

**EFFECTO DE ENOXAPARINA SOBRE PARÁMETROS INFLAMATORIOS,  
HEMOSTÁTICOS Y DE NOCICEPCIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE  
INFLAMACIÓN POR QUEMADURA**



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
POSTGRADO DE MEDICINA VETERINARIA**



**EFFECTO DE ENOXAPARINA SOBRE PARÁMETROS INFLAMATORIOS,  
HEMOSTÁTICOS Y DE NOCICEPCIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE  
INFLAMACIÓN POR QUEMADURA.**

**Tesis Doctoral presentada como requisito para optar al título de Doctor en  
Ciencias Veterinarias**

**AUTOR: LCDO. HEMBER VICCI**

**TUTORA: DRA. MARÍA DEL PILAR NAVARRO**

**MARACAY, 08 DE MAYO 2019**



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



## VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias Veterinarias y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la **Tesis Doctoral** presentada por: **HEMBER JOSÉ VICCI VARGAS**, Cédula de identidad N° 12.935.031, bajo el título “**EFFECTO DE ENOXAPARINA SOBRE PARÁMETROS INFLAMATORIOS, HEMOSTÁTICOS Y DE NOCICEPCIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE INFLAMACIÓN POR QUEMADURA**”, a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 08 de mayo de 2019 a las 08:30 a.m., para que el autor lo defendiera en forma pública, lo que éste hizo en el Salón de Usos Múltiples del Biomed, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

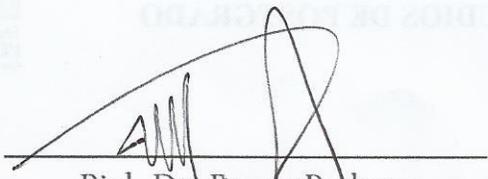
2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLO**, por considerar, sin hacerse solidario con las ideas expuestas por el autor, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado se ajusta a la aproximación clínica del modelo experimental utilizado, lo cual representa un gran aporte a la introducción de nuevas terapias farmacológicas en pacientes quemados, además representa un estudio integrado y multisistémico de parámetros interrelacionados, tales como los hemostáticos, inflamatorios y de nocicepción.

3.-El jurado por unanimidad decidió otorgar la calificación de **EXCELENTE** al presente trabajo por considerarlo de excepcional calidad, ya que por primera vez se reporta el aumento de trombina en este modelo de quemadura, cambios en la concentración de nitritos en asta dorsal modular y la relación de enoxaparina en la modificación de parámetros nociceptivos conductuales.

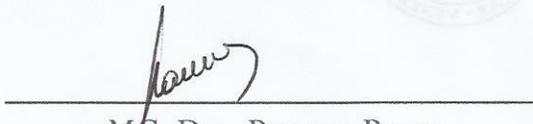
.../...

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 08 días del mes de mayo del año 2019, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinadora del jurado la Lcda. Dra. María del Pilar Navarro (FCS-UC).



Biol. Dr. Renny Pacheco  
C.I.No. V- 14.721.738  
UC

Jurado designado por el Consejo  
de Facultad



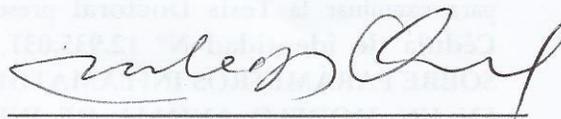
M.C. Dra. Rossana Bosco  
C.I.No. V- 9.441.440  
UC

Jurado designado por el Consejo  
de Facultad



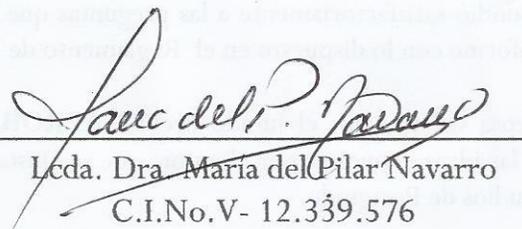
MV, PhD Ana Zuley Ruiz  
C.I.No.V-7.250.471  
FCV-UCV

Jurado designado por el Consejo  
de Estudios de Postgrado



Lcda. Dra. Miledys Oviedo  
C.I.No.V- 7.197.304  
FCV-UCV

Jurado designado por el Consejo  
de Estudios de Postgrado



Lcda. Dra. María del Pilar Navarro  
C.I.No.V- 12.339.576  
FCS-UC  
Tutora

MPN/RP/RB/AZR/MO  
08/05/2019



## DEDICATORIA

**A mi amada esposa Neitzer**, quien comparte su vida conmigo, me apoya incondicionalmente, siempre segura que todo lo puedo y me ha hecho mejor ser humano.

**A mí adorado hijo Jesucito**, mi razón para seguir adelante y esforzarme a diario para enseñarle con mi ejemplo y ofrecerle un mejor futuro.

**A Mami**, quien me dió la vida, tiene la palabra de optimismo y aliento en el momento exacto para tomar la mejor decisión y por mostrarme el valor de las pequeñas cosas.

**A mi hermana Ismerlin y a José Miguel** por estar siempre presente, brindar su apoyo a mi y mi familia cuando más lo necesitaba.

**A mis sobrinos Miguelito y el bebé José David**, por regalarme siempre una sonrisa, alegrar mi vida y demostrarme su cariño cada día.

**A Consuelito, Amado, Luzmar y Jorge** por ser mi otra familia y respaldar en todo momento a Rosty y Jesucito.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios Padre Celestial**, que todo lo puede, me dio la oportunidad de vivir, ha sido mi guía, arquitecto de paciencia y nos ha dado el don de la salud para trabajar y alcanzar nuestras metas.

**Al Dr. Tony Eblén**, por su humildad, optimismo, sentido humano y apoyo incondicional, quien me enseñó que aún con pocos recursos se puede hacer ciencia. Más que mi asesor, un familiar.

**A las Dras. Mercedes López y Rosalva Rodríguez** por su ayuda y sugerencias para la elaboración del trabajo.

**A la Dra. Mirian García y el Dr. Manuel Da Silva** porque de manera espontánea e incondicional me regalaron su tiempo y aportaron sugerencias para la elaboración del trabajo escrito y la presentación oral del mismo.

**Al Lic. Gustavo Crespo** por su amistad y apoyo experimental en el laboratorio de hemostasia.

**A la Lic. América y María de los Ángeles** por su amistad y apoyo en el laboratorio de neurofisiología.

**A todos simplemente... ¡Muchas Gracias!**

## RESUMEN

La enoxaparina es un anticoagulante que ha demostrado actividad antiinflamatoria en diversos modelos experimentales, El modelo inflamatorio de quemadura con agua caliente simula con precisión situaciones clínicas en el humano. Se propuso evaluar el efecto de enoxaparina sobre parámetros inflamatorios, hemostáticos y de nocicepción en un modelo animal de inflamación por quemadura. La inflamación se indujo sumergiendo la pata de la rata en agua a 60° C durante 60 segundos. Se determinó área del edema mediante fotografía digital ortogonal, recuento de leucocitos y plaquetas; concentración plasmática de proteína C reactiva (PCR) y complejo trombina-antitrombina (TAT) mediante ensayo inmunoenzimático, fibrinógeno (Fg) por método gravimétrico, nitritos y actividad de fosfatasa ácida resistente a fluoruro (FRAP) en suero y asta dorsal medular (ADM) mediante reacción de Griess y método cinético, respectivamente; actividad motora por medición de desplazamiento e hiperalgesia térmica mediante prueba de plato caliente. Se obtuvo valores máximos de edema, PCR y TAT a 4 horas post-quemadura; nitritos séricos, nitritos y FRAP en ADM ipsilateral a 6 horas post-quemadura; Fg a 12 horas post-quemadura y leucocitos a 24 horas postquemadura, mientras que se obtuvo menor latencia y desplazamiento a 4 horas post-quemadura. La enoxaparina disminuyó edema (-32,1%), recuento de leucocitos (-32,9%), concentración plasmática de PCR (-37,9%), TAT (-66,7%) y Fg (-8%); concentración de nitritos (-30,6%) y FRAP (-56,9%) en ADM ipsilateral. Además, incrementó la latencia (+95,9%), atenuando la hiperalgesia térmica y restauró la actividad motora (+27,5%) en inflamación. Enoxaparina tiene efectos antiinflamatorios y antinociceptivos, y puede ser empleada como fármaco coadyuvante en tratamiento de quemaduras.

Palabras clave: Inflamación, Coagulación, Nocicepción. Enoxaparina, Edema, Modelo animal de quemadura.

## ABSTRACT

Enoxaparin is an anticoagulant that has shown anti-inflammatory activity in various experimental model. The inflammatory model of burn with hot water accurately simulates clinical situations in humans. It was evaluated the effect of enoxaparin on inflammatory, hemostatic and nociception parameters in animal model of inflammation by burn. Inflammation was induced by submersing the rat hind paw in water at 60 °C for 60 seconds. The edema area was determined by orthogonal digital photography, leukocyte and platelet counts were determined; C-reactive protein (CRP) and thrombin-antithrombin complex (TAT) levels were estimated by immunosorbent assay, fibrinogen (Fg) by the gravimetric method, nitrites and fluoride-resistant acid phosphatase activity (FRAP) serum and spinal dorsal horn (ADM) by Griess reaction and kinetic method, respectively; motor activity by displacement measurement and thermal hyperalgesia by hot plate test. Maximum values of edema, CRP and TAT were obtained at 4 hours post-burn; serum nitrites, nitrites and FRAP in ipsilateral ADM at 6 hours post-burn; Fg at 12 hours post-burn and leukocytes at 24 hours post-burn; while lower latency and displacement were obtained at 4 hours post-burn. Enoxaparin decreased edema (-32.1%), white blood cell count (-32.9%), CRP (-37.9%), TAT (-66.7%) and Fg plasma levels (-8%); nitrites (-30.6%) and FRAP levels (-56.9%) in ipsilateral ADM. In addition, it was increased latency (+ 95.9%), attenuating thermal hyperalgesia and restored motor activity (+ 27.5%) in inflammation. Enoxaparin should be considered as a potential adjuvant drug for the treatment of burns.

**Key words:** Inflammation, coagulation, nociception. enoxaparin, edema, animal model of burn.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivo General	8
1.2 Objetivos Específicos	8
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>10</b>
2.1 Antecedentes de la investigación	10
2.1.1 Modelos inflamatorios <i>in vivo</i>	10
2.1.2 Efecto de HBPM e inhibidores de trombina en modelos de inflamación aguda <i>in vivo</i> .	11
2.2 Bases teóricas	13
2.2.1 Inflamación	13
2.2.1.1 Mediadores de la respuesta inflamatoria	13
2.2.1.2 Sistemas enzimáticos plasmáticos	15
2.2.1.3 Extravasación de leucocitos en la reacción inflamatoria	16
2.2.1.4 Biomarcadores de inflamación y nocicepción	19
2.2.1.4.1 Óxido nítrico (NO)	19
2.2.1.4.2 Proteína C Reactiva (PCR)	20
2.2.1.4.3 Fibrinógeno (Fg)	21
2.2.1.4.4 Fosfatasa ácida resistente a fluoruro (FRAP)	22
2.2.2 Sistema de la Coagulación	23
2.2.2.1 Hemostasia primaria	23
2.2.2.2 Hemostasia secundaria	24
2.2.2.3 Modelo celular de la hemostasia	24
2.2.3 Fibrinólisis	28
2.2.4 Mecanismos de Regulación de la coagulación	30
2.2.5 Trombina	35
2.2.6 Factor Xa	37
2.2.6.1 Inhibidores directos de FXa	38
2.2.6.2 Inhibidores indirectos de FXa	40
2.2.6.2.1 Heparina no fraccionada (HNF)	40
2.2.6.2.2 Heparinas de bajo peso molecular (HBPM).	43
2.2.6.2.2.3 Enoxaparina	47
2.2.6.2.3 Heparinas de ultra bajo peso molecular (HUBPM)	49
2.2.7 Receptores activados por proteasas PARs	50
2.2.8 Dolor y transmisión nociceptiva	56
2.2.9 Mecanismos inflamatorios asociados a la nocicepción	60

	<b>Pág.</b>
2.2.10 Mecanismos inflamatorios asociados a las quemaduras	62
2.2.11 Interacción entre inflamación, coagulación y dolor	64
2.3 Sistema de Variables e Indicadores	67
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>68</b>
3.1 Diseño y tipo de Investigación	68
3.2 Unidades experimentales	68
3.2.1 Diseño Experimental de la Investigación	69
3.2.1.2 Administración de las drogas	70
3.3 Procedimiento Experimental	71
3.3.1 Determinación del curso temporal del edema inducido por quemadura en ratas. Efecto de enoxaparina sobre el edema	71
3.3.2 Obtención muestra de sangre	72
3.3.3 Laminectomía.	73
3.3.3.1 Preparación de homogenatos de astas dorsales medulares	74
3.3.4 Determinación de parámetros inflamatorios. Efecto de enoxaparina sobre parámetros inflamatorios	74
3.3.4.1 Contaje total de leucocitos	74
3.3.4.2 Determinación de Proteína C Reactiva (PCR)	75
3.3.4.3 Determinación de nitritos en suero y asta dorsal medular. Índice de nitritos en ADM ipsilateral/contralateral.	76
3.3.5 Determinación de parámetros hemostáticos. Efecto de enoxaparina sobre parámetros hemostáticos.	77
3.3.5.1 Contaje total de plaquetas	77
3.3.5.2 Determinación de fibrinógeno (Fg)	77
3.3.5.3 Determinación del complejo Trombina/Antitrombina (TAT)	78
3.3.6 Determinación de parámetros nociceptivos. Efecto de enoxaparina sobre parámetros nociceptivos	80
3.3.6.1 Determinación de fosfasata ácida resistente a fluoruro (FRAP) en suero y asta dorsal medular (ADM). Índice de FRAP en ADM ipsilateral/contralateral	80
3.3.6.1.1 Determinación de proteínas totales y calibración	81
3.3.6.2 Pruebas Conductuales	81
3.3.6.2.1 Determinación de la variación en la actividad motora	82
3.3.6.2.2 Determinación del umbral nociceptivo térmico. Evaluación de la hiperalgesia térmica	82
3.4 Análisis estadístico	83
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>84</b>
4.1 Curso temporal del edema inducido por quemadura en ratas	84

	<b>Pág.</b>
4.2 Efecto de enoxaparina sobre el edema	84
4.3 Contaje total de leucocitos en sangre periférica	86
4.4 Efecto de enoxaparina sobre el contaje total de leucocitos en sangre periférica	87
4.5 Concentración plasmática de PCR	88
4.6 Efecto de enoxaparina sobre la concentración plasmática de PCR	90
4.7 Concentración de nitritos en suero, asta dorsal medular e índice nitritos ADM ipsilateral/contralateral en ratas con o sin inflamación inducida.	92
4.8 Efecto de enoxaparina sobre la concentración de nitritos en suero, asta dorsal medular e índice nitritos ADM ipsilateral/contralateral	95
4.9 Contaje total de plaquetas en sangre periférica	97
4.10 Concentración plasmática de Fg	98
4.11 Efecto de enoxaparina sobre la concentración plasmática de Fg	99
4.12 Concentración plasmática de complejo TAT	100
4.13 Efecto de enoxaparina sobre la concentración plasmática de complejo TAT	101
4.14 Actividad de FRAP en suero y ADM. Índice FRAP ADM ipsilateral/contralateral	103
4.15 Efecto de enoxaparina sobre la actividad de FRAP en ADM ipsilateral	106
4.16 Variación en la actividad motora	108
4.17 Efecto de enoxaparina sobre la actividad motora	109
4.18 Umbral nociceptivo térmico	111
4.19 Efecto de enoxaparina sobre el umbral nociceptivo térmico	112
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>114</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>135</b>
<b>7. RECOMENDACIONES</b>	<b>137</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>138</b>

## INDICE DE FIGURAS

Nº		Pág.
1.	Etapas de la extravasación leucocitaria en la inflamación	17
2.	Modelo celular de la Hemostasia	26
3.	Activación de FX y FIX a partir de FT/FVIIa	27
4.	Sistema Fibrinolítico	30
5.	Mecanismos que regulan la coagulación	31
6.	Representación esquemática de la vía extrínseca de la coagulación	32
7.	Activación de la protrombina en trombina	36
8.	Estructuras moleculares de la secuencia pentasacárido presente en la heparina y sus derivados sintéticos	44
9.	Mecanismo de inhibición del factor Xa por el pentasacárido de heparina	45
10.	Estructura química de enoxaparina	48
11.	Mecanismo de autoactivación de los receptores activados por proteasas (PARs)	51
12.	Área de la pata trasera después de la inmersión en agua a temperatura ambiente o agua a 60°C por 60 seg.	85
13.	Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre el edema 4 h después de inducir la quemadura	86
14.	Contaje de leucocitos en sangre total luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente o agua a 60°C por 60 seg.	87
15.	Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre el recuento de leucocitos en sangre periférica 24 h después de inducir la quemadura	88
16.	Concentración sérica de PCR luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente o agua a 60°C por 60 seg.	89
17.	Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre la concentración de proteína C reactiva, 4 h después de inducir la quemadura	91
18.	Concentración de nitritos en suero, ADM) ipsilateral y ADM contralateral, luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente o agua a 60°C por 60 seg.	93
19.	Índice nitritos ADM ipsilateral/contralateral luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente o agua a 60°C por 60 seg.	94

	<b>Pág.</b>
20. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre la concentración de nitritos en suero y ADM ipsilateral, 6 h después de inducir la quemadura	96
21. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre el índice nitritos ADM ipsilateral/contralateral, 6 h después de inducir la quemadura	97
22. Contaje de plaquetas en sangre total luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente o agua a 60°C por 60 seg.	98
23. Concentración plasmática de Fg luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente o agua a 60°C por 60 seg.	99
24. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre la concentración de Fg, 12 h después de inducir la quemadura	100
25. Concentración plasmática de TAT luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente o agua a 60°C por 60 seg.	101
26. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre la concentración de TAT, 4 h después de inducir la quemadura	102
27. Actividad de FRAP en suero ADM ipsilateral y ADM contralateral, luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente o agua a 60°C por 60 seg	104
28. Actividad de FRAP en ADM ipsilateral y ADM contralateral en ratas con inflamación inducida por inmersión de la pata trasera en agua a 60°C por 60 seg.	105
29. Índice FRAP ADM ipsilateral/contralateral luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente o agua a 60°C por 60 seg.	106
30. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre la actividad de FRAP en ADM ipsilateral 6 h después de inducir la quemadura	107
31. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre el índice FRAP ADM ipsilateral/contralateral 6 h después de inducir la quemadura	108
32. Actividad motora luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente o agua a 60°C por 60 seg.	109
33. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre la actividad motora, 4 h después de inducir la quemadura	110
34. Umbral nociceptivo térmico luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente o agua a 60°C por 60 seg.	111
35. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre el umbral nociceptivo térmico 4 h después de inducir la quemadura	113

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Nº</b>		<b>Pág.</b>
1.	Características de los factores de coagulación	25
2.	Métodos de obtención de Heparinas de bajo peso molecular (HBPM)	42
3.	Pesos moleculares medios y distribución de fragmentos de HBPM	43
4.	Relación de pesos moleculares y acción antitrombótica/anticoagulante de HBPM	46

## 1. INTRODUCCIÓN

La inflamación se define como un conjunto de respuestas que incluyen la participación de factores solubles, cambios en la permeabilidad vascular, migración de leucocitos y activación de redes neuronales nociceptivas (Millán, 1999; Muller, 2002; Eblen-Zajjur, 2005 a,b). Estos cambios en el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular producen los signos clásicos de la inflamación: tumor, rubor, calor, dolor y pérdida de función de tejidos (Campos, 2012).

La respuesta inflamatoria inducida por agentes exógenos (físicos, químicos y/o mecánicos) o endógenos (virus, bacterias, hongos y/o parásitos) está constituida por una compleja red de interacciones moleculares y celulares dirigida a facilitar el retorno a la homeostasis fisiológica y la reparación del tejido afectado. Sin embargo, cuando el tejido no es restaurado, la inflamación se convierte en una condición crónica que daña los tejidos circundantes, siendo el sustrato para la activación de vías nociceptivas que desencadenan respuestas que perpetúan el dolor, aún resuelta la lesión inicial (Millán 1999; Eblen-Zajjur 2005 a,b). De hecho, durante las respuestas inmunes inflamatorias crónicas, el daño y la regeneración del tejido proceden de forma simultánea, conduciendo a un grave deterioro en la zona afectada (Mitchell y Cotran, 2003).

Los mecanismos inflamatorios son mediados por citocinas, polipéptidos de bajo y alto peso molecular, que actúan regulando la inmunidad y el equilibrio homeostático, mediante complejas interacciones entre células endoteliales, células sanguíneas, liberación de neurotransmisores excitatorios, activación de cadenas enzimáticas, sistema de coagulación y fibrinólisis cuyos efectos pueden ser inhibidos y/o estimulados por otras citocinas, hormonas, antagonistas de receptores de citocinas y

receptores circulantes (Grignani y Maiolo, 2000; Licastro *et al.*, 2005; Bosco *et al.*, 2011). En efecto, ante una adecuada estimulación exógena o endógena, son secretadas citocinas proinflamatorias: Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleucina-1 (IL-1) e Interleucina-6 (IL-6); cuyos efectos son inhibidos por la secreción de citocinas antiinflamatorias: Interleucina 10 (IL-10), Interleucina 14 (IL-14) e Interleucina 13 (IL-13); que además, atenúan la activación de algunas funciones efectoras de linfocitos T y fagocitos mononucleares (Carrillo y Gonzalez, 2002; Lio, 2004; Licastro *et al.*, 2005; Bosco *et al.*, 2011; Liou *et al.*, 2011).

La respuesta inflamatoria se compone de eventos locales y/o sistémicos. Los eventos locales se caracterizan por la activación de las células inflamatorias como: células asesinas naturales (Natural Killer, NK), neutrófilos, macrófagos, que en conjunto con la secreción de citocinas proinflamatorias, mediadores vasoactivos [serotonina (5HT), histamina (HT)], fibrinopéptidos, sustancia P, cininas, productos de degradación de fibrina), activación de componentes del complemento (C3a, C4a, C5a), conllevan a la vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular y la expresión de moléculas de adhesión celular: selectinas, integrinas, moléculas de adhesión celular vascular (VCAM), moléculas de adhesión vascular intercelular (ICAM), favoreciendo la transmigración endotelial de las células inflamatorias al sitio de la lesión (Flórez, 2003; Goldsby *et al.*, 2004; Parham, 2006).

Por su parte, los efectos sistémicos favorecen el desarrollo de la respuesta de fase aguda caracterizada por leucocitosis, fiebre, anorexia, somnolencia, síntesis de proteínas de fase aguda como Proteína C Reactiva (PCR) y Fibrinógeno (Fg), entre otras (Cecilliani *et al.*, 2002; Licastro *et al.*, 2005).

Diversos estudios han demostrado que existe una estrecha interrelación entre la inflamación y la coagulación, siendo ambos procesos mecanismos de defensa, ya que la respuesta inflamatoria puede inducir la activación del sistema de la coagulación y

viceversa, conllevando a un ciclo cerrado de efecto-respuesta (Levi y Van der Poll, 2010).

Una de las vías mediante la cual la inflamación activa el proceso de coagulación es a través de la generación de trombina, mediada por la expresión del factor tisular (FT) en diferentes células como: monocitos, macrófagos y células endoteliales (Levi *et al.*, 2003; Levi *et al.*, 2012).

