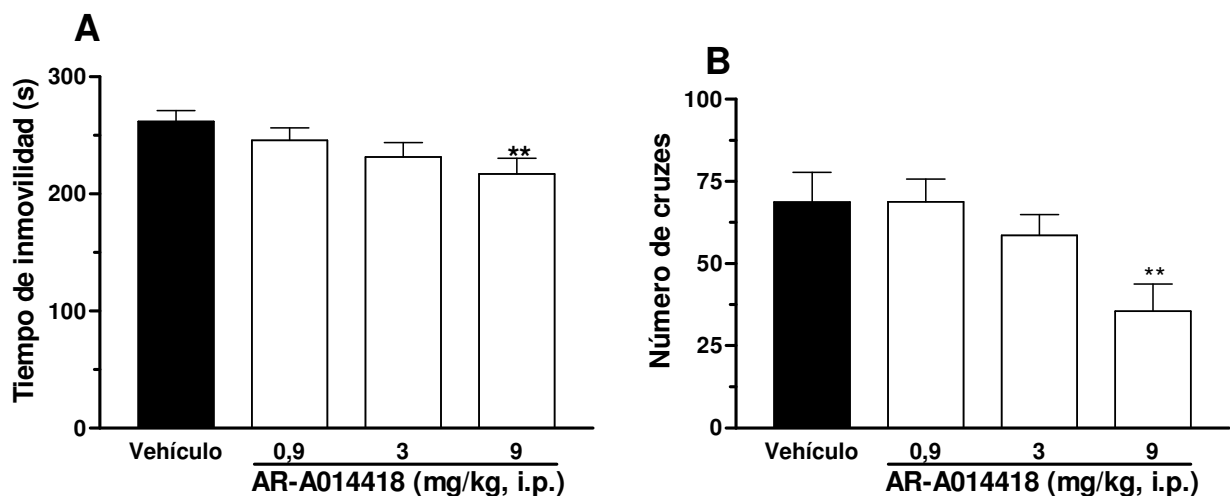


Figura 38. Efecto del tratamiento de ratones con vehículo (10 ml/kg, i.p.) o AR-A014418 (0,9-9 mg/kg) 30 minutos antes del test de la natación forzada. Los valores están expresados como promedios \pm error estándar de los promedios. (n=6). **P<0,01 respecto al control tratado solamente con vehículo.

En el test de campo abierto, la administración del AR-A014418 ocasionó una disminución en la conducta locomotora de los animales cuando fueron tratados con la dosis de 9 mg/kg, i.p. (ver **Figura 38B**). Estos datos indican que el AR-A014418, así como la TDZDs, tiene propiedades antidepresivas y que dicho efecto no se puede explicar por una alteración locomotora de los animales.

Efecto de la rosiglitazona en el test de la natación forzada

La **Figura 39** muestra el efecto de la administración i.c.v. de rosiglitazona (1-10 $\mu\text{g/sitio}$) en el test de la natación forzada en ratones. La rosiglitazona produjo un efecto antidepresivo a la dosis de 5 $\mu\text{g/sitio}$ y mostró una curva en U (ver **Figura 39A**); a la dosis de 10 $\mu\text{g/sitio}$ perdió su efecto. En el test del campo abierto, la administración de rosiglitazona no indujo ninguna alteración en la conducta locomotora de los animales (ver **Figura 39B**). Estos datos indican que la rosiglitazona posee propiedades antidepresivas y que dicho efecto no se debe a una alteración locomotora de los animales.

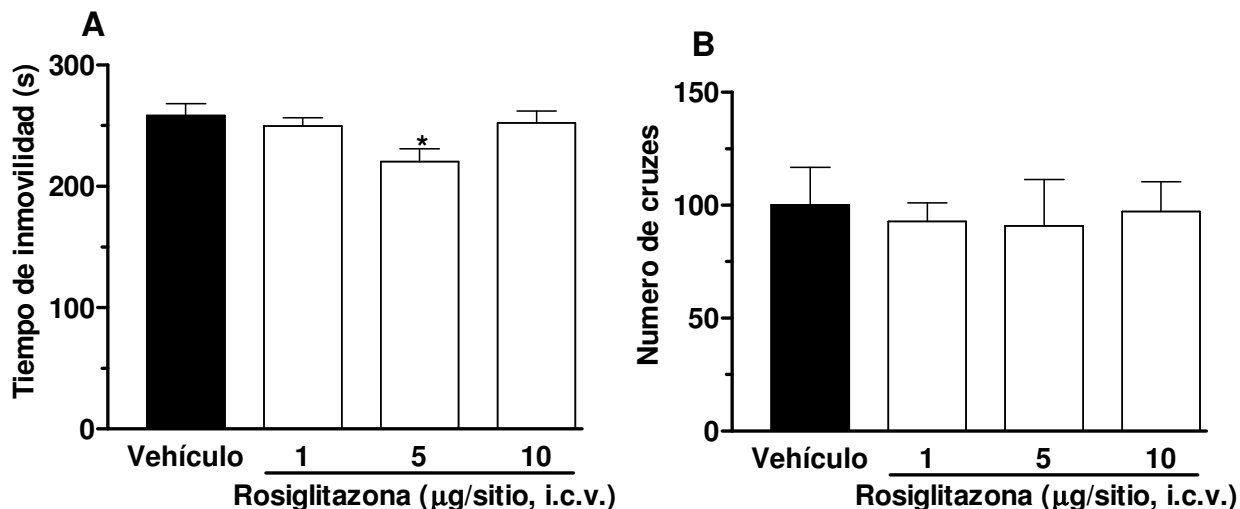


Figura 39. Efecto del tratamiento de ratones con vehículo (10 ml/kg, i.p.) o rosiglitazona (1-10 $\mu\text{g/sitio}$) 15 minutos antes del test de la natación forzada. Los valores están expresados como promedios \pm error estándar de los promedios. (n=6-11). *P<0,05 respecto al control tratado solamente con vehículo.

Efecto del GW9662 en el test de la natación forzada

La **Figura 40** representa el efecto de la administración i.c.v. del antagonista de receptores PPAR- γ GW9662 (1-10 $\mu\text{g/sitio}$) en el test de la natación forzada en ratones. El GW9662 no

mostró efecto antidepresivo a ninguna de las dosis evaluadas (ver **Figura 40A**). En el test del campo abierto, la administración de GW9662 tampoco ocasionó ninguna alteración en la conducta locomotora de los animales (ver **Figura 40B**). Estos datos indican que el antagonismo PPAR- γ no modifica la conducta de los animales en el test de la natación forzada ni en el campo abierto.

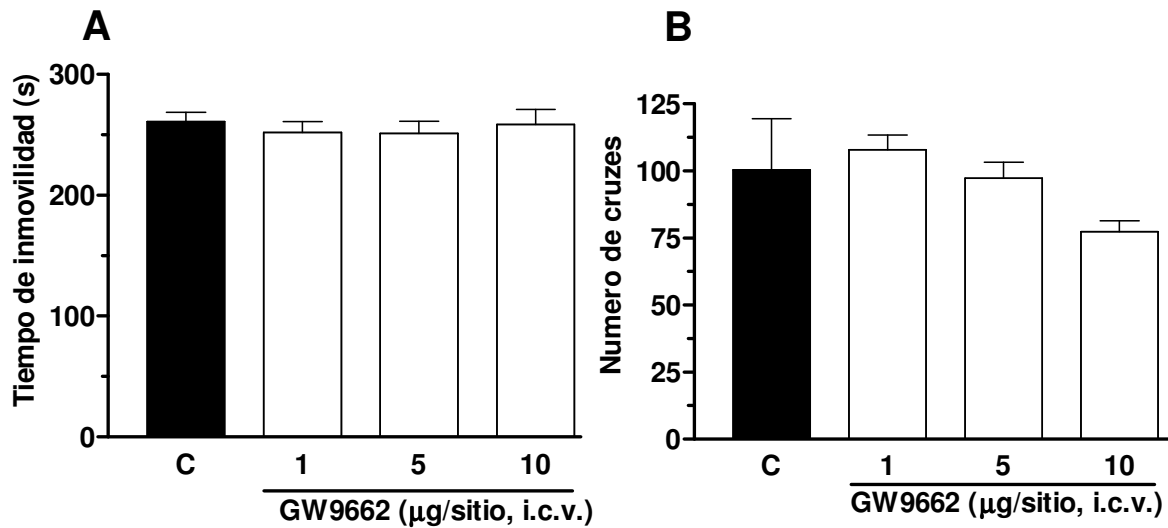


Figura 40. Efecto del tratamiento de ratones con vehículo (10 ml/kg, i.p.) o GW9662 (1-10 µg/sitio) 15 minutos antes del test de la natación forzada. Los valores corresponden al promedios \pm error estándar del promedio. (n=6-7).

El antagonismo de los receptores PPAR- γ mediante el tratamiento con GW9662 vía intracerebroventricular previene el efecto antidepresivo de la rosiglitazona y de las TDZDs en el test de la natación forzada

La rosiglitazona i.c.v. (5 µg/sitio) produjo un efecto antidepresivo en el test de la natación forzada (**Figura 41A**). La administración del antagonista GW9662 (10 µg/sitio) vía i.c.v. revirtió completamente el efecto antidepresivo de la rosiglitazona. En la **Figura 41B** esta representado el efecto de la administración del antagonista GW9662 (10 µg/sitio) vía i.c.v. sobre el efecto antidepresivo de las TDZDs NP031112 y NP031115 administrados a la dosis activa de 5 mg/kg, i.p. El antagonista GW9662 también revirtió el efecto antidepresivo de las TDZDs. Estos resultados sugieren que la activación de los receptores PPAR- γ participa, al menos en parte, en el efecto antidepresivo de la rosiglitazona y las TDZDs.

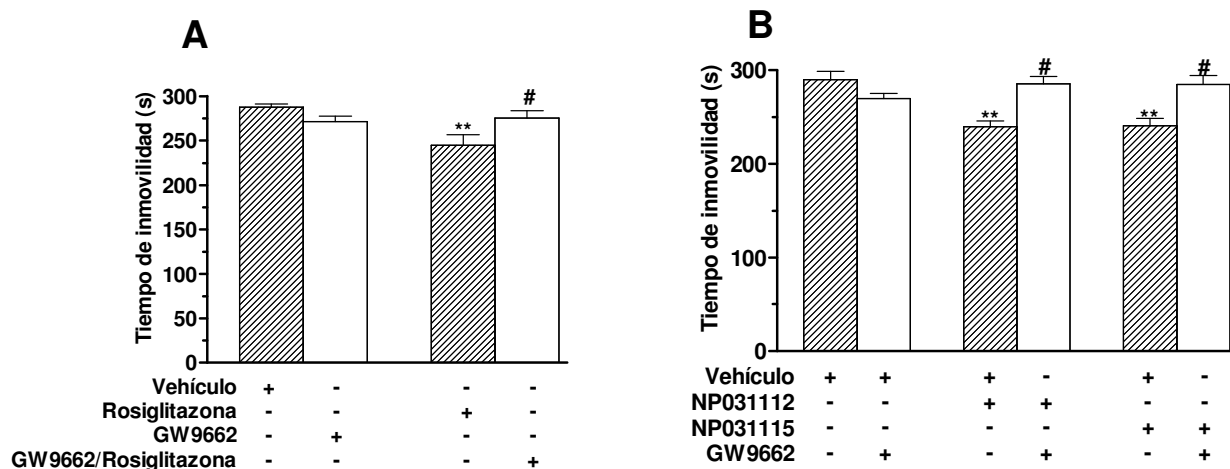


Figura 41. (A) Efecto del co-tratamiento vía intracerebroventricular de los ratones con GW9662 (10 µg/sitio, i.c.v.) y rosiglitazona (panel A, 5 µg/sitio, i.c.v.) administrados 15 min antes del test de la natación forzada. (B) Efecto del pretratamiento con GW9662 (10 µg/sitio, i.c.v.) 15 minutos antes de los tratamientos con NP031112 (5 mg/kg) o NP031115 (5 mg/kg) en el test de la natación forzada. Los valores están expresados como promedios ± error estándar del promedio. (n=6-8). **P<0,001 respecto al control tratado solo con vehículo. # P<0,05 respecto al mismo grupo sin el co-tratamiento con el GW9662.

El NP031112 produce un efecto sinérgico con la fluoxetina en el test de la natación forzada

La **Figura 42** muestra el efecto de la administración de NP031112 (0,5 mg/kg, i.p.) o fluoxetina (10 mg/kg, i.p.) en dosis subactivas o el efecto de la administración conjunta de los dos fármacos.

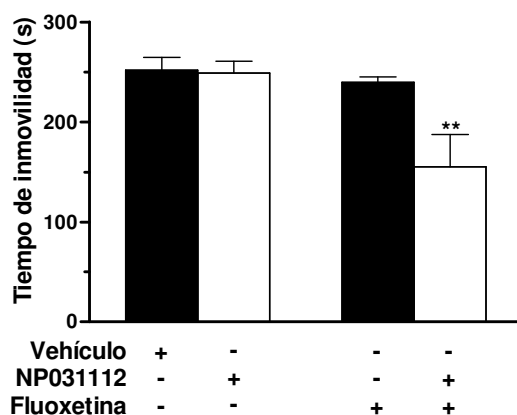


Figura 42. Efecto del co-tratamiento vía intraperitoneal de los ratones con NP031112 (0,5 mg/kg, i.p.) y fluoxetina (10 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes del test de la natación forzada. Los valores están expresados como promedios ± error estándar del promedio. (n=5-7). **P<0,01 respecto al control tratado solo con vehículo.

El tratamiento con NP031112 o fluoxetina a dosis subactivas no produjeron efecto antidepresivo significativo en este test. Como se puede observar, los fármacos mostraron una sinergia en este modelo de la natación forzada. Estos resultados sugieren una posible sinergia entre los mecanismos de acción de las TDZDs y la fluoxetina frente a la depresión.

4.1. Efecto neuroprotector de las TDZDs

Efecto de la privación de oxígeno y glucosa (POG) sobre la viabilidad celular en rodajas de hipocampo de rata

La exposición de las rodajas de hipocampo a una hora de POG provocó un aumento significativo de la muerte celular cuando esta se evalúa justo después de finalizar el periodo de POG, y tras las tres horas siguientes de re-oxigenación, en comparación con las rodajas controles no sometidas a la POG (ver **Figura 43**).

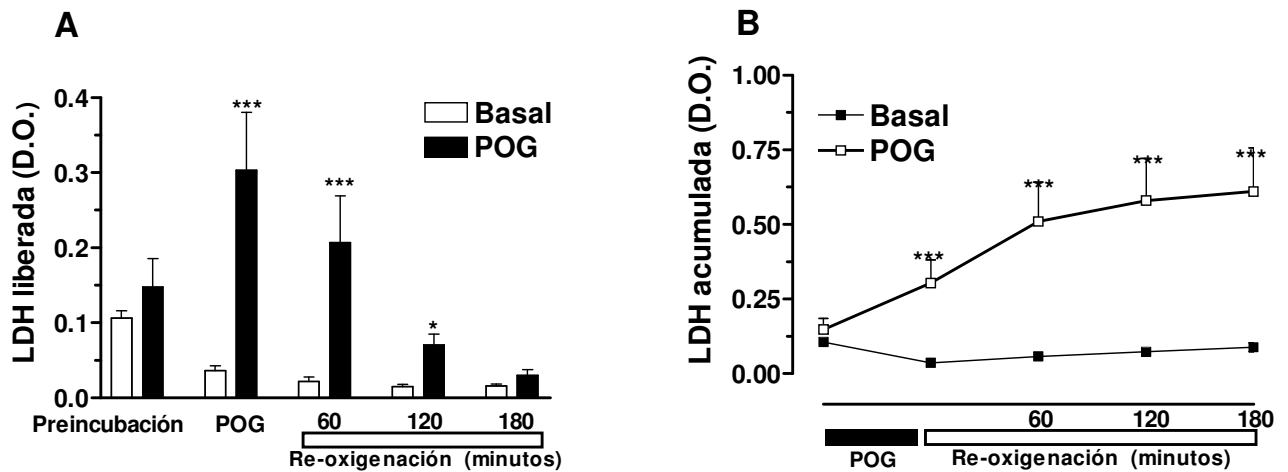


Figura 43: Efecto de la privación de oxígeno y glucosa (POG) en rodajas de hipocampo de rata. Los valores representan el promedio \pm error estándar de la densidad óptica que corresponde a la lectura de la enzima LDH (lactato deshidrogenasa, indicativo de muerte neuronal) presente en el medio extracelular (A) después de media hora de preincubación, 1 hora de POG, o en las 3 horas siguientes de re-oxigenación y reintroducción de la glucosa o (B) los mismos valores representados arriba pero acumulados a partir de la hora de POG. En A se ven en blanco las rodajas control, no sometidas a la privación de glucosa y oxígeno, y en negro las rodajas sometidas a la POG y re-oxigenación B) los cuadrados blancos representan las rodajas sometidas a POG y los negros las rodajas control. (n=7) *** P<0.001 y * P<0,05 respecto a los respectivos controles.

Efecto de las TDZD sobre la lesión inducida por POG

Se ha evaluado el posible efecto protector de las TDZDs NP031112, NP00111 y NP01139 a las concentraciones de 3, 10 y 30 μM en el modelo de POG seguida de re-oxigenación en rodajas de hipocampo. Ninguno de estos compuestos, a las concentraciones estudiadas, mostró toxicidad *per se* en este modelo experimental (ver valores de preincubación: el primer punto antes de la POG, **Figura 44**).

El compuesto NP031112 produjo una protección tras la hora de POG y en la hora siguiente de re-oxigenación (**Figura 44A**). El NP00111, a la concentración de 10 μM ocasionó una protección significativa después de la primera hora de re-oxigenación (**Figura 44B**), la protección se mantuvo durante todo el experimento pero no protegió cuando se consideró el valor exacto después de la hora de POG. El compuesto NP01139 no produjo protección a ninguna de las concentraciones estudiadas (**Figura 44C**).

