

## EFFECTOS SOBRE LA ACTIVIDAD NOCICEPTIVA DE LA RATA DE UN PÉPTIDO NOOTRÓPICO SINTÉTICO<sup>1</sup>

MARÍA DEL PILAR SANTACRUZ<sup>2</sup>, RAÚL OYUELA-VARGAS,  
JOSÉ ARTURO BRIÑEZ-ORTA, SANDRA LUCÍA ECHEVERRY

y

LEONARDO LAREO

*Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia*

### ABSTRACT

Based on the analgesic effect of NMDA antagonist receptors, the nociceptive action of the peptide BLMP-101 is evaluated, agonist of NMDA, designed to boost learning/memory. 32 Wistar rats (male and female) were divided into four groups and were injected IP with different BLMP-101 doses (0.01 mg, 0.1 mg, and 0.5 mg) and a control group with physiological saline solution, during 11 days. Daily behavior of animals was registered 15 minutes after injection, and appearance of 26 nociceptive related variables was checked. Data was analyzed by mixed variance with  $\alpha < 0.05$ . No important alterations were found. Results suggest that the BLMP-101 peptide does not present nociceptive activity at levels and periodicity used in this study.

*Key Words:* Peptide, learning, learning in rats, perception of pain.

### RESUMEN

Conociendo la efectividad analgésica de los antagonistas de los receptores NMDA, se evaluó la posible actividad nociceptiva del péptido BLMP-101, agonista de los NMDA, diseñado para potenciar el aprendizaje/memoria. 32 ratas Wistar –hembras y machos–, se

*continúa*

<sup>1</sup> Investigación VA1814/2004 subvencionada por la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá-Colombia.

<sup>2</sup> Correspondencia: MARÍA DEL PILAR SANTACRUZ, Facultad de Psicología, Pontificia Universidad Javeriana Bogotá-Colombia. Correo electrónico: mpsanta@hotmail.com.

dividieron en 4 grupos y se inyectaron i.p.: BLMP-101 (0.01mg, 0.1mg y 0.5mg) y el control con solución salina, durante 11 días consecutivos. Después de 15 minutos de ser inyectadas se observaba diariamente, por un periodo de 15 minutos, si cada rata presentaba conductas nociceptivas espontáneas en 26 modalidades. Los datos se analizaron a través del análisis de varianza mixto con un  $\alpha < 0.05$ . No se encontraron alteraciones importantes. Los resultados sugieren descartar la actividad nociceptiva del BLMP-101 en estas dosis y cronicidad estudiada.

*Palabras clave:* péptido, aprendizaje, aprendizaje en ratas, percepción del dolor.

## INTRODUCCIÓN

El dolor es una experiencia subjetiva en la que intervienen diversos componentes sensoriales, afectivos y evaluativos: estos últimos se refieren a la magnitud de esta experiencia. El dolor sería, entonces, una interpretación subjetiva de los impulsos nerviosos causados por un estímulo que está lesionando al organismo; esta sensación se constituye como una experiencia vital para la supervivencia y la adaptación del individuo, por lo tanto para la preservación la especie.

El dolor es una experiencia subjetiva en la que intervienen diversos componentes sensoriales, afectivos y evaluativos: estos últimos se refieren a la magnitud de esta experiencia. El dolor sería, entonces, una interpretación subjetiva de los impulsos nerviosos causados por un estímulo que está lesionando al organismo; esta sensación se constituye como una experiencia vital para la supervivencia y la adaptación del individuo, por lo tanto para la preservación la especie.

El dolor, tanto en los humanos como en los animales, tiene muchos aspectos en común, por lo que los estudios con animales donde se emulan las condiciones clínicas del dolor, han ayudado enormemente a entender los procesos que subyacen esta experiencia. Los diversos conocimientos obtenidos a través de los estudios con modelos animales han contribuido a generar alternativas de tratamiento, control y prevención del dolor (Coderre, Grimes & Melzack, 1986; Hogan, 2002; Hough, Gordas & Carr, 2004;

Okon, 2007; Rodin & Kruger, 1984; Rozsa, Molinari, Greenspan & Kenshalo, 1985; Sluka & Westlund, 1993; Vos, Strassman & Maciewicz, 1994; Zimmermann, 1986). Mediante esta metodología se han establecido los efectos favorables o desfavorables de una droga o de un procedimiento, así se ha visto que los modelos animales ayudan considerablemente a prevenir el uso de sustancias inadecuadas o la exposición innecesaria de pacientes a algunos procedimientos nocivos. (Coderre, Grimes & Melzack, 1986; Vos, Strassman & Maciewicz, 1994).

Teniendo en cuenta la subjetividad del dolor y la similitud de esta experiencia en la mayoría de los seres dentro de la filogenia, los estudiosos del dolor han tratado de determinar parámetros comunes de evaluación, de ahí que numerosas investigaciones se hayan enfocado en el examen de las conductas asociadas al dolor, las que se catalogan como una serie de comportamientos con los que el animal comunica a su ambiente que está padeciendo una experiencia nociceptiva.

En consecuencia, dentro de los variados modelos animales que existen para el estudio del dolor, existen los que se basan en la producción controlada de dolor por medios químicos o mecánicos, precisando determinadas características de la estimulación nociceptiva, como intensidad, localización, frecuencia, duración y se evalúan las respuestas dadas a dicha estimulación. Generalmente se analizan la latencia de respuesta del retiro o de la huida de la estimulación progresiva que inflige el daño; dicha latencia tiene una

relación inversamente proporcional a la intensidad de la estimulación nociceptiva (Molony & Kent, 1997), también se presentan conductas de huida, saltos o ataque con el objetivo claro de disminuir las fuentes del dolor.