Por otra parte, estudios han demostrado que el factor X activado (FXa) y trombina tienen efectos proinflamatorios mediados por la activación de los receptores activados por proteasas (PAR Protease Activated Receptor). PAR-1 y PAR-2 son activados por FXa mientras que, PAR-1, PAR-3 y PAR-4 son activados por trombina (Derian *et al.*, 2002; Coughlin, 2005; Popovic *et al.*, 2012). A través de la activación de sus receptores, la trombina induce expresión de P-selectina (células endoteliales), quimiotaxis (monocitos y neutrófilos), expresión de moléculas de adhesión (leucocitos), secreción de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 (células endoteliales), proliferación y activación celular (monocitos y linfocitos) (Bizios *et al.*, 1986; McEver, 1992; Johnson *et al.*, 1998), mientras que FXa actúa como inductor de la expresión de IL-6, IL-8, proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1 Monocyte Chemoattractant Protein-1) (fibroblastos, células endoteliales y monocitos) y adicionalmente induce la expresión de moléculas de adhesión (monocitos) (Spronk *et al.*, 2014).

Mediante la modulación de citocinas proinflamatorias y la activación directa de receptores PAR-1, PAR-2 y PAR-4, localizados en neuronas del sistema nervioso central y periférico, tanto FXa como trombina pueden mediar la respuesta al dolor como resultado de la sensibilización de fibras nerviosas tipo C (mielínicas) y/o fibras A $\delta$  (amielínicas), capaces de liberar neuropéptidos que no sólo son neurotransmisores del dolor sino que también intervienen como mediadores inflamatorios (Asfaha *et al.*, 2002; Zegarska *et al.*, 2006; Dale y Vergnolle, 2008).

En tal sentido, cuando ocurre un proceso inflamatorio, las células lesionadas y perilesionadas generan IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8; factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IL-6, factores tróficos y quimiotácticos como el factor de crecimiento neural (NGF, Neuronal Growth Factor, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, Fibroblast Growth Factor, por sus siglas en inglés) y neurotrofinas (NT<sub>3</sub> y NT<sub>4</sub>), promoviendo la respuesta inmune con mayor secreción de citocinas proinflamatorias. En el aferente primario, estos mediadores activan la enzima óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS neuronal Nitric Oxide Synthase), incrementando la concentración de óxido nítrico (NO Nitric Oxide), un neurotransmisor que promueve la producción de bradicinina (Bk) (polipéptido con propiedades vasodilatadoras, proalgésicas y proinflamatorias), mediante la apertura de canales de calcio y sodio, liberación de neurotransmisores excitatorios e incremento de prostaglandinas (PG). Por su parte, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6, NGF y PGE<sub>2</sub> promueven el incremento en la concentración de calcio iónico libre intracelular, el cual se une a moléculas fijadoras de calcio como calmodulina (CaM) formando el complejo CaM-Ca que activa la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS inducible Nitric Oxide Synthase) elevando la concentración de NO, prolongando así los efectos proinflamatorios y nociceptivos (Eblen-Zajjur, 2005 a,b).

En la patogénesis del dolor participan neuronas sensoriales primarias, interneuronas y células gliales. La activación glial también promueve la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  durante los procesos inflamatorios agudos periféricos. Del mismo modo, es probable la activación de la cascada del complemento, a través de los factores C3 principalmente, C1, C1q, C3d y C9; tal como se ha demostrado en estudios inmunocitoquímicos en modelos de inflamación periférica (Sweitzer *et al.*, 1999; De Leo y Yezierski, 2001; Winters *et al.*, 2005).

El dolor se clasifica en dos categorías: dolor patológico (neuropático y funcional) y dolor adaptativo (inflamatorio y nociceptivo) (Millán, 1999; Woolf, 2004). La estimulación nociceptiva activa un conjunto de mecanismos que conllevan a la

expresión y supresión de receptores en las astas dorsales de la médula espinal (ADM) y liberación de sustancias neuroactivas como la enzima: Fosfatasa ácida resistente a fluoruro (FRAP Fluoride resistant acid phosphatase), la cual se considera un marcador de integridad de neuronas y fibras aferentes primarios nociceptivos y cuya actividad se asocia a la intensidad de la función aferente nociceptiva (Glykys *et al.*, 2003; Czaplinski *et al.*, 2005). Además, existen cambios electrofisiológicos y bioquímicos que sugieren una respuesta asimétrica de las redes neuronales de ambas ADM caracterizada por una menor expresión de proteínas, menor magnitud y duración de la respuesta contralateral respecto de la ipsilateral (Ruda *et al.*, 1988; Eblen-Zajjur y Sandkühler, 1997; Koltzenburg *et al.*, 1999; Shenker *et al.*, 2003; Glykys *et al.*, 2003; Bosco *et al.*, 2011).

Las lesiones por quemadura generan dolor nociceptivo asociado a inflamación local y/o sistémica, y las causadas por líquidos calientes son las más frecuentes en niños y ancianos, induciendo hiperalgesia mecánica y térmica, elevados niveles plasmáticos de catecolaminas y citocinas proinflamatorias; originando un estado de hiperinflamación (Jeschke *et al.*, 2007; Summer *et al.*, 2007; Abdullahi *et al.*, 2014). Una vez producida una lesión por quemadura, la activación del proceso inflamatorio y/o de coagulación conlleva también al inicio de diversos sistemas de regulación para disminuir la generación de trombina, sus efectos locales y sistémicos. Ejemplo de ello lo constituyen los sistemas anticoagulantes fisiológicos: Inhibidor de la vía del Factor Tisular (TFPI, Tissue Factor Pathway Inhibitor, por sus siglas en inglés), sistema de la proteína C (PC) y/o antitrombina III (ATIII), entre otros (Strukova, 2006; Páramo *et al.*, 2009).

La ATIII, es una  $\alpha$ -glicoproteína producida en células endoteliales del hígado, riñón y pulmón (Harker, 1994; Diaz y Almagro, 2001); *In vivo*, es el principal inhibidor plasmático de FXa, trombina y otras proteasas de la coagulación (FIXa, FXIa, FXIIa, calicreína y complejo FVIIa-FT), regulando la generación de trombina. El sitio reactivo

de ATIII (RCL Reactive Center Loop), que es reconocido como sustrato por el sitio catalítico de las proteasas, se encuentra parcialmente inaccesible en su estructura, no obstante, en presencia de heparina como cofactor, la ATIII cambia su conformación estructural, exponiendo su RCL. Este efecto depende de una secuencia pentasacárida presente en la heparina, que se une principalmente a residuos de lisina y arginina presentes en el RCL de la ATIII, favoreciendo la actividad inhibitoria de la serpina, e inactivando los efectos de las proteasas (Huntington, 2003; Di Nisio *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2005; Castañon, 2008; Levy *et al.*, 2016).

La heparina no fraccionada (HNF), forma parte de la familia de polisacáridos sulfatados conocidos como glicosaminoglicanos que interactúan con proteasas, moléculas de señalización extracelular (quimiocinas y factores de crecimiento) y proteínas de unión en la membrana lipídica. La HNF ha sido aislada a partir de fuentes animales (intestino de cerdo y pulmón de vacuno) y es utilizada como terapia antitrombótica (Li *et al.*, 2008; Xianxiang, 2010).

A partir de la degradación enzimática o hidrólisis parcial de HNF se sintetizan las heparinas de bajo peso molecular (HBPM), inhibidores de FXa y trombina, que contienen el pentasacárido de alta afinidad a ATIII y se emplean en el tratamiento de alteraciones tromboembólicas (Gray *et al.*, 2008; García *et al.*, 2012). Las HBPM presentan mayor actividad catalítica anti-FXa/anti-FIIa, mejores propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas que HNF (Dotan *et al.*, 2001; Duboscq *et al.*, 2013). Adicionalmente ha sido demostrado su efecto antiinflamatorio a partir de diversos modelos experimentales de inflamación (Yan *et al.*, 2017) *in vitro*, por activación de células mononucleares humanas con lipopolisacárido (LPS) (Gori *et al.*, 2004) e *in vivo* en ratas por inflamación intraperitoneal inducida por TNF $\alpha$  (Salas *et al.*, 2000), pleuritis inducida por  $\lambda$ -carragenina (Ceccarelli *et al.*, 2009) y edema inducido por  $\lambda$ -carragenina en ratones (Posadas *et al.*, 2004).

Un fármaco anticoagulante comúnmente empleado en el tratamiento antitrombótico es la enoxaparina, una HBPM que *in vitro*, ha demostrado elevada actividad anti-FXa y débil actividad antitrombínica. Asimismo, se le atribuye actividad antiinflamatoria, demostrado en modelos experimentales inflamatorios *in vivo* en ratas: colitis inducida por ácido sulfónico-dinitrobenceno (Dotan *et al.*, 2001) y daño endotelial inducido por LPS (Iba *et al.*, 2012).

Entre los modelos experimentales inflamatorios, la inyección intraplantar de  $\lambda$  carragenina, ha sido comúnmente empleado para evaluar el efecto de fármacos (Cicala *et al.*, 2007; Vásquez *et al.*, 2015); sin embargo, éste modelo dista mucho de la respuesta clínica en el humano, es por ello, que se han implementado otros modelos experimentales en animales, como el de quemadura con agua caliente (Torres *et al.*, 2016), mediante el cual se ha inducido respuesta inflamatoria local y sistémica, evidenciada por edema, cambios morfológicos y metabólicos en tejido nervioso e incremento de mediadores asociados a neuroinflamación (Hamasaki *et al.*, 2017); además, ha permitido evaluar la conducta nociceptiva y el efecto de fármacos antiinflamatorios no esteroideos sobre la expresión de proteínas en asta dorsal medular de la rata (Wang *et al.*, 2011; Bosco *et al.*, 2011).

En virtud de que el modelo inflamatorio por quemadura con agua caliente simula adecuadamente las alteraciones fisiopatológicas, celulares, moleculares presentes en el humano y la enoxaparina presenta alta biodisponibilidad y predecible dosis-respuesta. Se propuso evaluar el efecto de enoxaparina sobre parámetros inflamatorios, hemostáticos y de nocicepción en un modelo animal de inflamación por quemadura en la rata. Ello permitiría considerar el pretratamiento con dicho inhibidor para mejorar el estado hiperinflamatorio e hiperalgésico presente en pacientes con lesiones por quemadura.

### **1.1 Objetivo General.**

Evaluar el efecto de enoxaparina sobre parámetros inflamatorios, hemostáticos y de nocicepción en un modelo animal de inflamación por quemadura.

### **1.2 Objetivos específicos.**

- ✓ Determinar el curso temporal del edema inducido por quemadura en ratas
- ✓ Determinar parámetros inflamatorios: Contaje total de leucocitos, concentración plasmática de proteína C reactiva, nitritos en suero y asta dorsal medular; e índice nitritos asta dorsal medular ipsilateral/contralateral.
- ✓ Determinar parámetros hemostáticos: Contaje total de plaquetas, concentración plasmática de fibrinógeno y complejo trombina-antitrombina.
- ✓ Determinar parámetros nociceptivos: Actividad de fosfatasa ácida resistente a fluoruro en suero y asta dorsal medular, índice de la enzima en asta dorsal medular ipsilateral/contralateral, variación en la actividad motora y umbral nociceptivo térmico.
- ✓ Determinar el efecto de enoxaparina sobre el edema.
- ✓ Determinar el efecto de enoxaparina sobre parámetros inflamatorios: Contaje total de leucocitos, concentración plasmática de proteína C reactiva, concentración de nitritos en suero y asta dorsal medular; y sobre el índice nitritos ADM ipsilateral/contralateral.

- ✓ Determinar el efecto de enoxaparina sobre parámetros hemostáticos: Contaje total de plaquetas, concentración plasmática de fibrinógeno y complejo trombina-antitrombina.
  
- ✓ Determinar el efecto de enoxaparina sobre parámetros nociceptivos: Actividad de fosfatasa ácida resistente a fluoruro en suero y asta dorsal medular, índice de la enzima en asta dorsal medular ipsilateral/contralateral, actividad motora y umbral nociceptivo térmico.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Antecedentes de la investigación.

#### 2.1.1 Modelos inflamatorios *in vivo*.

Wang *et al.* (2011), estudiaron la conducta nociceptiva en ratas jóvenes en un modelo de lesión por quemadura con agua caliente en ratas. La inducción inflamatoria produjo edema local, formación de ampollas y ulceración en el área lesionada; además de hiperalgesia térmica y disminución de la expresión de iNOS y nNOS en asta dorsal medular. Por otra parte, la administración de dextrometorfano un antagonista de receptores N-metil-D- aspartato (NMDA) atenuó la hiperalgesia térmica y expresión de nNOS en asta dorsal medular ipsilateral. Concluyeron que probablemente la vía NMDA es importante para la conducta antinociceptiva en el modelo presentado demostrando que el modelo de quemadura con agua caliente permite explorar los mecanismos de lesiones por quemadura.

Al respecto, Bosco *et al.* (2011), estudiaron el efecto de la indometacina sobre la expresión de proteínas y del canal de sodio Nav1.3 en asta dorsal medular de ratas, inducido por inflamación periférica aguda inducida con agua caliente. Demostraron que la inflamación incrementó la concentración de proteínas totales en el asta dorsal ipsilateral y la redujo en la contralateral. Además, la indometacina disminuyó la expresión de proteínas en inflamación e inhibió proteínas constitutivas ipsilaterales en el grupo sin inflamación; concluyendo, que se produce una respuesta diferencial de cada asta dorsal medular ante un estímulo nocivo y la participación de las ciclooxigenasas en el proceso de expresión proteica.

Por su parte, Vásquez *et al.* (2015), evaluaron los cambios sistémicos inducidos por inyección intraplantar de carragenina en ratas. Observaron respuesta inflamatoria caracterizada por edema, deposición de fibrina, infiltración leucocitaria, incremento en la expresión de FT, IL-6, IL-1 $\beta$ , y TNF $\alpha$  en tejido de la pata y pulmonar; además de hiperalgesia térmica e incremento de proteínas de fase aguda (PCR y Fg). Concluyeron que la inyección de carragenina induce una respuesta inflamatoria sistémica.

Por otro lado, Torres *et al.* (2016), evaluaron parámetros inflamatorios locales y sistémicos, posteriores a la inducción inflamatoria por quemadura periférica con agua caliente en ratas. Encontraron que dicho modelo induce edema local, leucocitosis y fibrinogenemia. Concluyeron que el modelo animal de quemadura inducido por agua a 60 °C por 60 segundos (seg.) incita la respuesta inflamatoria sistémica.

### **2.1.2 Efecto de HBPM e inhibidores de trombina en modelos de inflamación aguda *in vivo*.**

Dotan *et al.* (2001), evaluaron el efecto de la administración subcutánea de HNF y enoxaparina en un modelo de colitis inducida con ácido sulfónico dinitrobenceno y yodoacetamida en ratas. Los investigadores demostraron que dosis no anticoagulantes de enoxaparina (80  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) y HNF (200 U.Kg $^{-1}$ ) atenuaron significativamente la severidad de la colitis por disminución de la lesión en el área de la mucosa. Asimismo, demostraron disminución en la actividad de NOS, mieloperoxidasa y en los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$ . Concluyeron, que dosis bajas de enoxaparina y HNF mejoran la severidad de la colitis y este efecto antiinflamatorio es independiente de las propiedades anticoagulantes.

Por su parte, Xia *et al.* (2004), empleando dalteparina, otra HBPM, evaluaron el efecto de ésta sobre la expresión de P-selectina en plaquetas, niveles plasmáticos de IL-8 y expresión de TNF $\alpha$  en la mucosa colónica, mediante un modelo de colitis en

ratas, inducida por ácido sulfónico trinitrobenceno. Se encontró que el tratamiento con dalteparina disminuyó significativamente la inflamación colónica y la producción de IL-8, no obstante, la expresión de P-selectina y la concentración de TNF $\alpha$  no mostraron diferencias significativas. Concluyeron, que dalteparina tiene efecto antiinflamatorio, posiblemente relacionado con la inhibición de IL-8 pero no con la expresión de P-selectina.

Asimismo, Ceccarelli *et al.* (2009), evaluaron los efectos antiinflamatorios de K5NOSepiLMW, un derivado semisintético de heparina con bajo peso molecular en un modelo de inflamación aguda inducida por inyección intraperitoneal de carragenina en ratas. Se encontró que K5NOSepiLMW atenuó el infiltrado leucocitario tanto a nivel pulmonar como en exudado pleural, inhibió la actividad de iNOS y COX<sub>2</sub> y disminuyó la generación de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ . Concluyeron que K5NOSepiLMW podría ser usado a futuro como posible medicamento antiinflamatorio.

Finalmente, Navarro (2010), evaluó la influencia del pretratamiento de inhibidores de trombina (hirudina, dipetarudina, PEG-hirudina, PEG-dipetarudina y argatroban) en el modelo de inflamación aguda, inducido por administración intraplantar de carragenina en la rata; demostrando que los inhibidores de trombina disminuyen el edema local, leucocitosis, concentración de complejo TAT, PCR e hiperalgesia térmica. La hirudina, PEG-hirudina y la PEG dipetarudina disminuyeron significativamente la expresión de IL-1 $\beta$  e IL-6 y la dipetarudina, sólo IL-1 $\beta$ . Sus resultados sostienen que la trombina y los PARs intervienen de manera importante en los mecanismos de inflamación aguda y demuestran que el pretratamiento con inhibidores directos de trombina tiene efectos antiinflamatorios y antihiperalgésicos.

## **2.2 Bases teóricas.**

### **2.2.1. Inflamación.**

La inflamación constituye una respuesta fisiológica multifactorial a diversos estímulos, como infecciones, lesión tisular y a la presencia de agentes físicos o químicos exógenos. Entre los principales efectos de la respuesta inflamatoria se incluyen la migración de leucocitos a través del endotelio hacia el sitio de lesión, incremento en la permeabilidad vascular a macromoléculas, incremento del aporte sanguíneo local, reducción la velocidad del flujo sanguíneo, lo que conlleva a la manifestación de los signos y síntomas característicos (dolor, calor, rubor y tumor). En general la reacción inflamatoria aguda tiene un inicio rápido y se establece por poco tiempo, además se acompaña de una respuesta generalizada que se conoce como reacción de fase aguda y se caracteriza por alteración rápida de las concentraciones de varias proteínas plasmáticas (Cicala y Cirino, 1998; Roitt *et al.*, 2000; Sánchez y Talamás, 2002; Pier *et al.*, 2004; Ferrero-Milliani *et al.*, 2006).

#### **2.2.1.1. Mediadores de la respuesta inflamatoria.**

En las reacciones inflamatorias actúan quimiocinas, productos de sistemas enzimáticos y mediadores vasoactivos, entre otros. Las aminas vasoactivas y los productos del sistema de cinina, modulan las respuestas inmediatas. En respuesta a agentes exógenos y/o endógenos, se libera gran variedad de mediadores (derivados del complemento, lípidos, citocinas, y enzimas proteolíticas) (Roitt *et al.*, 2000; Flórez, 2003; Goldsby *et al.*, 2004).

La liberación temprana de quimiocinas favorece la quimiotaxis y extravasación de leucocitos hacia los sitios de lesión. Ejemplo de ello, son MCP-1 y el factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF Macrophage Inhibitory Factor),

quienes aumentan la expresión de moléculas de adhesión celular y activan genes que inducen la síntesis de citocinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 e IFN $\gamma$ ) (Goldberg, 2009).

TNF $\alpha$  induce la secreción de factores estimulantes de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, por sus siglas en inglés) en células endoteliales y macrófagos. Estos CSF estimulan la hematopoyesis y causan aumento transitorio de la producción de leucocitos (Kindt *et al.*, 2007). Además, promueve el reclutamiento de neutrófilos y monocitos, induce la secreción de PAF en células endoteliales y activa el mecanismo de coagulación por inducción de la expresión de FT sobre células endoteliales, neutrófilos y monocitos, favoreciendo la generación de trombina y formación de fibrina en el sitio de inflamación (Imamura *et al.*, 2002; Parham, 2006). Adicionalmente, estimula la liberación de IL-8, IL-1 e IL-6 por los macrófagos, actúa como pirógeno e incrementa la síntesis de proteínas hepáticas que inician la respuesta de fase aguda (Pier *et al.*, 2004).

La síntesis de IL-1 es inducida por TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y por la unión de células presentadores de antígenos a linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Dos formas de IL-1 han sido descritas: IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  es sintetizada principalmente por monocitos, macrófagos y células dendríticas, entre otras. Esta citocina induce e incrementa la expresión de: IL-2, fosfolipasa A<sub>2</sub>, COX<sub>2</sub>, moléculas de adhesión, además, estimula la producción de IL-8 y secreción de IL-6 (Dianarello, 2000; Parham, 2006; Enciso y Arroyo, 2011).

Por su parte, IL-6 es sintetizada por monocitos, células endoteliales, fibroblastos, células adiposas en respuesta a IL-1 y TNF $\alpha$ , y funciona como un activador autocrino, paracrino y endocrino de la inflamación, favorece la síntesis de inmunoglobulinas, estimula la proliferación de linfocitos T y la actividad de las células NK. También, induce un estado protrombótico al incrementar la expresión de FT (células endoteliales

y monocitos), síntesis de factor VIII (FVIII) y von Willebrand (FvW), incrementar la producción plaquetaria, la maduración y proliferación de megacariocitos (Xing *et al.*, 1998; Kerr *et al.*, 2001; Kindt *et al.*, 2007; Moilanen, 2014).

Con el fin de que los leucocitos circulantes ingresen en el tejido inflamado o en los órganos linfoides periféricos, el endotelio vascular y los leucocitos expresan las llamadas moléculas de adhesión celular (CAM), que les permite a estos últimos adherirse y pasar entre las células que revisten el endotelio en un proceso que se denomina extravasación. Además, las CAM potencian las interacciones funcionales entre las células del sistema inmune (linfocitos T helper con células presentadoras de antígenos), linfocitos T helper con células B y linfocitos T citolíticos con células blanco. Las CAM pertenecen a cuatro familias de proteínas: selectinas, mucina, integrinas e inmunoglobulinas (Kindt *et al.*, 2007).

#### **2.2.1.2. Sistemas enzimáticos plasmáticos.**

Varios sistemas enzimáticos plasmáticos son importantes en la homeostasis y el control de la inflamación: el sistema de la cinina, el sistema del complemento (actúa como enlace entre el sistema inmunitario y los fenómenos inflamatorios), el sistema de la coagulación y el sistema fibrinolítico.

El sistema de la cinina genera los mediadores bradicinina y lisilbradicinina (kalidina). La bradicinina es un nonapéptido con poderosas propiedades vasoactivas, la cual dilata las vénulas, aumenta la permeabilidad vascular e induce la contracción de la musculatura lisa. La bradicinina se produce tras la activación del factor de Hageman (XII) del sistema de la coagulación sanguínea, mientras que la kalidina es generada tras la activación del sistema fibrinolítico (plasmina) o por la acción de enzimas liberadas por tejidos dañados (Roitt *et al.*, 2000).

Por otra parte, poblaciones celulares como mastocitos, basófilos y plaquetas son importantes fuentes de mediadores vasoactivos como HT y 5HT, que producen vasodilatación y aumentan la permeabilidad vascular. Los mastocitos a su vez son fuente de mediadores inflamatorios de reacción lenta como leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos. Las plaquetas también pueden ser activadas por el sistema inmunitario, ya sea por inmunocomplejos o factor activador de plaquetas (PAF Platelet Activator Factor) producido por neutrófilos, basófilos y macrófagos (Roitt *et al.*, 2000).