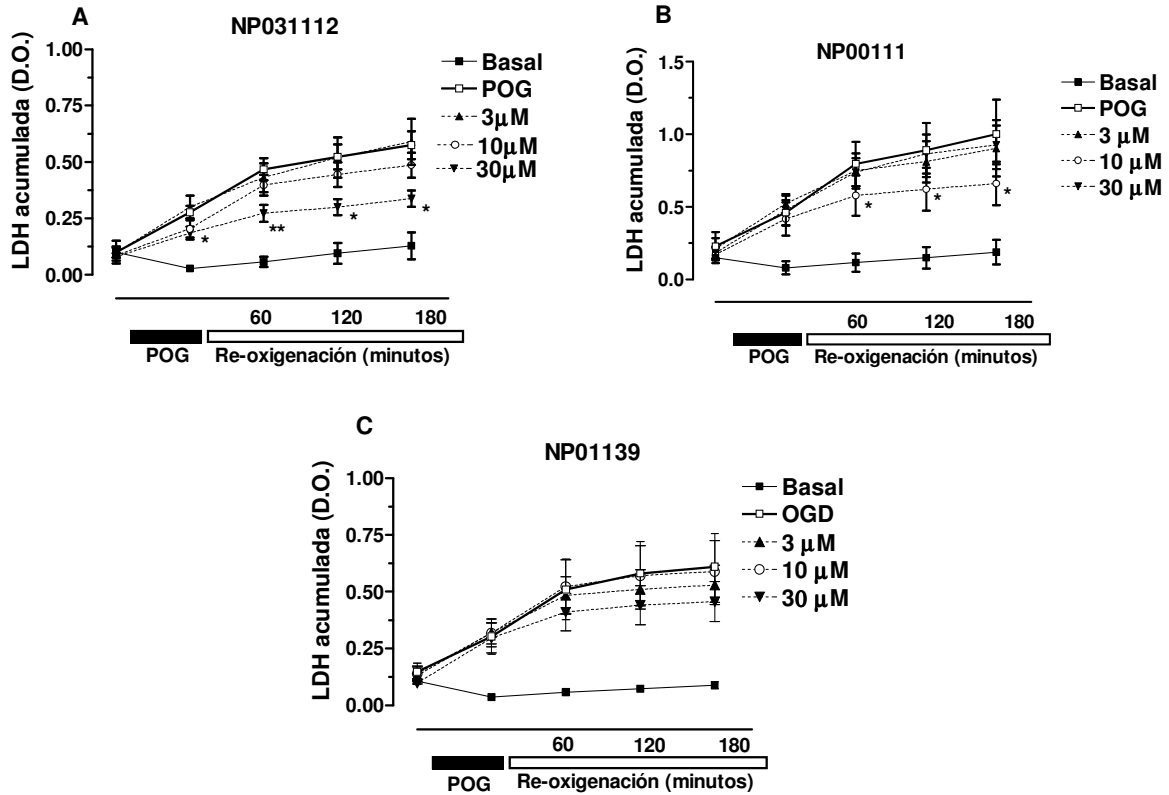


Figura 44: Efecto de las TDZD NP031112, NP00111 y NP01139 (A, B y C respectivamente) en rodajas de hipocampo de rata sometidas a POG. Los valores representan el promedio \pm error estándar de la densidad óptica que corresponde a la lectura de la enzima LDH (lactato deshidrogenasa, indicativo de muerte neuronal). (n=7-9) **P<0,01 y * P<0,05 respecto a los respectivos grupos sometidos a POG.

Efecto de los inhibidores de GSK-3 β sobre la lesión ocasionada por POG

Dado que las TDZDs son inhibidores de la enzima GSK-3 β decidimos evaluar el efecto de dos reconocidos inhibidores de esta enzima, a saber, el litio (un inhibidor conocido de GSK-3) y el AR-A014418 (un inhibidor específico de GSK-3 β) Curiosamente, tal como puede observarse en la **Figura 45A** y **Figura 45B**, ninguno de estos compuestos ofreció protección significativa a ninguna de las concentraciones estudiadas.

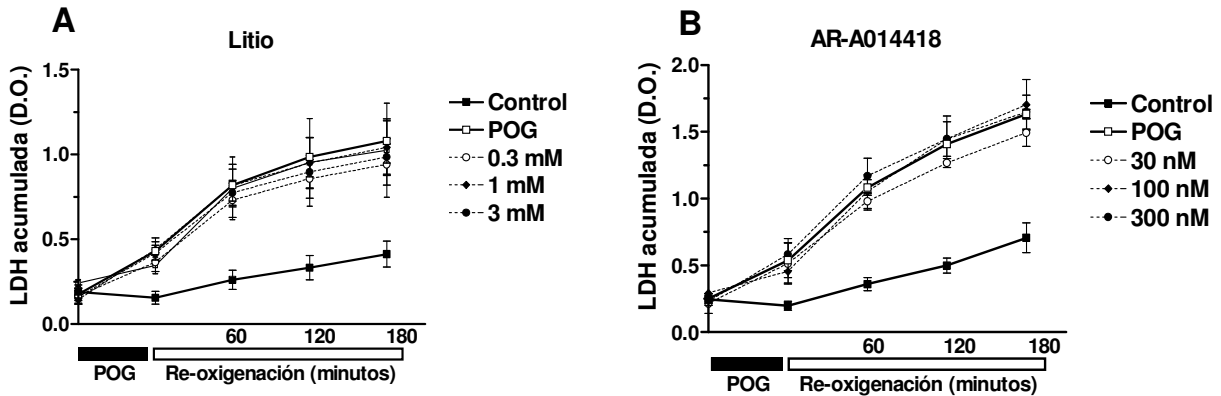


Figura 45: Efecto de los inhibidores de GSK-3 β , litio y AR-A014418 (A y B respectivamente) en rodajas de hipocampo de rata sometidas a POG. Los valores representan el promedio \pm el error estándar de la densidad óptica que corresponde a la lectura de la enzima LDH (lactato deshidrogenasa, indicativo de muerte neuronal) liberada durante los distintos periodos de incubación de los tejidos. (n=4-8) El análisis estadístico no mostró una diferencia significativa entre los grupos POG y los tratados con los dos fármacos.

Efecto del agonista PPAR- γ rosiglitazona sobre la lesión inducida por POG

La incubación de las rodajas con el agonista PPAR- γ rosiglitazona protegió frente al daño producido por la POG a la concentración de 3 μ M; Este efecto fue especialmente evidente durante la fase de re-oxigenación (ver **Figura 46**). Igual que sucedió con el NP00111, la protección se perdió a concentraciones más altas.

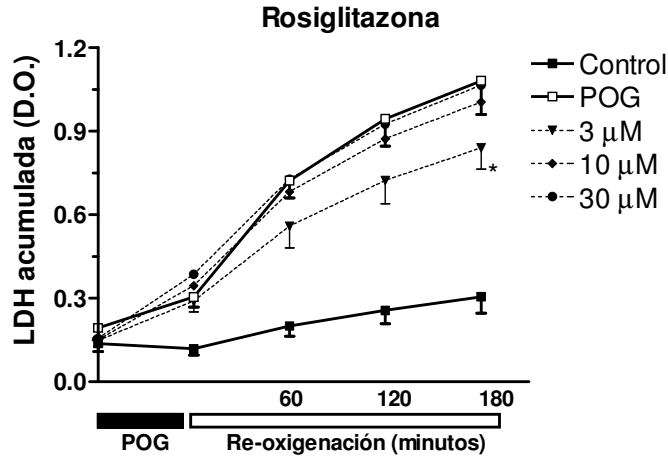


Figura 46: Efecto de la rosiglitazona en rodajas de hipocampo de rata sometidas a la POG. Los valores representan el promedio \pm error estándar de la densidad óptica que corresponde a la lectura de la enzima LDH (lactato deshidrogenasa, indicativo de muerte neuronal) liberada al medio durante los periodos de incubación señalados con las barras horizontales al pie de la figura. (n=8) * $P < 0,05$ respecto a los respectivos grupos sometidos a POG.

Efecto del antagonista PPAR- γ GW9662 sobre la lesión inducida por POG

La incubación de las rodajas con el antagonista PPAR- γ GW9662, a la concentración de 3 μ M, no tuvo ningún efecto sobre el daño producido por la POG. Tampoco se observó algún efecto sobre los valores basales de LDH liberada al medio extracelular tras media hora de preincubación con este compuesto (**Figura 47**).

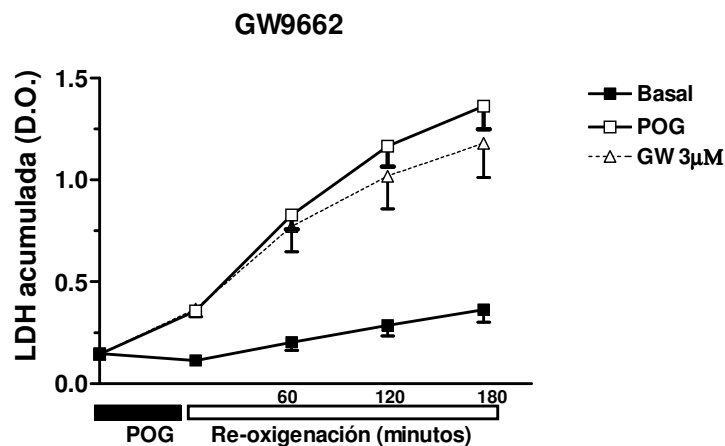


Figura 47: Efecto del GW9662 en rodajas de hipocampo de rata sometidas a la POG. Los valores representan el promedio \pm error estándar de la densidad óptica que corresponde a la lectura de la enzima LDH (lactato deshidrogenasa, indicativo de muerte neuronal) liberada al medio durante los periodos de incubación señalados con las barras horizontales al pie de la figura. (n=17) * $P < 0,05$ respecto a los respectivos grupos sometidos a POG.

Efecto del antagonista PPAR- γ GW9662 sobre la protección ocasionada por las TDZDs y la rosiglitazona

Tanto el efecto protector del NP031112 (30 μ M **Figura 48A**) como del NP00111 (10 μ M, **Figura 48B**) y la rosiglitazona (3 μ M, **Figura 48C**) se revirtieron cuando se incubaron simultáneamente con el GW9662 (3 μ M, un antagonista específico PPAR- γ). Estos resultados sugieren que el efecto protector de estas dos TDZD y la rosiglitazona, en este modelo experimental, está mediado fundamentalmente por PPAR- γ .

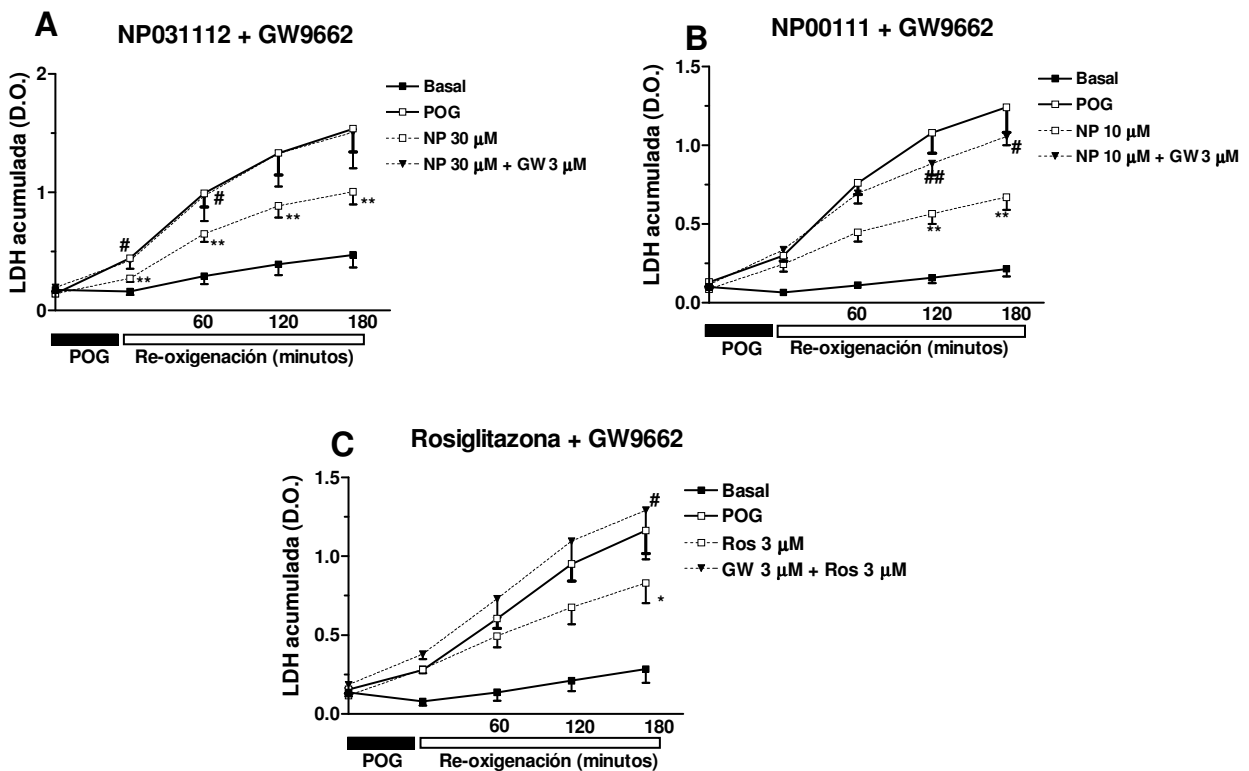


Figura 48: Efecto del pre-tratamiento con GW9662 (antagonista de receptores PPAR- γ) sobre el efecto protector de la rosiglitazona, y de las TDZD (NP031112 y NP00111) (A, B y C respectivamente) en rodajas de hipocampo de rata sometidas a POG. Los valores representan el promedio \pm el error estándar de la densidad óptica que corresponde a la lectura de la enzima LDH (lactato deshidrogenasa, indicativo de muerte neuronal), liberada al medio durante los periodos de incubación señalados con las barras horizontales al pie de la figura. (n=7) **P<0,01 y * P<0,05 respecto a los respectivos grupos sometidos a POG. ## P<0,01 y # P<0,05 respecto al grupo tratado con el mismo fármaco pero sin antagonista.

Efecto del NP00111 y la rosiglitazona sobre la fosforilación de ERK1/2

Como se puede observar en la **Figura 49**, la incubación durante 30 minutos con rosiglitazona (3 μ M) o NP00111 (10 μ M), produjo un incremento en la cantidad de ERK1/2 fosforilada en las rodajas de hipocampo de rata. Este aumento fue revertido por la administración conjunta del antagonista PPAR- γ GW9662 (3 μ M). Esto indica que la activación de los receptores PPAR- γ induce una fosforilación de la enzima ERK1/2.

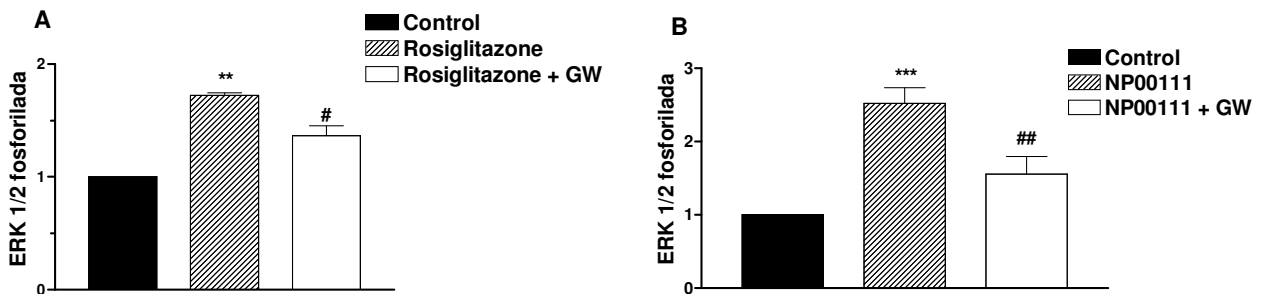


Figura 49. Western blot demostrando la fosforilación de ERK1/2 en la rodajas de hipocampo de rata preincubadas con vehículo, rosiglitazona o rosiglitazona + GW9662 (A) o vehículo, NP00111 o NP00111 + GW9662. Los resultados en las graficas representan el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes. ** $P < 0.01$ respecto al vehículo. # $P < 0.05$ respecto al grupo tratado con rosiglitazona.

Efecto del inhibidor de la ERK1/2 PD98059 sobre la neuroprotección inducida por NP00111

Para corroborar que la vía ERK1/2 estaba implicada en la protección observada por el NP00111 se realizaron experimentos de neuroprotección frente la POG con el inhibidor de la ERK1/2 PD98059 (50 μ M). Los resultados de la **Figura 50** muestran que el PD98059 revirtió el efecto neuroprotector del NP00111 (10 μ M). La administración del PD98059 no produjo ningún efecto *per se* sobre la muerte inducida por la POG. Estos datos indican que el efecto neuroprotector del NP00111 está mediado por la activación de ERK1/2.

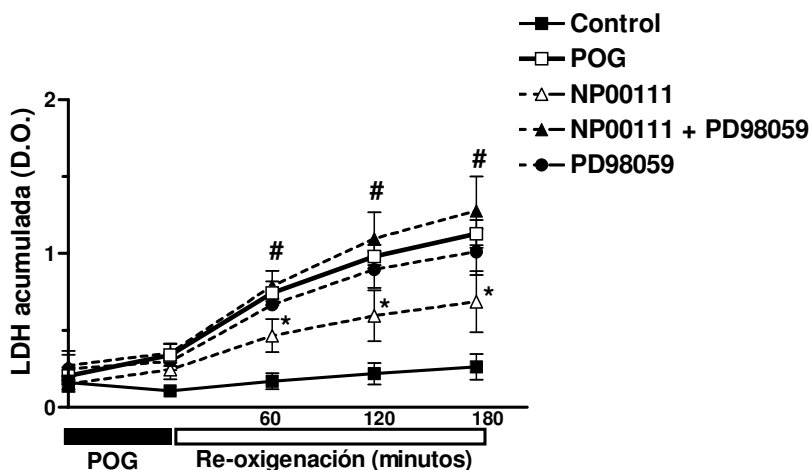


Figura 50. Efecto del pre-tratamiento con PD98059 (un inhibidor de la ERK1/2) sobre el efecto protector de la TDZD NP00111 en rodajas de hipocampo de rata sometidas a POG. Los valores representan el promedio \pm el error estándar de la densidad óptica que corresponde a la lectura de la enzima LDH (lactato deshidrogenasa, indicativo de muerte neuronal), liberada al medio durante los periodos de incubación señalados con las barras horizontales al pie de la figura. (n=6) * P<0,05 respecto al grupo POG. #P<0,05 respecto al grupo tratado con NP00111 pero sin el inhibidor de la ERK1/2.

5. Discusión

En esta discusión analizaré por separado los resultados obtenidos en modelos animales de dolor, de neuroprotección y en modelos para el crivado de fármacos antidepresivos, con las nuevas TDZDs estudiadas, NP031112, NP031115, NP00111 y NP01139 en comparación con otros compuestos conocidos.

5.1. Propiedades analgésicas de las TDZDs

En este trabajo se ha demostrado el potencial efecto terapéutico frente al dolor agudo producido por la estimulación directa de los nociceptores y la nocicepción de origen inflamatoria de la TDZD NP031112. Las TDZDs tienen como diana la GSK-3 β , inhibiéndola (Martinez *et al.*, 2002a; Martinez *et al.*, 2002b) en un sitio distinto al del ATP. Esto está de acuerdo con datos de la literatura que demuestran que la TDZD-8, un molécula de la misma familia que el NP031112, es activa frente a modelos de inflamación inducida por carragenina en el pulmón (Cuzzocrea *et al.*, 2006a) y la artritis inducida por colágeno del tipo II en ratones (Cuzzocrea *et al.*, 2006b). También está de acuerdo con el hecho de que la GSK-3 β está relacionada con la nocicepción, una vez que hay un aumento en su actividad durante el fenómeno de tolerancia a la morfina y este aumento parece ser al menos en parte responsable de esta tolerancia. De hecho, la aplicación de inhibidores de la GSK-3 β intratecalmente ayuda a prevenir la tolerancia a la morfina (Parkitna *et al.*, 2006).

Como un primer abordaje experimental, utilizamos el modelo del ácido acético. Este modelo de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético en ratones está considerado como un modelo típico de nocicepción inflamatoria visceral siendo ampliamente utilizado como herramienta para la detección y evaluación de nuevos agentes con propiedades analgésicas y antiinflamatorias. Además, la inyección de ácido acético en la cavidad peritoneal de ratones activa la liberación de diversos mediadores de la respuesta inflamatoria, tales como las prostaglandinas, bradicinina, TNF- α , IL-1 β , entre otros. Por otra parte, se sabe que las fibras del tipo C y los receptores de vaniloideos del tipo I son mediadores de la nocicepción en este modelo (Ikeda *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2000; Vinegar *et al.*, 1976).