Existen diversos modelos para el estudio del dolor en animales, mediante los cuales se observa la actividad nociceptiva en condiciones controladas de laboratorio; los más usuales son:

1. El plato caliente. Se coloca al animal sobre un plato a temperatura ambiente, que se va calentando progresivamente.
2. El "Tail Flick" o retiro de la cola, en el que se expone la cola de la rata a una luz quemante.
3. La inserción de una aguja delgada en la piel de una extremidad.
4. El test de presión de la pata, de Randal y Selitto (1957). Este test consiste en que se presiona una extremidad entre una superficie plana y un puntero (Hogan, 2002).
5. La inmersión de una extremidad del animal en agua a diferentes temperaturas.
6. La caja de Hargreaves, que tiene una superficie de vidrio calentada a una temperatura que se aumenta progresivamente (Hogan, 2002).

En todos estos métodos se registra la presentación de una conducta, ya sea la latencia de retirada o de salto, lamerse una extremidad como manifestación de la sensación de dolor. Todos estos métodos se basan en la producción de dolor agudo mediante un estímulo nociceptivo específico.

Adicionalmente a estos existen otras formas de abordar el estudio del dolor en modelos animales; estos se centran en la observación de las conductas espontáneas que se generan por diferentes agentes químicos, para evaluar el dolor producido por sustancias o también para determinar el efecto analgésico de otras: por ejemplo, el

tiempo total de levantamiento de alguna parte de su cuerpo, la lamida y/o el mordisqueo de una extremidad son útiles para evaluar el ardor producido por la formalina (test de formalina) o por la aplicación de agentes irritantes, como los cristales de urato en ratas; en este caso para evaluar el dolor de gota (Sluka & Westlund, 1993); lamerse o arrastrar el abdomen, expandir el cuerpo, arquear el lomo, se utilizan para evaluar la inflamación de las vísceras o el dolor abdominal. En estos casos se registra la frecuencia de las conductas en una unidad de tiempo (Hogan, 2002). Estas conductas no se presentan en los animales que no están en la misma situación de prueba, y si se presentan, no ocurren con la misma magnitud, por esta razón en esta metodología es esencial el uso de animales controles.

La ausencia de comportamientos es, también, un indicador de experiencias dolorosas; por ejemplo, la conducta exploratoria, conducta típica en un ambiente novedoso se pierde en el sujeto cuando está expuesto a estímulos dolorosos; en su lugar se presentan aislamiento, inmovilidad y pelo erizado; se disminuyen el consumo de agua y de alimento (Gentile, 1997) y, como consecuencia, se disminuye el peso; además, se incrementa el acicalamiento o autoaseo y las interacciones sociales se reducen, es muy importante en los estudios de dolor evaluar la actividad en general, ya que la disminución de la actividad en general, es un índice significativo de dolor. De esta manera, la reducción de una conducta usual o la presencia de conductas no usuales sirven como indicadores de la autopercepción del dolor, siempre en comparación con los sujetos que no han recibido dicha estimulación nociceptiva.

La presencia de conductas estereotipadas, son un parámetro útil ya que reflejan un nivel bajo de bienestar que puede ser la expresión de una sensación nociceptiva. Para determinarlo es necesario realizar previamente una observación etológica de conductas anteriormente especificadas, cuya frecuencia se puede comparar a la exhibida bajo estimulación supuestamente dolorosa. La automutilación, por ejemplo, es un caso especial de conducta espontánea, con la que el

organismo puede llegar a arrancar con sus dientes los dedos o sus miembros delanteros o traseros, en un intento para disminuir las fuentes del dolor. Se ha dicho que puede ser una forma extrema de aseo o de respuesta al prurito, aunque se podría interpretar como que el animal no reconoce sus miembros como propios. Además, se han encontrado conductas tales como sacudidas de un miembro o de todo el cuerpo, vocalizaciones, chillidos, lamidos excesivos, observarse largamente el miembro afectado, movimientos de la cabeza y del cuerpo opuestos a la fuente de la estimulación nociceptiva, posturas o actividades locomotoras anormales o excesivas, como conductas causadas por un estímulo que causa dolor, Silverman (1978).

Dentro de las conductas espontáneas de dolor se incluyen el temblor en uno de los miembros o temblor generalizado, focalización de la atención hacia el lugar doloroso, contemplarse largamente una extremidad, vigilar la extremidad, rascarse, lamerse y peinarse excesivamente, exhibir autoaseo en la extremidad que le duele, lamerse el abdomen, expandir y arquear el lomo, o arrastrar el abdomen sobre el suelo, mover la cabeza o saltar alejándose de un estímulo.

Adicionalmente se encuentran paradigmas de investigación del dolor más complejos, estos involucran conductas de escape o de evitación aprendidas, o conductas que requieren que el animal discrimine y actúe diferencialmente entre estímulos nocivos e inocuos. Estos modelos, en los que es común observar la latencia de respuesta, se denominan de Operantes Condicionadas, dado que previamente las conductas que se observan se han colocado en situaciones de aprendizaje (Hogan, 2002).