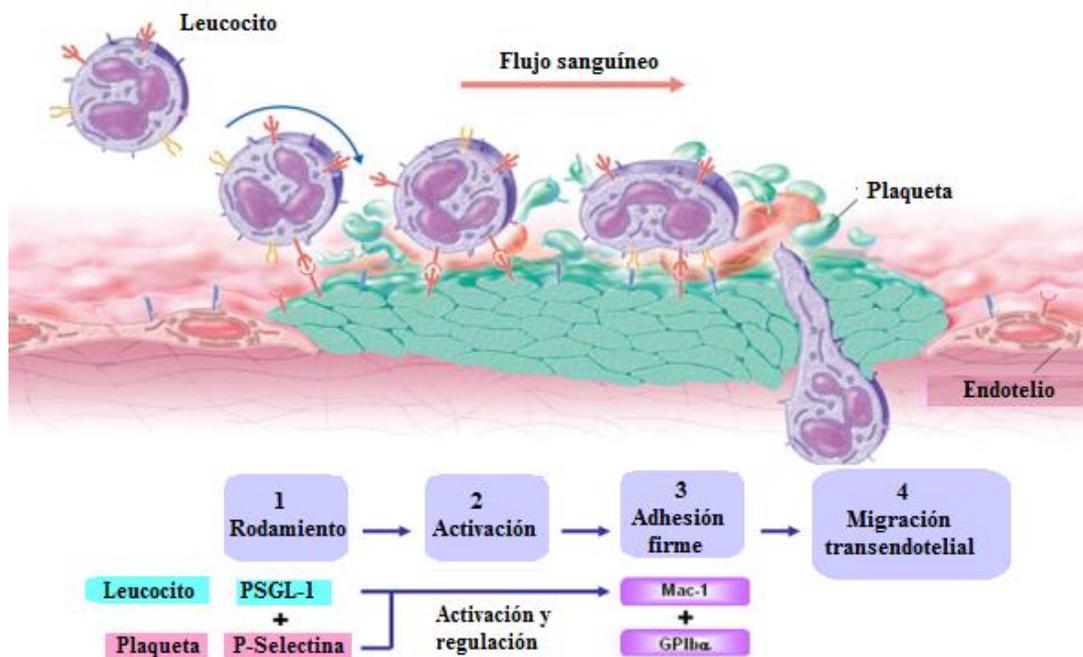
La activación del complemento por las vías clásica y alternativa resulta en la formación de diversos productos que actúan como importante mediadores inflamatorios. La fijación de las anafilotoxinas C3a y C5a a receptores de la membrana de mastocitos tisulares induce su degranulación con liberación de HT. Además, C3a, C5a y C5b67 actúan en conjunto para promover la adhesión de monocitos y neutrófilos a las células del endotelio, su extravasación y migración hacia el sitio de activación del complemento en los tejidos (Kindt *et al.*, 2007).

Algunos mediadores inflamatorios como 5HT, bradicinina, y eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos o leucotrienos) son responsables de inducir dolor, motivado a la sensibilización de neuronas aferentes primarias especializadas, en cuyo terminal periférico se ubican los nociceptores (Cicala y Cirino, 1998; Millán; 1999; Parada *et al.*, 2001; Sánchez y Talamás 2002; Rittner *et al.*, 2005; Inoue *et al.*, 2009; Vergnolle, 2009).

### **2.2.1.3. Extravasación de leucocitos en la reacción inflamatoria.**

Para que los leucocitos sean extravasados y puedan migrar al sitio de lesión es necesario que reconozcan y se adhieran firmemente al endotelio activado, evitando ser movilizados por el flujo sanguíneo. Este proceso consta de varias etapas: 1)

rodamiento, mediado por selectinas; 2) activación por el estímulo quimioatrayente; 3) paro y adhesión, y 4) migración transendotelial (Figura 1) (Davis *et al.*, 2003; Goldsby *et al.*, 2004; Kindt *et al.*, 2007).



**Figura 1. Etapas de la extravasación leucocitaria en la inflamación** (Tomado de Inoue *et al.*, 2011).

Los neutrófilos suelen ser el primer tipo celular en unirse al endotelio. Una vez activado el endotelio, favorece la liberación de selectina P, movilizada a la superficie celular por el leucotrieno B<sub>4</sub>, C5a e HT a partir de los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales. Los neutrófilos expresan selectina L y moléculas de adherencia celular similares a la mucina (PSGL-1 P-Selectin Glicoprotein Ligand-1 o tetrasacárido sialilo de Lewis<sup>a</sup> y sialilo de Lewis<sup>x</sup>) para mediar el rodamiento sobre el endotelio. Simultáneamente, los neutrófilos son activados por quimioatrayentes desde la superficie de las células endoteliales o secretados por células que intervienen en la reacción inflamatoria: quimiocinas como IL-8, la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 $\beta$ , Macrophage Inflammatory Protein-1 $\beta$ ), el PAF, los productos de

desdoblamiento del complemento C5a, C3a y C5b67 y diversos péptidos de N-formilo, actúan sobre los neutrófilos y disparan una señal activadora mediada por proteínas G, que produce un cambio en la configuración de las integrinas en la membrana del neutrófilo incrementando su afinidad por ICAM y facilitando su adherencia a las células endoteliales, cuyo resultado es la fijación firme del neutrófilo al endotelio y así deja de rodar (Davis *et al.*, 2003; Florez, 2003; Goldsby *et al.*, 2004; Kindt *et al.*, 2007). Una vez adheridos al endotelio, los neutrófilos comienzan el proceso de trans migración deslizando entre dos células endoteliales vecinas (diapédesis), alcanzando la membrana basal y secretando proteasas que la degradan, llegando de esta manera a la zona inflamada o lesionada (Parham, 2006). Los neutrófilos pueden ingerir, destruir y digerir los agentes patógenos invasores por la liberación del contenido tóxico de sus gránulos (peróxido de hidrógeno, superóxido y radicales hidróxilo) y especies reactivas de nitrógeno (proteínasa 3, catepsina G y elastasa), liberan mediadores como MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  (Davis *et al.*, 2003; Flórez, 2003); y pueden expresar FT, lo que le atribuye efectos procoagulantes y un nexo importante entre inflamación y coagulación (Imamura *et al.*, 2002).

Los monocitos periféricos llegan al sitio de lesión después de los neutrófilos. Esto se debe al tiempo que tarda el endotelio en aumentar la expresión de VCAM-1 e ICAM-1. El rodamiento es mediado por selectina L y las integrinas (VLA-4), las cuales son activadas por MCP-1. La trans migración endotelial es mediada por interacciones en las que intervienen la molécula 1 de adhesión a plaquetas (PECAM-1 Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1) y la molécula 1 de unión y adhesión a células (JAM-1 Junctional Adhesion Molecule 1). Los monocitos son atraídos a la zona lesionada por fragmentos peptídicos bacterianos y fragmentos del complemento. En los tejidos los monocitos se transforman en macrófagos que una vez activados, secretan IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , fagocitan detritos tisulares y células muertas; tras procesar el antígeno, lo presentan a los linfocitos para la formación de inmunoglobulinas (Flórez, 2003; Goldsby *et al.*, 2004; Parham, 2006; Kindt *et al.*, 2007).

## **2.2.1.4 Biomarcadores de inflamación y nocicepción.**

### **2.2.1.4.1 Óxido nítrico (NO).**

Es un radical libre de 30 Daltons, con moderada reactividad y una vida media de 2-6 seg., que cumple múltiples funciones regulatorias organo-específicas. NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por una familia de enzimas: sintasas de óxido nítrico (NOSs). La oxidación de un nitrógeno terminal de L-arginina produce NO y L-citrulina. Tres isoformas de sintasas han sido identificadas: Dos formas constitutivas, nNOS y sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS endothelial Nitric Oxide Synthase), y una tercera isoforma iNOS. La síntesis de NO por las isoformas constitutivas es baja (nanomolar) y está controlada por agentes que movilizan  $Ca^{++}$ , e inhibida por antagonistas de calmodulina, mientras que iNOS sintetiza NO en altas concentraciones (micromolares), manteniéndose elevada por horas (h) o días, siendo inducida por productos bacterianos y citocinas proinflamatorias (IL-1 y  $TNF\alpha$ ), no obstante, esta isoforma es regulada por inhibidores de la transcripción de ADN, de la síntesis de proteínas (actomicina D y cicloheximida); y por citocinas antiinflamatorias (IL-4 e IL-13) (Coleman, 2002; Kolios *et al.*, 2004).

NO puede interactuar directamente con proteínas o radicales orgánicos libres que contienen metales. *In vivo*, la interacción directa de ON con la enzima guanilato ciclasa favorece la formación de cGMP a partir de GTP. cGMP tiene importante función regulatoria sobre el tono vascular, la inhibición de la agregación plaquetaria y la adhesión leucocitaria. La interacción de NO con el anión superóxido ( $O_2^-$ ) sirve de protección a las enzimas que contienen hem, relacionadas con la síntesis de prostaglandinas (ciclooxigenasas). NO tiene efecto antioxidante al disminuir la producción de especies como el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) (Kolios *et al.*, 2004).

En el sistema nervioso central (SNC), NO interviene en la regulación del flujo sanguíneo cerebral, contrarestando la vasoconstricción y permitiendo un aporte constante de flujo sanguíneo. La nNOS se encuentra altamente difundida en la corteza cerebral, hipocampo y núcleo estriado; y la isoforma endotelial es sintetizada en respuesta al estrés mecánico que produce el flujo sanguíneo sobre la pared del endotelio. NO actúa como neurotransmisor que no se almacena en vesículas ni posee receptores específicos de membrana e interviene en procesos de plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria. La concentración de NO se incrementa en períodos de isquemia por efecto de iNOS, la cual se expresa en la microglia y otras células inflamatorias. Además, en respuesta a la inflamación, NO inhibe los complejos enzimáticos I y II de la cadena de transporte mitocondrial, aumenta el consumo de oxígeno, la formación de peroxinitrilo y de dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD nicotinamide adenine dinucleotide). Por otra parte, la liberación de sustancias relacionadas con la fisiopatología nociceptiva, como la sustancia P (SP), estimula la producción de NO, el cual actúa como un mediador inhibitorio o excitatorio del estímulo doloroso (Benavides y Pinzón, 2008).

#### **2.2.1.4.2 Proteína C reactiva (PCR).**

Es una proteína de fase aguda compuesta por cinco polipéptidos idénticos que se mantienen unidos entre sí por uniones no covalentes. La proteína C reactiva se fija a gran variedad de microorganismos y activa el complemento dando como resultado depósito de opsonina C3b sobre la superficie de los gérmenes. Las células fagocíticas que expresan el receptor C3b, pueden fagocitar con facilidad los agentes patógenos cubiertos por la opsonina. (Pepys y Hirschfield, 2003; Kindt *et al.*, 2007). En humanos, la concentración de esta molécula es muy usada como marcador bioquímico no específico de inflamación y su medición contribuye a monitorear la respuesta a tratamientos de antiinflamatorios (Giffen *et al.*, 2003; Pepys y Hirschfiel, 2003), ya que

los niveles séricos de PCR incrementan significativamente después de un daño tisular o de una infección (Padilla *et al.*, 2003).

Muchos efectos de la fase aguda se deben a la acción combinada de IL-1, TNF $\alpha$ , e IL-6. Cada una de estas citocinas actúa sobre el hipotálamo para inducir una reacción febril y el incremento de proteínas de fase aguda por los hepatocitos (Kindt *et al.*, 2007).

#### **2.2.1.4.3 Fibrinógeno (Fg).**

Es una glicoproteína circulante con alto peso molecular (340 kDa), la cual es sintetizada en el hígado en respuesta a la estimulación de la IL-6, tiene una estructura simétrica de forma alargada con tres pares de cadenas polipeptídicas (A $\alpha$ , B $\beta$ ,  $\gamma$ ) unidas por puentes disulfuros. Tiene una vida media aproximada de 100 h y con una concentración plasmática entre 200 y 400 mg.dL<sup>-1</sup>. Se presenta en forma soluble y por acción de la trombina se transforma en fibrina la cual es insoluble, siendo esta transformación el principal papel de Fg en el proceso de coagulación, donde se le conoce como factor I. De esta manera, el Fg forma parte del proceso de coagulación sanguínea al intervenir en su fase final. El catabolismo de esta proteína está mediado por la plasmina, que actúa sobre el Fg y la fibrina, generando productos de degradación (FDP, Fibrinogen Degradation Product, por sus siglas en inglés), estos últimos estimulan en los macrófagos la producción de IL-6 que trae como consecuencia un incremento en la síntesis hepática de Fg (Espinosa, 2002; Guo *et al.*, 2009).

La concentración de esta proteína de fase aguda aumenta de 2 a 20 veces como resultado de una respuesta inflamatoria (agresiones físicas, químicas, infecciones bacterianas o virales, parásitos y neoplasias, estado post-operatorio y embarazo); estos niveles se mantienen elevados durante 3-5 días, retornando a su valor basal una vez que cesa el estímulo (Espinosa, 2002).

Además de su papel en la trombosis, el Fg tiene un número importante de otras funciones que establecen su posible participación en la génesis y progresión de la enfermedad vascular tales como: a) *Regulación de la proliferación, quimiotaxis y adhesión celular*, al infiltrar la pared muscular de una arteria con disfunción endotelial, favoreciendo la proliferación de células musculares lisas y además, la fibrina y los péptidos derivados de esta proteína pueden provocar una desorganización de las monocapas de las células endoteliales y estimular la migración y la proliferación de las células vasculares; b) *Incremento de la vasoconstricción en los sitios de lesión en la pared vascular*, ya que niveles elevados de Fg inducen la formación de trombos murales rígidos, fuertemente adheridos y pocos susceptibles a la acción de la fibrinólisis endógena; c) *Estimulación de la agregación plaquetaria*; donde el Fg sirve como un mecanismo hemostático primario cuando ocurre el daño vascular, en este sentido, las plaquetas circulan en un medio rico en fibrinógeno pero no se enlazan a él, a no ser que se produzca su activación, donde la glicoproteína IIb/IIIa actúa como receptor del Fg. Una vez que ocurre la unión de las plaquetas al Fg se promueve la agregación y la formación del tapón plaquetario (Espinosa 2002; Toros *et al.*, 2005).

#### **2.2.1.4.4 Fosfatasa ácida resistente a fluoruro (FRAP).**

En general, las neuronas nociceptivas (sensibles al dolor), se clasifican en peptidérgicas y nopeptidérgicas, difiriendo molecularmente, anatómicamente y funcionalmente. FRAP es una enzima considerada marcador de neuronas nopeptidérgicas del ganglio de la raíz dorsal (DRG Dorsal Root Ganglion, por sus siglas en inglés). FRAP es expresada en la mayoría de neuronas nopeptidérgicas y un subgrupo de neuronas peptidérgicas, específicamente en células y terminaciones de axones de neuronas nopeptidérgicas isolectina B4 positivas (IB<sub>4</sub><sup>+</sup>) y en menor proporción en neuronas peptidérgicas del DRG que contienen el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP<sup>+</sup>) (Taylor y Zylka, 2010).

Tiamina monofosfatasa (TMPasa) o FRAP presenta una estructura similar a la isoforma transmembrana de fosfatasa ácida prostática (PAP) (Quintero *et al.*, 2007; Zylka *et al.* 2008). En ratas, ratones y humanos, PAP es expresada como una proteína secretada o proteína transmembrana tipo 1 con un dominio catalítico extracelular (Quintero *et al.*, 2007; Roiko *et al.*, 1990). La isoforma secretora ha sido empleada como marcador diagnóstico de cáncer prostático (Quintero *et al.*, 2007). La identificación molecular de PAP/FRAP ha permitido dilucidar su función en circuitos nociceptivos.

### **2.2.2 Sistema de la coagulación.**

La hemostasia se define como el conjunto de mecanismos fisiológicos y de defensa que mantienen la fluidez de la sangre e integridad vascular. La coagulación de la sangre está mediada por componentes celulares y proteínas plasmáticas. En respuesta a una lesión vascular, las plaquetas circulantes se adhieren, agregan, y proporcionan los fosfolípidos de la superficie celular para el ensamblaje de complejos enzimáticos de la coagulación sanguínea, los cuales están constituidos por: una proteasa de serina, un cofactor no enzimático, iones de calcio y fosfolípidos de membrana de una variedad de células (plaquetas, células endoteliales, fibroblastos y monocitos) (Mann *et al.*, 1990; Allen *et al.*, 2000; Rosenberg, 2001; Hoffman, 2003).

El mecanismo de activación de la coagulación se divide en hemostasia primaria y secundaria:

#### **2.2.2.1 Hemostasia primaria.**

Se inicia con la activación del endotelio, se describen dos formas de activación: Daño físico del endotelio con pérdida de la solución de continuidad del mismo exponiendo elementos subendoteliales y por activación del endotelio sin daño físico.

La hemostasia primaria se caracteriza principalmente por la agregación plaquetaria e interacción de los componentes tisulares, las proteínas plasmáticas y sus receptores. Después de presentarse el daño vascular, las plaquetas inician una serie de reacciones (rodamiento, adhesión, secreción) dependientes de elementos relacionados con la activación endotelial, como son: colágeno, factor von Willebrand (FvW), P-selectina, E-selectina e integrinas, entre otros. Las plaquetas sufren cambios morfológicos, como aumento de su superficie, expresión de receptores y previo a la etapa de secreción se genera una unión más estable con el endotelio mediado por la integrina GPIb-V-IX. En la etapa de secreción, la plaqueta libera tromboxano A<sub>2</sub>, ADP, calcio y 5HT contenidos en sus gránulos densos; se inicia la agregación y reclutamiento de mayor número de plaquetas, además, de la contracción del músculo liso de los vasos sanguíneos. Otro producto de los gránulos alfa, es la fibronectina, la cual se secreta después de la estimulación plaquetaria por la trombina o el colágeno, y facilita la unión entre las plaquetas y diversas proteínas (Frenette y Wagner, 1996; Tello *et al.*, 2011).

#### **2.2.2.2. Hemostasia secundaria.**

Corresponde a la activación de la cascada de la coagulación. Los factores de la coagulación son proteínas presentes en la sangre, se sintetizan en su mayoría en el hígado, con excepción del factor tisular (FT). Estos factores circulan bajo condiciones fisiológicas en forma inactiva (zimógenos) que son convertidos a enzimas activas por ruptura de uniones peptídicas y tienen una vida media que varía entre minutos y días (Tabla.1) (Roberts *et al.*, 2001; Izaguirre, 2005, Guerrero y López, 2015).

#### **2.2.2.3 Modelo celular de la hemostasia.**

De acuerdo a este modelo, el proceso de la hemostasia secundaria se realiza sobre una superficie celular, siendo activado por el complejo FVIIa/FT, con la participación

de diversas células: fibroblastos, monocitos, células endoteliales y plaquetas (Hoffman y Monroe, 2001; Guerrero y López, 2015).

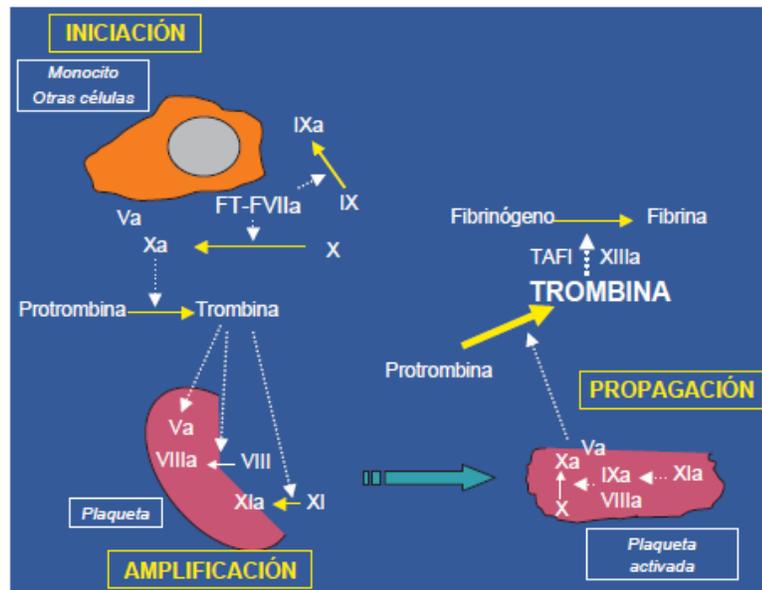
**Tabla 1. Características de los factores de coagulación.**

<b>Factores</b>	<b>Vida media en plasma (horas)</b>	<b>Concentraciones plasmáticas (<math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math>)</b>
Fibrinógeno	72-120	2000-4000
Protrombina	60-70	100-150
V	12-16	5-10
VII	3-6	0,5
VIII	8-12	0,1
IX	18-24	4-5
X	30-40	8-10
XI	52	5
XII	60	30
Proteína C	6	4-5
Proteína S	42	25
Factor Tisular	---	---
Trombomodulina	---	---
Antitrombina	72	150-400
Inhibidor de la vía del Factor Tisular	---	0,1

Tomado de Roberts *et al.*, 2004.

La coagulación se produce en tres etapas simultáneas e interrelacionadas (Figura 2), la *fase de iniciación*, que tiene lugar a nivel de células que expresan FT y conlleva la generación de los factores Xa, IXa y pequeñas cantidades de trombina. La *fase de amplificación* se traslada a la superficie de las plaquetas, que son activadas por la trombina generada y acumulan factores y cofactores en su superficie, permitiendo el ensamblaje necesario para que tengan lugar las reacciones enzimáticas. Finalmente, en la *fase de propagación*, las proteasas se combinan con los cofactores en la superficie plaquetaria, promoviendo la generación de grandes cantidades de trombina que

favorecen la formación de fibrina y su ulterior polimerización para constituir un coágulo (Páramo *et al.*, 2009).

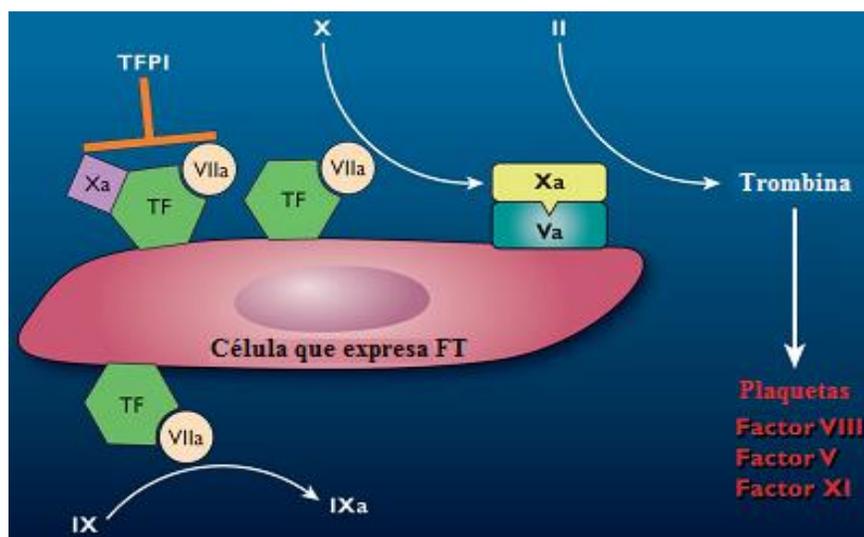


**Figura 2. Modelo Celular de la Hemostasia** (Tomado de Páramo *et al.*, 2009).

### a) Fase de Iniciación.

El inicio del proceso de coagulación *in vivo* tiene lugar a nivel de células endoteliales, fibroblastos, células musculares lisas, monocitos/macrófagos entre otras; que expresan FT, una glicoproteína de transmembrana (42 kDa) codificada por un gen localizado en el cromosoma 1 (p21-p22), que da lugar a una proteína de 263 residuos de aminoácidos, constituida por un dominio extracelular de 219 aminoácidos, una región transmembrana de 23 aminoácidos y un dominio intracelular de 21 aminoácidos. FT es el único factor de la coagulación que normalmente no está presente en la sangre y su síntesis se encuentra bajo control transcripcional, activándose en respuesta a trauma, inflamación y estímulos hormonales (Díaz y Almagro, 2001; Carrillo *et al.*, 2007; Breitenstein *et al.*, 2010).