El NP031112, administrado 30 minutos antes del test, previno el dolor inducido por la inyección de ácido acético vía i.p. De hecho, la prevención de la nocicepción inducida por ácido acético se mantuvo hasta 24 horas después de una única dosis de NP031112, resultado que indica la larga duración de acción de este compuesto. Además, el NP031112 inhibió la extravasación

plasmático medida a través de la tinción con Azul de Evans. Estos datos están de acuerdo con el hecho de que los inhibidores de la GSK-3 β tengan un efecto inhibitor de la expresión de citocinas (Vines *et al.*, 2006) lo que podría explicar, al menos en parte, que el fármaco tenga efectos a largo plazo inhibiendo el dolor de origen inflamatorio. En este estudio se ha observado que tanto el inhibidor de la GSK-3 β AR-A014418, como el agonista PPAR- γ rosiglitazona inhibieron la nocicepción producida por el ácido acético. El hecho de que el inhibidor de los receptores PPAR- γ GW9662, no revierta el efecto del NP031112, indica que el efecto sobre la GSK-3 β predomina sobre el agonismo PPAR- γ en este modelo de dolor. Curiosamente, estas dos dianas se relacionan, es decir, una vez que se produce la activación de los receptores PPAR- γ se puede inhibir la GSK-3 β a través de la activación de la kinasa Akt (Singh *et al.*, 2005); se ha sugerido que este sea es el mecanismo por el cual el agonismo PPAR- γ inhibe la GSK-3 β (Inestrosa *et al.*, 2005). Entonces es posible que el efecto nociceptivo del agonismo PPAR- γ sea también mediado por la inhibición de GSK-3 β , y en el caso del NP031112, tratándose de un inhibidor directo de la enzima, no tiene su efecto alterado por la modulación de la Akt, ya que la Akt y el PPAR- γ son anteriores a la GSK-3 β en esta cascada.

Con la finalidad de corroborar y poder discriminar mejor el efecto antinociceptivo del NP031112, en este trabajo también se ha estudiado si la administración del NP031112 podría inhibir la nocicepción causada por la inyección intraplantar de formalina, un modelo utilizado ampliamente para la evaluar fármacos analgésicos (Le Bars *et al.*, 2001). Tanto los ratones como las ratas, tienen un comportamiento bifásico cuando se inyecta intraplantarmente la formalina. La primera fase se debe en su mayor parte a la estimulación directa de los nociceptores, mientras que la segunda fase se asocia fundamentalmente a la sensibilización de los nociceptores por mediadores inflamatorios (Le Bars *et al.*, 2001). Esta prueba farmacologica adquiere gran relevancia justamente por permitir esta separación, que facilita el cribado de fármacos capaces de modular el dolor de origen inflamatorio, considerado más resistente a los analgésicos (Hunskaar *et al.*, 1985). La administración del NP031112 inhibió la nocicepción tanto en la primera fase como en la segunda fase del test de la formalina. Estos datos sugieren que el NP031112 tiene un efecto antinociceptivo frente a la estimulación directa de los nociceptores y frente al dolor de origen inflamatorio, reafirmando la hipótesis de que el NP031112 posee propiedades antinociceptivas y antiinflamatorias.

Una vez observado que el NP03112 produce una inhibición del dolor agudo y, que el glutamato está implicado en la transmisión de este tipo de dolor y, que datos en la literatura apoyan la idea de que la inhibición de la GSK-3 β (Facci *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2004; Luna-

Medina *et al.*, 2005) protege frente a la excitotoxicidad del glutamato, se decidió estudiar el efecto del NP031112 en modelos de dolor que implican la transmisión glutamatergica.

Los resultados de esta tesis demuestran que la administración intraperitoneal de NP031112 produce una inhibición significativa de la respuesta nociceptiva causada por la inyección de glutamato en la pata de ratones. El glutamato y sus receptores comprenden el sistema de neurotransmisores excitadores más importantes del sistema nervioso de mamíferos. Además, está bastante establecido en la literatura que el sistema glutamatérgico ejerce un papel importante en los procesos nociceptivos tanto a nivel central como periférico (Fundytus, 2001; Millan, 1999; Ozawa *et al.*, 1998). Datos en la literatura demuestran que las sustancias capaces de antagonizar los receptores glutamatérgicos tanto ionotrópicos como metabotrópicos, presentan un importante efecto antinociceptivo en diferentes especies de mamíferos, incluso en los humanos (Lutfy *et al.*, 1997; Neugebauer, 2002; Wiech *et al.*, 2004). La respuesta nociceptiva inducida por la inyección intraplantar de glutamato parece implicar sitios de acción periféricos, espinales y supraespinales, siendo ampliamente mediada tanto por receptores NMDA como no-NMDA, bien como por la liberación de óxido nítrico (NO) o por sustancias relacionadas con el NO (Beirith *et al.*, 2002).

El NP031112, administrado *i.p.*, también inhibió significativamente y de forma dependiente de dosis, la nocicepción ocasionada por la inyección intratecal de NMDA, mostrando así la implicación de los receptores NMDA, a nivel espinal, en su acción antinociceptiva. El NP031112 también inhibió el dolor producido por la inyección intratecal de AMPA, lo que sugiere que los receptores AMPA también están mediando a nivel de médula el efecto inhibitor del NP031112 sobre la nocicepción inducida por el glutamato. Estos datos están de acuerdo con el hecho que la TDZD-8 y otros inhibidores de la GSK-3 inhiban, en cuestión de minutos, las corrientes producidas por activación del receptor NMDA (Chen *et al.*, 2007) y los inhibidores de GSK-3 sean neuroprotectores frente a la excitotoxicidad de glutamato, NMDA y kainato (Goodenough *et al.*, 2004; Kelly *et al.*, 2004). Este efecto del NP031112 podría explicar, al menos en parte, su efecto agudo frente al dolor inducido por la formalina y ácido acético, así como frente al producido por el glutamato inyectado intratecalmente o en la pata del animal.

Sorprende que la administración *i.p.* de NP031112 no inhibiera la nocicepción inducida por la inyección intratecal del trans-ACPD, y que potenciara la respuesta inducida por este agonista. La principal vía de transducción de señales ocasionada por la activación de los receptores glutamatérgicos metabotrópicos del tipo I está mediada por la activación de una proteína Gq que promueve la activación de la PLC, formación de inositoltrifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), con la consiguiente movilización intracelular de calcio y la activación de la

NOS (Meldrum, 2000). La activación de los receptores PPAR- γ parece aumentar discretamente los niveles intracelulares de calcio en monocitos probablemente por una liberación de depósitos de calcio intracelulares (Singh *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que el NP031112 es una agonista PPAR- γ , es posible que su efecto potenciador del agonista metabotrópico sea debido a un efecto sinérgico en la movilización del calcio intracelular; de esta manera el fármaco modularía la actividad de las neuronas nociceptivas o la modulación ejercida en estas por células inflamatorias. Sin embargo, la magnitud de este efecto sinérgico comparado con el efecto sobre los demás receptores de glutamato parece ser irrelevante, una vez que el efecto final de NP031112 sobre el dolor inducido por el agonista fisiológico glutamato es una inhibición muy potente.

Muchas citocinas como TNF- α , IL-1 α , IL-1 β y IFN- γ , inducen un comportamiento nociceptivo cuando se inyectan intratecalmente, en ausencia de un estímulo nociceptivo periférico (Robertson *et al.*, 1997; Tadano *et al.*, 1999). Este efecto se debe probablemente a la liberación de glutamato y sustancia P de las terminaciones nerviosas (Tadano *et al.*, 1999). Resulta llamativo que el NP031112 revirtiera de manera dosis-dependiente el efecto nociceptivo de las citocinas TNF- α y IL-1 β a nivel espinal. Esto podría explicarse tanto por una inhibición de alguna de las etapas de sus vías señalización o sobre la señalización inducida por el glutamato liberado por estas citocinas en la médula; de hecho, el NP031112 inhibe el dolor inducido por glutamato, NMDA, o AMPA, cuando se administran intratecalmente.

Como he comentado anteriormente, la vía L-arginina-NO está implicada en la nocicepción producida por el glutamato (Beirith *et al.*, 2002). Por ello, también se ha estudiado si el NP031112 actúa sobre la vía L-arginina-NO en el test del ácido acético. El pretratamiento con L-arginina, pero no su isómero inactivo D-arginina revirtió parcialmente el efecto del inhibidor de la NOS L-NOARG, pero no inhibió el efecto del NP031112.

Los efectos del NP031112 sobre modelos de dolor inflamatorio sirvieron la conveniencia estudiar su efecto sobre la hiperalgesia producida por agentes flogísticos.

La carragenina aumenta la presencia de distintos mediadores químicos de la inflamación, como la IL-1 β , IL-6, PGE2, TNF- α y CINC-1 (Cuzzocrea *et al.*, 2006a; Loram *et al.*, 2007). El NP031112 inhibió la hiperalgesia mecánica y térmica inducida por carragenina, hecho que está de acuerdo con los efectos descritos anteriormente frente al dolor producido por formalina (segunda fase) y disminución de la extravasación y dolor producidos por el ácido acético. También está de acuerdo con datos que muestran que la TDZD-8 disminuye la producción de nitritos/nitratos (NO x), TNF- α y IL-1 β inducidos por carragenina (Cuzzocrea *et al.*, 2006a).

La activación de la PKC, otro de los estímulos utilizados para producir hiperalgesia en este trabajo, está asociada a una excitabilidad y a una hipersensibilidad de los nociceptores a bradicinina o histamina (Dray *et al.*, 1992; Mizumura *et al.*, 1997; Mizumura *et al.*, 2000) durante un estímulo inflamatorio. De hecho, los inhibidores de la PKC disminuyen la nocicepción inducida por bradicinina, adrenalina o sustancias inflamatorias como la carragenina, tanto en ratas como en ratones (Aley *et al.*, 2000; Khasar *et al.*, 1999). Está descrito que los ésteres de forbol son capaces de producir la excitación directa de las neuronas sensoriales primarias *in vitro* (Leng *et al.*, 1996; Rang *et al.*, 1988; Schepelmann *et al.*, 1993), producen una nocicepción espontánea, hiperalgesia térmica y mecánica, además de alodinia en ratas y ratones (Souza *et al.*, 2002; Taniguchi *et al.*, 1997). Al parecer, la acción del PMA (un activador de PKC) en las vías de nocicepción implican el receptor vaniloide TRPV1 (Ferreira *et al.*, 2005; Tsuchiya *et al.*, 2005). Las fibras sensibles a capsaicina (principalmente fibra del tipo C) ejercen un papel relevante en la nocicepción inducida por PMA; son la fuente de ciertos mediadores implicados en el dolor provocado por PMA, como el glutamato, la sustancia P y CGRP (Szallasi *et al.*, 1999). Los ésteres de forbol liberan sustancia P y CGRP de neuronas de los ganglios espinales en cultivos (Barber *et al.*, 1996). La COX-1, COX-2, IL-1 β , TNF- α , NGF y BDNF también participan en el dolor producido por PMA (Ferreira *et al.*, 2005). En este trabajo, el NP031112 inhibió la hiperalgesia mecánica y térmica inducida por PMA, lo que evidencia que el NP031112 interfiere en el mecanismo hiperalgésico de la activación de la PKC. Es posible que el NP031112 actúe inhibiendo la liberación o la señal producida por alguna de las citocinas liberadas por la estimulación con PMA, o inhibiendo la señalización de ciertas sustancias por la neurona aferente primaria localmente (ej. glutamato, bradicinina) que activan las células inflamatorias. De hecho tal como se ha mencionado anteriormente, parece ser que la señalización por glutamato es inhibida por el NP031112.

La bradicinina es un inductor potente de nocicepción que, actuando en receptores del tipo B2 en las terminaciones de las neuronas sensitivas, induce nocicepción y liberación de neuropéptidos; también actúa sobre fibras simpáticas, liberando noradrenalina y prostaglandinas que amplifican la señal nociceptiva (Calixto *et al.*, 2000). Curiosamente, la bradicinina estimula también la liberación de TNF- α e IL-1 β por los macrófagos (Tiffany *et al.*, 1989). El NP031112 también inhibió la hiperalgesia inducida por este mediador inflamatorio. Esto significa que, de alguna manera, el compuesto puede inhibir la señalización desencadenada por la bradicinina, o de las sustancias liberadas por la estimulación con bradicinina como el TNF, IL-1 o PGE₂.

La adrenalina produce una hiperalgesia, principalmente por aumentar la respuesta de las fibras tipo C a estímulos sub-umbrales (Chen *et al.*, 2005) vía activación de receptores; este es

un efecto mediado tanto por la PKA como la PKC (Khasar *et al.*, 1999). La estimulación de los receptores beta-adrenérgicos también estimula la liberación de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y IL-6 en macrófagos (Tan *et al.*, 2007). El NP031112 no revirtió la hiperalgesia térmica y mecánica inducida por la adrenalina. Curiosamente, se ha descrito que la adrenalina puede inhibir la GSK-3 mediante la activación de la PKA (Jensen *et al.*, 2007). Es posible que el componente de la hiperalgesia generada en células “beta-sensibles” no responda a una inhibición adicional de GSK-3 β , una vez que ya están inhibidas.

La administración de PGE₂ intradérmica produce hiperalgesia mecánica y térmica en animales. El receptor VR1 es esencial para la hiperalgesia térmica; así, la sensibilización térmica inducida por inflamación no se desarrolla en ratones sin VR1 (Caterina *et al.*, 2000; Caterina *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000). La PGE₂ parece producir una hiperalgesia térmica al activar la vía PKA/AMPC, aumentando de esta manera la función del receptor de capsaicina (Lopshire *et al.*, 1997; Pitchford *et al.*, 1991). En la hiperalgesia mecánica parece ser que la PGE₂ no actúa directamente sino que actúa mediante la potenciación de los efectos de la bradicinina (Grubb *et al.*, 1991). El NP031112 inhibió la hiperalgesia mecánica pero no la hiperalgesia térmica inducida por PGE₂. Quizás esto se pueda explicar por la importancia que la bradicinina tiene en la hiperalgesia mecánica inducida por PGE₂, que ya está inhibida por el NP031112.

Esta bien establecido que la hiperalgesia persistente causada por una inyección intraplantar de CFA resulta en un dolor inflamatorio de larga duración que se desarrolla en horas, un efecto que está mediado por muchos mediadores como citocinas, glutamato, óxido nítrico, prostanoïdes, histamina, serotonina y agentes inmunológicos (Raghavendra *et al.*, 2004). Además, también implica la sensibilización inducida por la liberación de estos múltiples mediadores inflamatorios del dolor, que a su vez, colaboran a aumentar la sensibilidad periférica y central (Raghavendra *et al.*, 2004). La inyección i.pl. de CFA produce respuestas hiperalgésicas mecánicas y térmicas tanto en el lado ipsilateral como contralateral en las patas traseras, este dolor aparece a las pocas horas de su administración y persiste durante meses. Estos efectos se inician por la activación del nociceptor periféricamente, conjuntamente con la liberación de mediadores inflamatorios, como citocinas y prostanoïdes, llevando a una sensibilización de las vías nociceptivas centrales (Samad *et al.*, 2001); a ello se asocia una modificación en la actividad de neuronas en las laminas superficiales (I y II) y profundas (V y VI) del asta dorsal, que reciben entradas de estímulos nociceptivos (Chan *et al.*, 2000). En este trabajo se ha verificado que la administración del NP031112 también puede inhibir la alodinia inducida por CFA, lo que podría ser debido a una inhibición en la señalización de las citocinas

proinflamatorias liberadas por la inflamación inducida por CFA, hecho que se relaciona con los efectos analgésicos del NP031112 en los modelos de dolor inducido por TNF- α e IL-1 β .

Por último, hemos podido comprobar que la administración de NP031112 también inhibe la alodinia inducida por un agente inflamatorio y la compresión del nervio ciático. Se sabe que la ablación del gen que codifica el receptor TNFR1 reduce la alodinia mecánica inducida por la lesión en el nervio (Vogel *et al.*, 2006). De hecho, tras una compresión del nervio ciático existe un incremento de muchas citocinas como la TNF- α y la IL-1 β (Okamoto *et al.*, 2001). En este modelo de dolor también se ha descrito una migración de células inflamatorias que pueden invadir el ganglio espinal (Morin *et al.*, 2007). Una posible explicación para este fenómeno es que el NP031112 esté inhibiendo la transmisión glutamatérgica y la liberación de citocinas ocasionadas por la compresión del nervio. Otra posible explicación, que no excluye la primera hipótesis, es que la HO-1 inducida por la inhibición de la GSK-3 β (ver más adelante la discusión al respecto), disminuya la migración de células inflamatorias (Wagener *et al.*, 2003) y con ello la alodinia inducida por la citocinas liberadas.

El NP031112 indujo un efecto analgésico de larga duración en los modelos del ácido acético, CFA y compresión del nervio ciático. Es probable que el efecto analgésico se mantenga durante tanto tiempo debido a la síntesis de proteínas que puedan modular la vía nociceptiva. Recientemente, se ha demostrado que la inhibición de enzima GSK-3 β induce la translocación del factor Nrf2 hacia el núcleo y la transcripción de la enzima HO-1 (Salazar *et al.*, 2006). Con este objetivo se ha estudiado si la inducción de la HO-1 podría tener un efecto antinociceptivo y, con ello, podría explicar parte del efecto antinociceptivo de los inhibidores de GSK-3 β .

Los resultados de este trabajo demuestran que la sobreexpresión de la HO-1, mediante la activación del factor de transcripción Nrf2, en animales tratados con CoPP, puede modular la nocicepción. La inducción de la HO-1 por CoPP fue efectiva durante la segunda fase del test de la formalina, pero no en la primera fase. Estos resultados indican que la HO-1 puede modular principalmente la nocicepción de origen inflamatoria. Esto está de acuerdo con datos en la literatura que muestran que la HO-1 participa en la inflamación (Mohri *et al.*, 2006; Poss *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 2006; Yachie *et al.*, 1999). Dos de los hechos más significativos que indican que la HO-1 es importante en la inflamación, son que el ratón deficiente de HO-1 desarrolla una inflamación crónica que progresa con la edad (Poss *et al.*, 1997) y que el único caso publicado de un humano que tenía una actividad enzimática baja de la HO-1 murió de una síndrome inflamatorio (Yachie *et al.*, 1999). Esto, junto con el hecho que la expresión de la HO-1 está

aumentada en enfermedades inflamatorias (Mohri *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2006) podría significar que la HO-1 participa como un agente limitante de la inflamación.

El efecto antinociceptivo producido por la CoPP parece estar relacionado con la isoforma HO-1 de la enzima. Este hecho se sostiene en base a los siguientes hechos: (i) el tratamiento con CoPP 24 horas antes del test de la formalina i.p., aumentó cerca de 20 veces la expresión de la HO-1 en la pata, (ii) La SnPP, un inhibidor de la HO, inyectado 30 minutos antes del test previno el efecto antinociceptivo de la CoPP durante la segunda fase del test de la formalina; aunque la SnPP inhibe ambas isoformas de la HO, sólo parece modular la nocicepción cuando la HO-1 esta sobrepresada,. (iii) la SnPP, al menos a la dosis usada en este trabajo, no modificó la nocicepción *per se* en ninguna de las fases del test de formalina, lo que sugiere que la HO-2 constitutiva no ejerce efecto en la modulación periférica del dolor aquí descrita y (iv) recientemente se ha demostrado que la CoPP induce la expresión de HO-1, pero no de HO-2 (Parfenova *et al.*, 2005).