Al aprendizaje y a la memoria le subyacen diferentes procesos neuronales que mediante mecanismos bioquímicos en las membranas, en los receptores y en otras estructuras neuronales, hacen que el organismo se afecte por la experiencia (Wolf, 1967; Martínez & Kesner, 1991; Alcaraz & Guzmán, 2001). Dentro de los numerosos mecanismos bioquímicos que apoyan el aprendi-

zaje y la memoria, se destacan los receptores del glutamato, los N-metil-D-aspartato (NMDA), los que se han visto como fundamentales para el desarrollo de la plasticidad neuronal. Corroborado con la alta densidad de dichos receptores en las estructuras relacionadas con el aprendizaje, principalmente en el hipocampo y en la amígdala; además se ha visto que su activación facilita la potenciación a largo plazo (PLP) en las células hipocampales (Tang, Shimizu, Dube, Rampon, Kerchner, Zhuo, Liu, & Tsien, 1999).

Se considera que la PLP hipocampal se desarrolla para facilitar el almacenamiento de la información como resultado de la experiencia (Bliss & Lomo, 1973; Kandel, Jessel & Schwartz, 2000; Newcomer & Kristal, 2001). Además de la PLP, se ha encontrado que un evento opuesto, la depresión a largo plazo (DLP), también obedece a la actividad de los receptores NMDA, y estos dos fenómenos se manifiestan en el aprendizaje y en la consolidación de ese aprendizaje. (Childers & Baudy, 2007; Hough, Goudas, & Carr, 2004; Okon, 2007)

En apoyo a lo anterior, se ha encontrado que el bloqueo de los receptores NMDA con antagonistas en la amígdala deteriora el aprendizaje espacial (Sutherland & cols., 1983), estos receptores se han relacionado con el miedo condicionado producido por el apareamiento repetido de un estímulo neutro con un estímulo aversivo, hasta, que el estímulo neutro logra generar conductas de miedo, como inmovilidad, vocalizaciones e hiperreactividad. Las drogas que bloquean los NMDA no permiten a los sujetos aprender de la misma forma que los sujetos control. Sin embargo, aunque las sustancias que aumentan la PLP mejoran el aprendizaje y la memoria, producen también, alteraciones sensoriales y conductuales, lo que indica que existe una gran cercanía entre la eficacia de la droga agonista de los NMDA y la toxicidad (Tsien & Ezzell, 2000).

Morris (2001) describe que los ratones transgénicos de Kerchner, Li y Zhuo (1999) poseían mayores subunidades NR2B de los receptores NMDA, y estos a su vez exhibían un

aprendizaje y una memoria superior, en comparación con otras cepas de ratones. Estos presentaban una prolongación sostenida y duradera de la Potenciación a Largo Plazo en dos regiones del cerebro anterior: la corteza cingulada y la corteza insular. Adicionalmente, aunque exhibían una respuesta normal al dolor agudo, presentaban exageradas respuestas bioquímicas y conductuales a la estimulación dolorosa crónica de igual forma que a la no dolorosa. Esto les permitió suponer que los receptores glutamérgicos NMDA del cerebro anterior tienen un papel crítico en el mantenimiento de dolor persistente; los antagonistas selectivos a la subunidad NR2B de los receptores NMDA son muy buenos analgésicos para el alivio del dolor crónico, pero no del dolor agudo. Numerosos estudios demuestran que la activación de los receptores N-metil-D-aspartato contribuyen al desarrollo del dolor crónico e intratable (Hough, Gordas & Carr, 2004) y esta relación se fortalece al encontrar que los antagonistas a los receptores NMDA son analgésicos potentes, la ketamina por ejemplo, es un antagonista de los NMDA y se ha utilizado con alta eficiencia en dolores tan fuertes como el dolor neuropático asociado con alta malignidad en los enfermos de cáncer (Okon, 2007).

Ha sido tema de numerosos estudios el papel de los receptores NMDA en la transmisión de la información nociceptiva. Jackson, Graff, Richardson y Hargreaves (1995) y Lawand, Willis y Westlund (1997) encontraron que la aplicación de inyecciones locales de Glutamato o de NMDA estimulaban la presentación de conductas nociceptivas en ratas, las que se disminuían por la administración de sustancias antagonistas a los receptores NMDA. Igualmente estos autores encontraron que las conductas de dolor causadas por la aplicación de formalina, se inhibieron rápidamente con inyecciones de antagonistas NMDA.

Estos estudios confirman que los receptores NMDA glutamatérgicos participan en la inducción y el mantenimiento de la hiperexcitabilidad neuronal causada por los estímulos nocivos, por lo que en la última década numerosos estudios se

han enfocado en identificar las subclases de receptores NMDA que están implicados en el dolor (Childers & Baudy, 2007; Davies & Lodge, 1987; Dickenson & Sullivan, 1987; Hough, Gordas & Carr, 2004; Jackson, Graff, Richardson & Hargreaves, 1995; Lawand, Willis & Westlund, 1997; Okon, 2007).

Basados en la evidencia científica respecto de la participación de los receptores, NMDA en la potenciación del aprendizaje y la memoria, el grupo de Bioquímica Computacional y Estructural y Bioinformática de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, diseñó un péptido agonista de los NMDA denominado "BLMP-101," para potenciar la memoria. La evaluación conductual inicial de los efectos de este péptido en la memoria la realizaron Oyuela, Lareo, Muñoz, Morales, Echeverri, Uribe, Santos y Acuña (2004), quienes encontraron que 1.0 mg/Kg del péptido BLMP-101 agonista del los receptores NMDA, administrado intraperitonealmente (i. p.) incrementaba la memoria espacial, evaluado en el laberinto de Morris, en ratas Wistar macho. En efecto, en este estudio preliminar, el análisis de los datos sugirió que el péptido diseñado -BLMP-101-, mejora los procesos de memoria espacial y aprendizaje en comparación a los grupos que se les administró antagonista MK-801 y solución salina. Esta mejoría se observó en el 50% de los sujetos.