Durante el proceso hemostático que tiene lugar tras la lesión vascular, se produce el contacto de la sangre circulante con el subendotelio, lo que favorece la unión del FT con el Factor VII circulante y su posterior activación. El complejo “tenasa extrínseco” (FT/VIIa, iones calcio y fosfolípidos) genera más factor VIIa y activa los factores IX y X (Figura 3). El factor Xa se combina en la superficie celular con el factor Va para producir cantidades limitadas de trombina, pero suficiente para activar a los factores FVIII, FV y FXI que se ensamblan en la superficie plaquetaria para promover ulteriores reacciones en la siguiente fase (Oliver *et al.*, 1999; Mackman *et al.*, 2007; Páramo *et al.*, 2009)



**Figura 3. Activación de FX y FIX a partir de FT/FVIIa** (Tomado de Roberts *et al.*, 2004).

### **b) Fase de amplificación.**

Tanto el factor Xa como el factor IXa formados activan a su vez al factor VIIa, lo cual constituye un mecanismo de amplificación. El factor Xa formado, ya sea de forma rápida por el complejo factor VIIa/FT, o de forma más lenta pero continúa por el complejo factor IXa/VIIIa, activa a la protrombina en presencia de factor Va,

fosfolípidos y calcio, lo cual fomenta una mayor generación de trombina. Por otra parte, el daño vascular favorece el contacto de las plaquetas, las cuales se adhieren a la matriz subendotelial, siendo activadas en lugares donde se ha expuesto FT; los factores Va y VIIIa se unen a éstas y son responsables del anclaje de sus respectivas proteasas, lo cual permite la expresión de la actividad coagulante (Díaz y Almagro, 2001; Páramo *et al.*, 2009).

### **c) Fase de propagación.**

Durante esta fase, el complejo “tenasa intrínseco” (VIIIa, IXa, Ca<sup>++</sup> y fosfolípidos) cataliza la conversión de factor Xa, mientras que el complejo “protrombinasa” (Xa, Va, Ca<sup>++</sup> y fosfolípidos) cataliza a nivel de la superficie plaquetaria, la conversión de protrombina en grandes cantidades de trombina, necesarias para la formación de un coágulo estable de fibrina (Mann *et al.*, 2003; Páramo *et al.*, 2009). La trombina generada condiciona la escisión proteolítica del fibrinógeno y la formación de monómero de fibrina que se polimeriza para consolidar el inestable coágulo inicial de plaquetas en un coágulo firme y organizado de fibrina. La trombina a su vez activa al factor XIII, lo que da mayor estabilidad al coágulo, la fase de propagación también se caracteriza por la activación del sistema de retroalimentación negativa a través de la activación de la antitrombina III, sistema de proteína C/S y del inhibidor de la vía del FT (Mann *et al.*, 2003; Carrillo *et al.*, 2007; Páramo *et al.*, 2009).

### **2.2.3 Fibrinólisis.**

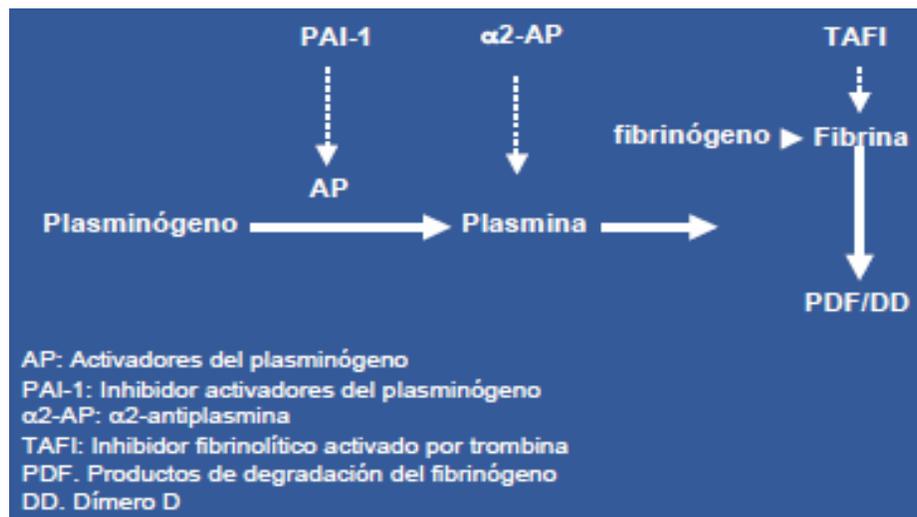
La fibrinólisis constituye un mecanismo esencial para eliminar los coágulos de fibrina durante el proceso de cicatrización, así como remover los coágulos intravasculares e impedir la trombosis. La activación y regulación de la fibrinólisis ocurre por múltiples proteínas resultando en la generación de plasmina efector final del sistema, que degrada la fibrina en productos de degradación (PDF) y dímero D. La

plasmina es producida a partir de un precursor inactivo, el plasminógeno, por acción de dos activadores del plasminógeno: activador tisular (t-PA) y activador tipo urocinasa (u-PA), este último se une a un receptor celular: receptor del activador tipo urocinasa del plasminógeno (uPAR), resultando en una mayor activación de plasminógeno y cuya función principal es la inducción de la proteólisis pericelular.

tPA es el más potente activador de plasminógeno en plasma y el principal regulador de la fibrinólisis. Después de la estimulación (trombina, oclusión venosa, ejercicio físico), el tPA es liberado localmente en la circulación a partir de las células endoteliales. La activación del plasminógeno mediada por tPA es facilitada por una superficie de fibrina, que restringe la fibrinólisis al sitio de formación de trombos. Además, una vez unido a la fibrina, el tPA está protegido del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), su principal inhibidor en plasma.

Por otro lado,  $\alpha$ 2-antiplasmina es el principal inhibidor fisiológico de la plasmina; sin embargo, la plasmina está parcialmente protegida de la actividad inhibitoria cuando la enzima está unida a la fibrina. Durante la formación de trombos,  $\alpha$ 2-antiplasmina se une a la fibrina por acción del factor XIIIa, facilitando la inhibición local de la fibrinólisis.

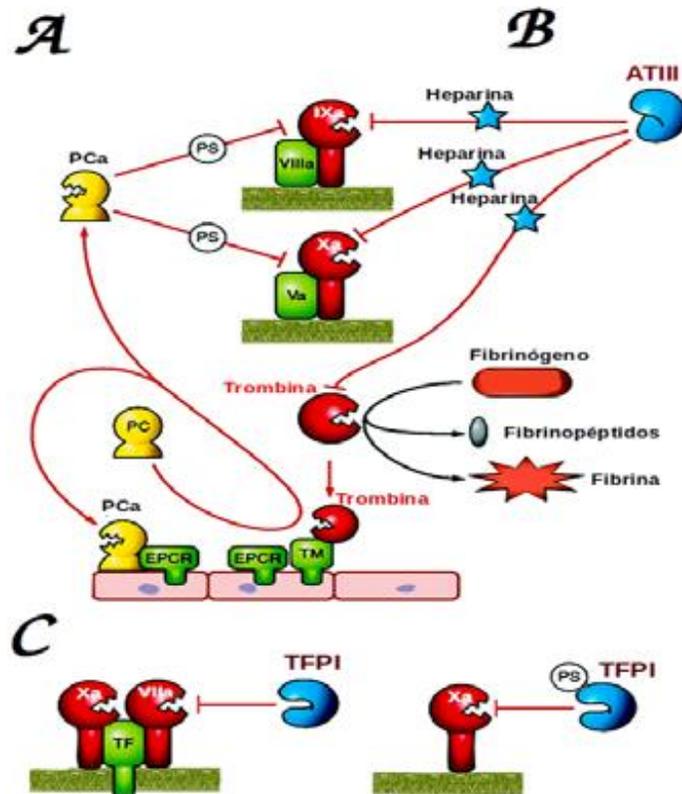
Otro componente importante del sistema fibrinolítico es el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), que conecta directamente la coagulación y la fibrinólisis. TAFI se activa por la trombina, pero su activación es más de 1000 veces mayor por el complejo trombina - trombomodulina (TM). TAFI activado remueve residuos de lisina carboxilo-terminal, reduciendo la unión del plasminógeno y tPA al coágulo de fibrina y ulterior lisis del coágulo (Figura 4) (Cesarman y Hajjar, 2005; Nesheim y Bajzar, 2005; Rijken y Lijnen, 2009; Scaldaferrì *et al.*, 2011).



**Figura 4. Sistema Fibrinolítico** (Tomado de Páramo *et al.*, 2009).

#### 2.2.4 Mecanismos de Regulación de la Coagulación.

Con la finalidad de mantener un equilibrio hemostático, el sistema de la coagulación debe ser regulado, evitando la generación de excesivas cantidades de trombina. Esto es posible, por la acción de sistemas anticoagulantes naturales, presentes a nivel del endotelio vascular, siendo los más importantes TFPI, ATIII, PC y proteína S (PS) (Figura 5). El TFPI forma un complejo cuaternario con FT/FVII y FXa impidiendo la fase inicial de la coagulación, mientras que ATIII inhibe la actividad de proteasas (Xa, IXa, XIa, XIIa y trombina). El sistema de la PC y PS se activa a nivel del endotelio por trombina, en presencia de un receptor endotelial, TM. La proteína C circulante se une al receptor endotelial de PC (EPCR, por sus siglas en inglés). El complejo formado por estas proteínas permite la rápida conversión de PC en proteína C activada (APC Activated Protein C, por sus siglas en inglés) que, conjuntamente con PS como cofactor, inhibe los factores Va y VIIIa, disminuyendo la generación de trombina, además de poseer otras propiedades anticoagulantes y antiinflamatorias (Esmon, 2003; Dahlback, 2005).

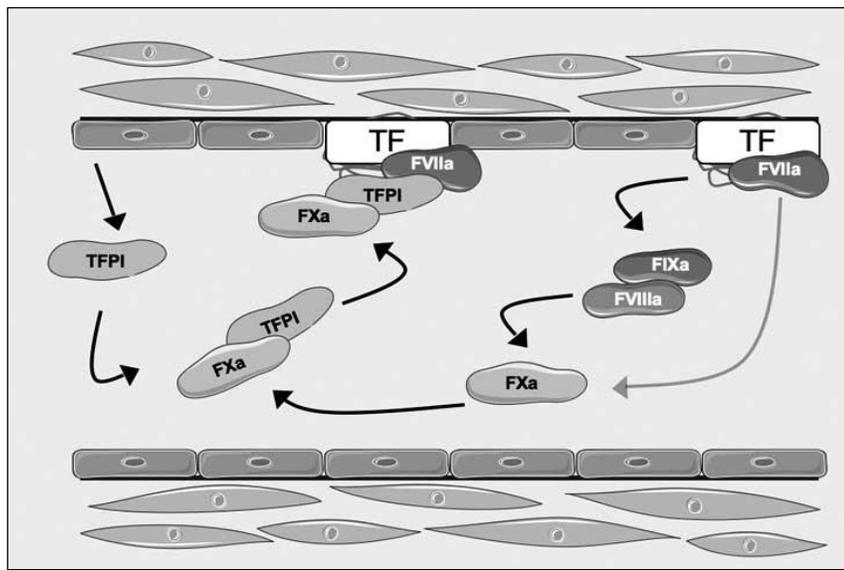


**Figura 5. Mecanismos que regulan la coagulación.** A) El complejo trombina-TM-EPCR, que transforma PC en PCa y junto a PS inactiva a FVa y FVIIIa. B) La ATIII que inhibe a trombina, FIXa y FXa en presencia de heparina. C) El TFPI que inhibe al complejo TF-FVIIa-FXa (Tomado de Guerrero y López, 2015)

#### a) Inhibidor de la Vía del factor tisular (TFPI).

Otro mecanismo de inhibición de la coagulación está regulado por TFPI, un inhibidor endógeno de la vía extrínseca de la coagulación (TF/FVIIa), su acción está relacionada con la presencia de FXa y está constituido por tres dominios inhibidores de proteasa de tipo Kunitz. El primer dominio Kunitz reacciona con el sitio activo de FVIIa en el complejo TF/ VIIa, mientras el segundo dominio Kunitz reacciona con el

sitio activo de FXa. Una vez formado el complejo TFPI/ Xa, este se une con mayor afinidad a TF/VIIa resultando en la formación de un complejo tetramolecular TF/VIIa - TFPI/Xa (Figura 6).



**Figura 6. Representación esquemática de la vía extrínseca de la coagulación:** FVII unido a FT se convierte rápidamente en su forma activada (FVIIa). FVIIa se une a FX, que se convierte en su forma activa (FXa). Varias proteasas de coagulación (VIIa, IXa), amplifican el proceso de activación. TFPI modula la actividad de FT/FVIIa. En presencia de FXa, se forma un complejo que, a su vez, se une con alta afinidad a FT/VIIa causando así, la formación e inhibición del complejo tetra-molecular FT/VIIa /TFPI/Xa (Tomado de Petrillo *et al.*, 2010).

### b) Antitrombina III (ATIII).

La ATIII, es una  $\alpha$ -glicoproteína de un peso molecular de 58 kDa, miembro de la familia de las Serpinas, producida en las células endoteliales del hígado, riñón y pulmón, se encuentra en una concentración plasmática de 150  $\mu\text{g/mL}$ , además, se puede encontrar en algunos espacios extravasculares. Esta glicoproteína inactiva a la trombina

en forma irreversible formando un complejo estequiométrico 1:1 (complejo TAT), a través de la interacción del residuo de serina 195 del centro activo de la trombina con el residuo de arginina 393 de la ATIII.

La formación del complejo TAT ocurre a una velocidad relativamente lenta en ausencia de heparina; sin embargo, cuando el polisacárido está presente, se une simultáneamente al exosito II de la trombina y a la ATIII, induciendo un cambio conformacional en esta proteína, que le permite su unión a la proteasa. Una vez formado este complejo, la heparina se disocia del mismo, y se une con otras moléculas de ATIII, y el complejo trombina- ATIII es eliminado de la circulación.

Varias enzimas del mecanismo de la coagulación son inactivadas por ATIII (FXIIa, FXIa, FIXa, FXa y FVIIa), inclusive otras proteasas de serina que no pertenecen al sistema de la coagulación, como plasmina, C1s y tripsina. Este proceso ocurre de forma similar a lo descrito anteriormente para la trombina, lo que hace del mecanismo ATIII-heparina la vía principal de neutralización de la mayoría de los factores activados, excepto el factor XIIa, en el cual el mecanismo principal de inhibición lo lleva a cabo el inhibidor del componente C1 del complemento (Harker, 1994; Díaz y Almagro, 2001; Di Nisio *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2005; Páramo *et al.*, 2009).

### **c) El cofactor II de heparina (HCII).**

Es otro miembro de la familia de inhibidores de proteasas de serina conocidas como serpinas con un peso molecular de 65,6 kilodaltons (kDa). El HCII es sintetizado por los hepatocitos y secretado en circulación sanguínea a una concentración de aproximadamente 1  $\mu$ M. Esta serpina inactiva selectivamente a la trombina en presencia de heparina o dermatán sulfato. La trombina reconoce la unión peptídica llamada P1-P1' la cual en el HCII está constituida por Leu<sub>444</sub>-Ser<sub>445</sub> y así la trombina queda unida en un complejo 1:1 altamente estable, donde la proteasa está inactiva

(Rossi *et al.*, 1999; Aihara *et al.*, 2009). El inhibidor HCII se une a heparina con más baja afinidad que la ATIII, pero la velocidad a la cual neutraliza la trombina es similar a la de ATIII en concentraciones saturantes de heparina. La especificidad de HCII está restringida a la trombina y el sulfato de dermatano (Rossi *et al.*, 1999; Díaz y Almagro, 2001; Aihara *et al.*, 2009).

#### **d) El sistema de la proteína C (PC).**

La vía de PC está constituida por una glicoproteína integral de membrana: TM, EPCR y dos proteínas plasmáticas vitamina K dependientes: el zimógeno de PC y el cofactor de proteína S. Luego de la escisión del dodecapéptido del enlace N-terminal de la cadena ligera de PC por el complejo trombina-TM, el zimógeno PC es convertido en APC. La PC *per se* es un pobre sustrato para trombina, pero la unión alostérica trombina-TM incrementa en gran magnitud la interacción trombina-PC y la subsecuente conversión del zimógeno PC a su forma proteolíticamente activa APC.

El grado de activación por el complejo trombina-TM es más eficiente cuando el zimógeno PC se encuentra unido a EPCR, incrementando la interacción con la trombina. El grado de activación de PC *in vivo*, está vinculado a la biodisponibilidad de PC, trombina y la densidad de moléculas de TM y EPCR expresado en células endoteliales. La actividad anticoagulante de la vía de PC incluye la proteólisis de APC sobre FVa y FVIIIa, efecto potenciado por la Proteína S; limitando de este modo la generación de trombina. Además, inactiva directamente al inhibidor del activador plasminógeno tipo 1 (PAI-1), favoreciendo así la fibrinólisis (Fernández y Borrasca, 1992; Díaz y Almagro, 2001; Gómez *et al.*, 2005; Scaldaferrri *et al.*, 2011).

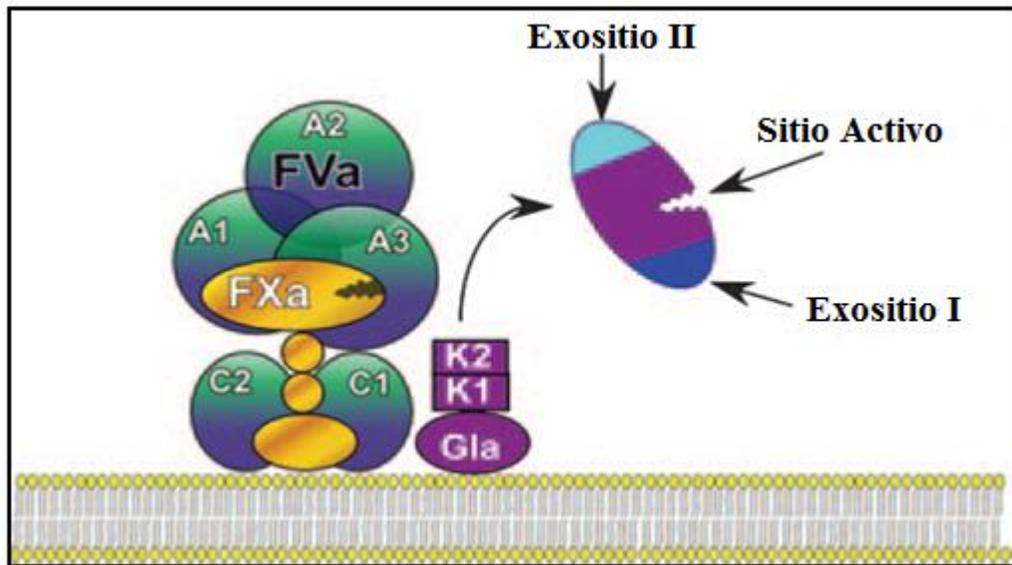
Entre otros inhibidores involucrados en la coagulación se encuentran: la  $\alpha$ 2-macroglobulina que actúa como un inhibidor trombina en ausencia de heparina, la  $\alpha$ 1-anti-tripsina, la cual inhibe al FXIa, plasmina y APC. El inhibidor del componente C1

del complemento (C1 esterasa), el cual también inhibe a FXIIa, FXIa y plasmina (Fernández y Borrasca, 1992; Sala *et al.*, 1993).

### 2.2.5 Trombina

La trombina es una proteasa de serina (miembro de la familia de la tripsina), sintetizada en el hígado que circula en plasma como zimógeno inactivo, siendo el producto de activación de la protrombina, una glicoproteína de 70 kDa, que pierde por completo dominios importantes de su estructura, una vez activada por el complejo protrombinasa. La protrombina es escindida por FXa en el sitio Arg<sub>320</sub>, generando el intermediario meizotrombina que posteriormente es escindido en el sitio Arg<sub>271</sub> generando la trombina (35 kDa) y el fragmento 1.2 (Davie y Kulman, 2006). Por otra parte, la escisión de los dominios de protrombina permite a la trombina la exposición del sitio activo y regiones de unión a aniones, denominadas exositos I y II, ricos en residuos básicos que interactúan electrostáticamente con grupos cargados negativamente de otras moléculas y que son cruciales para extender el alcance y especificidad de las acciones de la proteasa, además de facilitar su unión a sustratos e inhibidores (Figura 7).

Estructuralmente, la molécula de trombina activa está constituida por una cadena ligera o cadena A de 49 residuos de aminoácidos, unida por un enlace disulfuro a una cadena pesada o cadena B de 259 residuos. La cadena B tiene el sitio catalítico constituido por la triada: S<sub>195</sub>, H<sub>57</sub>, D<sub>189</sub> (Lane *et al.*, 2005; Crawley *et al.*, 2007).



**Figura 7. Activación de la protrombina en trombina.** La protrombina se activa como parte del complejo de protrombinasa a meizotrombina por escisión en Arg<sub>320</sub>. La región Gla y los dominios K1 y K2 dominios se escinden en Arg<sub>271</sub>, permitiendo la formación de trombina, la cual presenta 3 regiones funcionalmente accesibles: el sitio activo y los exositos I y II (Tomado de Lane *et al.*, 2005).

La trombina interviene en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos (coagulación sanguínea, anticoagulación, fibrinólisis, regulación del tono vascular, proliferación celular, inflamación, reparación de tejidos y otros procesos inducidos por daño endotelial) (Strukova, 2000; Borissoff *et al.*, 2009). En efecto a través de la activación de receptores, la trombina media importantes efectos en el endotelio: inducción de la expresión de moléculas de adhesión como P- selectina (CD62P), E- selectina (CD62E) e ICAM-1 (CD54), que participan de manera coordinada para el rodamiento de leucocitos al sitio de lesión; también induce la síntesis y liberación de citocinas y factores de crecimiento que incluyen IL-1, IL-6, IL-8 y MCP-1 que actúan como quimioatrayentes para la activación periférica de leucocitos. Todas estas acciones a nivel endotelial indican que la trombina favorece los procesos coordinados que facilitan la trans migración de leucocitos desde la sangre al espacio extravascular.

Las acciones extravasculares de trombina incluyen la activación de fibroblastos tisulares, monocitos/macrófagos y mastocitos; además de promover la activación, adhesión y agregación plaquetaria y estimular la proliferación de células musculares lisas y fibroblastos, siendo un enlace entre el proceso inflamatorio y el mecanismo de la coagulación (Derian *et al.*, 2002).

### **2.2.6 Factor Xa.**

El factor X es una proteína vitamina K dependiente sintetizada en el hígado que circula como zimógeno inactivo y es activado a FXa por el complejo FT/FVII/FXa. o FIXa/FVIIIa. FXa pertenece a la familia de las serina proteasas que activa la trombina a partir de la protrombina. FXa circulante es una molécula constituida por cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas unidas por un enlace simple de disulfuro. El extremo N-terminal de la cadena ligera (residuos 1-39) es un dominio Gla, rico en ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico modificado que interactúa con fosfolípidos de membrana. El dominio Gla está seguido por una serie de residuos hidrófobos (residuos 40-45), y dos repeticiones de dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF). La cadena pesada de FXa contiene el sitio catalíticamente activo de serina proteasa (residuo de 254 aminoácidos). Residuos de His57, Asp102 y Ser195, forman una tríada catalítica en el sitio activo de unión al sustrato. La activación del FX a FXa implica la escisión de un péptido sencillo del extremo N-terminal de la cadena catalítica (Bauer *et al.*, 1989; Mann *et al.*, 1990; Faure *et al.*, 2007; Chattopadhyay *et al.*, 2009).