Existen estudios en la literatura que sugieren que la HO, actuando en la periferia, podría tener un efecto modulador de la nocicepción en ratas. La administración del grupo hemo, el sustrato de la HO, en la pata inhibe la hiperalgesia inducida por la IL-1 β ; sin embargo, cuando la inflamación fue ocasionada por PGE2, que no induce la HO-1, el efecto del grupo hemo no fue observado (Steiner *et al.*, 2001). Mas recientemente, se ha vuelto a sugerir, que la HO, actuando en la periferia tiene un efecto antinociceptivo por la vía CO-GMPc en el test de la formalina. En este caso, el efecto observado probablemente no era debido a la HO-1 ya que en dicho estudio no se utilizó ninguna manipulación para sobrepresar la HO-1. Por otra parte, la ZnPP, que también inhibe las dos isoformas de la HO, produce un efecto nociceptivo en el test de la formalina (Nascimento *et al.*, 2007). En esta tesis, se ha mostrado que el tratamiento de los animales con SnPP, localmente en la pata, revirtió el efecto de la sobrepresión de la HO-1 inducida por el tratamiento con la CoPP vía i.p., en el test de la formalina. Estos resultados refuerzan la idea que la HO-1 está actuando en la periferia inhibiendo la nocicepción. Además, se ha podido observar un aumento en el número de células positivas para HO-1 en los ratones control C57JBI/6J tratados con la CoPP en comparación con los animales no tratados. Estas células positivas para HO-1 tienen un aspecto alargado, se encuentran preferentemente en el tejido conjuntivo alrededor del tejido muscular y son compatibles con células inmunes infiltradas.

En un trabajo reciente, se ha demostrado que la CoPP aumenta la expresión de HO-1 mediante la activación del factor de transcripción Nrf2 (Shan *et al.*, 2006). En este estudio, hemos podido corroborar que la inducción de la HO-1 depende de Nrf2 en tanto en células HEK

como en ratones knockout para Nrf2. La administración de CoPP en animales knock-out para Nrf2 mostraron, aproximadamente, cinco veces menos inducción de HO-1 en comparación con los ratones control. Esta pérdida en la capacidad de inducción de HO-1 por el tratamiento con CoPP en el knock-out Nrf2 se correlacionó con la pérdida en el efecto antinociceptivo en la segunda fase inflamatoria del test de la formalina. Esto está relacionado con las observaciones que muestran que el Nrf2 protege frente a la inflamación en modelos animales, que los ratones knock-out Nrf2 son más susceptibles a una dosis letal de LPS o, que la producción de citocinas y quimiocinas inducidas por el LPS está aumentada en estos animales (Thimmulappa *et al.*, 2006).

En resumen, el NP031112 ha mostrado efecto antinociceptivo, antiinflamatorio, antihiperalgésico y antialodínico. El efecto antinociceptivo del NP031112 parece estar mediado por la inhibición de la señalización glutamatérgica tanto a nivel periférico, como en la médula espinal; en éste último caso, a través de la inhibición de los receptores NMDA, AMPA y kainato. También se ha evidenciado que inhibe la nocicepción inducida por la citocinas TNF- α e IL-1 β en la médula espinal. Además, el NP031112 actúa en la periferia inhibiendo la hiperalgnesia mecánica y térmica producidas por la activación de la PKC, bradicinina y la hiperalgnesia mecánica producida por la PGE₂, pero no la inducida por adrenalina. También se ha visto que la inducción de la HO-1 mediante la activación del factor de transcripción Nrf2 tiene un efecto antinociceptivo en ratones y que parte del efecto de los inhibidores de la GSK-3 β está mediado por esta vía antinociceptiva. Por tanto, las estrategias terapéuticas que impliquen la inducción de la HO-1 mediante la activación de Nrf2, la inhibición de GSK-3 β o la activación de los receptores PPAR- γ podrían ser consideradas nuevas dianas terapéuticas para la analgesia.

5.3. Propiedades antidepresivas de las TDZDs

En este trabajo hemos demostrado que las nuevas TDZDs NP031112 y NP031115 poseen efecto antidepresivo en ratones, empleando el test de la natación forzada (TNF). Estos resultados están de acuerdo con datos en la literatura que muestran que los inhibidores específicos de la GSK-3 β tienen efecto antidepresivo en el TNF (Gould *et al.*, 2004; Kaidanovich-Beilin *et al.*, 2004). De hecho, hemos podido constatar que el inhibidor de la GSK-3 β AR-A014418 produce un efecto antidepresivo en el TNF en ratones, un resultado similar al descrito anteriormente con este compuesto en ratas (Gould *et al.*, 2004). Los fármacos antidepresivos reducen la inmovilidad en el TNF, tanto en ratones como en ratas (Porsolt *et al.*, 1977). Existen varios estudios que han puesto de manifiesto que la eficacia de los fármacos antidepresivos en el TNF

se correlaciona con la de la clínica (Willner, 1984). El TNF tiene la desventaja de que pueden aparecer falsos positivos o negativos (Borsini *et al.*, 1988). Los fármacos que aumentan la actividad locomotora pueden dar falsos positivos en este test y los antidepresivos como el bupropión, nomifensina, y amineptina podrían ser rechazados porque aumentan la actividad locomotora (Porsolt *et al.*, 1977). Por tanto, es relevante que los inhibidores de GSK-3 β estudiados en esta tesis hayan reducido la locomoción en campo abierto, un efecto que está de acuerdo con el descrito sobre la locomoción espontánea y la hiperactividad motora inducida por anfetaminas en ratas tratadas con el inhibidor AR-A014418 (Gould *et al.*, 2004). Por ello, el efecto antidepresivo de las TDZDs no puede ser atribuido a un aumento de la locomoción. Se ha sugerido que este efecto, en particular sobre la locomoción, podría ser el responsable de las propiedades anti-maníacas de los inhibidores de la GSK-3 β , como es el caso del litio (Gould *et al.*, 2004).

La GSK-3 β es una enzima que fosforila y inhibe la glucógeno sintasa kinasa, y por consiguiente inhibe la síntesis de glucógeno (Grimes *et al.*, 2001). Hoy en día se cree que esta enzima posee, además, funciones importantes en la neurotransmisión, así como en la fisiopatología de muchas enfermedades cerebrales como el Alzheimer, isquemia, trastorno bipolar y depresión (Frame *et al.*, 2006; Gould *et al.*, 2005; Grimes *et al.*, 2001). Se cree que la GSK-3 β es una diana para la acción del litio, valproato, fluoxetina y agonistas 5-HT_{1A} (Chen *et al.*, 1999; De Sarno *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002a; Li *et al.*, 2004b). Además, mediante técnicas de microdialísis se ha podido determinar que esta enzima se inhibe por la administración *in vivo* de serotonina (Li *et al.*, 2004b). Si la acción de los antidepresivos dependiera exclusivamente de la inhibición de esta enzima, el diseño de nuevos fármacos que inhibieran selectivamente esta enzima evitaría los efectos secundarios derivados de la inhibición de mecanismos de señalización que están por encima de la GSK-3 β en las cascadas intracelulares.

Dado que las TDZDs también son agonistas PPAR- γ , se planteó la posibilidad de que el agonismo de estos receptores también pudiera contribuir a su efecto antidepresivo. Hasta ahora, no hay ningún trabajo que implique los receptores PPAR- γ en el efecto antidepresivo de ningún fármaco conocido. Sin embargo, en este trabajo, se ha observado que la activación de los receptores PPAR- γ produce un efecto antidepresivo en el TNF. La rosiglitazona, que es un potente agonista de los PPAR- γ produjo una disminución en el tiempo de inmovilidad en el TNF. El antagonista de los PPAR- γ GW9662 no mostró ningún efecto en el TNF o en el test del campo abierto, demostrando que el agonismo, pero no al antagonismo de estos receptores, puede modular la locomoción en el TNF. Se debe recordar que el efecto de la rosiglitazona no se puede

explicar por una alteración en la locomoción de los animales, ya que la administración de este fármaco no alteró este parámetro en los ratones.

Para confirmar que el efecto de la TDZDs estaba mediado, al menos en parte, por un agonismo PPAR- γ se estudió si el antagonista PPAR- γ GW9662 era capaz de revertir el efecto antidepresivo de estos fármacos en el TNF. De hecho, el efecto antidepresivo del NP031112, del NP031115 y de la rosiglitazona fue revertido por el GW9662, sugiriendo que los PPAR- γ podrían ser una nueva diana terapéutica antidepresiva. Aunque no haya ninguna evidencia de que los agonistas PPAR- γ puedan ejercer un efecto antidepresivo, se sabe que los agonistas activan la CAMKII y ERK1/2 (Gardner *et al.*, 2005; He *et al.*, 2006), que inhiben la GSK-3 β mediante la activación de la ruta PI3K-Akt (Koh *et al.*, 2005) y que el tratamiento crónico con estos fármacos posee efectos antiinflamatorio (Moraes *et al.*, 2006). La modulación del TNF por la activación de CAMKII y ERK1/2 ha sido demostrada recientemente (Almeida *et al.*, 2006) y la implicación de la inflamación en la depresión también ha sido demostrada (Elenkov *et al.*, 2005). Se sabe que ciertos fármacos antiinflamatorios son efectivos en la depresión (Muller *et al.*, 2006). Las alteraciones inflamatorias en individuos deprimidos incluyen un número aumentado de leucocitos y células fagocíticas, proteínas de fase aguda (*positive acute-phase proteins*, APPs) conjuntamente con un número reducido de APPs negativas, neopterin aumentada en el suero, PGE₂ y receptores IL-2, aumento en la liberación de citocinas proinflamatoria, como IL-1, IL-2 y IL-6 por macrófagos activados y IFN- γ por células T activadas (Schiepers *et al.*, 2005). Así pues, el agonismo de los receptores PPAR- γ podría modular otras dianas moleculares asociadas a la depresión, como la síntesis de proteínas neuroprotectoras que pueden ser relevantes para el tratamiento de la depresión.

En resumen, el NP031112, el NP031115 y la rosiglitazona tienen un efecto antidepresivo en la prueba de la natación forzada. El inhibidor específico de la GSK-3 β AR-A014418 también produce un efecto antidepresivo en ratones, lo que confirma datos previos en ratas. Los receptores PPAR- γ participan en el efecto antidepresivo del NP031112, NP031115 y de la rosiglitazona, indicando que la activación de estos receptores puede ser una nueva diana para el tratamiento de la depresión.

5.2. Efecto neuroprotector de la TDZDs

Como las TDZDs inhiben la GSK-3 β en el rango micromolar, surgió el planteamiento de si la protección observada con estos compuestos estaba mediada por la inhibición de la GSK-3 β , en rodajas de hipocampo sometidas a POG. Para contestar esta pregunta se estudiaron otros inhibidores de GSK-3 β con estructuras diferentes a la de las TDZDs, en el mismo modelo experimental. Así, en este estudio hemos visto que la inhibición de la GSK-3 β no es neuroprotectora en este modelo agudo de POG en rodajas de hipocampo y es probable que esto sea debido al corto tiempo de re-oxigenación al que están sometidas las rodajas. Sin embargo, otros trabajos realizados con inhibidores de la GSK-3 β *in vitro* e *in vivo* han encontrado efectos positivos de inhibidores de esta enzima frente a la POG (Kelly et al., 2004, Cimarosti et al., 2005, Pereira et al., 2005). La discrepancia de estos con los obtenidos en esta tesis pueden residir en el tiempo de exposición de los inhibidores de GSK-3 β ; tanto en el estudio *in vitro*, realizado en cultivos organotípicos de cerebros, como en *in vivo*, los fármacos se administraron durante varios días, mientras que en este trabajo estuvo presente solo durante 3 horas.

La GSK-3 β está surgiendo como un buen blanco terapéutico neuroprotector por las razones que comentaré a continuación. La GSK-3 β es una serina/treonina kinasa multifuncional que se encuentra en todas las células eucariotas; su denominación original se debió a su capacidad de fosforilar e inhibir la glucógeno sintasa, pero ahora ya se sabe que es una enzima capital en muchas vías de señalización celular. En mamíferos hay dos isoformas íntimamente relacionadas (GSK-3 α y GSK-3 β). La GSK-3 β se expresa intensamente en tejidos neuronales (Bhat et al., 2004). Existen muchas maneras por las cuales la GSK-3 β puede afectar la supervivencia neuronal y por ello se ha implicado en la fisiopatología de múltiples enfermedades del sistema nervioso central relacionadas con la neurodegeneración y la pérdida neuronal (Eldar-Finkelman, 2002). Los estudios realizados en líneas neuronales han demostrado que la sobreexpresión de dominantes negativos de GSK-3 β previene la apoptosis (Bhat et al., 2000) y la sobreexpresión de la enzima activa es suficiente para producir la muerte neuronal (Bhat et al., 2004). Además, los inhibidores específicos de la GSK-3 β reducen el área de infarto tras una isquemia cerebral focal (Kelly et al., 2004). Estos modelos *in vivo* demostraron también que la GSK-3 β participa en la supervivencia neuronal. Por ello, la inhibición de la GSK-3 β puede ser una posible diana para conseguir un efecto neuroprotector y, por consiguiente, para el tratamiento de enfermedades del SNC que cursan con una muerte neuronal. Por medio de los

datos aquí presentados, llegamos a la conclusión de que la inhibición de la GSK-3 β no protege en nuestro modelo de POG agudo y por lo tanto, el efecto de las TDZDs tampoco podría ser explicado por este mecanismo. Eso no excluye la posibilidad de que estos fármacos sean neuroprotectores frente a otros insultos como el péptido β -amiloide (Su et al., 2004), o la hiperfosforilación de la proteína TAU (Bhat et al., 2003). También podrían proteger frente la muerte neuronal tras una POG pero en periodos más retardados de la re-oxigenación, por un mecanismo dependiente de GSK-3 β .

El agonista PPAR- γ rosiglitazona protegió frente a la POG en nuestro modelo experimental y este efecto se revirtió por un antagonista PPAR- γ . Este resultado está de acuerdo con los trabajos que demuestran que el agonismo PPAR- γ es neuroprotector frente a la isquemia cerebral *in vivo* (Lin et al., 2006, Luo et al., 2006) y a la POG aguda (Wang et al., 2006). El hecho que el efecto de las TDZDs (NP00111 y NP031112) se reviertiera por el GW9662, sugiere que el efecto de las TDZDs puede estar mediado por un agonismo PPAR- γ y, que los agonistas de este receptor son neuroprotectores en este modelo experimental. Existen datos en la literatura que demuestran que las TDZDs son agonistas PPAR- γ (Luna-Medina et al., 2005, Luna-Medina et al., 2007). Además el NP00111 protege los cultivos neuronales, por un mecanismo PPAR- γ dependiente, frente la excitotoxicidad por glutamato, la administración de staurosporina o toxicidad producida por un medio de cultivo de astrocitos activados (Luna-Medina et al., 2005) y el NP031112 protege frente a la toxicidad *in vivo* del kainato (Luna-Medina et al., 2007).

Los PPAR- γ pertenecen a la familia de los receptores nucleares normalmente encontrados en el citoplasma. Es un receptor huérfano que forma dímeros con el receptor de ácido retinoico e induce la transcripción en el núcleo después de translocarse hasta él. Además hay un grupo de características de los ligandos PPAR- γ , que todavía no se conocen, que están relacionados con eventos no dependientes de transcripción; estos incluye la activación de CAMKII y ERK1/2 (Gardner et al., 2005). En este trabajo se ha demostrado que el efecto neuroprotector de las TDZDs, frente a la POG, puede revertirse por un inhibidor de la ERK1/2. De hecho, la incubación, durante 30 minutos, con NP00111 o rosiglitazona ocasionó un incremento de la ERK1/2 fosforilada. Este resultado está de acuerdo con la literatura, donde se describe que la ERK1/2 es fundamental en el proceso de preconditionamiento isquémico. Se cree que esta enzima es neuroprotectora debido a una acción en distintas dianas protectoras, una vez que puede controlar por fosforilación de factores de transcripción, mediadores intracelulares, proteínas del citoesqueleto u otras proteínas kinasas. Uno de los mecanismo más sorprendentes de la

neuroprotección inducida por ERK es que la ERK2 puede fosforilar directamente la caspasa 9 en la treonina125 y esto bloquea su acción activadora de la caspasa 3 (Hetman *et al.*, 2004).

Existe un número creciente de publicaciones que apuntan que el agonismo PPAR- γ pueden mitigar la muerte neuronal (Lin *et al.*, 2006, Lau *et al.*, 2006, Zhao *et al.*, 2006, Uryu *et al.*, 2002). De hecho, la troglitazona y la rosiglitazona protegen las células granulares cerebelares de la excitotoxicidad del glutamato, incluso cuando se administraron 2,5 h después del glutamato (Uryu *et al.*, 2002).

En resumen, el agonismo PPAR- γ de las TDZDs y de la rosiglitazona es neuroprotector frente a la lesión producida por POG en rodajas de hipocampo. Sin embargo, los inhibidores de GSK-3 β no protegieron de la muerte neuronal aguda inducida por POG. Aún cuando las TDZDs inhiben la GSK-3 β , este no parece ser el mecanismo implicado en la neuroprotección producida tras una POG aguda. La fosforilación de ERK1/2 es una de las vías de supervivencia responsables de la neuroprotección ejercida por las TDZDs.

5.4. Consideraciones finales

Aunque las TDZDs hayan sido desarrolladas, en un principio, con el objetivo de tratar la enfermedad de Alzheimer (Alonso, 2004), en este trabajo se ha visto que pueden tener un perfil terapéutico mucho más amplio y novedoso como son el dolor, la depresión y, posiblemente, en otras enfermedades donde haya muerte neuronal, como en la isquemia cerebral.

Es interesante que desde hace tiempo se haya hecho una asociación entre enfermedades mentales y dolor; las enfermedades mentales se han considerado antecedentes, consecuencias o comorbilidades del dolor crónico. Incluso se ha sugerido que el dolor crónico no específico es una manifestación “enmascarada” de la depresión. Los individuos con depresión que tienen una peor calidad de vida son los que tienen relatos de dolor crónico y el peor pronóstico para el tratamiento del dolor crónico son los que tienen antecedentes de depresión (Nicholas, 2007). Por tanto, las TDZDs pueden ser una alternativa terapéutica interesante en pacientes que cursen con dolor y depresión. Pues además de tratar el dolor, tratarían la depresión ya en su inicio, o incluso prevenirla en estos individuos. Además de estos dos efectos, la neuroprotección también es un factor positivo en el tratamiento antidepresivo ya que está bien establecido que existe una atrofia y pérdida neuronal, principalmente en el hipocampo, en pacientes con depresión (Lee *et al.*, 2002)

La neuropatía diabética es una manifestación dolorosa en pacientes que tienen diabetes como enfermedad primaria, lo que afecta aproximadamente a un 50% de los individuos enfermos; un 11 % de los cuales sienten dolor crónico (Argoff *et al.*, 2006). En estos casos, quizás, las TDZDs también podrían ser de utilidad ya que sus dos mecanismos de acción pueden contribuir al control de la diabetes (Henriksen *et al.*, 2006; Krentz *et al.*, 2005) y del dolor (como se ha descrito en este trabajo). Además, se ha descrito que los inhibidores de la GSK-3 β promueven la protección de la células β -pancreáticas (Mussmann *et al.*, 2007), lo que podría ofrecer un beneficio adicional en estos pacientes diabéticos.

Por las razones mencionadas anteriormente, las TDZDs constituyen un nuevo grupo de fármacos con un amplio abánico de posibilidades terapéuticas como son el tratamiento del dolor, de la depresión o enfermedades del SNC que cursan con muerte neuronal.