Teniendo en cuenta estos resultados preliminares acerca de la posible efectividad del péptido agonista de los NMDA en la potenciación de la memoria y paralelamente enfatizando en la cadena ampliamente conocida de los NMDA y el dolor (Davies & Lodge, 1987; Dickenson & Sullivan, 1987) se examinó la posible actividad nociceptiva del péptido BLMP-101, agonista a los NMDA. Así, se seleccionaron tres dosis del péptido BLMP-101, 0.5 mg/kg, 0.1mg/kg y 0.01 mg/kg., las que se administraban durante 11 días consecutivos, para explorar una posible actividad nociceptiva en ratas hembras y machos. Se inició con dosis pequeñas para descartar progresivamente la posible actividad nociceptiva de este péptido agonista de los NMDA y estudiar con mayor seguridad los efectos de este péptido en el aprendizaje y la memoria.

La actividad nociceptiva se determinó a través del análisis de las conductas nociceptivas espontáneas de la rata, consignadas en un registro etológico en el que se incluyeron diversas conductas tomadas del etograma de Silverman (1978). Este registro de conducta espontáneas incluía conductas nociceptivas y de ansiedad, donde se consideraba la frecuencia de presentación de cada una de estas conductas, en una unidad de tiempo (en minutos).

## MÉTODO

### *Diseño*

Se utilizó un diseño experimental factorial, de medidas repetidas, con cuatro grupos, tres experimentales a los cuales se les aplicaba (i.p.) el péptido BLMP-101 en dosis de 0,5mg / kg, 0,1mg / kg y 0,01 mg / kg. y un grupo control al cual se le inyectaba (i.p.) solución salina, diariamente por once días consecutivos

### *Sujetos*

Se utilizaron 32 ratas Wistar, 16 machos y 16 hembras, de 2 y medio meses de edad, 4 machos y 4 hembras en cada grupo, provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Salud. Se mantuvieron a una temperatura ambiente promedio de  $24 \pm 3^\circ \text{C}$ , se distribuyeron en cajas individuales de policarbonato (29 x 25 x 20 cm.), con libre acceso a la comida y agua, en un ciclo invertido de luz/oscuridad 12 /12 horas, durante todo el estudio.

Para el mantenimiento y el manejo de los animales se tuvieron en cuenta las normas éticas establecidas por la Resolución N° 008430 del 4 de Octubre de 1993 del Ministerio de Salud.

### *Técnicas e Instrumentos.*

Se utilizaron cuatro cámaras de video *Sony Handycam* referencia 450 X (video 8) con vi-

sión nocturna; dos contadores de tiempo multifunción referencia 54035A *Lafayette* y una llave de respuesta *Lafayette*, referencia 58026.

### *Sustancias*

El péptido diseñado fue diluido en solución salina (0,9mg/ml). La síntesis del péptido BMPL-101 se realizó en la casa *Abgent* (San Diego, CA, USA), se utilizaron dosis de 0,01, 0,1 y 0,5mg / kg., en un volumen de 200 microlitros.

### *Etograma de actividad nociceptiva espontánea*

*Arrastrar el abdomen.* El sujeto coloca el abdomen en el suelo y lo mueve de un lugar a otro sin despegarlo del suelo.

*Temblor en un miembro.* El sujeto presenta pequeñas sacudidas en uno de sus miembros.

*Temblor generalizado.* El sujeto presenta pequeñas sacudidas en todo el cuerpo.

*Vigilar la extremidad.* El sujeto se mira y olfatea una de sus extremidades.

*Rascarse.* Con sus patas traseras el sujeto se frota reiteradamente alguna parte de su cuerpo.

*Autoaseo.* El sujeto limpia su cuerpo o su hocico, usando sus patas delanteras o lamiéndose.

*Lamer.* El sujeto con su lengua limpia sus patas traseras o delanteras reiteradamente y fro-tándose sus patas entre sí.

*Explorar.* Deambulación destinada al conocimiento de su ambiente físico.

*Erguidas.* Posición vertical con movimientos exploratorios de la cabeza hacia el entorno.

*Escudriñar.* El sujeto permanece en posición horizontal con movimientos exploratorios de la cabeza.

*Inmovilidad.* El sujeto permanece quieto en su jaula con los ojos semicerrados.

*Erizado.* El pelo del animal está vertical y tiene los ojos semicerrados.

*Beber.* El sujeto toma agua del bebedero.

*Comer.* El sujeto introduce los alimentos en su boca.

*Conductas estereotipadas.* Conductas extrañas que no tienen ningún objetivo claro

*Automutilar.* El sujeto se muerde sus miembros y se los arranca del cuerpo.

*Vocalizaciones o chillidos.* El sujeto abre la boca y emite sonidos agudos.

*Cavar.* Con sus patas delanteras hace un hueco en el piso.

*Saltar.* Levantamiento del cuerpo hacia delante y hacia arriba.

*Deambular.* Locomoción, moverse de un espacio a otro.

*Voltear.* Girar su cabeza y su cuerpo en la misma dirección hacia algún lado.

*Girar cabeza:* El sujeto voltea su cabeza hacia algún lado, manteniendo su cuerpo quieto sobre su eje.