Diversos efectos proinflamatorios han sido atribuidos a FXa, demostrando ser agente mitogénico de células musculares lisas y promover la respuesta inflamatoria en células endoteliales, incluyendo la síntesis de NO. Además, induce respuestas proinflamatorias y deposición de factor de crecimiento de tejido conectivo, activación del factor nuclear kappa-B (NF-kB Nuclear Factor kB), liberación de IL-6, IL-8 y MCP-1 en las células endoteliales y fibroblastos. Asimismo, FXa promueve la expresión, de

E-selectina, ICAM 1 y VCAM-1 en células endoteliales, lo que resulta en un incremento en la adhesión de leucocitos (Borensztajn *et al.*, 2009; Scaldaferrri *et al.*, 2011). En sinergia con TNF $\alpha$ , FXa induce la expresión de FT a través de la inhibición de sus reguladores negativos: el inhibidor del factor kappa B alfa (IkB $\alpha$ ) y la proteína 3 inducida por TNF $\alpha$  (TNFAIP3) (Borensztajn *et al.*, 2009; Hezi-Yamit *et al.*, 2005). La mayoría de estas respuestas son mediadas a través de la activación de PAR-2, aunque algunos estudios muestran participación de PAR-1. Por otra parte, FXa también afecta a células del sistema inmune induciendo la secreción de IL-2 por los linfocitos (Scaldaferrri *et al.*, 2011). Finalmente, existe evidencia de que FXa puede mediar respuestas inflamatorias *in vivo*, ya que induce la formación de edema cuando es inyectado vía subcutánea en la pata de la rata (Cirino *et al.* 1997).

El hecho de que FXa constituye la vía común del sistema de la coagulación y que una molécula de FXa cataliza la formación de aproximadamente 1000 moléculas de trombina, lo hace un objetivo importante para el diseño de fármacos antitrombóticos. Los inhibidores del factor Xa pueden actuar directa o indirectamente. Los indirectos son análogos sintéticos de la secuencia pentasacárida que media la interacción de la heparina con ATIII, mientras que los inhibidores directos de FXa, bloquean la interacción de éste con su sustrato en una proporción de 1:1. (Hirsh *et al.*, 2005).

#### **2.2.6.1 Inhibidores directos de FXa.**

El otamixabán es un potente inhibidor directo sintético, y altamente selectivo para FXa que se administra por vía intravenosa (i.v.), con una vida media de 30 minutos y un rápido inicio y desaparición de la acción anticoagulante. La principal vía de eliminación de otamixaban es biliar (71%, como metabolito reducido) y orina (25%, como otamixaban). El metabolismo reductor se produce presumiblemente en el tracto gastrointestinal (Hinder *et al.*, 2006; Guertin y Choi, 2007).

Por su parte, EP217609 es un anticoagulante sintético parenteral de acción dual que combina un inhibidor indirecto de FXa (pentasacárido de unión a la ATIII), un inhibidor directo de trombina (peptidomimético derivado del  $\alpha$ -NAPAP) y una molécula de biotina. La vida media en ratas es de 2,9 h y la biodisponibilidad tras administración subcutánea (s.c.) es del 100% y se elimina parcialmente vía renal en forma inalterada (Petitou *et al.*, 2009; Gómez-Outes *et al.*, 2011).

Tanogitrán (BIBT 986) es un fármaco sintético de 542 Da que inhibe de manera directa, específica y reversible a FXa (Ki 26 nM) y trombina (Ki 2,7 nM) y ha mostrado una potente acción anticoagulante en modelos preclínicos de trombosis venosa en ratas y conejos, con una vida media de eliminación de 12 h (Graefe- Mody *et al.*, 2006).

Otros inhibidores de FXa incluyen a Rivaroxabán, el cual bloquea FXa tanto en su forma libre como la unida al complejo protrombinasa, Las concentraciones máximas en plasma se alcanzan rápidamente entre 2,5 a 4 h después de la administración oral, presentando una vida media de 7-11 h, 2/3 del fármaco se metaboliza por el hígado y una tercera parte es eliminada vía renal sin alteración.

Apixabán es un inhibidor directo de FXa libre y FXa unido al complejo protrombinasa, se administra por vía oral, siendo rápidamente absorbido por el tracto gastrointestinal, alcanzando una concentración plasmática máxima a las 3 h tras la administración, con una vida media de 8-14 h, además es metabolizado en hígado con baja excreción renal y mayor eliminación fecal (70%). Por su parte, Edoxabán es un inhibidor directo reversible de FXa, que se absorbe rápidamente con una buena biodisponibilidad, una vida media de 8-10 h, y de eliminación renal (Turpie, 2007; Gómez-Outes *et al.*, 2011).

Existen inhibidores naturales de FXa como Orgarón, un danaparoiide sódico constituido por una mezcla de glicosaminoglicanos sulfatados de bajo peso molecular

(sulfato de heparano, de dermatano y de condroitina) aislado de la mucosa intestinal del cerdo y con actividad antiXa/IIa >20. El péptido anticoagulante de garrapata (TAP Tick anticoagulant peptide, por sus siglas en inglés) es un inhibidor de FXa proveniente de la garrapata *Ornithodoros moubata*, eficaz en la prevención de las reoclusiones de las coronarias post-trombólisis en animales. Igualmente, la antistasina, péptido anticoagulante de la sanguijuela *Haementaria officinalis* (Fontenay, 2007).

### **2.2.6.2 Inhibidores indirectos de FXa.**

#### **2.2.6.2.1 Heparina no fraccionada (HNF).**

La heparina no fraccionada (HNF), es una molécula compuesta por una mezcla heterogénea de glucosaminoglicanos ramificados, presenta actividad anticoagulante y propiedades farmacocinéticas heterogéneas. Sus rangos de peso molecular varían aproximadamente entre 3.000 y 30.000 Da con un promedio de 15.000 (45 cadenas de monosacáridos), siendo su principal acción anticoagulante mediada por la interacción heparina/ATIII, debido a que, se une a sitios de lisina en la ATIII a través de una única unidad de glucosamina que contiene una secuencia pentasacárida, esta interacción genera un cambio conformacional en la ATIII, que favorece la exposición del residuo Arg<sub>393</sub> y favoreciendo a la vez, su interacción con la trombina, formándose de esta manera el complejo heparina-trombina-ATIII, de manera que la heparina se une simultáneamente al exosito II de la trombina y a la ATIII (Hirsh y Raschke, 2004; Di Nisio *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2005; Páramo *et al.*, 2009).

El complejo heparina/ATIII inactiva a trombina, FXa, FIXa, FXIa, y FXIIa; siendo la trombina y FXa más sensibles a la inhibición por dicho complejo. La heparina inhibe la trombina uniéndose a ambas proteínas: a la enzima de coagulación (a través de efecto inespecífico de cargas) y a la ATIII mediante el pentasacárido de alta afinidad; mientras que, la inhibición de FXa requiere solamente la unión de la heparina al pentasacárido

mencionado. En consecuencia, moléculas de heparina con menos de 18 sacáridos pierden la capacidad de unirse simultáneamente a la trombina y ATIII y no son capaces de catalizar la inhibición de trombina. En contraste, fragmentos pequeños de heparina que contienen el pentasacárido de alta afinidad catalizan la inhibición de FXa por ATIII.

Es conocido otro mecanismo anticoagulante de la heparina (independiente de ATIII y HCII) que consiste en la modulación de la generación de FXa. Dicho mecanismo carga-dependiente es mediado por la unión de heparina a FIXa y requiere de altas dosis de polisacáridos sulfatados para producir efecto anticoagulante.

Las dos vías principales de administración de heparina no fraccionada (HNF) son, la infusión i.v. y la inyección s.c. La dosis inicial s.c. debe ser de aproximadamente 10% mayor que la dosis habitual i.v. para superar la reducida biodisponibilidad. Cuando la heparina es administrada vía s.c. en una dosis de 35000 unidades más de 24 h (divididas en dos dosis) el retraso del efecto anticoagulante es de 1 h y el máximo nivel plasmático se obtiene aproximadamente en 3 h.

Cabe destacar, que una vez que HNF circula en plasma, puede unirse a células endoteliales y macrófagos, lo que disminuye su concentración y altera su farmacocinética. Además, tiene la capacidad de unirse a proteínas plasmáticas, reduciendo su actividad anticoagulante y contribuyendo de esta forma con la variabilidad de la respuesta en pacientes con alteraciones tromboembólicas y al fenómeno *in vitro* de resistencia a la heparina (Hirsh y Raschke, 2004).

Por otra parte, es conocido el efecto de HNF sobre las plaquetas, uniéndose al factor de Von Willebrand (vWF) e inhibiendo la función plaquetaria dependiente de ese factor. Adicionalmente, HNF puede unirse al factor plaquetario 4 (FP4) formando el complejo HNF/FP4, que puede ser reconocido por autoanticuerpos, induciendo una

reacción inmunológica. Finalmente, HNF *per se*, induce agregación plaquetaria, conllevando a trombocitopenia, activación plaquetaria y/o trombosis. (Hirsh y Raschke, 2004; Castelli *et al.*, 2007).

El aclaramiento de HNF se realiza mediante la combinación de dos mecanismos, uno rápido saturable y otro más lento. La fase saturable es mediada por la unión de HNF a receptores expresados en células endoteliales y macrófagos donde ocurre su despolimerización, mientras que la fase lenta no saturable contempla su eliminación vía renal (Hirsh y Raschke, 2004).

A partir de la HNF se han preparado las heparinas de bajo peso molecular (HBPM), mediante métodos enzimáticos o químicos (Tabla 2), tales como: despolimerización con ácido nitroso (dalteparina, nadroparina, reviparina), degradación enzimática (tinzaparina) o benzilación seguida de hidrólisis alcalina (enoxaparina) (Xianxiang, 2010).

**Tabla 2. Métodos de obtención de heparinas de bajo peso molecular (HBMP).**

<b>HBPM</b>	<b>Método de obtención</b>
Dalteparina	Despolimerización con ácido nítrico + cromatografía de intercambio iónico (gel filtración)
Enoxaparina	Benzilación + despolimerización alcalina
Nadroparina	Despolimerización con ácido nítrico + precipitación con etanol
Tinzaparina	Despolimerización enzimática con heparinasa
Bemiparina	Despolimerización beta eliminación medio no acuoso

HBPM= Heparinas de bajo peso molecular

Tomado de Fernández, 2002

### 2.2.6.2.2 Heparinas de bajo peso molecular (HBPM).

Las HBPM son glucosaminoglicanos polisulfatados cuyo peso molecular equivale a un tercio del peso molecular de HNF, con un promedio entre 4.000 y 5.000 Da (aproximadamente 15 unidades de monosacáridos por molécula), con un rango de 2.000 a 9.000 Da (Tabla 3). En comparación con HNF, las HBPM tienen una menor capacidad para inactivar la trombina debido a que los fragmentos más pequeños no se pueden enlazar simultáneamente a ATIII y trombina, no obstante, presentan mejor actividad anticoagulante anti-FXa (Hirsh y Raschke, 2004).

**Tabla 3. Pesos moleculares medios y distribución de fragmentos de HBMP**

<b>HBMP</b>	<b>Peso molecular medio (daltons)</b>	<b>Rango de pesos moleculares (%)</b>
Dalteparina	5.700	2.000 - 9.000 (90%)
Enoxaparina	4.500	2.000 - 8.000 (68%)
Nadroparina	4.300	2.000 – 8.000 (75 – 95%)
Tinzaparina	6.500	2.000 – 8.000 (60 – 72%)
Bemiparina	3.600	2.000 – 6.000 (50 – 75%)
HNF	15.000	2.000 – 8000 (< 15%)

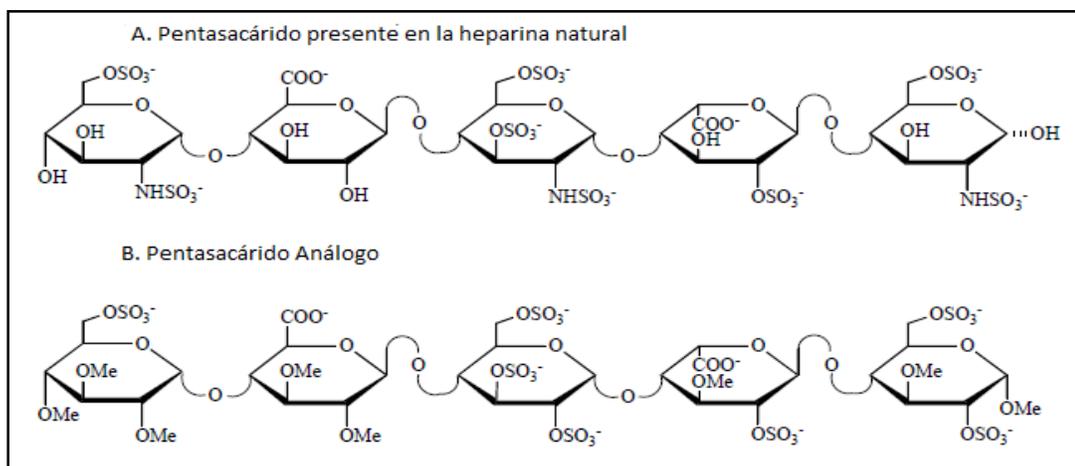
HBPM= Heparinas de bajo peso molecular

Tomado de Fernández, 2002.

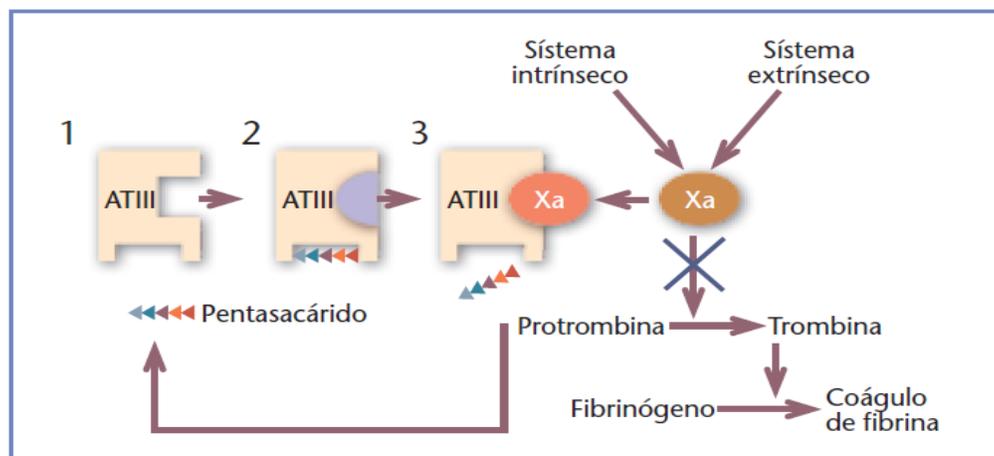
Por otro lado, las HBPM presentan menos capacidad de unirse a proteínas plasmáticas, permitiendo predecir la relación dosis-respuesta. Otra propiedad, es la baja incidencia de unión a células endoteliales y macrófagos, lo que incrementa su vida media en plasma con respecto a HNF, además, se unen con menos afinidad a las

plaquetas y PF4, lo que explica en parte, la baja incidencia de trombocitopenia inducida por heparina (TIH).

Al igual que HNF, las HBPM tienen efecto anticoagulante sobre ATIII, cuya interacción es mediada por la secuencia única de pentasacárido (Figura 8). Debido a que es requerido un mínimo de 18 sacáridos de longitud de la cadena (incluyendo el pentasacárido) para la formación del complejo ternario entre la heparina, trombina y ATIII, sólo 25 a 50% de las especies de HBPM que presentan una longitud de cadena mayor que el número crítico, inactivan la trombina. Por el contrario, todas las cadenas de HBPM que contienen el pentasacárido de alta afinidad catalizan la inactivación de FXa (Figura 9).



**Figura 8. Estructuras moleculares de la secuencia pentasacárido presente en la heparina y sus derivados sintéticos.** La heparina se compone de residuos alternos de hexosamina (D-glucosamina) y ácido hexurónico (ácido-L-idurónico o -D ácido-glucurónico), unidos por enlaces glucosídicos (1,4). (Tomado de Ma *et al.*, 2007).



**Figura 9. Mecanismo de inhibición del factor Xa por el pentasacárido de heparina.**

La secuencia pentasacárida presente en la heparina, se une principalmente al sitio reactivo de ATIII, produciendo un cambio conformacional en la estructura, que favorece la actividad inhibitoria de la serpina, e inactiva los efectos de la proteasa (Tomado de Carretero, 2006).

Debido a que prácticamente todas las moléculas de HNF contienen por lo menos 18 unidades de sacáridos, presentan actividad anti-Xa/anti-IIa con relación 1:1, mientras que, las preparaciones comerciales de HBPM presentan actividad anti-Xa/anti-IIa variable, dependiendo de su peso molecular, desde una relación 2:1 hasta 4:1 (Tabla 4).

Estudios previos han demostrado una biodisponibilidad de HBPM cercana al 100% cuando es administrada a dosis bajas vía s.c, con un pico anti-FXa entre 3 a 5 h después de la inyección y una dosis-respuesta más predecible. Además, la vida media de eliminación de HBPM es más larga (3 a 6 h después de la inyección s.c) y no depende de la dosis, al compararla con HNF. Por otra parte, el pico plasmático anti-FXa varía entre las preparaciones individuales de HBPM dados en la misma dosis debido a las variaciones en la farmacocinética, no obstante, después de una dosis terapéutica de HBPM ajustada al peso y administrada vía s.c., la actividad anti-FXa presenta un pico

en aproximadamente 4 h, y este es el tiempo recomendado para realizar el seguimiento de ensayos (Hirsh y Raschke, 2004).

**Tabla 4. Relación de pesos moleculares y acción antitrombótica/anticoagulante de las heparinas de bajo peso molecular.**

<b>HBPM</b>	<b>Rango de pesos moleculares (daltons)</b>	<b>% (2.000 – 6.000 daltons)</b>	<b>Relación Anti Xa/anti IIa</b>
Dalteparina	2.000 – 9.000	56%	2,3:1
Enoxaparina	3.000 – 8.000	64%	3,3:1
Nadroparina	2.000 – 8000	65%	3,0:1
Tinzaparina	3.000 – 6.000	42%	1,9:1
Bemiparina	3.000 – 4.200	75%	8:1

HBPM= Heparinas de bajo peso molecular.

Tomado de Fernández, 2002.

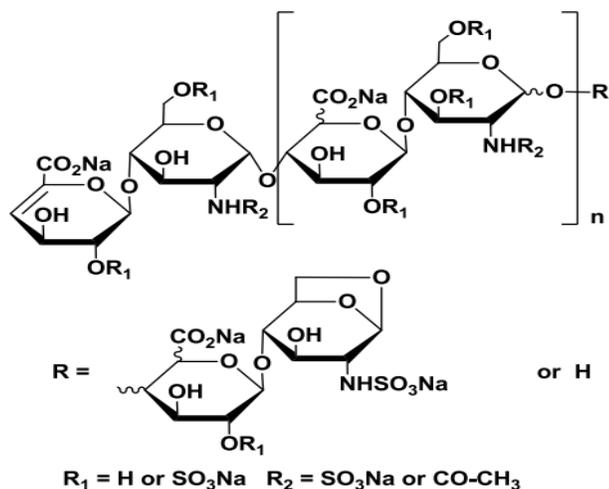
Los dos productos más utilizados en cardiopatía isquémica son la dalteparina y la enoxaparina. La dosis de dalteparina es 120 U/12 h vía s.c. y la de enoxaparina es 1 mg/Kg/12 h. Debido al efecto anticoagulante estable, el tratamiento no se controla. Ambas deben ajustarse (a la mitad de la dosis) en pacientes con insuficiencia renal (debido a que su eliminación es por esta vía), edad avanzada y coadministración con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (Arzamendi *et al.*, 2006).

Diversos estudios coinciden en que, además del efecto anticoagulante, HNF y HBPM, también presentan propiedades antiinflamatorias, demostrado a través de modelos de inflamación animal y celular. HNF disminuye el reclutamiento de neutrófilos inducido por LPS, los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , complejo TAT, además, inhibe la formación de trombos, la deposición de fibrina, expresión de TNF $\alpha$ ,

IL-1 $\beta$  y transcripción de genes que codifican para FT (Ding *et al.*, 2011). Otros estudios señalan que ambas; HNF y HBPM son potentes inhibidores de la activación del complemento y expresión de moléculas de adhesión como P y L-selectinas. Otras propiedades antiinflamatorias de la heparina incluyen la inhibición de proteasas catiónicas de neutrófilos, elastasa de leucocitos humanos y catepsina G, tanto *in vitro* como *in vivo*. En células endoteliales, inhibe la activación y translocación de NF-kB. Adicionalmente, HNF y HBPM son capaces de inhibir *in vitro* la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la interacción de los productos finales de glicación avanzada (AGEs Advanced Glycation End product) con el receptor de productos de glicación avanzada (RAGE Receptor for Advanced Glycation End products), y bloquear la señalización proinflamatoria y profibrótica que conduce a nefropatía en modelos animales experimentales de diabetes e insuficiencia renal. Sin embargo, HNF y HBPM no se han empleado comúnmente como terapia antiinflamatoria debido al riesgo de hemorragia (Rao *et al.*, 2010; Xianxiang, 2010).

#### **2.2.6.2.2.3 Enoxaparina**

La enoxaparina, es una HBPM que se obtiene por despolimerización alcalina del éster bencílico de heparina a partir de la mucosa intestinal porcina, presentando un peso molecular de 4.500 Da aproximadamente (3.500-5.500) (Figura 10). En sistema purificado *in vitro*, posee una actividad anti-FXa elevada (alrededor de 100 UI/mg) y una débil actividad anti-FIIa o antitrombínica (aproximadamente 28 UI/mg), siendo la relación entre estas dos actividades de 3.6, aproximadamente. Además de su actividad anti-Xa/IIa, se han identificado más propiedades antitrombóticas y antiinflamatorias en individuos sanos y pacientes, así como en modelos no clínicos. Esto incluye la inhibición de ATIII dependiente de otros factores de coagulación como FVIIa, la inducción de la liberación de TFPI, así como, una reducción en la liberación de vWF desde endotelio vascular a la circulación sanguínea (AEMPS, 2014).



**Figura 10. Estructura química de enoxaparina.** La estructura de enoxaparina se caracteriza por un grupo ácido 2-O-sulfo-4-enepiranosurónico en el extremo no reductor; un grupo 2-N, 6-O-disulfo-D-glucosamina en el extremo reductor de la cadena y aproximadamente 20% de la estructura de la enoxaparina contiene un derivado 1,6 anhidro en este extremo. (Tomado de Xu *et al.*, 2015).

La determinación de la actividad farmacocinética anti-Xa y anti-IIa se efectúa por método amidolítico validado, con substratos específicos y un estándar de enoxaparina calibrado frente al patrón internacional LMWH1 (por sus siglas en inglés *Low Molecular Weight Heparin 1<sup>st</sup>*) del NIBSC (por sus siglas en inglés *National Institute for Biological Standards and Control*). En humanos, la biodisponibilidad de enoxaparina, basada en la actividad anti-Xa, es cercana al 100% tras la inyección s.c., observando una actividad máxima 3-5 h. después, y alcanzando 0,2; 0,4; 1,0 y 1,3 UI anti-Xa/mL, tras la administración s.c. única de 20 mg (2000 UI), 40 mg (4000 UI) 1 mg/Kg (100 UI/Kg) y 1,5 mg/Kg (150 UI), respectivamente. Por otra parte, la actividad plasmática anti-IIa, tras la administración s.c., es aproximadamente 10 veces menor que la actividad anti-Xa, observando el máximo de actividad anti-IIa de 3 a 4 h después de la administración y alcanzando 0,13 UI/mL y 0,19 UI/mL tras la administración

repetida de 1 mg/Kg dos veces al día y, 1.5 mg/Kg una vez al día, respectivamente (AEMPS, 2014).

La enoxaparina sódica se metaboliza en el hígado por desulfatación y/o despolimerización, su eliminación parece ser monofásica con una vida media de 4 h aproximadamente tras una única dosis, y de 7 h tras una dosificación repetida. La eliminación de la enoxaparina y sus metabolitos sucede por vía renal y biliar. El aclaramiento renal de fragmentos activos representa aproximadamente el 10% de la dosis administrada, y el total de la excreción renal de los fragmentos activos y no activos representa aproximadamente el 40% de la dosis administrada (AEMPS, 2014).