6. Conclusiones

- ◆ El NP031112 tiene efecto antinociceptivo, antialodínico, y antihiperalgésico.
- ◆ El efecto antinociceptivo del NP031112 parece estar mediado, fundamentalmente, por la inhibición de la GSK-3 β .
- ◆ El efecto antinociceptivo del NP031112 depende, al menos en parte, de una inhibición de la señalización del glutamato, vía NMDA y AMPA, así como de la señalización de las citocinas TNF- α e IL-1 β en la médula.
- ◆ La inducción periférica de la HO-1 por la CoPP o la inhibición de la GSK-3 β en ratones tiene efecto antinociceptivo en el test de la formalina.
- ◆ El efecto antinociceptivo de la CoPP o la inhibición de la GSK-3 β en el test de la formalina depende de la activación del factor de transcripción Nrf2.
- ◆ El NP031112 y el NP031115 poseen efecto antidepresivo en el modelo de la natación forzada en ratones
- ◆ Los efectos antidepresivos de los inhibidores de las TDZDs están también mediados por un agonismo PPAR- γ
- ◆ El NP031112 produce un efecto sinérgico con la fluoxetina en el test de la natación forzada
- ◆ Las TDZDs NP00111 y NP031112 y, el agonista PPAR- γ rosiglitazona protegieron frente a la POG en un modelo experimental en rodajas de hipocampo de ratas.
- ◆ Los inhibidores de la enzima GSK-3 β , litio y el AR-A14418, no ofrecieron protección frente la lesión ocasionada por POG en rodajas de hipocampo.
- ◆ El efecto neuroprotector de las TDZDs (NP00111 y NP031112), así como el de la rosiglitazona (agonista PPAR- γ) están mediados por un agonismo de los receptores PPAR- γ y la activación de ERK1/2

7. Referencias bibliográficas

- ADAMS, H.P., JR. (2001). Treatment of acute ischemic stroke: selecting the right treatment for the right patient. *Eur Neurol*, **45**, 61-6.
- AGHDAM, S.Y. & BARGER, S.W. (2007). Glycogen synthase kinase-3 in neurodegeneration and neuroprotection: lessons from lithium. *Curr Alzheimer Res*, **4**, 21-31.
- AKOPIAN, A.N., SIVILOTTI, L. & WOOD, J.N. (1996). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature*, **379**, 257-62.
- ALAM, J., KILLEEN, E., GONG, P., NAQUIN, R., HU, B., STEWART, D., INGELFINGER, J.R. & NATH, K.A. (2003). Heme activates the heme oxygenase-1 gene in renal epithelial cells by stabilizing Nrf2. *Am J Physiol Renal Physiol*, **284**, F743-52.
- ALEY, K.O., MESSING, R.O., MOCHLY-ROSEN, D. & LEVINE, J.D. (2000). Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. *J Neurosci*, **20**, 4680-5.
- ALMEIDA, R.C., SOUZA, D.G., SOLETTI, R.C., LOPEZ, M.G., RODRIGUES, A.L. & GABILAN, N.H. (2006). Involvement of PKA, MAPK/ERK and CaMKII, but not PKC in the acute antidepressant-like effect of memantine in mice. *Neurosci Lett*, **395**, 93-7.
- ALONSO, M., DORRONSORO, I., CASTRO, A., RODRIGUEZ-FRANCO, M. I., ABELLÁN, G., BOIANI, M., VERICAT, J. A., MARTINEZ, A. (2004). TDZDs: GSK-3b inhibitors as therapeutic agents for Alzheimer's disease and other tauopathies. In *XVIII International Symposium on Medicinal Chemistry*. pp. 337. Copenhagen, Denmark.
- AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION (2002). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV-TR*. Washington, D.C.
- ARGOFF, C.E., COLE, B.E., FISHBAIN, D.A. & IRVING, G.A. (2006). Diabetic peripheral neuropathic pain: clinical and quality-of-life issues. *Mayo Clin Proc*, **81**, S3-11.
- ARIAS, R.L., TASSE, J.R. & BOWLBY, M.R. (1999). Neuroprotective interaction effects of NMDA and AMPA receptor antagonists in an in vitro model of cerebral ischemia. *Brain Res*, **816**, 299-308.
- ARTIGAS, F., CELADA, P., LARUELLE, M. & ADELL, A. (2001). How does pindolol improve antidepressant action? *Trends Pharmacol Sci*, **22**, 224-8.
- ARTIGAS, F., ROMERO, L., DE MONTIGNY, C. & BLIER, P. (1996). Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends Neurosci*, **19**, 378-83.
- BALDESSARINI, R.J. (1996). Drugs and treatment of psychiatry disorders - depression and mania. In *Goodman & Gilman's the Pharmacological basis of therapeutics*. ed Limird, L.E., Hardman, J.G. pp. 431-459. New York: McGraw-Hill.
- BARBER, L.A. & VASKO, M.R. (1996). Activation of protein kinase C augments peptide release from rat sensory neurons. *J Neurochem*, **67**, 72-80.
- BEIRITH, A., SANTOS, A.R. & CALIXTO, J.B. (2002). Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res*, **924**, 219-28.
- BENVENISTI-ZAROM, L., CHEN-ROETLING, J. & REGAN, R.F. (2006). Inhibition of the ERK/MAP kinase pathway attenuates heme oxygenase-1 expression and heme-mediated neuronal injury. *Neurosci Lett*, **398**, 230-4.
- BERK, M., PLEIN, H., FERREIRA, D. & JERSKY, B. (2001). Blunted adenosine A_{2a} receptor function in platelets in patients with major depression. *Eur Neuropsychopharmacol*, **11**, 183-6.

- BERMAN, R.M., CAPPIELLO, A., ANAND, A., OREN, D.A., HENINGER, G.R., CHARNEY, D.S. & KRYSTAL, J.H. (2000). Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*, **47**, 351-4.
- BESSON, J.M. (1997). [The complexity of physiopharmacologic aspects of pain]. *Drugs*, **53 Suppl 2**, 1-9.
- BESSON, J.M. (1999). The neurobiology of pain. *Lancet*, **353**, 1610-5.
- BESSON, J.M. & CHAOUCH, A. (1987). Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev*, **67**, 67-186.
- BHAT, R.V., LEONOV, S., LUTHMAN, J., SCOTT, C.W. & LEE, C.M. (2002). Interactions between GSK3beta and caspase signalling pathways during NGF deprivation induced cell death. *J Alzheimers Dis*, **4**, 291-301.
- BHAT, R.V., SHANLEY, J., CORRELL, M.P., FIELES, W.E., KEITH, R.A., SCOTT, C.W. & LEE, C.M. (2000). Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11074-9.
- BICKLER, P.E. & FAHLMAN, C.S. (2004). Moderate increases in intracellular calcium activate neuroprotective signals in hippocampal neurons. *Neuroscience*, **127**, 673-83.
- BICKLER, P.E., ZHAN, X. & FAHLMAN, C.S. (2005). Isoflurane preconditions hippocampal neurons against oxygen-glucose deprivation: role of intracellular Ca²⁺ and mitogen-activated protein kinase signaling. *Anesthesiology*, **103**, 532-9.
- BORSINI, F. & MELI, A. (1988). Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)*, **94**, 147-60.
- BRAUN, S., HANSELMANN, C., GASSMANN, M.G., AUF DEM KELLER, U., BORN-BERCLAZ, C., CHAN, K., KAN, Y.W. & WERNER, S. (2002). Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol Cell Biol*, **22**, 5492-505.
- BREIDERT, T., CALLEBERT, J., HENEKA, M.T., LANDRETH, G., LAUNAY, J.M. & HIRSCH, E.C. (2002). Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem*, **82**, 615-24.
- BROCARDO, P.S., ASSINI, F., FRANCO, J.L., PANDOLFO, P., MULLER, Y.M., TAKAHASHI, R.N., DAFRE, A.L. & RODRIGUES, A.L. (2007). Zinc Attenuates Malathion-Induced Depressant-like Behavior and Confers Neuroprotection in the Rat Brain. *Toxicol Sci*, **97**, 140-8.
- BROWNLEES, J., IRVING, N.G., BRION, J.P., GIBB, B.J., WAGNER, U., WOODGETT, J. & MILLER, C.C. (1997). Tau phosphorylation in transgenic mice expressing glycogen synthase kinase-3beta transgenes. *Neuroreport*, **8**, 3251-5.
- CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J. & CAMPOS, M.M. (2000). Kinins in pain and inflammation. *Pain*, **87**, 1-5.
- CAMERON, H.A. & MCKAY, R. (1998). Stem cells and neurogenesis in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol*, **8**, 677-80.
- CAMPBELL, S., MARRIOTT, M., NAHMAS, C. & MACQUEEN, G.M. (2004). Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry*, **161**, 598-607.
- CASTAGNOLI, K., PALMER, S. & CASTAGNOLI, N., JR. (1999). Neuroprotection by (R)-deprenyl and 7-nitroindazole in the MPTP C57BL/6 mouse model of neurotoxicity. *Neurobiology (Bp)*, **7**, 135-49.
- CATERINA, M.J., LEFFLER, A., MALMBERG, A.B., MARTIN, W.J., TRAFTON, J., PETERSEN-ZEITZ, K.R., KOLTZENBURG, M., BASBAUM, A.I. & JULIUS, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, **288**, 306-13.
- CATERINA, M.J., ROSEN, T.A., TOMINAGA, M., BRAKE, A.J. & JULIUS, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, **398**, 436-41.

- CERVO, L. & SAMANIN, R. (1987). Potential antidepressant properties of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a selective serotonin_{1A} receptor agonist. *Eur J Pharmacol*, **144**, 223-9.
- CIMAROSTI, H., ZAMIN, L.L., FROZZA, R., NASSIF, M., HORN, A.P., TAVARES, A., NETTO, C.A. & SALBEGO, C. (2005). Estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3 β . *Neurochem Res*, **30**, 191-9.
- COGGESHALL, R.E. & CARLTON, S.M. (1997). Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain Res Brain Res Rev*, **24**, 28-66.
- COLLINO, M., ARAGNO, M., MASTROCOLA, R., GALLICCHIO, M., ROSA, A.C., DIANZANI, C., DANNI, O., THIEMERMANN, C. & FANTOZZI, R. (2006). Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR- γ agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol*, **530**, 70-80.
- CONCEPCION, M., MADDI, R., FRANCIS, D., ROCCO, A.G., MURRAY, E. & COVINO, B.G. (1984). Vasoconstrictors in spinal anesthesia with tetracaine--a comparison of epinephrine and phenylephrine. *Anesth Analg*, **63**, 134-8.
- CORDÁS, T.A. (2002). *Depressão: da bile negra aos neurotransmissores (uma introdução histórica)*. São Paulo: Lemos editorial.
- CRAIG, A., DOSTROVSKY, JO. (1999). Medulla to thalamus. In *Textbook of pain*. ed Wall, P., Melzack, R. pp. 1280. Londres: Churchill Livingstone.
- CROSS, S.A. (1994). Pathophysiology of pain. *Mayo Clin Proc*, **69**, 375-83.
- CUZZOCREA, S., CRISAFULLI, C., MAZZON, E., ESPOSITO, E., MUIA, C., ABDELRAHMAN, M., DI PAOLA, R. & THIEMERMANN, C. (2006a). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. *Br J Pharmacol*, **149**, 687-702.
- CUZZOCREA, S., MAZZON, E., DI PAOLA, R., MUIA, C., CRISAFULLI, C., DUGO, L., COLLIN, M., BRITTI, D., CAPUTI, A.P. & THIEMERMANN, C. (2006b). Glycogen synthase kinase-3 β inhibition attenuates the degree of arthritis caused by type II collagen in the mouse. *Clin Immunol*, **120**, 57-67.
- CHAN, C.F., SUN, W.Z., LIN, J.K. & LIN-SHIAU, S.Y. (2000). Activation of transcription factors of nuclear factor kappa B, activator protein-1 and octamer factors in hyperalgesia. *Eur J Pharmacol*, **402**, 61-8.
- CHARNEY, D.S. (1998). Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. *J Clin Psychiatry*, **59 Suppl 14**, 11-4.
- CHEN, G., BOWER, K.A., MA, C., FANG, S., THIELE, C.J. & LUO, J. (2004a). Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *Faseb J*, **18**, 1162-4.
- CHEN, G., HUANG, L.D., JIANG, Y.M. & MANJI, H.K. (1999). The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. *J Neurochem*, **72**, 1327-30.
- CHEN, P., GU, Z., LIU, W. & YAN, Z. (2007). Glycogen Synthase Kinase 3 Regulates NMDA Receptor Channel Trafficking and Function in Cortical Neurons. *Mol Pharmacol*.
- CHEN, X. & LEVINE, J.D. (2005). Epinephrine-induced excitation and sensitization of rat C-fiber nociceptors. *J Pain*, **6**, 439-46.
- CHEN, Y.W., HUANG, K.L., LIU, S.Y., TZENG, J.I., CHU, K.S., LIN, M.T. & WANG, J.J. (2004b). Intrathecal tri-cyclic antidepressants produce spinal anesthesia. *Pain*, **112**, 106-12.
- CHICHORRO, J.G., LORENZETTI, B.B. & ZAMPRONIO, A.R. (2004). Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. *Br J Pharmacol*, **141**, 1175-84.

- CHO, K.O., KIM, S.K., CHO, Y.J., SUNG, K.W. & KIM, S.Y. (2007). Regional differences in the neuroprotective effect of minocycline in a mouse model of global forebrain ischemia. *Life Sci*, **80**, 2030-5.
- CHOI, D.W. (1995). Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci*, **18**, 58-60.
- CHOI, D.W. (1996). Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol*, **6**, 667-72.
- CHRISTOPHE, M. & NICOLAS, S. (2006). Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. *Curr Pharm Des*, **12**, 739-57.
- D'AQUILA, P.S., COLLU, M., GESSA, G.L. & SERRA, G. (2000). The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur J Pharmacol*, **405**, 365-73.
- DA SILVA, G.D., MATTEUSSI, A.S., DOS SANTOS, A.R., CALIXTO, J.B. & RODRIGUES, A.L. (2000). Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. *Neuroreport*, **11**, 3699-702.
- DAVIES, S.S., PONTSLER, A.V., MARATHE, G.K., HARRISON, K.A., MURPHY, R.C., HINSHAW, J.C., PRESTWICH, G.D., HILAIRE, A.S., PRESCOTT, S.M., ZIMMERMAN, G.A. & MCINTYRE, T.M. (2001). Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and agonists. *J Biol Chem*, **276**, 16015-23.
- DAVIS, J.B., GRAY, J., GUNTHORPE, M.J., HATCHER, J.P., DAVEY, P.T., OVEREND, P., HARRIES, M.H., LATCHAM, J., CLAPHAM, C., ATKINSON, K., HUGHES, S.A., RANCE, K., GRAU, E., HARPER, A.J., PUGH, P.L., ROGERS, D.C., BINGHAM, S., RANDALL, A. & SHEARDOWN, S.A. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, **405**, 183-7.
- DE ALBA, J., CLAYTON, N.M., COLLINS, S.D., COLTHUP, P., CHESSELL, I. & KNOWLES, R.G. (2006). GW274150, a novel and highly selective inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), shows analgesic effects in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, **120**, 170-81.
- DE SARNO, P., LI, X. & JOPE, R.S. (2002). Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology*, **43**, 1158-64.
- DE VOS, P., LEFEBVRE, A.M., MILLER, S.G., GUERRE-MILLO, M., WONG, K., SALADIN, R., HAMANN, L.G., STAELS, B., BRIGGS, M.R. & AUWERX, J. (1996). Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest*, **98**, 1004-9.
- DENSON, D.D., BRIDENBAUGH, P.O., TURNER, P.A., PHERO, J.C. & RAJ, P.P. (1982). Neural blockade and pharmacokinetics following subarachnoid lidocaine in the rhesus monkey. I. Effects of epinephrine. *Anesth Analg*, **61**, 746-50.
- DENSON, D.D., TURNER, P.A., BRIDENBAUGH, P.O. & THOMPSON, G.A. (1984). Pharmacokinetics and neural blockade after subarachnoid lidocaine in the rhesus monkey. III. Effects of phenylephrine. *Anesth Analg*, **63**, 129-33.
- DICKENSON, A.H., MATTHEWS, E.A. & SUZUKI, R. (2002). Neurobiology of neuropathic pain: mode of action of anticonvulsants. *Eur J Pain*, **6 Suppl A**, 51-60.
- DIRNAGL, U., IADECOLA, C. & MOSKOWITZ, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, **22**, 391-7.
- DONOHUE, P.H., FAHLMAN, C.S., BICKLER, P.E., VEXLER, Z.S. & GREGORY, G.A. (2001). Neuroprotection and intracellular Ca²⁺ modulation with fructose-1,6-bisphosphate during in vitro hypoxia-ischemia involves phospholipase C-dependent signaling. *Brain Res*, **917**, 158-66.

- DRAVID, S.M. & MURRAY, T.F. (2003). Fluorescent detection of Ca²⁺-permeable AMPA/kainate receptor activation in murine neocortical neurons. *Neurosci Lett*, **351**, 145-8.
- DRAY, A. (1997). *Peripheral Mediators of Pain*. Berlin: Springer.
- DRAY, A., PATEL, I.A., PERKINS, M.N. & RUEFF, A. (1992). Bradykinin-induced activation of nociceptors: receptor and mechanistic studies on the neonatal rat spinal cord-tail preparation in vitro. *Br J Pharmacol*, **107**, 1129-34.
- DRAY, A., URBAN, L. & DICKENSON, A. (1994). Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol Sci*, **15**, 190-7.
- DREVETS, W.C. (2000). Neuroimaging studies of mood disorders. *Biol Psychiatry*, **48**, 813-29.
- DUMUIS, A., SEBEN, M., FAGNI, L., PREZEAU, L., MANZONI, O., CRAGOE, E.J., JR. & BOCKAERT, J. (1993). Stimulation by glutamate receptors of arachidonic acid release depends on the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in neuronal cells. *Mol Pharmacol*, **43**, 976-81.
- DURUKAN, A. & TATLISUMAK, T. (2007). Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*, **87**, 179-97.
- EBERT, D. & EBMEIER, K.P. (1996). The role of the cingulate gyrus in depression: from functional anatomy to neurochemistry. *Biol Psychiatry*, **39**, 1044-50.
- EBMEIER, K.P., DONAGHEY, C. & STEELE, J.D. (2006). Recent developments and current controversies in depression. *Lancet*, **367**, 153-67.
- ECKELI, A.L., DACH, F. & RODRIGUES, A.L. (2000). Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effects in mice. *Neuroreport*, **11**, 1839-43.
- EGEA, J., ROSA, A.O., CUADRADO, A., GARCÍA, A.G., LÓPEZ, M.G. (2007). Nicotinic receptor activation by epibatidine induces heme oxygenase-1 and protects chromaffin cells against oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*, **Postprint**, 10.1111/j.1471-4159.2007.04665.x.
- EL YACOUBI, M., LEDENT, C., PARMENTIER, M., BERTORELLI, R., ONGINI, E., COSTENTIN, J. & VAUGEOIS, J.M. (2001). Adenosine A_{2A} receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A_{2A} receptor knockout mice. *Br J Pharmacol*, **134**, 68-77.
- ELBIRT, K.K. & BONKOVSKY, H.L. (1999). Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc Assoc Am Physicians*, **111**, 438-47.
- ELENKOV, I.J., IEZZONI, D.G., DALY, A., HARRIS, A.G. & CHROUSOS, G.P. (2005). Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. *Neuroimmunomodulation*, **12**, 255-69.
- ELGUN, S. & KUMBASAR, H. (2000). Increased serum arginase activity in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **24**, 227-32.
- EMBI, N., RYLATT, D.B. & COHEN, P. (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*, **107**, 519-27.
- ENGELHARD, K., WERNER, C., EBERSPACHER, E., BACHL, M., BLOBNER, M., HILDT, E., HUTZLER, P. & KOCHS, E. (2003). The effect of the alpha 2-agonist dexmedetomidine and the N-methyl-D-aspartate antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesth Analg*, **96**, 524-31, table of contents.
- EROGLU, L. & CAGLAYAN, B. (1997). Anxiolytic and antidepressant properties of methylene blue in animal models. *Pharmacol Res*, **36**, 381-5.
- ESPEJO, E.F. & MINANO, F.J. (1999). Prefrontocortical dopamine depletion induces antidepressant-like effects in rats and alters the profile of desipramine during Porsolt's test. *Neuroscience*, **88**, 609-15.