*Roer.* Movimientos repetidos de la quijada.

*Atender.* Orientación visual de la cabeza y el cuerpo hacia un estímulo.

*Descansar.* Reposar con ojos abiertos y/ o cerrados, puede acompañarse de husmeo.

*Dormir.* Ojos cerrados y posición enroscada.

#### *Procedimiento*

Inicialmente se asignaron aleatoriamente las 32 ratas Wistar, 16 hembras y 16 machos a los

cuatro grupos; tres experimentales para las dosis de 0,5mg / kg, 0,1mg / kg y 0,01 mg / kg. del péptido BMPL-101 y para el control al cual se le inyectaba solución salina. Una vez constituidos los cuatro grupos con 4 hembras y 4 machos, se inyectaron diariamente vía intraperitoneal (i.p.) durante once (11) días consecutivos.

Inmediatamente después de cada inyección, se colocaba al sujeto en su caja de vivienda y pasados 15 minutos se iniciaba la observación. Esta se hacía registrando la presentación de las conductas especificadas en el etograma de conductas nociceptivas espontáneas durante 15 minutos en total, distribuidos en tres períodos de registro de 5 minutos cada uno, separados a su vez por intervalos de 5 minutos. Se contabilizaba la frecuencia de presentación de cada conducta durante 1 minuto hasta completar los cinco minutos.

#### RESULTADOS

Se contabilizó la frecuencia de presentación de las veintiséis conductas contenidas en el etograma, durante los once días consecutivos y se analizaron aquellas que ocurrieron con una probabilidad superior a 0.01, mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) Mixto de medidas repetidas, con una  $\alpha \leq 0,05$ .

Los grados de libertad del ANOVA a lo largo del tiempo, en el análisis intrasujeto, se corrigieron con el método de Greenhouse-Geisser porque no todas las conductas satisficieron el criterio de esfericidad.

De las conductas nociceptivas espontáneas incluidas en el etograma; el arrastrar el abdomen, el temblor de un miembro, el temblor generalizado, el vigilar una extremidad, la inmovilidad, el erizarse, el beber, las conductas estereotipadas, la automutilación, las vocalizaciones o chillidos y el atender tuvieron muy baja frecuencia de presentación en las 11 observaciones diarias, lo que no permitió realizar un análisis estadístico, se analizaron únicamente catorce conductas.

A continuación se presentarán las comparaciones entre los grupos experimentales y el control, las comparaciones entre hembras y machos y finalmente las comparaciones a lo largo del tiempo.

En la Tabla 1 se describe el valor  $F$  y la probabilidad asociada a cada comparación, entre las diferentes dosis y el control (por grupo), por género (hembras y machos) y la interacción (género y grupo).

TABLA 1

*Comparaciones en cada comportamiento entre los grupos experimentales y el control, entre hembras y machos y en la interacción; se presenta el valor  $F$  y la significancia*

Comportamiento	Comparaciones	$F$	$p$
Explorar	Grupo	0,682	0,572
	Sexo	0,282	0,600
	Grupo/Sexo	0,487	0,695
Erguirse	Grupo	0,441	0,726
	Sexo	2,694	0,114
	Grupo/Sexo	0,414	0,745
Cavar	Grupo	1,109	0,365
	Sexo	0,959	0,337
	Grupo/Sexo	0,123	0,946
Rascar	Grupo	1,966	0,146
	Sexo	0,070	0,794
	Grupo/Sexo	2,047	0,134
Voltear	Grupo	1,407	0,265
	Sexo	0,458	0,505
	Grupo/Sexo	0,186	0,905
Girar cabeza	Grupo	0,491	0,692
	Sexo	2,673	0,115
	Grupo/Sexo	1,073	0,379
Dormir	Grupo	1,449	0,253
	Sexo	0,366	0,551
	Grupo/Sexo	0,045	0,987
Descansar	Grupo	2,352	0,097
	Sexo	1,563	0,223
	Grupo/Sexo	1,734	0,187
Roer	Grupo	1,748	0,184
	Sexo	0,186	0,670
	Grupo/Sexo	0,075	0,973
Lamer	Grupo	1,118	0,362
	Sexo	1,588	0,220
	Grupo/Sexo	1,588	0,218
Aautoaseo	Grupo	1,632	0,208
	Sexo	0,109	0,744
	Grupo/Sexo	0,637	0,599
Deambular	Grupo	0,055	0,983
	Sexo	2,023	0,168
	Grupo/Sexo	0,392	0,760

No se encontraron diferencias significativas en el dormir, descansar, roer, cavar, deambular, exploración, erguidas, rascarse, voltear, girar cabeza, lamer y autoaseo en ninguna de las comparaciones realizadas.

En la Tabla 2 se muestran las conductas con diferencias significativas:

TABLA 2

*Frecuencia de Atender, en hembras y machos de los diferentes grupos del estudio*

Comportamiento de atender		$\bar{X}$	DT
Grupo control	Hembras	0,750	0,159
	Machos	0,806	0,159
	Total	0,778	0,113
Péptido 0.01	Hembras	0,583	0,159
	Machos	1,111	0,159
	Total	0,847	0,113
Péptido 0.1	Hembras	0,833	0,159
	Machos	0,472	0,159
	Total	0,653	0,113
Péptido 0.5	Hembras	0,917	0,159
	Machos	0,417	0,159
	Total	0,667	0,113
Total	Hembras	0,771	0,080
	Machos	0,701	0,080
		<i>F</i>	<i>p</i>
Comparaciones	Grupo	0,678	0,574
	Sexo	0,380	0,544
	Grupo/Sexo	4,218	0,016 *

Se encontró una interacción significativa ( $F=4,218, p<0,05$ ) entre el genero y los grupos, los machos tratados con la dosis menor mostraron un incremento significativo de atender y en las otras dosis, exhiben significativamente menos atención que las hembras. En las hembras ocurre lo contrario, las del grupo de menor dosis del péptido presentaron una disminución importante del atender y en los de mayor dosis las hembras atendieron más como se representa en la Tabla 3 y las Figuras 1 y 2.