#### **2.2.6.2.3 Heparinas de ultra-bajo peso molecular (HUBPM).**

La semuloparina, es una HUBPM de 2.400 Da, con predominio de actividad anti-FXa (relación anti-Xa:anti-IIa >30) y una vida media entre 11 y 22 h que permite la administración s.c. una vez al día. Se obtiene por despolimerización de la heparina de la mucosa intestinal del cerdo. En un modelo de trombosis venosa en ratas, semuloparina mostró una actividad antitrombótica comparable a la de enoxaparina, pero a dosis inferiores (Dubruc *et al.*, 2009; OMS, 2009; Viskov *et al.*, 2009; Eikelboom y Weitz, 2010).

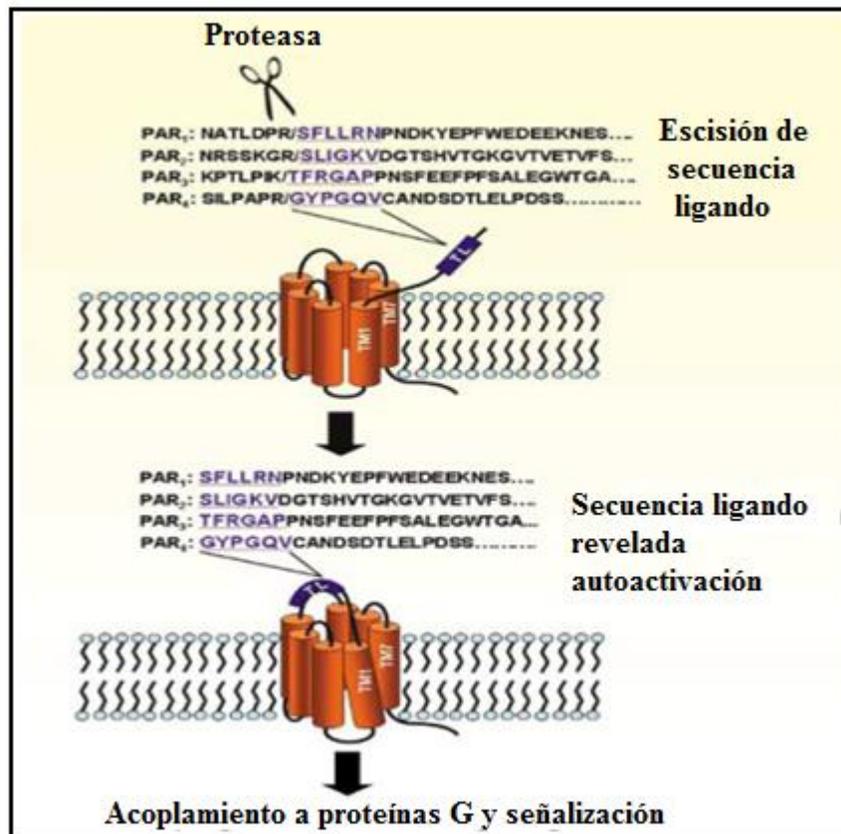
El fondaparinux sódico, un análogo sintético de la secuencia de pentasacáridos presente en HNF y HBPM, es un inhibidor indirecto y selectivo de FXa, por unión a ATIII (Hirsh *et al.*, 2005; Maínez y Moya, 2006). Fondaparinux no tiene efecto sobre las plaquetas, tiempo de sangrado o actividad fibrinolítica. A dosis fija s.c., presenta una respuesta anticoagulante predecible, sin necesidad de monitorización, siendo su vida media de eliminación entre 17 y 21 h exclusivamente renal (64% al 77%) (Hirsh *et al.*, 2005; Maínez y Moya, 2006; De Lisa *et al.*, 2011).

Idraparinux, es un derivado hipermetilado del fondaparinux que se une con mayor afinidad a ATIII por su mayor carga negativa, lo que se traduce en una vida media prolongada entre 80 y 130 h, permitiendo su administración una vez por semana. Se absorbe casi por completo después de su inyección por vía s.c., la concentración plasmática máxima se alcanza a las 4 h después de la administración y se excreta vía renal.

Idrabiotaparinux (idraparinux biotinilado), es un pentasacárido sintético de acción prolongada. Muestra propiedades anticoagulantes similares a las de idraparinux pero se diferencia por su unión con la biotina, de manera que el efecto anticoagulante de idrabiotaparinux puede ser rápidamente neutralizado después de la perfusión intravenosa i.v. de avidina, un antídoto derivado de la proteína de huevo (Paty *et al.*, 2010).

### **2.2.7 Receptores activados por proteasas (PARs).**

El efecto de trombina y factores VIIa y Xa sobre las células es mediado por su interacción con receptores de superficie celular acoplados a proteína G o receptores activados por proteasas (PAR, Proteinase-Activated Receptor, por sus siglas en inglés), los cuales han sido localizados en células endoteliales, plaquetas, fibroblastos, células musculares lisas, monocitos, osteoblastos, neuronas, células gliales, y mastocitos. Se han identificado 4 tipos (PAR 1 a 4), de los cuales, sólo los PAR 1, 3 y 4 son activados por trombina, mientras que el PAR 2, es activado por el complejo FT/FVIIa, FXa y tripsina. La activación de estos receptores ocurre cuando la proteasa de serina reconoce y escinde una secuencia en el extremo N-terminal (dominio extracelular) del receptor desenmascarando un nuevo extremo N-terminal, que actúa como ligando activando al receptor (Figura 11) (Dugina *et al.*, 2002; Vergnolle *et al.*, 2002).



**Figura 11. Mecanismo de autoactivación de los receptores activados por proteasas (PARs):** Tras la escisión proteolítica del extremo N-terminal ( $\text{NH}_3^+$ ) del PAR por trombina, tripsina o triptasa (dependiendo del subtipo del receptor), se expone un nuevo resto N-terminal ( $*\text{NH}_3^+$ ) y se desenmascara la secuencia que autoactiva el receptor acoplado a proteína G. TM1: primer dominio transmembranar. TM7: séptimo dominio transmembrana. COO-: grupo carboxiterminal (Tomado de Ramachandran y Hollenberg, 2008).

### **a) Receptor activado por proteasas-1 (PAR-1).**

PAR-1 es el prototipo de la familia de receptores heptahelicoidales acoplados a proteína G (GPCRs), que es activado por proteólisis vía N-terminal por proteasas de serina (APC, tripsina, triptasa, plasmina, catepsina G, FXa, trombina). La trombina (activador fisiológico de PAR-1) se acopla a dos sitios en el residuo N-terminal de PAR-1. La interacción inicial es entre el sitio de reconocimiento de unión a anión de la trombina (Exosítio I) y una superficie de hirudina cargada negativamente en PAR-1 (DK51YEPF55). Esta interacción de alta afinidad induce un cambio conformacional que facilita la unión de trombina a PAR-1 por escisión de la secuencia (LDPR412S42FLLRN). En consecuencia, queda expuesto un nuevo péptido N-terminal: NSFLLRN (secuencia humana) que actúa como ligando activador del receptor que inicia la señalización intracelular (Coughlin, 2000; Dugina *et al.*, 2002).

Cabe destacar que PAR-1 no es activado exclusivamente por trombina, sino también, por otras proteasas de serina (FVIIa, FXa, ACP), además, su clivaje no conduce necesariamente a la activación del receptor, sino que pueden producirse escisiones no productivas en los sitios de corte del ligando del receptor, conllevando a que no haya activación proteolítica del receptor (permaneciendo estructuralmente intacto); sugiriendo un mecanismo de regulación (además de los mecanismos de fosforilación, internalización y desensibilización) para finalizar la señalización. Un ejemplo de ello es la catepsina G, una proteasa liberada por los neutrófilos activados, aunque puede activar PAR-1 en sistemas heterólogos, la sobreexpresión de escisión no productiva parece predominar fisiológicamente (Molino *et al.*, 1995).

Los efectos de la activación de PAR-1 han sido demostrados en diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*: La estimulación de monocitos con trombina a través de PAR-1 conlleva a un incremento en la expresión de MCP-1, adicionalmente la trombina puede modular la liberación de IL-6, proteína básica plaquetaria y FP4 por

parte de monocitos. La activación de PAR-1 en leucocitos incrementa el rodamiento y adhesión de estos al endotelio. En pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino, PAR-1 es sobreexpresado en células del colon e induce respuesta inflamatoria mediada por linfocitos T y B, además, la activación de PAR-1 resulta ser exacerbada y prolongada en modelos de inflamación colónica inducida por ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS). La activación de PAR-1 es fundamental en el desarrollo de lesión pulmonar en modelo animal de instilación intratecal con bleomicina, en el que ratones con deficiencia de PAR-1 mostraron una significativa atenuación de células inflamatorias (Shpacovitch *et al.*, 2008). PAR-1 también se expresa en nervios sensoriales aferentes (fibras C y  $\delta$ ) del sistema nervioso periférico. *In vivo*, la activación de este receptor resulta en la liberación de SP y CGRP, que median el edema. Además, en tejido cerebeloso, el exceso de trombina, vía PAR-1 incrementa la neuroexcitabilidad y el daño neuronal posterior a una lesión (García *et al.*, 2010).

Por otra parte, los efectos antiinflamatorios de PAR-1 han sido descritos, en un modelo de artritis inducida por albúmina sérica bovina metilada (BSA Bovine Serum Albumin, por sus siglas en inglés), la activación de PAR-1 en ratones, redujo significativamente la severidad de artritis y los niveles plasmáticos de IgG (Shpacovitch *et al.*, 2008).

Es importante acotar que, la activación de PAR-1 por FXa difiere de la estimulación con trombina en la cinética de escisión y la actividad requerida de la enzima para escindir PAR-1. La activación por trombina muestra una cinética más rápida para inducir la unión de NF-kB y posteriormente la respuesta de los genes a la proteasa. Tanto PAR-1 como PAR-3 tienen una secuencia de hirudina que muestran alta complementariedad con el exosito I de la trombina; esto favorece el reconocimiento de PAR-1 por la trombina. Debido a que el exosito I de unión al sustrato de FXa es ácido, la unión de FXa a la región de hirudina de PAR-1 es poco probable, por lo tanto, FXa no puede interactuar con PAR-1 con la misma afinidad que

lo hace la trombina. En consecuencia, solo una porción de PAR-1 es susceptible a escisión vía FXa. Sin embargo, a diferencia de la trombina, puede unirse a la membrana celular a través de su extremo amino-terminal con dominio Gla. La inducción de genes vía PAR-1 requiere una concentración de FXa en un rango de 10 -100 nM, muy similar a la requerida para la activación mediada por PAR-2 en fibroblastos. Por lo tanto, parece que el componente principal para la señalización es la localización de FXa en la superficie celular próxima al receptor y no la secuencia de reconocimiento específica del sitio de escisión en el PAR respectivo (Riewald *et al.*, 2001).

#### **b) Receptor activado por proteasas 2 (PAR-2).**

PAR-2, es el único PAR que no es activado por trombina, es escindido y activado por tripsina, triptasa de mastocitos, FVIIa y FXa. La escisión de PAR-2 en el péptido de unión N-terminal R<sup>34</sup>–S<sup>35</sup> es responsable de la activación proteolítica e iniciación de señalización del receptor. Péptidos sintéticos son capaces de escindir y activar PAR-2. Una glicosilación unida al extremo N-terminal de PAR-2 parece regular la señalización por triptasa pero no por tripsina u otro péptido agonista, indicando que las modificaciones post-traduccionales pueden conferir especificidad. Además, la presencia de cofactores en la superficie celular puede orientar la proteasa y modular alostéricamente su actividad a favor del clivaje de PAR-2. FVIIa puede activar PAR-2 directamente en el complejo FT/FVIIa o indirectamente a través de la generación de FXa, siendo más eficiente al formarse el complejo ternario FT/FVIIa/FXa. La unión de FT/FVIIa a su receptor celular puede inducir la producción de diversas citocinas y factores de crecimiento, además, incrementa la respuesta inflamatoria (producción de especies reactivas del oxígeno, expresión de moléculas del complejo de histocompatibilidad de clase II y moléculas de adhesión celular) en macrófagos, favorece la infiltración de neutrófilos y la expresión de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Arora *et al.*, 2007; Levi *et al.*, 2012).

La estimulación de neutrófilos humanos con agonistas de PAR-2 (tc-LICRLO-NH<sub>2</sub> o tripsina), incrementa la motilidad de estas células en superficies de colágeno, además, agonistas de PAR-2 incrementan la expresión de L-selectina en la superficie celular de neutrófilos humanos, lo que sugiere que PAR-2 podría intervenir en la migración de neutrófilos a través de la matriz extracelular. Sin embargo, se ha señalado que la estimulación simultánea de neutrófilos y células endoteliales humanas con proteasas (tripsina, triptasa) vía PAR-2, reduce la migración transendotelial de granulocitos y prolonga la vida de neutrófilos *in vitro*. Asimismo, agonistas de PAR-2, incrementan la expresión del antígeno de macrófagos (Mac-1 Macrophage-1 antigen) e integrina VLA-4 (*Very Late Antigen -4* por sus siglas en inglés), y estimulan la liberación de IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-6 por neutrófilos (Shpacovitch *et al.*, 2008)

La mediación de PAR-2 en el dolor ha sido estudiada en modelos animales. La activación del receptor en fibras C amielínicas del nervio safeno, incrementa la respuesta a estímulos térmicos y disminuye el umbral de activación necesario para la respuesta al dolor. La activación de PAR-2 por liberación de SP o neurokinina-1 en neuronas espinales favorece la sensibilización y respuesta hiperalgésica por estímulo periférico (García *et al.*, 2010)

### **c) Receptor activado por proteasas-3 (PAR-3).**

PAR-3 fue descrito en ratones deficientes de PAR-1, cuyas plaquetas fueron activadas por trombina y presenta una secuencia consenso para el exosito I de la proteasa. En humanos es expresado en médula ósea, corazón, cerebro, placenta, hígado, páncreas, timo, intestino delgado, estómago, nódulos linfáticos y tráquea, mientras que en ratones, es expresado en megacariocitos y plaquetas (Derian *et al.*, 2002). Se conoce poco acerca de este receptor, debido a la deficiencia de un agonista selectivo, lo que ha limitado las investigaciones sobre sus funciones. Sin embargo, se ha demostrado que, en plaquetas

humanas no se expresa, lo que sugiere que PAR-3 no presenta una acción importante, en contraste con las plaquetas de ratones (Steinhoff *et al.*, 2005).

#### **d) Receptor activado por proteasas-4 (PAR-4).**

PAR-4 es activado por trombina, catepsina G, FXa y tripsina (Derian *et al.*, 2002; Dale y Vergnolle, 2008). Se ha demostrado que la activación de PAR-4 induce reclutamiento de granulocitos, favoreciendo el rodamiento y adhesión de leucocitos a la pared vascular y edema por incremento en la permeabilidad vascular, mediante la liberación de cininas activas de las células endoteliales y de neutrófilos, que se unen y activan receptores B2, favoreciendo la respuesta inflamatoria (Vergnolle, 2009). A su vez, PAR-4 ha sido implicado en la activación de plaquetas mediada por trombina, mediante la activación de  $G_{12/13}$  y  $G_q$ . Por otra parte, este receptor es expresado por neuronas de DRG que liberan SP y CGRP, por lo cual al activarse puede participar en la respuesta nociceptiva (Dale y Vergnolle, 2008).

#### **2.2.8 Dolor y transmisión nociceptiva.**

La sensación de dolor constituye un elemento crucial en la protección de los seres vivos contra daño a los tejidos por estímulos mecánicos, químicos y térmicos. La estimulación nociva provoca una serie de cambios fisiológicos en el organismo diseñados para minimizar el riesgo de daño. A nivel de conducta, generalmente ocurre una retirada del sitio estimulado, aparte de la conducta motora tal como: ataque o huida y actividad autónoma caracterizada por cambios en la respiración, frecuencia cardíaca y presión sanguínea (Hunt y Bester, 2005; Yoshimura y Furue, 2006).

La Asociación Internacional para el estudio del dolor lo define como “una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a una lesión tisular actual o potencial”. El dolor se divide en dos categorías: dolor patológico (neuropático y

funcional) y adaptativo (inflamatorio y nociceptivo), contribuyendo este último a la supervivencia del organismo protegiéndolo de daños o promoviendo la recuperación posterior a una lesión (Gebhart, 2000; Woolf, 2004).

El dolor nociceptivo se define como una sensación fisiológica vital y transitoria en respuesta a un estímulo nocivo. La nocicepción se refiere únicamente al mecanismo por el cual se genera el dolor nociceptivo, e involucra los mecanismos de transducción (convierte el estímulo nocivo, ya sea mecánico, térmico o químico en una señal eléctrica), conducción (paso del estímulo desde las terminales periféricas a la médula espinal y a centros supraespinales), transmisión (transferencia sináptica a neuronas dentro de láminas específicas del asta dorsal) y percepción (integración de los tres anteriores, creando la “experiencia dolorosa”) (Woolf, 2004; Kidd y Urban, 2001; Torregrosa, 1994).

Para que el dolor se origine es necesaria la activación de nociceptores, los cuales son terminaciones nerviosas libres de las fibras C y A $\delta$  que constituyen las neuronas aferentes de primer orden. Los nociceptores son muy heterogéneos, estos se diferencian en el neurotransmisor que liberan, los receptores y canales iónicos que expresan para los diferentes mediadores del dolor, en su velocidad de conducción, sus propiedades de respuesta ante un estímulo nocivo y su capacidad de sensibilizarse durante el daño y/o inflamación (Torregrosa, 1994; McCleskey y Gold, 1999; Stucky *et al.*, 2001).

Con relación a las fibras aferentes, las fibras A $\delta$  son de dos tipos I y II, estas fibras tienen axones ligeramente mielinizados, lo que hace que la velocidad de conducción sea rápida (5-30 m/s), tienen un diámetro de 1-5  $\mu$ m, con un campo receptivo pequeño y canales iónicos específicos de alto umbral que son activados por estímulos térmicos o mecánicos de alta intensidad; estas fibras median el dolor pasajero y punzante. Las fibras de tipo II responden a estímulos térmicos nocivos de 40-45 °C y son sensibles a capsaicina. El incremento paulatino de la temperatura provoca un aumento en la

respuesta de estas fibras. En cambio, las fibras tipo I responden a temperaturas mayores de 52-56 °C y son insensibles a capsaicina (Hunt y Mantyh, 2001; Steeland *et al.*, 2006).

Por otra parte, las fibras C tienen axones sin mielina con un diámetro de 0,25- 5 µm y su conducción es lenta (0,5-2 m/s), tienen un campo receptivo mayor al de las fibras Aδ; median el dolor quemante y representan aproximadamente 70% de todos los nociceptores. Estas fibras son polimodales, es decir, son activadas por estímulos mecánicos, térmicos y químicos. Las sustancias químicas que estimulan a las fibras C son producto de un daño celular inducido por la cascada inflamatoria y mediadores inmunológicos. Las fibras polimodales han sido divididas en dos grupos en base a su contenido de péptidos o FRAP, y en base al sitio donde terminan en la médula espinal (Hunt y Mantyh, 2001). Un grupo de fibras C contiene una variedad de neuropéptidos que incluye SP, CGRP y expresa el receptor trkA de alta afinidad para el factor de crecimiento nervioso (Stucky *et al.*, 2001; Kidd y Urban, 2001; Giordano, 2005). Estas neuronas se proyectan hacia la región más externa del ADM (lámina I y lámina II externa) y terminan en las neuronas espinales que se proyectan hacia el tálamo. Las fibras identificadas por el contenido de FRAP no expresan SP o trkA, contienen pocos neuropéptidos pero expresan un grupo de carbohidratos superficiales que se unen selectivamente a IB<sub>4</sub> (Bennett *et al.*, 1998; Julius y Basbaum, 2001; Molliver *et al.*, 2005). Las neuronas IB<sub>4</sub> positivas median el dolor neuropático, mientras que las IB<sub>4</sub> negativas responden a calor y químicos nocivos (bajo pH y 5HT) e incrementan su concentración durante la inflamación, lo que sugiere que son mediadoras del dolor inflamatorio (Snider y McMahon, 1998; Stucky y Lewin, 1999; Stucky *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2005).

Una vez producido el estímulo, es transmitido a través de los aferentes hacia la sustancia gelatinosa del ADM, las fibras Aδ terminan en las láminas I, II y IIa, mientras que las fibras C en Ia, II, III y V (Giordano, 2005).

La vía ascendente del dolor continúa con las neuronas de primer orden, las cuales hacen sinapsis con las de segundo orden, formando el tracto espinotalámico transmitiendo los estímulos dolorosos al núcleo del tálamo ventroposterior (núcleo medial ventroposterior (VPM) y el núcleo lateral ventroposterior (VPL), donde se integran los impulsos dolorosos del tálamo. En esta región las neuronas de segundo orden hacen sinapsis con las de tercer orden, las cuales transmiten el impulso hacia la corteza cerebral, donde ocurre la interpretación subjetiva (Rang *et al.*, 2000; Wickenden *et al.*, 2004; Woolf, 2004).

La percepción del estímulo doloroso en la corteza cerebral provoca que se active la vía descendente, la cual es inhibitoria y controla el impulso en el asta dorsal. Una parte importante de este sistema es la materia gris periacueductal (PAG, por sus siglas en inglés), la cual recibe proyecciones del hipotálamo, la corteza y el tálamo. A partir de PAG se proyectan neuronas hacia la parte baja del tallo cerebral en la médula rostroventromedial (RVM), específicamente al núcleo de *raphe magnus* (NRM, por sus siglas en inglés) y de ahí se transmite el impulso por las fibras del cordón dorsolateral de la médula espinal que forma conexiones sinápticas sobre las interneuronas del ADM, las cuales inhiben la descarga de las neuronas espinotalámicas (Stamford, 1995; Rang *et al.*, 2000; Hunt y Mantyh, 2001).

Los principales neurotransmisores implicados en el control descendente del dolor son la 5-HT, noradrenalina (NA) y opioides endógenos  $\beta$ -endorfina y dinorfina. La médula RVM cuenta con neuronas que contienen 5-HT en el NRM, éstas se proyectan al ADM y al activarse producen antinocicepción, mientras que el principal núcleo noradrenérgico es el locus coeruleus (LC). En lo que respecta a los opioides, los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  se relacionan con el control descendente del dolor, ambos receptores se expresan mayormente en el LC, y DNR; además, los receptores  $\mu$  también son expresados en la porción caudal de la materia PAG (Stamford, 1995).

Para que se genere el dolor nociceptivo es necesario que se produzcan cambios de permeabilidad en los canales iónicos expresados por los nociceptores. Los principales canales responsables de las corrientes entrantes en la membrana de los nociceptores son los canales de sodio ( $\text{Na}_v$ ) y los de calcio ( $\text{Ca}_v$ ), mientras que la transmisión de la corriente saliente se realiza a través de los canales de potasio ( $\text{K}_v$ ); siendo todos estos, voltaje dependiente (Yunjong *et al.*, 2005).

### **2.2.9 Mecanismos inflamatorios asociados a la nocicepción**

Al presentarse una lesión tisular, las células lesionadas e indemnes circundantes, generan la secreción de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, TNF $\alpha$  e IL-6, reduciendo el umbral de descarga en el aferente primario tanto para estímulos mecánicos como químicos. Además son liberados factores tróficos y quimiotácticos, como NGF, factor neural derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) y neurotrofinas (NT<sub>3</sub> y NT<sub>4</sub>), los cuales promueven la respuesta inmune al incrementar a su vez la secreción de citocinas proinflamatorias que determinan en parte las manifestaciones tempranas del proceso inflamatorio. Adicionalmente, NGF interviene sobre la función nociceptiva provocando hiperalgesia térmica y mecánica (Shu y Mendell, 1999; Eblen-Zajjur, 2005 a,b).