- FACCI, L., STEVENS, D.A. & SKAPER, S.D. (2003). Glycogen synthase kinase-3 inhibitors protect central neurons against excitotoxicity. *Neuroreport*, **14**, 1467-70.
- FAHLMAN, C.S., BICKLER, P.E., SULLIVAN, B. & GREGORY, G.A. (2002). Activation of the neuroprotective ERK signaling pathway by fructose-1,6-bisphosphate during hypoxia involves intracellular Ca²⁺ and phospholipase C. *Brain Res*, **958**, 43-51.
- FAKATA, K.L. & COLE, B.E. (2007). Peripheral opioid antagonists: A therapeutic advance for optimizing opioid gastrointestinal tolerability. *J Fam Pract*, **56**, S1-S12.
- FAROOQUI, A.A., YANG, H.C., ROSENBERGER, T.A. & HORROCKS, L.A. (1997). Phospholipase A2 and its role in brain tissue. *J Neurochem*, **69**, 889-901.
- FEINSTEIN, D.L., GALEA, E., GAVRILYUK, V., BROSNAN, C.F., WHITACRE, C.C., DUMITRESCU-OZIMEK, L., LANDRETH, G.E., PERSHADSINGH, H.A., WEINBERG, G. & HENEKA, M.T. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*, **51**, 694-702.
- FERNANDEZ, A., HARO, J.M., CODONY, M., VILAGUT, G., MARTINEZ-ALONSO, M., AUTONELL, J., SALVADOR-CARULLA, L., AYUSO-MATEOS, J.L., FULLANA, M.A. & ALONSO, J. (2006). Treatment adequacy of anxiety and depressive disorders: primary versus specialised care in Spain. *J Affect Disord*, **96**, 9-20.
- FERREIRA, J., TRICHES, K.M., MEDEIROS, R. & CALIXTO, J.B. (2005). Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. *Pain*, **117**, 171-81.
- FIELDS, R.D. & STEVENS-GRAHAM, B. (2002). New insights into neuron-glia communication. *Science*, **298**, 556-62.
- FRAME, S. & ZHELEVA, D. (2006). Targeting glycogen synthase kinase-3 in insulin signalling. *Expert Opin Ther Targets*, **10**, 429-44.
- FUJITA, R. & UEDA, H. (2003a). Protein kinase C-mediated cell death mode switch induced by high glucose. *Cell Death Differ*, **10**, 1336-47.
- FUJITA, R. & UEDA, H. (2003b). Protein kinase C-mediated necrosis-apoptosis switch of cortical neurons by conditioned medium factors secreted under the serum-free stress. *Cell Death Differ*, **10**, 782-90.
- FUNDYTUS, M.E. (2001). Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. *CNS Drugs*, **15**, 29-58.
- GABILONDO, A.M., MEANA, J.J. & GARCIA-SEVILLA, J.A. (1995). Increased density of mu-opioid receptors in the postmortem brain of suicide victims. *Brain Res*, **682**, 245-50.
- GABRA, B.H. & SIROIS, P. (2004). Pathways for the bradykinin B1 receptor-mediated diabetic hyperalgesia in mice. *Inflamm Res*, **53**, 653-7.
- GAO, X., KIM, H.K., CHUNG, J.M. & CHUNG, K. (2007). Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. *Pain*.
- GARDNER, O.S., DEWAR, B.J. & GRAVES, L.M. (2005). Activation of mitogen-activated protein kinases by peroxisome proliferator-activated receptor ligands: an example of nongenomic signaling. *Mol Pharmacol*, **68**, 933-41.
- GAUDET, R.J., ALAM, I. & LEVINE, L. (1980). Accumulation of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism in gerbil brain during reperfusion after bilateral common carotid artery occlusion. *J Neurochem*, **35**, 653-8.
- GOLD, M.S. (1999). Tetrodotoxin-resistant Na⁺ currents and inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7645-9.
- GONZALEZ-ZULUETA, M., FELDMAN, A.B., KLESSE, L.J., KALB, R.G., DILLMAN, J.F., PARADA, L.F., DAWSON, T.M. & DAWSON, V.L. (2000). Requirement for nitric oxide activation of p21(ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 436-41.

- GOODENOUGH, S., CONRAD, S., SKUTELLA, T. & BEHL, C. (2004). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β protects against kainic acid-induced neurotoxicity in vivo. *Brain Res*, **1026**, 116-25.
- GOODWIN, F.K., JAMISON, K.R. (1990). *Maniac-depressive illness*. New York: Oxford University Press.
- GOTTRON, F.J., YING, H.S. & CHOI, D.W. (1997). Caspase inhibition selectively reduces the apoptotic component of oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal cell death. *Mol Cell Neurosci*, **9**, 159-69.
- GOULD, T.D., EINAT, H., BHAT, R. & MANJI, H.K. (2004). AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. *Int J Neuropsychopharmacol*, **7**, 387-90.
- GOULD, T.D. & MANJI, H.K. (2005). Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. *Neuropsychopharmacology*, **30**, 1223-37.
- GRIMES, C.A. & JOPE, R.S. (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog Neurobiol*, **65**, 391-426.
- GRUBB, B.D., BIRRELL, G.J., MCQUEEN, D.S. & IGGO, A. (1991). The role of PGE₂ in the sensitization of mechanoreceptors in normal and inflamed ankle joints of the rat. *Exp Brain Res*, **84**, 383-92.
- GUIRIMAND, F., LE BARS, D. (1996). Physiologie de la nociception. *Ann Fr Anesth Réanim*, 1048-1079.
- GUNTER, T.E., BUNTINAS, L., SPARAGNA, G., ELISEEV, R. & GUNTER, K. (2000). Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium*, **28**, 285-96.
- GUPTA, R.K., TILLER, J.W. & BURROWS, G.D. (2003). Dual action antidepressants and some important considerations. *Aust N Z J Psychiatry*, **37**, 190-5.
- GUYTON, A. (1992). *Tratado de fisiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- HACIMUFTUOGLU, A., HANDY, C.R., GOETTL, V.M., LIN, C.G., DANE, S. & STEPHENS, R.L., JR. (2006). Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. *Behav Brain Res*, **173**, 211-6.
- HALESTRAP, A.P. (2006). Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans*, **34**, 232-7.
- HALESTRAP, A.P., CLARKE, S.J. & JAVADOV, S.A. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*, **61**, 372-85.
- HAMA, H., HARA, C., YAMAGUCHI, K. & MIYAWAKI, A. (2004). PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron*, **41**, 405-15.
- HAMABE, W., FUJITA, R. & UEDA, H. (2003). Neuronal necrosis inhibition by insulin through protein kinase C activation. *J Pharmacol Exp Ther*, **307**, 205-12.
- HARKIN, A., CONNOR, T.J., WALSH, M., ST JOHN, N. & KELLY, J.P. (2003). Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Neuropharmacology*, **44**, 616-23.
- HARKIN, A.J., BRUCE, K.H., CRAFT, B. & PAUL, I.A. (1999). Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. *Eur J Pharmacol*, **372**, 207-13.
- HAYDON, P.G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 185-93.
- HE, G., SUNG, Y.M. & FISCHER, S.M. (2006). Troglitazone induction of COX-2 expression is dependent on ERK activation in keratinocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **74**, 193-7.

- HEIBERG, I.L., WEGENER, G. & ROSENBERG, R. (2002). Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. *Behav Brain Res*, **134**, 479-84.
- HENRIKSEN, E.J. & DOKKEN, B.B. (2006). Role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr Drug Targets*, **7**, 1435-41.
- HETMAN, M., CAVANAUGH, J.E., KIMELMAN, D. & XIA, Z. (2000). Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci*, **20**, 2567-74.
- HETMAN, M. & GOZDZ, A. (2004). Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur J Biochem*, **271**, 2050-5.
- HILL, R.G. (2001). Molecular basis for the perception of pain. *Neuroscientist*, **7**, 282-92.
- HONORE, P., WISMER, C.T., MIKUSA, J., ZHU, C.Z., ZHONG, C., GAUVIN, D.M., GOMTSYAN, A., EL KOUHEN, R., LEE, C.H., MARSH, K., SULLIVAN, J.P., FALTYNEK, C.R. & JARVIS, M.F. (2005). A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **314**, 410-21.
- HOSHI, M., TAKASHIMA, A., NOGUCHI, K., MURAYAMA, M., SATO, M., KONDO, S., SAITOH, Y., ISHIGURO, K., HOSHINO, T. & IMAHORI, K. (1996). Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2719-23.
- HOWE, J.R., WANG, J.Y. & YAKSH, T.L. (1983). Selective antagonism of the antinociceptive effect of intrathecally applied alpha adrenergic agonists by intrathecal prazosin and intrathecal yohimbine. *J Pharmacol Exp Ther*, **224**, 552-8.
- HUANG, H.C. & KLEIN, P.S. (2006). Multiple roles for glycogen synthase kinase-3 as a drug target in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets*, **7**, 1389-97.
- HUNSKAAR, S., FASMER, O.B. & HOLE, K. (1985). Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods*, **14**, 69-76.
- IKEDA, Y., UENO, A., NARABA, H. & OH-ISHI, S. (2001). Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Sci*, **69**, 2911-9.
- IMMKE, D.C. & GAVVA, N.R. (2006). The TRPV1 receptor and nociception. *Semin Cell Dev Biol*, **17**, 582-91.
- INESTROSA, N.C., GODOY, J.A., QUINTANILLA, R.A., KOENIG, C.S. & BRONFMAN, M. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in hippocampal neurons and its activation prevents beta-amyloid neurodegeneration: role of Wnt signaling. *Exp Cell Res*, **304**, 91-104.
- INOUE, A., IKOMA, K., MORIOKA, N., KUMAGAI, K., HASHIMOTO, T., HIDE, I. & NAKATA, Y. (1999). Interleukin-1beta induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system. *J Neurochem*, **73**, 2206-13.
- ISENBERG, K.E., ZORUMSKI, C.F. (2000). Electroconvulsive therapy. In *Kaplan and Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry*. ed Benjamin J. Sadock, V.A.S. pp. CD-ROM for windows. Philadelphia: Lippincott Williams and Williams.
- JAKAB, B., HELYES, Z., VARGA, A., BOLCSKEI, K., SZABO, A., SANDOR, K., ELEKES, K., BORZSEI, R., KESZTHELYI, D., PINTER, E., PETHO, G., NEMETH, J. & SZOLCSANYI, J. (2005). Pharmacological characterization of the TRPV1 receptor antagonist JYL1421 (SC0030) in vitro and in vivo in the rat. *Eur J Pharmacol*, **517**, 35-44.
- JAVADOV, S., HUANG, C., KIRSHENBAUM, L. & KARMAZYN, M. (2005). NHE-1 inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodelling in the rat. *J Mol Cell Cardiol*, **38**, 135-43.

- JENSEN, J., BRENNESVIK, E.O., LAI, Y.C. & SHEPHERD, P.R. (2007). GSK-3beta regulation in skeletal muscles by adrenaline and insulin: evidence that PKA and PKB regulate different pools of GSK-3. *Cell Signal*, **19**, 204-10.
- JI, X., LI, C., LU, Y., CHEN, Y. & GUO, L. (2007). Post-ischemic continuous administration of galantamine attenuates cognitive deficits and hippocampal neurons loss after transient global ischemia in gerbils. *Neurosci Lett*, **416**, 92-5.
- JULIUS, D. & BASBAUM, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, **413**, 203-10.
- KAIDANOVICH-BEILIN, O., MILMAN, A., WEIZMAN, A., PICK, C.G. & ELДАР-FINKELMAN, H. (2004). Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus. *Biol Psychiatry*, **55**, 781-4.
- KARMAZYN, M., SOSTARIC, J.V. & GAN, X.T. (2001). The myocardial Na⁺/H⁺ exchanger: a potential therapeutic target for the prevention of myocardial ischaemic and reperfusion injury and attenuation of postinfarction heart failure. *Drugs*, **61**, 375-89.
- KASTER, M.P., ROSA, A.O., ROSSO, M.M., GOULART, E.C., SANTOS, A.R. & RODRIGUES, A.L. (2004). Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A1 and A2A receptors. *Neurosci Lett*, **355**, 21-4.
- KASTER, M.P., ROSA, A.O., SANTOS, A.R. & RODRIGUES, A.L. (2005a). Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effects of adenosine in the forced swimming test. *Int J Neuropsychopharmacol*, **8**, 601-6.
- KASTER, M.P., SANTOS, A.R. & RODRIGUES, A.L. (2005b). Involvement of 5-HT1A receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Brain Res Bull*, **67**, 53-61.
- KAWADA, H., TAKIZAWA, S., TAKANASHI, T., MORITA, Y., FUJITA, J., FUKUDA, K., TAKAGI, S., OKANO, H., ANDO, K. & HOTTA, T. (2006). Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation*, **113**, 701-10.
- KELLY, S., CHENG, D., STEINBERG, G.K. & YENARI, M.A. (2005). Mild hypothermia decreases GSK3beta expression following global cerebral ischemia. *Neurocrit Care*, **2**, 212-7.
- KELLY, S., ZHAO, H., HUA SUN, G., CHENG, D., QIAO, Y., LUO, J., MARTIN, K., STEINBERG, G.K., HARRISON, S.D. & YENARI, M.A. (2004). Glycogen synthase kinase 3beta inhibitor Chir025 reduces neuronal death resulting from oxygen-glucose deprivation, glutamate excitotoxicity, and cerebral ischemia. *Exp Neurol*, **188**, 378-86.
- KHASAR, S.G., MCCARTER, G. & LEVINE, J.D. (1999). Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. *J Neurophysiol*, **81**, 1104-12.
- KIAEI, M., KIPIANI, K., CHEN, J., CALINGASAN, N.Y. & BEAL, M.F. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist extends survival in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*, **191**, 331-6.
- KIM, Y.S., ZHUANG, H., KOEHLER, R.C. & DORE, S. (2005). Distinct protective mechanisms of HO-1 and HO-2 against hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Free Radic Biol Med*, **38**, 85-92.
- KLIEWER, S.A., LENHARD, J.M., WILLSON, T.M., PATEL, I., MORRIS, D.C. & LEHMANN, J.M. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*, **83**, 813-9.
- KOH, S.H., JUNG, B., SONG, C.W., KIM, Y., KIM, Y.S. & KIM, S.H. (2005). 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2, a neuroprotectant or a neurotoxicant? *Toxicology*, **216**, 232-43.

- KRENTZ, A.J. & BAILEY, C.J. (2005). Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, **65**, 385-411.
- KROCZKA, B., BRANSKI, P., PALUCHA, A., PILC, A. & NOWAK, G. (2001). Antidepressant-like properties of zinc in rodent forced swim test. *Brain Res Bull*, **55**, 297-300.
- KUDOH, A., TAKAHIRA, Y., KATAGAI, H. & TAKAZAWA, T. (2002). Small-dose ketamine improves the postoperative state of depressed patients. *Anesth Analg*, **95**, 114-8, table of contents.
- KUMAR, A., MINTZ, J., BILKER, W. & GOTTLIEB, G. (2002). Autonomous neurobiological pathways to late-life major depressive disorder: clinical and pathophysiological implications. *Neuropsychopharmacology*, **26**, 229-36.
- KWOK, J.B., HALLUPP, M., LOY, C.T., CHAN, D.K., WOO, J., MELICK, G.D., BUCHANAN, D.D., SILBURN, P.A., HALLIDAY, G.M. & SCHOFIELD, P.R. (2005). GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, **58**, 829-39.
- LAPPIN, S.C., RANDALL, A.D., GUNTHORPE, M.J. & MORISSET, V. (2006). TRPV1 antagonist, SB-366791, inhibits glutamatergic synaptic transmission in rat spinal dorsal horn following peripheral inflammation. *Eur J Pharmacol*, **540**, 73-81.
- LE BARS, D., GOZARIU, M. & CADDEN, S.W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*, **53**, 597-652.
- LEE, A.L., OGLE, W.O. & SAPOLSKY, R.M. (2002). Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disord*, **4**, 117-28.
- LEE, I., KIM, H.K., KIM, J.H., CHUNG, K. & CHUNG, J.M. (2007). The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons. *Pain*.
- LENG, S., MIZUMURA, K., KODA, H. & KUMAZAWA, T. (1996). Excitation and sensitization of the heat response induced by a phorbol ester in canine visceral polymodal receptors studied in vitro. *Neurosci Lett*, **206**, 13-6.
- LEVINE, J., PANCHALINGAM, K., RAPOPORT, A., GERSHON, S., MCCLURE, R.J. & PETTEGREW, J.W. (2000). Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. *Biol Psychiatry*, **47**, 586-93.
- LI, X., BIJUR, G.N. & JOPE, R.S. (2002a). Glycogen synthase kinase-3beta, mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disord*, **4**, 137-44.
- LI, X. & CLARK, J.D. (2001a). Heme oxygenase inhibitors reduce formalin-induced Fos expression in mouse spinal cord tissue. *Neuroscience*, **105**, 949-56.
- LI, X. & CLARK, J.D. (2003). Heme oxygenase type 2 participates in the development of chronic inflammatory and neuropathic pain. *J Pain*, **4**, 101-7.
- LI, X. & CLARK, J.D. (2000). The role of heme oxygenase in neuropathic and incisional pain. *Anesth Analg*, **90**, 677-82.
- LI, X. & CLARK, J.D. (2002b). Spinal cord heme oxygenase participates in glutamate-induced pain-related behaviors. *Eur J Pharmacol*, **450**, 43-8.
- LI, X. & CLARK, J.D. (2001b). Spinal cord nitric oxide synthase and heme oxygenase limit morphine induced analgesia. *Brain Res Mol Brain Res*, **95**, 96-102.
- LI, X., LIGHTHALL, G., LIANG, D.Y. & CLARK, J.D. (2004a). Alterations in spinal cord gene expression after hindpaw formalin injection. *J Neurosci Res*, **78**, 533-41.
- LI, X., ZHU, W., ROH, M.S., FRIEDMAN, A.B., ROSBOROUGH, K. & JOPE, R.S. (2004b). In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain. *Neuropsychopharmacology*, **29**, 1426-31.
- LIANG, D., LI, X., LIGHTHALL, G. & CLARK, J.D. (2003). Heme oxygenase type 2 modulates behavioral and molecular changes during chronic exposure to morphine. *Neuroscience*, **121**, 999-1005.