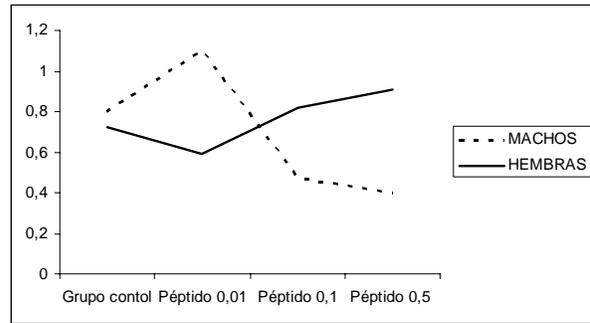


Figura 1. Comportamiento de atender en las hembras y machos de cada uno de los grupos.

TABLA 3

*Media y error típico de saltar, comparaciones entre los diferentes grupos del estudio y valor F y significancia*

Comportamiento saltar		$\bar{X}$	DT
Grupo control	Hembras	0,139	0,067
	Machos	0,167	0,067
	Total	0,153	0,047
Péptido 0.01	Hembras	8,333E-02	0,067
	Machos	0,194	0,067
	Total	0,139	0,047
Péptido 0.1	Hembras	2,778E-02	0,067
	Machos	0,278	0,067
	Total	0,153	0,047
Péptido 0.5	Hembras	2,778E-02	0,067
	Machos	0,139	0,067
	Total	8,333E-02	0,047
		<i>F</i>	<i>p</i>
Comparaciones	Grupo	0,493	0,691
	Sexo	7,043	0,014*
	Grupo/Sexo	0,957	0,429

\* Las hembras de todos los grupos presentaron significativamente mayor frecuencia de salto en comparación a los machos ( $F = 7.043, p = 0.014$ ).

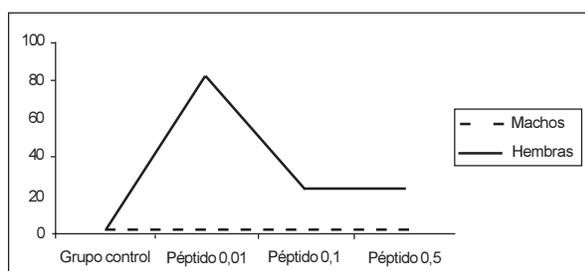


Figura 2. Mediadle comportamiento escudriñar en hembras y machos de los diferentes grupos del estudio. Las hembras escudriñaron significativamente más que los machos ( $F=4.57$ ,  $p= 0.04$ ).

Por último, se presentan las conductas que variaron significativamente a través de los once días consecutivos del estudio (véase Tabla 4).

TABLA 4

Anova mixto de medidas repetidas de los diferentes comportamientos a lo largo de 11 días de administración de BLMP-101 a los GE's y solución salina al GC, ( $N = 32$ )

A lo largo del tiempo (intra)			
Comportamiento	F	p	Variación comportamiento*
Erguirse	12.32	0.000***	-
Explorar	21.34	0.000***	-
Saltar	3.70	0.009**	-
Deambular	5.68	0.000***	-
Autoaseo	3.75	0.002**	-
Rascarse	11.08	0.000***	-
Voltear	3.33	0.037*	-
Escudriñar	7.42	0.000***	-
Descansar	6.27	0.000***	+
Dormir	13.56	0.000***	+

\* Variación comportamiento, significa si la conducta observada disminuyó (-) o aumentó (+), durante los 11 días de observación.

La frecuencia de emisión de las conductas del los sujetos durante el tiempo del estudio, varió significativamente, únicamente se incrementaron el dormir y el descansar, las demás se disminuyeron.

## DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, no se encontraron efectos nociceptivos evidentes del péptido BLMP-10 como consecuencia de ninguna de las dosis administradas de 0,01, 0,1 y 0,5  $\mu\text{g} / \text{kg}$ ., ni en las ratas hembras ni en las macho, ni en la administración aguda (una sola vez) ni en la administración crónica por once días consecutivos.

Para evaluar los efectos nociceptivos este estudio se enfocó en la actividad nociceptiva espontánea de la rata, donde se incluían una amplia gama de conductas, de dos grandes categorías: las que eran índice de nocicepción, como arrastrar el abdomen, erizarse, observarse durante mucho tiempo una extremidad, lamerse repetidamente alguna parte de su cuerpo y las conductas estereotipadas sumadas a la disminución de la comida y la bebida por citar algunas. Y las que pueden expresar ansiedad si las exhiben con una alta frecuencia, como deambular, saltar, explorar, escudriñar, autoaseo, voltear y las erguidas, entre otras.