Por otra parte, los factores proinflamatorios incrementan la liberación de neurotransmisores como el glutamato, SP, HT catecolaminas y péptidos opiáceos endógenos que intervienen en la modulación de la señal nociceptiva; además, inducen incremento de la actividad de COX<sub>2</sub>, incrementando los niveles de PGE<sub>2</sub> que induce sensibilización de los aferentes primarios.

Las citocinas proinflamatorias pueden activar los aferentes primarios a través del incremento en la actividad de nNOS, que aumenta la concentración de NO,

promoviendo la generación intracelular de GMPc y la actividad de proteinquinasa C (PKC), favoreciendo la despolarización celular por apertura de canales de calcio y sodio, y consecuente efecto nociceptivo.

El NO promueve la producción de Bradicinina (Bk), la cual activa a PKC e induce apertura de canales ionotrópicos para calcio y sodio, aumenta la liberación de glutamato, SP, IL-2, y CGRP, e induce la expresión de COX<sub>2</sub> y síntesis de PGE<sub>2</sub>, lo cual induce a vasodilatación, eritema, fiebre y mayor sensibilización de aferentes primarios.

Por su parte, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), NGF y PGE<sub>2</sub> aumentan la concentración de calcio iónico intracelular por apertura de canales de calcio de la membrana celular y/o mediante el incremento de la síntesis de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) que conlleva a la liberación de calcio a partir de los depósitos intracelulares. El calcio se une a la calmodulina (CM) formando el complejo CaM/Ca que incrementa la actividad de iNOS, manteniendo abiertos los canales de calcio y sodio, y por ende la despolarización celular. Por el contrario, la calcineurina (CN) otra molécula de fijación de calcio y las fosfatasas inhiben la acción de la PKC sobre los canales iónicos de membrana induciendo un efecto antinociceptivo.

La persistencia en el incremento de calcio intracelular y activación de PKC promueve la activación de factores de transcripción y protooncogenes (CREB, C-fos, Jun-D y Kroxs-24), que inducen la expresión de canales de calcio y sodio voltaje-dependiente y el consecuente efecto despolarizante. Adicionalmente, los fosfolípidos, lipopolisacáridos, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  y PGE<sub>2</sub> generados en el sitio de lesión, actúan en el hipotálamo induciendo la aparición de manifestaciones clínicas tales como: fiebre, apatía y astenia (Eblen-Zajjur, 2005 a,b).

### **2.2.10 Mecanismos inflamatorios asociados a las quemaduras.**

Las quemaduras son lesiones de tejidos vivos resultantes de la exposición a agentes físicos y/o químicos que traen como consecuencia procesos inflamatorios generalizados, generando un estado hiperdinámico e hipermetabólico caracterizado por fallas en la distribución de la circulación e isquemia tisular que de persistir puede generar finalmente una falla multiorgánica. Dicho proceso es mediado, entre otros factores por citocinas proinflamatorias, tales como TNF $\alpha$  la cual causa liberación de neutrófilos de la médula ósea, marginación de los mismos y activación de los macrófagos para liberar oxidantes y secretar otras citocinas. Por su parte, IL-1 aumenta la proliferación de células T e induce la producción de GM-CSF por la médula ósea (Alfaro, 2003).

Por su parte, los macrófagos activados degradan al ácido araquidónico, cuyos catabolitos forman mediadores químicos (leucotrienos, prostaglandinas y lipoxinas) que favorecen la vasodilatación, la activación de neutrófilos y su transmigración al sitio de la lesión, con el efecto adverso de trasvasación de plasma y consiguiente hipovolemia. Asimismo, incrementan la producción enzimas líticas y radicales libres de oxígeno (anión superóxido, O<sub>2</sub> y peróxido), que inducen la formación de ión hidróxido (OH<sup>-</sup>), que favorece la permeabilidad vascular, altera la función de los lípidos de la pared celular, la actividad fagocítica de macrófagos, el metabolismo del ácido araquidónico y la estructura del ARN y ADN; originando mayor daño (Cuenca *et al.*, 2001; Alfaro, 2003).

La fase temprana de la quemadura se caracteriza por leucocitosis, elevación plasmática de PCR y catecolaminas. Además, se activa la cascada de complemento con reducción de C3, C4, C5, disminución de proteínas totales, albúmina, fibronectina, IgG, IgA, IgM y  $\alpha$ 2-macroglobulinas. La activación de C3, C5 y secreción de IgE

promueve la liberación de mediadores inflamatorios, especies reactivas del oxígeno y enzimas a partir de células endoteliales, mastocitos, macrófagos y plaquetas. También se produce activación de los mecanismos de coagulación y fibrinólisis con tendencia a hipercoagulabilidad. Las PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2a</sub> estimulan la coagulación liberando 5HT de las plaquetas, formando polipéptidos vasoactivos (cininas), vía factor XII. Todo esto conjuntamente con la liberación de HT incrementa la permeabilidad microvascular y el estado inflamatorio (Alfaro, 2003).

Durante el proceso inflamatorio, mediadores como TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-2 también inducen la formación de nitritos y nitratos, potentes vasodilatadores que impiden la agregación plaquetaria, e interactúan con radicales libres de oxígeno en la lisis de los tejidos dañados. Por su parte, IL-3 e IL-5 estimulan la activación de los linfocitos, IL-4 interactúa con el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), IL-6 regula la secreción de otras citocinas proinflamatorias y activación de linfocitos B. Finalmente IL-8 tiene efecto quimiotáctico sobre los granulocitos y activa su función bactericida (Cuenca *et al.*, 2001).

Una vez que el tejido quemado se ha lisado y fagocitado, se producen factores de crecimiento a partir de células endoteliales, queratinocitos, macrófagos y plaquetas. Los factores de crecimiento se liberan en forma de cascada, iniciando factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de los queratinocitos, factor de crecimiento epitelial, de factor de crecimiento derivado endotelial. Todos estos intervienen en la reparación de la quemadura, incrementando la mitosis en los queratinocitos y otras células epidérmicas, con la subsiguiente epitelización, o bien en la angiogénesis y fibroplasia, con el cierre de las heridas (Cuenca *et al.*, 2001; Alfaro, 2003).

### **2.2.11 Interacción entre inflamación, coagulación y dolor.**

Existe evidencia que los sistemas de inflamación y coagulación interactúan entre sí, puesto que, vías moleculares que contribuyen a la inflamación, inducen activación de la coagulación y existen diversos puntos de enlace (células endoteliales, plaquetas y trombina) que los conectan (Cicala y Cirino, 1998; González, 2006; Levi *et al.*, 2012).

En las reacciones inflamatorias, la formación y deposición de fibrina es una característica común, indicando activación del sistema de la coagulación y generación de trombina en el sitio de la inflamación (Cirino *et al.*, 1996). En tal sentido, las células que expresan FT no están en contacto directo con la sangre; sin embargo, cuando la integridad de la pared de los vasos sanguíneos es interrumpida por una lesión, FT entra en contacto con la sangre y se expresa en células endoteliales activadas y/o células sanguíneas, activando el sistema de coagulación y generando trombina (Strukova, 2000; Steinhoff *et al.*, 2005). Adicionalmente, se ha demostrado que el bloqueo de la actividad de FT inhibe completamente la inflamación inducida por la generación de trombina en modelos experimentales de endotoxemia y bacteremia, demostrando así, su importancia para la interacción entre ambos sistemas (Levi *et al.*, 2012).

Por su parte, la trombina estimula la actividad de células sanguíneas y vasculares (plaquetas, monocitos, células endoteliales, linfocitos T, células musculares lisas y mastocitos). Además, trombina induce adhesión, agregación plaquetaria en el sitio de la lesión vascular y posterior degranulación (liberación de ADP, tromboxano A<sub>2</sub>, 5HT, factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento transformador  $\beta$ ), lo cual, favorece la expresión de CD40L y P-selectina, para así mediar su adherencia a células endoteliales y leucocitos. Al mismo tiempo, las plaquetas aportan una superficie procoagulante que permite amplificar la generación de trombina (Strukova, 2000; Steinhoff *et al.*, 2005; Levi, 2010).

Cabe destacar, que la trombina al inducir la liberación de sustancias vasoactivas (5HT de plaquetas e HT de mastocitos), incrementa la permeabilidad vascular, favoreciendo a su vez, la aparición del edema e influjo de células inflamatorias; constituyendo un evento importante para la génesis de la inflamación y el dolor (Cirino *et al.*, 1996; Levi y Van der Poll, 2010). Asimismo, esta proteasa de serina induce la expresión de MCP-1, P y E-selectinas, ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales; promoviendo la adhesión de leucocitos al endotelio y facilitando su trasmigración endotelial (Déry *et al.*, 1998; Rahman *et al.*, 2002; Levi y van der Poll, 2005; Borissoff *et al.*, 2009).

Por otra parte, procesos inflamatorios como sepsis, se caracterizan por una función deficiente del sistema de la PC, debido a disminución de la concentración plasmática de PC y PS, disminución de la expresión de TM y regulación negativa de EPCR, aunado a ello, la actividad de ATIII se encuentra disminuida favoreciendo el estado procoagulante (Viles-González *et al.*, 2005; Levi, 2010; Levi y van der Poll, 2010).

Por lo antes expuesto, en el proceso inflamatorio existe un estado de hipercoagulación causado por alteración en la regulación de la trombogénesis, debido a un incremento en la generación de trombina, disminución en la actividad de los sistemas anticoagulantes, incremento en la actividad procoagulante del endotelio y de células sanguíneas, como resultado de la expresión inducida del FT (Strukova, 2006; Levi y Van der Poll, 2010).

Existe evidencia que  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$  e  $IL6$  presentan propiedades hiperalgésicas como mediadores del dolor inflamatorio y neuropático, debido a que inducen liberación de sustancias algésicas (prostaglandinas, NO, factor de crecimiento de nervios y bradicininas). (Cunha *et al.*, 2005; Rittner *et al.*, 2005) y sus receptores se encuentran expresados en el DRG y trigeminal, que dan lugar a fibras  $A\delta$  y fibras C. En los terminales periféricos de estas fibras se ubican los receptores de alto umbral o

nociceptores, donde se traduce la información nociva de los estímulos que posteriormente se propaga a la médula espinal y al cerebro. (Rittner *et al.*, 2005).

En tal sentido, la trombina, puede mediar la respuesta al dolor por modulación de citocinas proinflamatorias y directamente por activación de receptores PARs, ya que estos se encuentran en neuronas del SNC y sistema nervioso periférico (SNP) (Dale y Vergnolle; 2008). En efecto, la activación de PARs se ha relacionado con el desarrollo y alteraciones de la memoria, enfermedades neurodegenerativas y de vías dopaminérgicas. Asimismo, el desarrollo de agonistas selectivos para PAR-1 (TFRIFD), PAR-2 (SLIGKV) y PAR-4 (AYPGKF) ha permitido evaluar los efectos de su activación en la inflamación neurogénica, percepción de dolor, sensación de prurito y regeneración de nervios (García *et al.*, 2010; Noorbakhsh *et al.*, 2003).

La activación de PAR-1 y PAR-2 se ha asociado a inflamación neurogénica en SNP, caracterizada por vasodilatación, edema, pérdida de proteínas, adhesión de leucocitos y sensibilidad al dolor (Vergnolle *et al.*, 2001a). Ambos receptores son expresados en aferentes nociceptivos (fibras C y A $\delta$ ) (Ossovskaya y Bunnett, 2004; Saito y Bunnett, 2005) y su activación *in vivo* conlleva a la liberación de neuropéptidos (SP y CGRP) (Green *et al.*, 2000; De Garavilla *et al.*, 2001). Por otra parte, la activación de PAR-1 con péptidos agonistas (AP) selectivos, induce analgesia mecánica y térmica, no obstante, tras la inyección intraplantar de trombina en la rata, se reproduce el efecto analgésico ante el estímulo mecánico; pero no ante el estímulo térmico, obteniendo una respuesta hiperalgésica (Asfaha *et al.*, 2002). Este efecto se atribuye a que trombina activa no sólo PAR-1 sino también PAR-4 (Gao *et al.*, 2002). Aunque la activación de PAR-4 conlleva a analgesia en respuesta a estimulación térmica y mecánica; este receptor también es activado por catepsina G y tripsina, de ahí que, sus efectos inhibitorios sobre la transmisión nociceptiva dependa del tipo de proteasa liberada en la proximidad de los nervios sensoriales (Kahn *et al.*, 1998; Kataoka *et al.*, 2003), ya que PAR-4 ejerce efectos inhibitorios directamente sobre neuronas sensoriales, a diferencia

de PAR-1 cuya activación en estas neuronas promueve la liberación de neuropéptidos pro-nociceptivos (CGRP y SP) (Asfaha *et al.*,2007).

### 2.3. Sistema de Variables e Indicadores.

Variable	Dimensión	Indicador	Método	
<b>Dependiente</b> Quemadura inducida por inmersión de la pata trasera de ratas en agua a 60°C durante 60 seg.	Edema	Porcentaje de incremento del área de la pata inflamada respecto a la no inflamada.	Fotografías ortogonales procesadas mediante software.	
	a) Leucocitos y plaquetas	a) Cuantificación del número total de células.	a)Contaje en cámara de Newbauer	
	b) Proteína reactiva, Complejo nitritos y FRAP	C Fg, TAT,	b)Concentraciones y Actividad enzimática	b)Químicos de punto final, cinéticos, ELISA
	a) Actividad motora	a) Porcentaje de desplazamiento con respecto a la línea de base.	a)Video procesado con Software	
	b)Umbral nociceptivo térmico	b) Medición del tiempo de latencia de la respuesta ante el estímulo térmico	b)Plancha caliente	
Indice FRAP en ADM ipsilateral/contralateral	Indice nitritos y ADM	Relación de concentraciones y actividad enzimática en ADM ipsi y contralateral	Cálculos matemáticos	

**Independiente:** Efecto de enoxaparina

**Intervinientes:** Temperatura y tiempo de inducción de la inflamación, tiempo post-quemadura, dosis del fármaco.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Diseño y tipo de investigación.**

En la presente investigación, se aplicó un diseño experimental, ya que, las variables fueron manipuladas intencionalmente por el investigador en condiciones controladas, se evaluó el efecto de la variable independiente (enoxaparina) sobre variables dependientes, manteniendo la confiabilidad interna de los resultados con el empleo de controles en cada uno de los procedimientos experimentales. Además el estudio se caracterizó por ser descriptivo- explicativo, al evaluar y describir el efecto producido por el fármaco (causa) sobre diversas variables.

El desarrollo experimental de la investigación se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología del Centro de Biofísica y Neurociencia (CBN) de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo Campus Bárbula y en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

#### **3.2 Unidades experimentales.**

Las unidades experimentales fueron constituidas por ratas (*Rattus norvegicus*) adultos machos de la cepa de Sprague Dawley con una masa corporal comprendida entre 350 y 400 g, debido a que los niveles hormonales presentan escasas variaciones, en comparación a ratas hembras (Wizemann y Pardue, 2001). Dichos ejemplares fueron provistos por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo (Campus Bárbula) y mantenidos en condiciones de temperatura controlada (22-25°C) con un ciclo de luz-oscuridad de 12h:12h, con

alimento y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron entre 08:00 y 12:00 h, para reducir las variaciones circadianas de los parámetros estudiados (Eblen-Zajjur *et al.*, 2015). Se estableció que una (01) unidad experimental corresponde a una (01) rata, escogidas a partir de una selección controlada y de acuerdo al marco referencial, criterios de inclusión y diseño experimental; hasta completar un total de 78 unidades experimentales (n=6 por grupo de estudio) y sustentar la validez del análisis estadístico. El manejo de los animales se realizó, evitando en lo posible el sufrimiento de los mismos, según consta en dictamen de bioética Nro. CPBBUC-012-2018-DIC-VH, código BASÑJKG de fecha 06-03-2018 y siguiendo los lineamientos establecidos por Guide for the care and use of laboratory animals del National Institute of Health (2011) y la Ley Venezolana para la Protección de la Fauna Doméstica Libre y en Cautiverio (2010).

### **3.2.1 Diseño experimental de la investigación.**

Los ensayos fueron diseñados en dos series. Una primera serie incluyó 5 grupos de 6 animales cada uno, para un total de 30 unidades experimentales que se les determinó el curso temporal de los marcadores (inflamación, hemostáticos y de nocicepción) antes y luego de 4, 6, 12 y 24 h de inducir la quemadura, con la finalidad de conocer el tiempo en que cada parámetro inflamatorio alcanzó su máximo valor y evaluar posteriormente el efecto de las diferentes dosis de enoxaparina: 01 grupo control de ratas sin inflamar SI, constituido por animales (n=6) a los cuales se les sumergió la pata posterior izquierda hasta el nivel de la rodilla en agua a temperatura ambiente durante 60 seg. y 04 grupos experimentales de animales inflamados a los cuales se les realizó el mismo procedimiento pero con agua a temperatura de 60o C durante 60 seg., con medición de parámetros a diferentes tiempos.

Posteriormente, se realizó una segunda serie de experimentos que incluyó 8 grupos de 6 animales cada uno, para un total de 48 unidades experimentales que se les determinó los parámetros anteriormente mencionados:

- ✓ 01 grupo control de animales sin inflamar SI (n=6)
- ✓ 04 grupos experimentales de animales inflamados pretratados con enoxaparina a diferentes dosis 0,01; 0,02; 0,04 y 0,08 mg.Kg-1 de peso, (n=6 por dosis), administrada vía s.c. 3 h antes de la inducción inflamatoria,
- ✓ 01 grupo control (antiinflamatorio de referencia) con inflamación, constituido por animales (n=6) pretratados con indometacina a dosis 4 mg.Kg-1 de peso, administrada vía i.p., 30 minutos antes de inducir la quemadura
- ✓ 01 grupo control (vehículo sin inflamación), constituido por animales sin inflamar (n=6) pretratados con solución salina estéril 0,85% (vehículo de la HBPM y del antiinflamatorio de referencia) administrada vía s.c., 3 h antes de sumergir la pata posterior izquierda en agua a temperatura ambiente durante 60 seg.
- ✓ 01 grupo control (vehículo con inflamación), constituido por animales inflamados (n=6) pretratados con solución salina estéril 0,85% (vehículo de la HBPM y de indometacina) administrada vía s.c., 3 h antes de inducir la inflamación.

### **3.2.1.2 Administración de las drogas.**

El protocolo de administración de drogas que se describe a continuación se empleó para cada uno de los experimentos que se realizaron en esta investigación. Para ello, la

enoxaparina se disolvió en solución salina y se aplicó vía s.c. 3 h antes de inducir la quemadura, esto debido a que es el tiempo necesario para que ésta alcance su máximo efecto sanguíneo (Hirsh y Raschke, 2004). Las dosis de enoxaparina oscilaron entre 0,01 y 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup> de peso. La selección de las dosis se hizo de acuerdo a lo reportado en la literatura (Dotan *et al.*, 2001). La indometacina se empleó como droga anti-inflamatoria de referencia, a dosis 4 mg.Kg<sup>-1</sup> de peso. (Bosco *et al.*, 2011), esta se disolvió en solución salina y se administró vía i.p., 30 minutos antes de inducir la quemadura. Es importante señalar, que este anti-inflamatorio inhibe de manera no selectiva a las enzimas ciclooxigenasas COX<sub>1</sub> y COX<sub>2</sub>, las cuales se encuentran involucradas en la síntesis de prostaglandinas, quienes son mediadores importantes en la respuesta inflamatoria (Vanegas y Schaible, 2001; El-Shenawy *et al.*, 2002).

### **3.3 Procedimiento Experimental.**

#### **3.3.1. Determinación del curso temporal del edema inducido por quemadura en ratas. Efecto de enoxaparina sobre el edema.**

Las ratas de cada grupo se anestesiaron administrando tiopental sódico (60 mg.Kg<sup>-1</sup> de peso) vía i.p., y posteriormente se les administró 0,25 mg de atropina vía s.c., para disminuir las secreciones respiratorias (Eblen-Zajjur y Sandkühler, 1997). Para inducir el proceso inflamatorio, se verificó la ausencia de reflejos (corneal, y retirada de la cola y pata ante el estímulo doloroso), al grupo de animales experimentales inflamados se les introdujo la pata posterior izquierda a la altura de la rodilla en agua a 60°C durante 60 seg. y para el grupo de animales sin inflamación SI se realizó un procedimiento similar, pero en agua a temperatura ambiente (Torres *et al.*, 2016). Para mantener la temperatura corporal constante (37 °C), los animales se colocaron sobre una manta eléctrica alimentada con corriente continua, regulada mediante retroalimentación, y un sensor colorrectal permitió monitorear la temperatura y controlar el funcionamiento de la manta eléctrica (Bosco *et al.*, 2011).

El área de inflamación de la pata del animal fue medida de manera secuencial antes y luego de 4, 6, 12 y 24 h post-quemadura, mediante fotografía digital ortogonal (planos dorso-plantar y lateral de la pata estimulada). Estas fotografías en formato bitmap (.bmp) se procesaron mediante el programa Image J versión 1.50i (NIH, 2016), con la herramienta de medición de áreas a través de los contornos de la imagen de la pata. El área total inflamada se determinó mediante la suma de las superficies de la pata en ambos planos, expresada como  $\text{píxeles}^2$  que se calibró mediante una superficie de área conocida en el mismo campo fotográfico, para su conversión a  $\text{mm}^2$ . La intensidad del edema se calculó como porcentaje (%) de incremento de la superficie de la pata, inducido por la quemadura en cada intervalo de tiempo. Las superficies de las patas de las ratas sin inflamación se consideraron como 100%. El tiempo (h) donde se obtuvo la mayor área de inflamación (edema), se empleó para evaluar el efecto de enoxaparina (n=6 por dosis) o indometacina (n=6). De la misma manera, se determinó el área de la pata en ratas pre-tratadas con el vehículo de los fármacos antes y después de inducir la reacción inflamatoria (n=6 por grupo), con el fin de descartar una posible alteración del parámetro por parte del vehículo.

### **3.3.2 Obtención de muestra de sangre.**

Para la determinación de parámetros bioquímicos relacionados al proceso inflamatorio, tanto en el grupo control SI como en el resto de los grupos experimentales, se extrajo muestras de sangre por punción cardíaca. Para ello, las ratas se anestesiaron previamente con tiopental de sodio a una dosis de 60 mg.Kg<sup>-1</sup> de peso. Parte de la sangre obtenida se mezcló con citrato de sodio al 3,2% p/v en una proporción 1:9 (citrato: sangre); esta sangre con anticoagulante se empleó para obtener el conteo total de leucocitos y el recuento plaquetario, y posteriormente se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos para obtener plasma y determinar las concentraciones plasmáticas de complejo TAT y Fg. La sangre restante se colocó en tubo sin anticoagulante y para

obtener el suero y determinar la concentración sérica de PCR, nitritos y la actividad de FRAP.

### **3.3.3. Laminectomía.**

El procedimiento quirúrgico de laminectomía, se realizó inmediatamente antes de la punción cardíaca, colocando al animal en posición de decúbito prono, iniciando con una incisión en la línea media dorsal a nivel de la región lumbar. Seguidamente, se retiró el tejido muscular hasta exponer la columna vertebral. A continuación se retiraron los procesos vertebrales, y luego se accedió a la columna usando un corta cutícula, evitando el contacto directo de los instrumentos con la médula para no lesionar el tejido. Al observar la médula espinal se perfundió con solución fisiológica NaCl (0,9 %) a fin de evitar su desecación y/o variaciones fisiológicas que eventualmente podían interferir en los componentes de interés. Finalmente, se procedió a seccionar y extraer la región medular comprendida entre la vértebra T8 y L5, cortando con un bisturí a nivel del metámero T8, el metámero L5 y las raíces asociadas a este segmento de la médula espinal (Czaplinski *et al.*, 2005).