- LIANG, H.W., XIA, Q. & BRUCE, I.C. (2005). Reactive oxygen species mediate the neuroprotection conferred by a mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opener during ischemia in the rat hippocampal slice. *Brain Res*, **1042**, 169-75.
- LIN, T.N., CHEUNG, W.M., WU, J.S., CHEN, J.J., LIN, H., CHEN, J.J., LIOU, J.Y., SHYUE, S.K. & WU, K.K. (2006). 15d-prostaglandin J2 protects brain from ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 481-7.
- LOPSHIRE, J.C. & NICOL, G.D. (1997). Activation and recovery of the PGE2-mediated sensitization of the capsaicin response in rat sensory neurons. *J Neurophysiol*, **78**, 3154-64.
- LORAM, L.C., FULLER, A., FICK, L.G., CARTMELL, T., POOLE, S. & MITCHELL, D. (2007). Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *J Pain*, **8**, 127-36.
- LORRIO, S., SOBRADO, M., ARIAS, E., RODA, J.M., GARCIA, A.G. & LOPEZ, M.G. (2007). Galantamine post-ischemia provides neuroprotection and memory recovery against transient global cerebral ischemia in gerbils. *J Pharmacol Exp Ther*.
- LUCAS, J.J., HERNANDEZ, F., GOMEZ-RAMOS, P., MORAN, M.A., HEN, R. & AVILA, J. (2001). Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J*, **20**, 27-39.
- LUNA-MEDINA, R., CORTES-CANTELI, M., ALONSO, M., SANTOS, A., MARTINEZ, A. & PEREZ-CASTILLO, A. (2005). Regulation of inflammatory response in neural cells in vitro by thiadiazolidinones derivatives through peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *J Biol Chem*, **280**, 21453-62.
- LUNA-MEDINA, R., CORTES-CANTELI, M., SANCHEZ-Galiano S., MORALES-GARCIA, J.A., MARTINEZ, A., SANTOS, A., & PEREZ-CASTILLO, A. (2007). NP031112, a thiadiazolidinone compound, prevents inflammation and neurodegeneration under excitotoxic conditions: Potential therapeutic role in brain disorders. *J Neurosci*, **27**, 5766-76.
- LUO, J., CHEN, H., KINTNER, D.B., SHULL, G.E. & SUN, D. (2006a). Inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 attenuates mitochondrial cytochrome C release in cortical neurons following in vitro ischemia. *Acta Neurochir Suppl*, **96**, 244-8.
- LUO, Y., YIN, W., SIGNORE, A.P., ZHANG, F., HONG, Z., WANG, S., GRAHAM, S.H. & CHEN, J. (2006b). Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *J Neurochem*, **97**, 435-48.
- LUTFY, K., CAI, S.X., WOODWARD, R.M. & WEBER, E. (1997). Antinociceptive effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. *Pain*, **70**, 31-40.
- MACGILLIVRAY, S., ARROLL, B., HATCHER, S., OGSTON, S., REID, I., SULLIVAN, F., WILLIAMS, B. & CROMBIE, I. (2003). Efficacy and tolerability of selective serotonin reuptake inhibitors compared with tricyclic antidepressants in depression treated in primary care: systematic review and meta-analysis. *Bmj*, **326**, 1014.
- MAES, M. (1995). Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **19**, 11-38.
- MAGAVI, S.S., LEAVITT, B.R. & MACKLIS, J.D. (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*, **405**, 951-5.
- MAGUE, S.D., PLIAKAS, A.M., TODTENKOPF, M.S., TOMASIEWICZ, H.C., ZHANG, Y., STEVENS, W.C., JR., JONES, R.M., PORTOGHESE, P.S. & CARLEZON, W.A., JR. (2003). Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **305**, 323-30.

- MALCON, C., ACHAVAL, M., KOMLOS, F., PARTATA, W., SAURESSIG, M., RAMIREZ, G. & SOUZA, D.O. (1997). GMP protects against quinolinic acid-induced loss of NADPH-diaphorase-positive cells in the rat striatum. *Neurosci Lett*, **225**, 145-8.
- MANJI, H.K., DREVETS, W.C. & CHARNEY, D.S. (2001). The cellular neurobiology of depression. *Nat Med*, **7**, 541-7.
- MANJI, H.K., QUIROZ, J.A., SPORN, J., PAYNE, J.L., DENICOFF, K., N, A.G., ZARATE, C.A., JR. & CHARNEY, D.S. (2003). Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. *Biol Psychiatry*, **53**, 707-42.
- MANN, J.J., MALONE, K.M., DIEHL, D.J., PEREL, J., COOPER, T.B. & MINTUN, M.A. (1996). Demonstration in vivo of reduced serotonin responsivity in the brain of untreated depressed patients. *Am J Psychiatry*, **153**, 174-82.
- MARINI, A.M., JIANG, X., WU, X., PAN, H., GUO, Z., MATTSON, M.P., BLONDEAU, N., NOVELLI, A. & LIPSKY, R.H. (2007). Preconditioning and neurotrophins: a model for brain adaptation to seizures, ischemia and other stressful stimuli. *Amino Acids*, **32**, 299-304.
- MARTINEZ, A., ALONSO, M., CASTRO, A., PEREZ, C. & MORENO, F.J. (2002a). First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) inhibitors: thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem*, **45**, 1292-9.
- MARTINEZ, A., CASTRO, A., DORRONSORO, I. & ALONSO, M. (2002b). Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation. *Med Res Rev*, **22**, 373-84.
- MATOS E SOUSA, F.G. (1999). Tratamento da depressão. *Rev Bras Psiq*, **21**, SI18-SI23.
- MATSUSHITA, K., KITAGAWA, K., MATSUYAMA, T., OHTSUKI, T., TAGUCHI, A., MANDAI, K., MABUCHI, T., YAGITA, Y., YANAGIHARA, T. & MATSUMOTO, M. (1996). Effect of systemic zinc administration on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus. *Brain Res*, **743**, 362-5.
- MAUBACH, K.A., RUPNIAK, N.M., KRAMER, M.S. & HILL, R.G. (1999). Novel strategies for pharmacotherapy of depression. *Curr Opin Chem Biol*, **3**, 481-8.
- MCMAHON, S., KOLTZENBURG, M (2005). Introduction to the fourth edition. In *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. ed Wall, P., Melzack, R. pp. 1280. Londres: Churchill Livingstone
- MEIJER, L., FLAJOLET, M. & GREENGARD, P. (2004). Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci*, **25**, 471-80.
- MELDRUM, B.S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*, **130**, 1007S-15S.
- MELENA, J., CHIDLOW, G. & OSBORNE, N.N. (2000). Blockade of voltage-sensitive Na(+) channels by the 5-HT(1A) receptor agonist 8-OH-DPAT: possible significance for neuroprotection. *Eur J Pharmacol*, **406**, 319-24.
- MERGENTHALER, P., DIRNAGL, U. & MEISEL, A. (2004). Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis*, **19**, 151-67.
- MILLAN, M.J. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, **66**, 355-474.
- MILLAN, M.J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, **57**, 1-164.
- MINOR, T.R., CHANG, W.C. & WINSLOW, J.L. (1994a). Stress and adenosine: I. Effect of methylxanthine and amphetamine stimulants on learned helplessness in rats. *Behav Neurosci*, **108**, 254-64.
- MINOR, T.R., WINSLOW, J.L. & CHANG, W.C. (1994b). Stress and adenosine: II. Adenosine analogs mimic the effect of inescapable shock on shuttle-escape performance in rats. *Behav Neurosci*, **108**, 265-76.

- MIZUMURA, K., KODA, H. & KUMAZAWA, T. (1997). Evidence that protein kinase C activation is involved in the excitatory and facilitatory effects of bradykinin on canine visceral nociceptors in vitro. *Neurosci Lett*, **237**, 29-32.
- MIZUMURA, K., KODA, H. & KUMAZAWA, T. (2000). Possible contribution of protein kinase C in the effects of histamine on the visceral nociceptor activities in vitro. *Neurosci Res*, **37**, 183-90.
- MOHRI, T., OGURA, H., KOH, T., FUJITA, K., SUMI, Y., YOSHIYA, K., MATSUSHIMA, A., HOSOTSUBO, H., KUWAGATA, Y., TANAKA, H., SHIMAZU, T. & SUGIMOTO, H. (2006). Enhanced expression of intracellular heme oxygenase-1 in deactivated monocytes from patients with severe systemic inflammatory response syndrome. *J Trauma*, **61**, 616-23; discussion 623.
- MOORE, P.K., BABBEDGE, R.C., WALLACE, P., GAFFEN, Z.A. & HART, S.L. (1993). 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br J Pharmacol*, **108**, 296-7.
- MORAES, L.A., PIQUERAS, L. & BISHOP-BAILEY, D. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther*, **110**, 371-85.
- MORIN, N., OWOLABI, S.A., HARTY, M.W., PAPA, E.F., TRACY, T.F., JR., SHAW, S.K., KIM, M. & SAAB, C.Y. (2007). Neutrophils invade lumbar dorsal root ganglia after chronic constriction injury of the sciatic nerve. *J Neuroimmunol*, **184**, 164-71.
- MOSER, P.C. & SANGER, D.J. (1999). 5-HT_{1A} receptor antagonists neither potentiate nor inhibit the effects of fluoxetine and biefloxatone in the forced swim test in rats. *Eur J Pharmacol*, **372**, 127-34.
- MULLER, N., SCHWARZ, M.J., DEHNING, S., DOUHE, A., CEROVECKI, A., GOLDSTEIN-MULLER, B., SPELLMANN, I., HETZEL, G., MAINO, K., KLEINDIENST, N., MOLLER, H.J., AROLT, V. & RIEDEL, M. (2006). The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Mol Psychiatry*, **11**, 680-4.
- MURAMATSU, Y., FURUICHI, Y., TOJO, N., MORIGUCHI, A., MAEMOTO, T., NAKADA, H., HINO, M. & MATSUOKA, N. (2007). Neuroprotective efficacy of FR901459, a novel derivative of cyclosporin A, in in vitro mitochondrial damage and in vivo transient cerebral ischemia models. *Brain Res*, **1149**, 181-90.
- MURRAY, C.J. & LOPEZ, A.D. (1997). Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, **349**, 1269-76.
- MUSSELMAN, D.L., EVANS, D.L. & NEMEROFF, C.B. (1998). The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. *Arch Gen Psychiatry*, **55**, 580-92.
- MUSSMANN, R., GEESE, M., HARDER, F., KEGEL, S., ANDAG, U., LOMOW, A., BURK, U., ONICHTCHOUK, D., DOHRMANN, C. & AUSTEN, M. (2007). Inhibition of GSK3 promotes replication and survival of pancreatic beta cells. *J Biol Chem*, **282**, 12030-7.
- NASCIMENTO, C.G. & BRANCO, L.G. (2007). Role of the peripheral heme oxygenase-carbon monoxide pathway on the nociceptive response of rats to the formalin test: evidence for a cGMP signaling pathway. *Eur J Pharmacol*, **556**, 55-61.
- NEMEROFF, C.B. & OWENS, M.J. (2002). Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci*, **5 Suppl**, 1068-70.
- NESTLER, E.J., TERWILLIGER, R.Z. & DUMAN, R.S. (1989). Chronic antidepressant administration alters the subcellular distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in rat frontal cortex. *J Neurochem*, **53**, 1644-7.
- NEUGEBAUER, V. (2002). Metabotropic glutamate receptors--important modulators of nociception and pain behavior. *Pain*, **98**, 1-8.

- NICHOLAS, M.K. (2007). Mental disorders in people with chronic pain: an international perspective. *Pain*, **129**, 231-2.
- O'COLLINS, V.E., MACLEOD, M.R., DONNAN, G.A., HORKY, L.L., VAN DER WERP, B.H. & HOWELLS, D.W. (2006). 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol*, **59**, 467-77.
- OKAMOTO, K., MARTIN, D.P., SCHMELZER, J.D., MITSUI, Y. & LOW, P.A. (2001). Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Exp Neurol*, **169**, 386-91.
- OLIVEIRA, A.C., BERTOLLO, C.M., ROCHA, L.T., NASCIMENTO, E.B., JR., COSTA, K.A. & COELHO, M.M. (2007). Antinociceptive and antiedematogenic activities of fenofibrate, an agonist of PPAR alpha, and pioglitazone, an agonist of PPAR gamma. *Eur J Pharmacol*, **561**, 194-201.
- OLMOS, G., DEGREGORIO-ROCASOLANO, N., PAZ REGALADO, M., GASULL, T., ASSUMPCIO BORONAT, M., TRULLAS, R., VILLARROEL, A., LERMA, J. & GARCIA-SEVILLA, J.A. (1999). Protection by imidazol(ine) drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. *Br J Pharmacol*, **127**, 1317-26.
- OROZCO, C., GARCIA-DE-DIEGO, A.M., ARIAS, E., HERNANDEZ-GUIJO, J.M., GARCIA, A.G., VILLARROYA, M. & LOPEZ, M.G. (2006). Depolarization preconditioning produces cytoprotection against veratridine-induced chromaffin cell death. *Eur J Pharmacol*, **553**, 28-38.
- OSBY, U., BRANDT, L., CORREIA, N., EKBOM, A. & SPAREN, P. (2001). Excess mortality in bipolar and unipolar disorder in Sweden. *Arch Gen Psychiatry*, **58**, 844-50.
- OZAWA, S., KAMIYA, H. & TSUZUKI, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*, **54**, 581-618.
- PAN, T., LI, X., XIE, W., JANKOVIC, J. & LE, W. (2005). Valproic acid-mediated Hsp70 induction and anti-apoptotic neuroprotection in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett*, **579**, 6716-20.
- PARFENOVA, H., CARRATU, P., TCHERANOVA, D., FEDINEC, A., POURCYROUS, M. & LEFFLER, C.W. (2005). Epileptic seizures cause extended postictal cerebral vascular dysfunction that is prevented by HO-1 overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **288**, H2843-50.
- PARK, S.W., YI, J.H., MIRANPURI, G., SATRIOTOMO, I., BOWEN, K., RESNICK, D.K. & VEMUGANTI, R. (2007). Thiazolidinedione class of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists prevents neuronal damage, motor dysfunction, myelin loss, neuropathic pain, and inflammation after spinal cord injury in adult rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **320**, 1002-12.
- PARKITNA, J.R., OBARA, I., WAWRZCZAK-BARGIELA, A., MAKUCH, W., PRZEWLOCKA, B. & PRZEWLOCKI, R. (2006). Effects of glycogen synthase kinase 3beta and cyclin-dependent kinase 5 inhibitors on morphine-induced analgesia and tolerance in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **319**, 832-9.
- PEREIRA, M.P., HURTADO, O., CARDENAS, A., ALONSO-ESCOLANO, D., BOSCA, L., VIVANCOS, J., NOMBELA, F., LEZA, J.C., LORENZO, P., LIZASOAIN, I. & MORO, M.A. (2005). The nonthiazolidinedione PPARgamma agonist L-796,449 is neuroprotective in experimental stroke. *J Neuropathol Exp Neurol*, **64**, 797-805.
- PETIT-DEMOULIERE, B., CHENU, F. & BOURIN, M. (2005). Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)*, **177**, 245-55.
- PETRIE, R.X., REID, I.C. & STEWART, C.A. (2000). The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder. A critical review. *Pharmacol Ther*, **87**, 11-25.
- PITCHFORD, S. & LEVINE, J.D. (1991). Prostaglandins sensitize nociceptors in cell culture. *Neurosci Lett*, **132**, 105-8.

- PLEUVRY, B.J. & LAURETTI, G.R. (1996). Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. *Pharmacol Ther*, **71**, 313-24.
- PORSOLT, R.D., BERTIN, A. & JALFRE, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, **229**, 327-36.
- POSS, K.D. & TONEGAWA, S. (1997). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10925-30.
- PRICE, L.H., CHARNEY, D.S., RUBIN, A.L. & HENINGER, G.R. (1986). Alpha 2-adrenergic receptor function in depression. The cortisol response to yohimbine. *Arch Gen Psychiatry*, **43**, 849-58.
- PROCHIANTZ, A. (2000). [Neurogenesis in the adult brain: hope for brain repair?]. *Bull Acad Natl Med*, **184**, 1181-9; discussion 1189-90.
- PROESCHOLDT, M., HEIMANN, A. & KEMPSKI, O. (2001). Neuroprotection of S(+) ketamine isomer in global forebrain ischemia. *Brain Res*, **904**, 245-51.
- RACLE, J.P., POY, J.Y., BENKHADRA, A., JOURDREN, L. & FOCKENIER, F. (1988). [Prolongation of spinal anesthesia with hyperbaric bupivacaine by adrenaline and clonidine in the elderly]. *Ann Fr Anesth Reanim*, **7**, 139-44.
- RAGHAVENDRA, V., TANGA, F.Y. & DELEO, J.A. (2004). Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur J Neurosci*, **20**, 467-73.
- RAJA, S., MEYER, RA, RINGKAMP, M, CAMPBELL, JN. (1999). Peripheral neural mechanisms of Pain nociception. In *Textbook of pain*. ed Wall PD, M.R. pp. 1280. New York: Churchill Livingstone.
- RAMI, H.K., THOMPSON, M., WYMAN, P., JERMAN, J.C., EGERTON, J., BROUGH, S., STEVENS, A.J., RANDALL, A.D., SMART, D., GUNTHORPE, M.J. & DAVIS, J.B. (2004). Discovery of small molecule antagonists of TRPV1. *Bioorg Med Chem Lett*, **14**, 3631-4.
- RAMPELLO, L., NICOLETTI, G. & RAFFAELE, R. (1991). Dopaminergic hypothesis for retarded depression: a symptom profile for predicting therapeutical responses. *Acta Psychiatr Scand*, **84**, 552-4.
- RANG, H.P. & RITCHIE, J.M. (1988). Depolarization of nonmyelinated fibers of the rat vagus nerve produced by activation of protein kinase C. *J Neurosci*, **8**, 2606-17.
- REDDY, S.V., MADERDRUT, J.L. & YAKSH, T.L. (1980). Spinal cord pharmacology of adrenergic agonist-mediated antinociception. *J Pharmacol Exp Ther*, **213**, 525-33.
- REDROBE, J.P. & BOURIN, M. (1997). Partial role of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors in the activity of antidepressants in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol*, **325**, 129-35.
- REDROBE, J.P., MACSWEENEY, C.P. & BOURIN, M. (1996). The role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in antidepressant drug actions in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol*, **318**, 213-20.
- REHNI, A.K. & SINGH, N. (2007). Role of phosphoinositide 3-kinase in ischemic postconditioning-induced attenuation of cerebral ischemia-evoked behavioral deficits in mice. *Pharmacol Rep*, **59**, 192-8.
- RESSLER, K.J. & NEMEROFF, C.B. (1999). Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Biol Psychiatry*, **46**, 1219-33.
- RESSLER, K.J. & NEMEROFF, C.B. (2000). Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress Anxiety*, **12 Suppl 1**, 2-19.
- RIBEIRO, R.A., VALE, M.L., THOMAZZI, S.M., PASCHOALATO, A.B., POOLE, S., FERREIRA, S.H. & CUNHA, F.Q. (2000). Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol*, **387**, 111-8.