Se incluyeron todas estas conductas porque una evaluación completa de la actividad nociceptiva de una sustancia, debe contener numerosos factores que están incluidos en el dolor. El dolor comprende dimensiones sensoriales, afectivas y evaluativas (estas últimas se relacionan con la intensidad del dolor). Las dimensiones sensoriales tienen que ver básicamente con las características específicas del dolor, como quemante, punzadas, etc. que, mediante modelos animales, es difícil discriminar, porque hasta el momento no se han determinado parámetros inconfundibles que permitan distinguir las características sensoriales del dolor que está padeciendo el sujeto experimental; solo se puede apreciar la presencia del dolor y en algunos casos la intensidad del dolor, teniendo en cuenta la duración de las conductas nociceptivas, como arrastrar el abdomen, o la magnitud del estiramiento (como en el test de la formalina) o el erizarse, frecuencia de lamido de pata sumado a la disminución de la actividad.

Las conductas de ansiedad tienen que ver con la dimensión afectiva o emocional del dolor (Melzack & Torgeson, 1971); estas conductas aisladas no son buenos indicadores de dolor pero, si se analizan concomitantemente con la presencia de otras conductas nociceptivas, se puede evaluar en modelos animales la dimensión emocional del dolor. De esta forma, basándose en los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede descartar la actividad nociceptiva del péptido BMPL-101 en las dosis de 0,01, 0,1 y 0,5  $\mu\text{g} / \text{kg}$ . aplicado durante 11 días consecutivos.

El incremento importante de la conducta de atender causado por el péptido BMPL-101 en dosis de 0,01  $\mu\text{g} / \text{kg}$ ., en las hembras y en los machos con las dosis mayores, se podría relacionar con sus efectos agonistas sobre los NMDA, en el aprendizaje dada la fuerte interacción entre atención y aprendizaje, es decir sin atención no hay aprendizaje. Lo que llama la atención son los efectos opuestos que se observaron entre las hembras y los machos, ya que la dosis menor incrementa la atención en las hembras y en los machos la disminuye, pero las dosis mayores decretan la atención en las hembras y en los machos la aumenta, estos efectos genero-relacionados generalmente se atribuyen a la interacción diferencial con las hormonas propias de cada género, aunque en aprendizaje se necesita mayor exploración, de estas dosis en diversas clases de aprendizaje.

La alta presentación de las hembras en comparación a los machos de conductas como saltar y escudriñar, resalta las diferencias conductuales genero-relacionadas en cuanto a la conducta emocional, las hembras de los mamíferos en general son más ansiosas que los machos, evaluando la ansiedad (conducta emocional) con actividad locomotora (Escorihuela, Fernández-Teruel, Tobeña, Langhans, Bättig & Driscoll, 1997); tal vez esto se atribuye a que ellas son quienes tienen a su cargo el cuidado de sus crías dentro de lo que esta la protección del depredador.

Como se había enunciado anteriormente, no se encontraron efectos nociceptivos del péptido

en estas dosis, por lo cual se podría evaluar con mayor seguridad el péptido BLMP-101, agonista de los NMDA en las dosis de 0,01  $\mu\text{g}$ , 0,1  $\mu\text{g}$  y 0,5  $\mu\text{g}$  y en una cronicidad de 11 días consecutivos en la posible actividad de potenciación del aprendizaje, en posteriores estudios. Sin embargo, es recomendable realizar más investigaciones donde se prolongue el tiempo de administración del péptido, con estas mismas dosis para descartar los efectos nociceptivos de este péptido en estas dosis en mayor cronicidad.

Además, como se están evaluando los efectos de este péptido en aprendizaje, en el caso que estas dosis no sean efectivas para potenciar este proceso, se puede explorar con dosis mayores hasta alcanzar la que permitió observar algún efecto potenciador del aprendizaje en el primer estudio (Oyuela & cols., 2004).

Al final del experimento se presentaron aisladamente algunas conductas como arrastrar el abdomen o erizarse (índices inequívocos de dolor) en algunos de los sujetos del presente estudio. Es posible que pudiesen ocurrir por irritación de la piel, producto de las inyecciones diarias, dado que su escasa frecuencia no permite concluir acerca de este evento, pero es importante tenerlo en cuenta sobre todo cuando se exploren dosis mayores o en un mayor tiempo de administración del péptido BMPL-101.

La amplia evidencia del papel de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) en el desarrollo neuronal de la plasticidad sináptica; específicamente en la consolidación de la información (Tang & cols., 1999); es lo que ha impulsado el diseño de agonistas a los NMDA para fortalecer el aprendizaje, no obstante se conoce abundantemente el papel de estos receptores en la modulación del dolor, de tal manera que los antagonistas a los NMDA, se han utilizado como analgésicos potentes; de tal forma que se ve que tanto el dolor como el aprendizaje y la memoria, comparten los mismos mecanismos moleculares, ya que los receptores del glutamato de la clase N-metil-D-Aspartato (NMDA), que están asociados al aprendizaje y a la memoria, están también involucrados en el

dolor y de ahí que sus antagonistas lo inhiben, (Davies & Lodge, 1987; Dickenson & Sullivan, 1987; Jackson, Graff, Richardson & Hargreaves, 1995).

Teniendo en cuenta lo anterior se sugiere en la evaluación de este péptido, analizar inicialmente la actividad nociceptiva, antes que la capacidad potenciadora del aprendizaje, para poder conocer con mayor certeza la seguridad de este péptido, previniendo la exposición innecesaria al dolor de los sujetos experimentales a dosis mayores o en tiempo de exposición al

péptido, para posteriormente evaluar sus consecuencias en aprendizaje y memoria. De ahí la importancia de empezar a evaluar la presencia de los efectos colaterales cuando estos son bien conocidos, como en el presente caso, y con mayor razón cuando todavía no se conocen sus efectos sobre el aprendizaje, de tal forma que se plantea una forma de trabajo en la que se inicia descartando la posible actividad nociceptiva de los péptidos agonistas a los NMDA, para luego verificar si en las dosis que no producen dolor podrían ser efectivas en la potenciación del aprendizaje y la memoria.