- ROBERTSON, B., XU, X.J., HAO, J.X., WIESENFELD-HALLIN, Z., MHLANGA, J., GRANT, G. & KRISTENSSON, K. (1997). Interferon-gamma receptors in nociceptive pathways: role in neuropathic pain-related behaviour. *Neuroreport*, **8**, 1311-6.
- RODRIGUES, A.L., DA SILVA, G.L., MATEUSSI, A.S., FERNANDES, E.S., MIGUEL, O.G., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. & SANTOS, A.R. (2002). Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sci*, **70**, 1347-58.
- RODRIGUES, A.L., ROCHA, J.B., MELLO, C.F. & SOUZA, D.O. (1996). Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol Toxicol*, **79**, 150-6.
- ROGOZ, Z., MARGAS, W., SKUZA, G., SOLICH, J., KUSMIDER, M. & DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, M. (2002a). Effect of repeated treatment with reboxetine on the central alpha 1-adrenergic and dopaminergic receptors. *Pol J Pharmacol*, **54**, 593-603.
- ROGOZ, Z., WROBEL, A., DLABOGA, D., MAJ, J. & DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, M. (2002b). Effect of repeated treatment with mirtazapine on the central alpha1-adrenergic receptors. *J Physiol Pharmacol*, **53**, 105-16.
- ROH, M.S., EOM, T.Y., ZMIJEWSKA, A.A., DE SARNO, P., ROTH, K.A. & JOPE, R.S. (2005). Hypoxia activates glycogen synthase kinase-3 in mouse brain in vivo: protection by mood stabilizers and imipramine. *Biol Psychiatry*, **57**, 278-86.
- ROJO, A.I., SALINA, M., SALAZAR, M., TAKAHASHI, S., SUSKE, G., CALVO, V., DE SAGARRA, M.R. & CUADRADO, A. (2006). Regulation of heme oxygenase-1 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/PKC-zeta pathway and Sp1. *Free Radic Biol Med*, **41**, 247-61.
- ROKYTA, R., HOLECEK, V., PEKARKOVA, I., KREJCOVA, J., RACEK, J., TREFIL, L. & YAMAMOTOVA, A. (2003). Free radicals after painful stimulation are influenced by antioxidants and analgesics. *Neuro Endocrinol Lett*, **24**, 304-9.
- ROKYTA, R., STOPKA, P., HOLECEK, V., KRIKAVA, K. & PEKARKOVA, I. (2004). Direct measurement of free radicals in the brain cortex and the blood serum after nociceptive stimulation in rats. *Neuro Endocrinol Lett*, **25**, 252-6.
- ROSA, A.O., LIN, J., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R. & RODRIGUES, A.L. (2003). Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. *Behav Brain Res*, **144**, 87-93.
- ROSA, K.A., GADOTTI, V.M., ROSA, A.O., RODRIGUES, A.L., CALIXTO, J.B. & SANTOS, A.R. (2005). Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. *Neurosci Lett*, **381**, 185-8.
- RUDORFER, M.V. & POTTER, W.Z. (1989). Antidepressants. A comparative review of the clinical pharmacology and therapeutic use of the 'newer' versus the 'older' drugs. *Drugs*, **37**, 713-38.
- RYTER, S.W., ALAM, J. & CHOI, A.M. (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*, **86**, 583-650.
- SALAZAR, M., ROJO, A.I., VELASCO, D., DE SAGARRA, R.M. & CUADRADO, A. (2006). Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem*, **281**, 14841-51.
- SAMAD, T.A., MOORE, K.A., SAPIRSTEIN, A., BILLET, S., ALLCHORNE, A., POOLE, S., BONVENTRE, J.V. & WOOLF, C.J. (2001). Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*, **410**, 471-5.
- SANCHEZ, V., CAMARERO, J., ESTEBAN, B., PETER, M.J., GREEN, A.R. & COLADO, M.I. (2001). The mechanisms involved in the long-lasting neuroprotective effect of fluoxetine against

- MDMA ('ecstasy')-induced degeneration of 5-HT nerve endings in rat brain. *Br J Pharmacol*, **134**, 46-57.
- SANTOS, A.R., MIGUEL, O.G., YUNES, R.A. & CALIXTO, J.B. (1999). Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther*, **289**, 417-26.
- SATO, T., TAKENO, M., HONMA, K., YAMAUCHI, H., SAITO, Y., SASAKI, T., MORIKUBO, H., NAGASHIMA, Y., TAKAGI, S., YAMANAKA, K., KANEKO, T. & ISHIGATSUBO, Y. (2006). Heme oxygenase-1, a potential biomarker of chronic silicosis, attenuates silica-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, **174**, 906-14.
- SAWYNOK, J., ESSER, M.J. & REID, A.R. (2001). Antidepressants as analgesics: an overview of central and peripheral mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci*, **26**, 21-9.
- SCHABITZ, W.R. & FISHER, M. (2006). Perspectives on neuroprotective stroke therapy. *Biochem Soc Trans*, **34**, 1271-6.
- SCHAFERS, M., SVENSSON, C.I., SOMMER, C. & SORKIN, L.S. (2003). Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J Neurosci*, **23**, 2517-21.
- SCHEPELMANN, K., MESSLINGER, K. & SCHMIDT, R.F. (1993). The effects of phorbol ester on slowly conducting afferents of the cat's knee joint. *Exp Brain Res*, **92**, 391-8.
- SCHIEPERS, O.J., WICHERS, M.C. & MAES, M. (2005). Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **29**, 201-17.
- SCHMIDT, W.K. (2001). Alvimopan* (ADL 8-2698) is a novel peripheral opioid antagonist. *Am J Surg*, **182**, 27S-38S.
- SCHRAMM, N.L., MCDONALD, M.P. & LIMBIRD, L.E. (2001). The alpha(2a)-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety. *J Neurosci*, **21**, 4875-82.
- SCHREIBER, S., BLEICH, A. & PICK, C.G. (2002). Venlafaxine and mirtazapine: different mechanisms of antidepressant action, common opioid-mediated antinociceptive effects--a possible opioid involvement in severe depression? *J Mol Neurosci*, **18**, 143-9.
- SCHWARTZ-BLOOM, R.D. & SAH, R. (2001). gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia. *J Neurochem*, **77**, 353-71.
- SERPELL, M.G., MAKIN, A. , HARVEY, A. (1998). Acute pain physiology and pharmacological targets: The present and future. *Acute Pain*, **1**, 31-47.
- SESHADRI, S., BEISER, A., KELLY-HAYES, M., KASE, C.S., AU, R., KANNEL, W.B. & WOLF, P.A. (2006). The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study. *Stroke*, **37**, 345-50.
- SHAN, Y., LAMBRECHT, R.W., DONOHUE, S.E. & BONKOVSKY, H.L. (2006). Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. *Faseb J*, **20**, 2651-3.
- SHAN, Y., PEPE, J., LAMBRECHT, R.W. & BONKOVSKY, H.L. (2002). Mapping of the chick heme oxygenase-1 proximal promoter for responsiveness to metalloporphyrins. *Arch Biochem Biophys*, **399**, 159-66.
- SHELINE, Y.I., WANG, P.W., GADO, M.H., CSERNANSKY, J.G. & VANNIER, M.W. (1996). Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3908-13.
- SHIMIZU, S., KONISHI, A., KODAMA, T. & TSUJIMOTO, Y. (2000). BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3100-5.

- SHORS, T.J., MIESEGAES, G., BEYLIN, A., ZHAO, M., RYDEL, T. & GOULD, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, **410**, 372-6.
- SIESJO, B.K., KATSURA, K., MELLERGARD, P., EKHOLM, A., LUNDGREN, J. & SMITH, M.L. (1993). Ácidosis-related brain damage. *Prog Brain Res*, **96**, 23-48.
- SINGH, N., WEBB, R., ADAMS, R., EVANS, S.A., AL-MOSAWI, A., EVANS, M., ROBERTS, A.W. & THOMAS, A.W. (2005). The PPAR-gamma activator, Rosiglitazone, inhibits actin polymerisation in monocytes: involvement of Akt and intracellular calcium. *Biochem Biophys Res Commun*, **333**, 455-62.
- SKOLNICK, P. (1999). Antidepressants for the new millennium. *Eur J Pharmacol*, **375**, 31-40.
- SKOLNICK, P. (2002). Modulation of glutamate receptors: strategies for the development of novel antidepressants. *Amino Acids*, **23**, 153-9.
- SLEATH, B., WURST, K. & LOWERY, T. (2003). Drug information sources and antidepressant adherence. *Community Ment Health J*, **39**, 359-68.
- SMITH, J.C. & WHITTON, P.S. (2000). Nitric oxide modulates N-methyl-D-aspartate-evoked serotonin release in the raphe nuclei and frontal cortex of the freely moving rat. *Neurosci Lett*, **291**, 5-8.
- SMITH, S.E. & MELDRUM, B.S. (1995). Cerebroprotective effect of lamotrigine after focal ischemia in rats. *Stroke*, **26**, 117-21; discussion 121-2.
- SOARES, J.C. & MANN, J.J. (1997). The anatomy of mood disorders--review of structural neuroimaging studies. *Biol Psychiatry*, **41**, 86-106.
- SOLAROGLU, I., CAHILL, J., JADHAV, V. & ZHANG, J.H. (2006). A novel neuroprotectant granulocyte-colony stimulating factor. *Stroke*, **37**, 1123-8.
- SOUZA, A.L., MOREIRA, F.A., ALMEIDA, K.R., BERTOLLO, C.M., COSTA, K.A. & COELHO, M.M. (2002). In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. *Br J Pharmacol*, **135**, 239-47.
- SPIEGEL, R. (1996). *Psychopharmacology: an introduction*. Washington D.C.
- SRIVASTAVA, K.K., CABLE, E.E., DONOHUE, S.E. & BONKOVSKY, H.L. (1993). Molecular basis for heme-dependent induction of heme oxygenase in primary cultures of chick embryo hepatocytes. Demonstration of acquired refractoriness to heme. *Eur J Biochem*, **213**, 909-17.
- STANLEY, W.C., RECCHIA, F.A. & LOPASCHUK, G.D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, **85**, 1093-129.
- STEINER, A.A., BRANCO, L.G., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (2001). Role of the haeme oxygenase/carbon monoxide pathway in mechanical nociceptor hypersensitivity. *Br J Pharmacol*, **132**, 1673-82.
- SUGIOKA, R., SHIMIZU, S., FUNATSU, T., TAMAGAWA, H., SAWA, Y., KAWAKAMI, T. & TSUJIMOTO, Y. (2003). BH4-domain peptide from Bcl-xL exerts anti-apoptotic activity in vivo. *Oncogene*, **22**, 8432-40.
- SUN, J.H., YANG, B., DONNELLY, D.F., MA, C. & LAMOTTE, R.H. (2006). MCP-1 enhances excitability of nociceptive neurons in chronically compressed dorsal root ganglia. *J Neurophysiol*, **96**, 2189-99.
- SUZUKI, E., YAGI, G., NAKAKI, T., KANBA, S. & ASAI, M. (2001). Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *J Affect Disord*, **63**, 221-4.
- SZALLASI, A. & BLUMBERG, P.M. (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*, **51**, 159-212.
- TADANO, T., NAMIOKA, M., NAKAGAWASAI, O., TAN-NO, K., MATSUSHIMA, K., ENDO, Y. & KISARA, K. (1999). Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. *Life Sci*, **65**, 255-61.

- TAKEDA, M., TANIMOTO, T., KADOI, J., NASU, M., TAKAHASHI, M., KITAGAWA, J. & MATSUMOTO, S. (2007). Enhanced excitability of nociceptive trigeminal ganglion neurons by satellite glial cytokine following peripheral inflammation. *Pain*, **129**, 155-66.
- TAN, K.S., NACKLEY, A.G., SATTERFIELD, K., MAIXNER, W., DIATCHENKO, L. & FLOOD, P.M. (2007). Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms. *Cell Signal*, **19**, 251-60.
- TANDA, G., BASSAREO, V. & DI CHIARA, G. (1996). Mianserin markedly and selectively increases extracellular dopamine in the prefrontal cortex as compared to the nucleus accumbens of the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, **123**, 127-30.
- TANDA, G., CARBONI, E., FRAU, R. & DI CHIARA, G. (1994). Increase of extracellular dopamine in the prefrontal cortex: a trait of drugs with antidepressant potential? *Psychopharmacology (Berl)*, **115**, 285-8.
- TANIGUCHI, K., SHINJO, K., MIZUTANI, M., SHIMADA, K., ISHIKAWA, T., MENNITI, F.S. & NAGAHISA, A. (1997). Antinociceptive activity of CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit antagonist. *Br J Pharmacol*, **122**, 809-12.
- THIMMULAPPA, R.K., SCOLICK, C., TRAORE, K., YATES, M., TRUSH, M.A., LIBY, K.T., SPORN, M.B., YAMAMOTO, M., KENSLER, T.W. & BISWAL, S. (2006). Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide. *Biochem Biophys Res Commun*, **351**, 883-9.
- TIFFANY, C.W. & BURCH, R.M. (1989). Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett*, **247**, 189-92.
- TJØLSEN, A., HOLE, K. (1997). *Animal Models of Analgesia*. Berlin: Springer.
- TRULLAS, R. & SKOLNICK, P. (1990). Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol*, **185**, 1-10.
- TSUCHIYA, M., SAKAKIBARA, A. & YAMAMOTO, M. (2005). A tachykinin NK1 receptor antagonist attenuates the 4 beta-phorbol-12-myristate-13-acetate-induced nociceptive behaviour in the rat. *Eur J Pharmacol*, **507**, 29-34.
- TSUJIMOTO, Y. (2002). Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Biosci Rep*, **22**, 47-58.
- UEDA, H. & FUJITA, R. (2004). Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain. *Biol Pharm Bull*, **27**, 950-5.
- UEDA, M., OYAMA, T., KURASHI, Y., AKAIKE, A. & SATOH, M. (1995). Alpha 2-adrenoceptor-mediated inhibition of capsaicin-evoked release of glutamate from rat spinal dorsal horn slices. *Neurosci Lett*, **188**, 137-9.
- VAIDA, G.T., MOSS, P., CAPAN, L.M. & TURNDORF, H. (1986). Prolongation of lidocaine spinal anesthesia with phenylephrine. *Anesth Analg*, **65**, 781-5.
- VAN DAMME, J., CAYPHAS, S., VAN SNICK, J., CONINGS, R., PUT, W., LENAERTS, J.P., SIMPSON, R.J. & BILLIAU, A. (1987). Purification and characterization of human fibroblast-derived hybridoma growth factor identical to T-cell-derived B-cell stimulatory factor-2 (interleukin-6). *Eur J Biochem*, **168**, 543-50.
- VERRI, W.A., JR., CUNHA, T.M., PARADA, C.A., POOLE, S., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. (2006). Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther*, **112**, 116-38.
- VIDEBECH, P. & RAVNKILDE, B. (2004). Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry*, **161**, 1957-66.
- VIGGIANO, A., MONDA, M., VIGGIANO, A., VIGGIANO, D., VIGGIANO, E., CHIEFARI, M., AURILIO, C. & DE LUCA, B. (2005). Trigeminal pain transmission requires reactive oxygen species production. *Brain Res*, **1050**, 72-8.

- VINEGAR, R., TRUAX, J.F. & SELPH, J.L. (1976). Quantitative comparison of the analgesic and anti-inflammatory activities of aspirin, phenacetin and acetaminophen in rodents. *Eur J Pharmacol*, **37**, 23-30.
- VINES, A., CAHOON, S., GOLDBERG, I., SAXENA, U. & PILLARISSETTI, S. (2006). Novel anti-inflammatory role for glycogen synthase kinase-3beta in the inhibition of tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-1beta-induced inflammatory gene expression. *J Biol Chem*, **281**, 16985-90.
- VISSERS, K., HOFFMANN, V., GEENEN, F., BIERMANS, R. & MEERT, T. (2003). Is the second phase of the formalin test useful to predict activity in chronic constriction injury models? A pharmacological comparison in different species. *Pain Pract*, **3**, 298-309.
- VOGEL, C., STALLFORTH, S. & SOMMER, C. (2006). Altered pain behavior and regeneration after nerve injury in TNF receptor deficient mice. *J Peripher Nerv Syst*, **11**, 294-303.
- VOLKE, V., WEGENER, G., BOURIN, M. & VASAR, E. (2003). Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. *Behav Brain Res*, **140**, 141-7.
- VON KNORRING, L., PERRIS, C., ORELAND, L., EISEMANN, M., ERIKSSON, U. & PERRIS, H. (1984). Pain as a symptom in depressive disorders and its relationship to platelet monoamine oxidase activity. *J Neural Transm*, **60**, 1-9.
- WAGENER, F.A., VAN BEURDEN, H.E., VON DEN HOFF, J.W., ADEMA, G.J. & FIGDOR, C.G. (2003). The heme-heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing. *Blood*, **102**, 521-8.
- WAKSMAN, G., HAMEL, E., FOURNIE-ZALUSKI, M.C. & ROQUES, B.P. (1986). Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase "enkephalinase" and of mu and delta opioid receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 1523-7.
- WANG, Z.J., LI, G.M., TANG, W.L. & YIN, M. (2006). Neuroprotective effects of stearic acid against toxicity of oxygen/glucose deprivation or glutamate on rat cortical or hippocampal slices. *Acta Pharmacol Sin*, **27**, 145-50.
- WARLOW, C.P. (1998). Epidemiology of stroke. *Lancet*, **352 Suppl 3**, SIII1-4.
- WATKINS, L.R., MARTIN, D., ULRICH, P., TRACEY, K.J. & MAIER, S.F. (1997). Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Pain*, **71**, 225-35.
- WEGENER, G., VOLKE, V., HARVEY, B.H. & ROSENBERG, R. (2003). Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. *Brain Res*, **959**, 128-34.
- WEGENER, G., VOLKE, V. & ROSENBERG, R. (2000). Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. *Br J Pharmacol*, **130**, 575-80.
- WIECH, K., KIEFER, R.T., TOPFNER, S., PREISSEL, H., BRAUN, C., UNERTL, K., FLOR, H. & BIRBAUMER, N. (2004). A placebo-controlled randomized crossover trial of the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist, memantine, in patients with chronic phantom limb pain. *Anesth Analg*, **98**, 408-13, table of contents.
- WILLNER, P. (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, **83**, 1-16.
- WONG, M.L. & LICINIO, J. (2001). Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 343-51.
- WU, L., SHEN, F., LIN, L., ZHANG, X., BRUCE, I.C. & XIA, Q. (2006). The neuroprotection conferred by activating the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel is mediated by inhibiting the mitochondrial permeability transition pore. *Neurosci Lett*, **402**, 184-9.
- YACHIE, A., NIIDA, Y., WADA, T., IGARASHI, N., KANEDA, H., TOMA, T., OHTA, K., KASAHARA, Y. & KOIZUMI, S. (1999). Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest*, **103**, 129-35.

- YAKSH, T.L. (1999). Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. *Trends Pharmacol Sci*, **20**, 329-37.
- YILDIZ, F., ERDEN, B.F., ULAK, G., UTKAN, T. & GACAR, N. (2000). Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, **149**, 41-4.
- YOSHIMURA, M. & FURUE, H. (2006). Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *J Pharmacol Sci*, **101**, 107-17.
- YULUG, B., YILDIZ, A., GUZEL, O., KILIC, E., SCHABITZ, W.R. & KILIC, E. (2006a). Risperidone attenuates brain damage after focal cerebral ischemia in vivo. *Brain Res Bull*, **69**, 656-9.
- YULUG, B., YILDIZ, A., HUDAOGU, O., KILIC, E., CAM, E. & SCHABITZ, W.R. (2006b). Olanzapine attenuates brain damage after focal cerebral ischemia in vivo. *Brain Res Bull*, **71**, 296-300.
- ZEILHOFER, H.U. & BRUNE, K. (2006). Analgesic strategies beyond the inhibition of cyclooxygenases. *Trends Pharmacol Sci*, **27**, 467-74.
- ZHANG, J.M. & AN, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*, **45**, 27-37.
- ZHANG, J.M., LI, H., LIU, B. & BRULL, S.J. (2002). Acute topical application of tumor necrosis factor alpha evokes protein kinase A-dependent responses in rat sensory neurons. *J Neurophysiol*, **88**, 1387-92.
- ZHAO, X., OU, Z., GROTTA, J.C., WAXHAM, N. & ARONOWSKI, J. (2006). Peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) activation protects neurons from NMDA excitotoxicity. *Brain Res*, **1073-1074**, 460-9.
- ZHAO, Y., PATZER, A., GOHLKE, P., HERDEGEN, T. & CULMAN, J. (2005). The intracerebral application of the PPARgamma-ligand pioglitazone confers neuroprotection against focal ischaemia in the rat brain. *Eur J Neurosci*, **22**, 278-82.
- ZOMKOWSKI, A.D., HAMMES, L., LIN, J., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R. & RODRIGUES, A.L. (2002). Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *Neuroreport*, **13**, 387-91.
- ZOMKOWSKI, A.D., SANTOS, A.R. & RODRIGUES, A.L. (2005). Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Neurosci Lett*, **381**, 279-83.