#### REFERENCIAS

- Alcaraz, V.M. & Guzmán, E. (2001). *Texto de neurociencias cognitivas*. México: Manual Moderno.
- Bliss, T. V. & Lomo, T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology*, 232, 331-356.
- Coderre T. J., Grimes R. W. & Melzack, R. (1986). Deafferentation and chronic pain in animals: An evaluation of evidence suggesting autonomy is related to pain. *Pain*, 26, 61-84.
- Childers, W., & Baudy, R. (2007). N-methyl-D-aspartate antagonists and neurophatic pain: the search for relief. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 50 (11):2557-2562.
- Davies, S. N. & Lodge, D. (1987) Evidence for involvement of N-methylaspartate receptors in 'wind-up' of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. *Brain Research*, 424, 402-406.
- Dickenson, A., & Sullivan, A. F. (1987). Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin - induced activity of rat dorsal horn. *Neuroscience Letter*, 83, 207-211.
- Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., Langhans, W., Bättig K. & Driscoll (1997). Labyrinth exploration, emotional reactivity, and conditioned fear in young Roman/Verh Inbred Rats. *Behavior Genetics*, 27, 573-578.
- Gentile, M. J. (1997). Sodium urate arthritis: Effects on the sensory properties of articular afferents in the chicken. *Pain*, 70, 245-251.
- Hogan, Q. (2002). Animal pain models. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 27(4), 385-401.
- Hough S. W., Goudas L. C., & Carr D.B. (2004). Anesthetic interventions in cancer pain. En: Warfield C. A, Bajwa Z. H, (Eds.), *Principles and Practice of Pain Medicine*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill.
- Jackson, D. L., Graff, C. B., Richardson, J. D. & Hargreaves, K. M. (1995). Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. *European Journal of Pharmacology*, 284, 321-325.
- Kandel, E., Jessell, T. & Schwartz, J. (2000). *Principles of neural science*. New York: McGraw Hill.
- Kerchner G. A, Li P. & Zhuo M. (1999). Speaking out of turn: a role for silent synapses in pain. *IUBMB Life*, 48(3), 251-256.
- Lawand, N. B., Willis, W. D. & Westlund, K. N. (1997) Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. *European Journal of Pharmacology*, 324, 169-177.
- Martínez, J. L., & Kesner, R. P. (1991). *Learning and memory. A biological view*. San Diego: Academic Press.
- Melzack, R., & Torgeson, W. (1971). On language of pain. *Anesthesiology*, 34, 50-59.
- Morris, K. (2001). Memory gain means more pain for transgenic mice. *The Lancet*, 357(9253), 367. Consultado febrero 5, 2006, en Research Library Core database. (Document ID: 68588551).
- Newcomer, J., & Kristal, J. (2001). NMDA receptor revelation of memory and behaviour in humans. *Hippocampus*, 11, 529-542.
- Okon, T. (2007). Ketamine: an introduction for the pain and paliative medicine physician. *Pain Physician*, 10(3), 493-500.
- Oyuela, R., Lareo, L., Muñoz, L., Morales, L., Echeverry, S., Uribe, A., Santos, O. & Acuña (2004). Estudio preliminar sobre el efecto en el aprendizaje y la memoria espacial de un péptido sintético en ratas. *Psicología desde el Caribe*, 13, 1-14.
- Randall, L. O., & Selitto, J. J. (1957). A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Archives of International Pharmacodynamic Therapy*, 111, 409 - 419. PMID: 13471093 [PubMed - OLDMEDLINE].

- Rodin, B. E., & Kruger, L. (1984). Deafferentation in animals as a model for the study of pain: An alternative hypothesis. *Brain Research Review*, 7, 213-228.
- Rozsa, A. J., Molinari, H. H., Greenspan, J. D., & Kenshalo, D. R. (1985). The primate as a model for the human temperature sensing system. Adapting temperature and intensity of thermal stimuli. *Somatosensory Research*, 2, 303-314.
- Silverman, P. (1978). *Animal behavior in the laboratory*. London: Chatman and Hall.
- Sluka, K. A., & Westlund, K. N. (1993). An experimental arthritis model in rats: The effects of NMDA and non-NMDA antagonists on aspartate and glutamate release in the dorsal horn. *Neuroscience Letters*, 149, 99-102.
- Tang, Y. P., Shimizu, E., Dube, G. R., Rampon, C., Kerchner, G. A., Zhuo, M., Liu, G. & Tsien, J. Z. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 401, 63-69.
- Tsien, J. & Ezzell, C. (2000). Learning, memory, genetic engineering, rodents. *Scientific American*. New York, 282 (4), 62-67.
- Vos, B. P., Strassman, A. M., & Maciewicz, R. J. (1994). Behavioral evidence of trigeminal pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *Journal of Neuroscience*, 14, 2708-2723.
- Wolf, W. (1967). *Introducción a la psicología México*: Breviarios, Fondo de Cultura Económica.
- Zimmerman, M. (1986). Physiological mechanisms of pain and its treatment. *Klinische Anästhesiologie und Intensivtherapie*, 32, 1-19.

Recepción: marzo de 2006

Aceptación final: junio de 2007