Inmediatamente después de la laminectomía, se colocó la médula espinal sobre una lámina de aluminio dentro de un criostato a -30 °C, y con un bisturí se procedió a realizar cortes transversales de 1 mm de grosor. Posteriormente, se realizó el reconocimiento del ADM, identificando ipsi y contralateral, a partir de las cuales se obtuvieron las muestras correspondientes mediante punches de 1 mm de diámetro. Dichos fragmentos se conservaron en 1 mL de tampón Tris HCl, pH 8,0 (Tris base 50 mM, EDTA 10 mM; Tritón X-100 1%, NaF 0,1%) con la finalidad de proteger el tejido, inhibir las proteasas liberadas por el seccionamiento realizado al retirar la región lumbar e inactivar las fosfatasas ácidas sensibles al fluoruro, dejando activas las resistentes al fluoruro. Cada muestra se mantuvo por separado y finalmente se

refrigeraron a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento, en no más de 48 h posteriores a la extracción.

### **3.3.3.1. Preparación de homogenatos de astas dorsales medulares.**

Para obtener los homogenatos de ambas ADM, se procedió a homogenizar las fracciones mediante un émbolo de teflón, aplicando 7 empujes del émbolo y sumergiendo el mismo en agua con hielo para evitar la desnaturalización de proteínas por la generación de calor durante el proceso. Los homogenatos se emplearon para determinar la concentración de nitritos y actividad de FRAP en ambas ADM.

### **3.3.4 Determinación de parámetros inflamatorios. Efecto de enoxaparina sobre parámetros inflamatorios.**

#### **3.3.4.1 Contaje total de leucocitos.**

El contaje total de leucocitos se realizó siguiendo las modificaciones de Ramírez *et al.* (2013) del protocolo para el recuento de leucocitos diseñado originalmente por Turk (Puga y Villaldea, 1930). Para ello se diluyeron  $20\text{ }\mu\text{L}$  de sangre en  $0,38\text{ }\mu\text{L}$  de líquido de Turk y se empleó la cámara de Neubauer para el recuento en microscopio óptico a 40x de aumento, dicho procedimiento fue realizado en el grupo de ratas SI y el resto de los grupos experimentales, antes y 4, 6, 12, 24 h post-quemadura (n= 6 por grupo). El tiempo (h) donde se alcanzó el mayor recuento de cada parámetro, se empleó para evaluar el efecto de enoxaparina (n=6 por dosis) o indometacina (n=6). Adicionalmente, se determinó el contaje de leucocitos en ratas pre-tratadas con el vehículo de los fármacos antes y después de inducir la reacción inflamatoria (n=6 por grupo), con el fin de descartar una posible alteración del parámetro por parte del vehículo.

### 3.3.4.2 Determinación de proteína C reactiva (PCR).

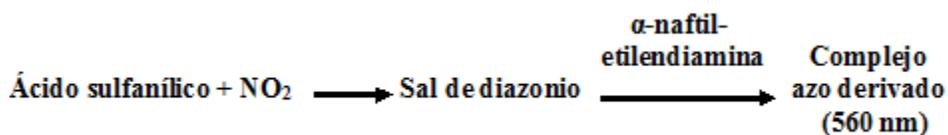
La concentración sérica de PCR se determinó mediante un estuche de ensayo inmunoenzimático específico para PCR de rata, de acuerdo al protocolo recomendado por los fabricantes. En este ensayo, 100  $\mu$ L de la muestra de suero previamente diluida en una proporción 1:4.000 con el tampón diluyente (Tris- pH 7.4 0,05% Tween 20), se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en una placa de poliestireno de 96 pozos previamente sensibilizada con el anticuerpo anti-PCR. Después, se removieron las proteínas del suero no unidas al anticuerpo anti-PCR por lavados con el tampón Tris- pH 7.4 0,05% Tween 20. Posteriormente, se adicionó 100  $\mu$ L del anticuerpo anti-PCR de rata conjugado a peroxidasa de rábano diluido 1:100. Otro paso de lavado fue realizado antes de adicionar 100  $\mu$ L del sustrato cromogénico peroxidasa de urea y 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB), se incubó protegido de la luz por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregó en cada pozo 100  $\mu$ L de la solución de ácido fosfórico para detener la reacción. Finalmente, se determinó la absorbancia del contenido de cada pozo a 450 nm, en un lector de microplacas (Biotek multiplaque reader, modelo 250C, USA). Para cuantificar la concentración de PCR en suero, se realizó una curva de calibración empleando estándares de diferentes concentraciones de PCR (4; 8; 14; 20; 26,7; 33,2 ng.mL<sup>-1</sup>).

La determinación de esta proteína de fase aguda se realizó en el grupo de ratas SI y el resto de los grupos experimentales antes y 4, 6, 12, 24 h posterior a la inducción de la quemadura (n= 6 por grupo). El tiempo (h) donde se alcanzó la mayor concentración de este reactante de fase aguda, fue empleado para evaluar el efecto de enoxaparina (n=6 por dosis) o indometacina (n=6). Adicionalmente, se determinó el nivel sérico de PCR en los grupos de ratas SI e inflamadas pre-tratadas con el vehículo de los fármacos (n=6 por grupo), con el fin de descartar una posible alteración sobre la concentración de esta proteína por parte del vehículo.

### 3.3.4.3 Determinación de nitritos en suero y asta dorsal medular. Índice de nitritos en ADM ipsilateral/contralateral.

Se realizó la determinación de nitritos en sangre y asta dorsal medular como cuantificación indirecta de la concentración de NO a través del ensayo de Griess (Green *et al.*, 1982), basado en la cantidad de nitrito generado, mediante el estuche comercial colorimétrico de Griess (INC Biomedicals®). Para reducir los nitratos a nitritos a 500  $\mu\text{L}$  de muestra se le agregó una alícuota de zinc metálico en polvo, se dejó reposar la mezcla durante 1 h 45 minutos agitando cada 30 minutos, y posteriormente, se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos. El procedimiento consistió en agregar en un tubo de ensayo 300  $\mu\text{L}$  del sobrenadante en una solución de 2600  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y 1000  $\mu\text{L}$  del reactivo de Griess. Posteriormente, se incubó la mezcla de reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro digital (MICROLAB 300®). La concentración de nitritos en suero y ADM se determinó mediante curvas de calibración con estándares  $\text{NaNO}_2$  a diferentes concentraciones (1; 2; 4; 8; 10; 15  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  y 10; 20; 40; 80; 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente).

Reacción química:



El índice nitritos ADM ipsi/contralateral, se obtuvo dividiendo la actividad enzimática en ADM ipsilateral entre la contralateral. La determinación de este parámetro se realizó en el grupo de ratas SI y el resto de los grupos experimentales antes y 4, 6, 12, 24 h posterior a la inducción de la quemadura (n= 6 por grupo). El tiempo (h) donde se alcanzó la mayor concentración de este marcador, fue empleado para evaluar el efecto de enoxaparina (n=6 por dosis) o indometacina (n=6).

Adicionalmente, se determinó la concentración de nitritos en los grupos de ratas SI e inflamadas pre-tratadas con el vehículo de los fármacos (n=6 por grupo), con el fin de descartar una posible alteración sobre la concentración del marcador por parte del vehículo.

### **3.3.5 Determinación de parámetros hemostáticos. Efecto de enoxaparina sobre parámetros hemostáticos.**

#### **3.3.5.1 Contaje total de plaquetas.**

Para el recuento plaquetario se empleó el método manual directo de Brecher y Conkrite, el cual se basa en la determinación de plaquetas en cámara de Neubauer, tras dilución de la sangre (1/100) con oxalato de amonio ( $C_2H_8N_2O_4$ ) al 1% (Fragachán, 1984). Dicho procedimiento fue realizado en muestras del grupo de ratas SI y el resto de los grupos experimentales, antes y 4, 6, 12, 24 h post-quemadura (n= 6 por grupo). Este procedimiento se hizo con el fin de obtener el valor máximo en sangre y posteriormente, evaluar el efecto de enoxaparina (n=6 por dosis) o indometacina (n= 6).

#### **3.3.5.2 Determinación de fibrinógeno (Fg).**

La concentración plasmática de Fg se determinó mediante el método gravimétrico descrito por Ingram, G.I.C. (1952). A 250  $\mu$ L de cada muestra de plasma, se le adicionó 750  $\mu$ L de solución de  $CaCl_2$  50 mM, 250  $\mu$ L de trombina humana 100 UI/mL y 250  $\mu$ L de NaCl 0,9%. Luego, a cada muestra se le colocó una varilla de vidrio y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Terminado el tiempo de incubación, se recolectó la malla de fibrina dándole vuelta y haciéndole presión a la varilla de vidrio sobre la pared del tubo de ensayo (12x75) y se colocó sobre papel de filtro. Posteriormente, la malla de fibrina se lavó 3 veces con solución NaCl 0,9% y se colocó en otro tubo de ensayo con 1 mL

de NaOH al 3%, se incubó 1 hora a 37 °C. Una vez disuelto el coágulo, se determinó la concentración de Fg a través de la reacción de Biuret, agregando 500 uL de la solución reactivo de trabajo de Biuret y 250 uL de la muestra correspondiente. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se leyeron las absorbancias en espectrofotómetro a 546 nm contra el blanco reactivo. Para cuantificar la concentración plasmática de Fg se realizó una curva de calibración utilizando estándares de Fg de diferentes concentraciones (1.5, 3, 6, 9, 12 mg.mL<sup>-1</sup>).

La determinación de este marcador se realizó en el grupo de ratas SI y el resto de los grupos experimentales antes y 4, 6, 12, 24 h posterior a la inducción de la quemadura (n= 6 por grupo). El tiempo (h) donde se alcanzó la mayor concentración de este reactante de fase aguda, fue empleado para evaluar el efecto de enoxaparina (n=6 por dosis) o indometacina (n=6). Adicionalmente, se determinó el la plasmática de Fg en los grupos de ratas SI e inflamadas pre-tratadas con el vehículo de los fármacos (n=6 por grupo), con el fin de descartar una posible alteración sobre la concentración de esta proteína por parte del vehículo.

### **3.3.5.3 Determinación del complejo trombina/antitrombina (TAT).**

La concentración de este complejo fue empleada como marcador de generación de trombina. Para ello, se utilizó un estuche de ensayo inmunoenzimático específico para el complejo TAT humano, el cual reacciona también con el complejo TAT de rata. En esta prueba, se utilizaron placas inmulon 4 (Dynatech Laboratories Inc, USA), las cuales se sensibilizaron con un anticuerpo policlonal de anti-trombina, el cual se diluyó previamente 1:100 con el tampón carbonato 50 mM e inmediatamente se adicionó 100 µL en cada pozo de la placa. Se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se vació el contenido de la placa, se le adicionó a cada pozo 150 µL del tampón de bloqueo salino fosfato-albúmina bovina sérica (PBS-BSA 2% p/v) y se dejó incubando por 90 minutos a temperatura ambiente. Luego, se descartará la solución

bloqueadora de la placa y se procederá a realizar 3 lavados con el tampón de lavado (NaCl 136 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,46 mM, KCl 2,68 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,4). Posteriormente, se adicionó en cada pozo de la microplaca sensibilizada, 100 µL de las muestras de plasma (libre de hemólisis), previamente diluidas en una proporción 1:4 con el tampón diluyente (HEPES 23 mM, NaCl 25 mM, BSA 37 mM, pH 7,2). Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados con el tampón de lavado con el fin de eliminar el material no unido. Luego, se adicionó a cada pozo de la microplaca 100 µL del anticuerpo secundario anti-ATIII conjugado a peroxidasa, previamente diluido 1:100 con el diluyente del conjugado (provisto por la casa comercial) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó nuevamente 3 lavados para remover el anticuerpo conjugado no unido. La reacción se reveló usando peróxido de hidrógeno en presencia del cromógeno orto-fenilendiamina (OPD), después de 15 minutos se detuvo la reacción con 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M y la intensidad del color producido se cuantificó a 490 nm usando un lector de microplacas (Bioteck multiplaque reader, modelo 250C, USA). La concentración de complejo TAT presente en las muestras se calculó mediante curva de calibración realizada con estándares de diferentes concentraciones de complejo TAT humano (0,2; 0,7; 2; 6; 10 pg.L<sup>-1</sup>).

La determinación de TAT se realizó en el grupo de ratas SI y el resto de los grupos experimentales antes y 4, 6, 12, 24 h posterior a la inducción de la quemadura (n= 6 por grupo). El tiempo (h) donde se alcanzó la mayor concentración del complejo, fue empleado para evaluar el efecto de enoxaparina (n=6 por dosis) o indometacina (n=6). Adicionalmente, se determinó la concentración plasmática de TAT en los grupos de ratas SI e inflamadas pre-tratadas con el vehículo de los fármacos (n=6 por grupo), con el fin de descartar una posible alteración sobre la concentración del marcador por parte del vehículo.

### 3.3.6 Determinación de parámetros nociceptivos. Efecto de enoxaparina sobre parámetros nociceptivos.

#### 3.3.6.1 Determinación de fosfatasa ácida resistente a fluoruro (FRAP) en suero y asta dorsal medular (ADM). Índice de FRAP en ADM ipsilateral/contralateral.

La cuantificación de FRAP en sangre y asta dorsal, se realizó utilizando el método cinético para FRAP (INVELAB®). El protocolo para su determinación consistió en agregar en tubo de ensayo 1 mL del reactivo ( $\delta$ -naftilfosfato 3 mM, rojo estable TR 1 mM, ácido cítrico 20 mM, citrato de sodio 60 mM, pH 5,3) y 100  $\mu$ L de la muestra correspondiente, luego se incubó a 37° C durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 405 nm. La actividad enzimática (U.L<sup>-1</sup>) se determinó considerando la siguiente ecuación:

$$[\text{FRAP}] = \Delta \text{Abs}/\text{min} \times 106 \times \text{Volr} (1,1) / \text{AMC} (12,9 \times 10^3) \times P (1,0) \times Vm (0,1) = \text{U/L}$$

Donde:

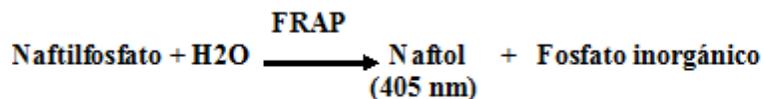
Volr: volumen total de reacción en mL

AMC: Absortividad Molar del Complejo  $\delta$ -naftol rojo estable TR a 405 nm.

P: Paso de la luz en cm.

Vm: volumen de la muestra en mL

Reacción química:



El índice FRAP ADM ipsi/contralateral, se obtuvo dividiendo la actividad enzimática en ADM ipsilateral entre la contralateral. La determinación de esta enzima se realizó en el grupo de ratas SI y el resto de los grupos experimentales en ADM y

suero, antes y 4, 6, 12, 24 h posterior a la inducción de la quemadura (n= 6 por grupo). El tiempo (h) donde se alcanzó la mayor concentración de esta enzima, fue empleado para evaluar el efecto de enoxaparina (n=6 por dosis) o indometacina (n=6).

Adicionalmente, se determinó la actividad de FRAP en los grupos de ratas SI e inflamadas pre-tratadas con el vehículo de los fármacos (n=6 por grupo), con el fin de descartar una posible alteración sobre la concentración de la enzima por parte del vehículo.

#### **3.3.6.1.1 Determinación de proteínas totales y calibración.**

Para corregir posibles variaciones en la masa de las muestras tomadas durante el ponchado de ADM, se determinó la concentración de proteínas totales (PT) mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para su determinación se adicionó 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford y 50  $\mu\text{L}$  del homogenato. Posteriormente, se incubó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro. La concentración de PT se cuantificó mediante una curva de calibración con estándares de BSA de diferentes concentraciones (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Posteriormente, se dividió las concentraciones de nitritos y FRAP de cada muestra entre su propia concentración de PT, cuyo resultado es una medición directa de la cantidad de tejido tomado, lo cual corrige el error de muestreo.

#### **3.3.6.2 Pruebas conductuales.**

Para evaluar el efecto nociceptivo ocasionado por el proceso inflamatorio, así como, el posible efecto anti-hiperalgésico de la enoxaparina, se realizaron las siguientes pruebas conductuales:

### **3.3.6.2.1 Determinación de la variación en la actividad motora.**

Se determinó la distancia total recorrida (Svensson y Thieme, 1969), en un ambiente constituido por una jaula de acero inoxidable con dimensiones 55 x 40 x 15 cm con piso homogéneo de hojuelas de arroz en la cual se colocó cada rata, realizando las grabaciones de sus desplazamientos en este ambiente mediante una cámara digital Olympus Stylus 1010 con 5 megapixels de resolución. Las imágenes fotográficas se realizaron cada 30 seg. durante 10 minutos y se procesaron de manera semiautomática mediante el programa Tracker®. Se calculó el porcentaje de actividad motora considerando como referencia de 100% la distancia total recorrida por los animales del grupo control. El tiempo (h) donde se obtuvo la menor actividad motora (menor porcentaje de distancia recorrida), fue empleado para evaluar el efecto de enoxaparina (n=6 por dosis) o indometacina (n=6).

### **3.3.6.2.2 Determinación del umbral nociceptivo térmico. Evaluación de la hiperalgesia térmica.**

La hiperalgesia térmica, se evaluó utilizando la prueba de plato caliente según el método descrito por Eddy y Leimbach, 1953. Para efectuar esta prueba, el animal se colocó en una placa de metal recubierta con teflón precalentada a una temperatura de 50°C (Hot Plate 39D, IITC) y se midió el tiempo que transcurrió entre el contacto de las patas con la superficie caliente hasta que el animal desplegó la conducta nocidefensiva de lamido o de retirada de la pata de la superficie caliente. A este valor temporal en seg. se le conoce como latencia de la respuesta, cuyo valor se determinó en el grupo de ratas SI y el resto de los grupos experimentales antes y 4, 6, 12, 24 h posterior a la inducción de la quemadura (n= 6 por grupo). El tiempo (h) donde se obtuvo el menor valor de umbral nociceptivo térmico (menor latencia) fue empleado para evaluar el efecto de enoxaparina (n=6 por dosis) o indometacina (n=6). Cuando el animal tardó hasta 30 seg. sin respuesta se retiró de la plancha caliente. En promedio,

un animal sin inflamación suele retirar la pata de la superficie caliente aproximadamente a los 12 seg. Valores superiores a los de la línea base están asociados a antinocicepción, mientras que valores inferiores a los basales reflejan un estado de hiperalgesia. Es importante señalar, que esta prueba conductual requiere una función motora indemne en el animal para poder validar los resultados.

### **3.4 Análisis estadístico.**

Los datos se representaron como la mediana  $\pm$  percentiles 25-75 como medidas de tendencia central y de dispersión. Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney y para evaluar las diferencias entre múltiples grupos se empleó la prueba de Kruskal-Wallis. Para el análisis estadístico se empleó el programa estadístico PAST versión v3.14 (Hammer *et al.*, 2001). Se estableció como nivel de significancia estadística un valor de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

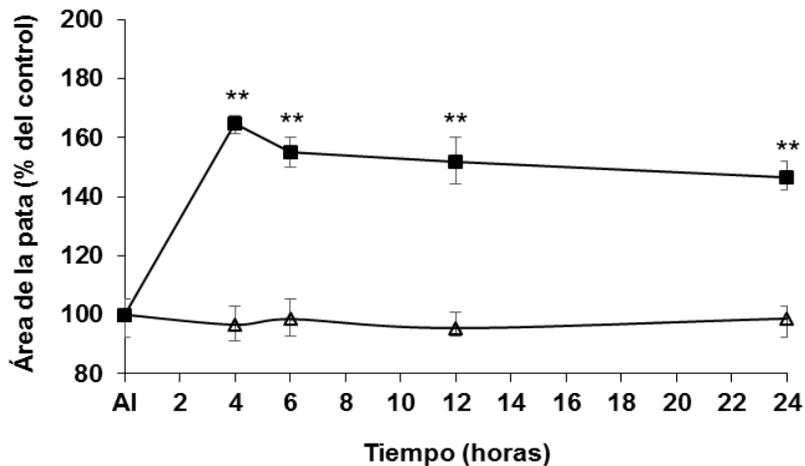
### 4.1 Curso temporal del edema inducido por quemadura en ratas.

En la Figura 12, se observa la evolución del área de la pata posterior izquierda de las ratas pertenecientes tanto al grupo control SI como en los grupos sometidos a la quemadura por inmersión en agua caliente. En el grupo control SI se obtuvo un valor de 888,65 mm<sup>2</sup> (820,95-935,90) (100%). En el grupo correspondiente a 4 h post-quemadura se observó edema con un valor máximo del área de la pata [1466,03 mm<sup>2</sup> (1415,08-1500,60) (164,9%)] e incremento de 0,6 veces respecto al grupo control SI, manteniéndose elevado durante 6, 12 y 24 h post-quemadura [1377,83 mm<sup>2</sup> (1308,79-1447,27) (155,1%); 1350,16 mm<sup>2</sup> (1247,21-1460,74) (151,9%) y 1302,70 mm<sup>2</sup> (1247,58-1375,42) (146,6%); respectivamente ( $p < 0,05$ )]. El tiempo correspondiente a 4 h post-quemadura se empleó como referencia para evaluar el efecto anti-inflamatorio del inhibidor del factor Xa.

### 4.2 Efecto de enoxaparina sobre el edema.

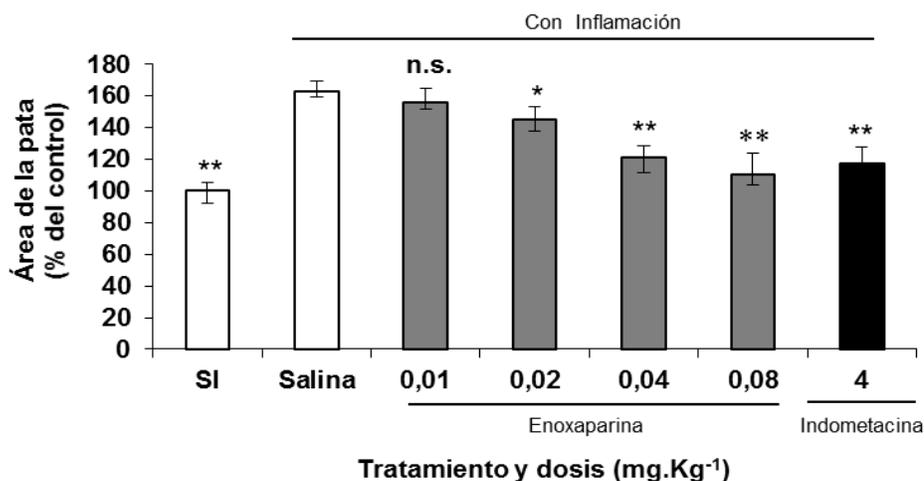
Al comparar el área de la pata inflamada entre los grupos pretratados con el inhibidor de FXa y el grupo de animales inflamados pretratados con solución salina se encontró diferencia estadísticamente significativa. Se pudo observar efecto antiedematogénico con una respuesta dosis-dependiente a 0,02; 0,04 y 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup> [1288,91 mm<sup>2</sup> (1197,20-1389,50) (145%); 1074,22 mm<sup>2</sup> (970,78-1159,54) (120,9%) y 980,22 mm<sup>2</sup> (945,58-1154,02) (110,3%), respectivamente vs 1444,38 mm<sup>2</sup> (1393,59-1543,54) (162,5%) ( $p < 0,05$ )], disminuyendo el edema 10,8%; 25,6% y 32,1%), respectivamente.

La indometacina, también redujo significativamente el edema [1039,27 mm<sup>2</sup> (945,58-1154,02) (116,9%) vs 1444,38 mm<sup>2</sup> (1393,59-1543,54) (162,5%) ( $p < 0,01$ )], con un efecto similar a dosis de 0,04 mg.Kg<sup>-1</sup> de enoxaparina (Figura 13).



**Figura 12.** Área de la pata trasera después de la inmersión en agua a temperatura ambiente (grupo control SI, triángulos abiertos) o agua a 60°C por 60 seg. (grupos con inflamación, cuadros cerrados) medidos previamente (AI, antes de inflamar) y a las 4, 6, 12 y 24 h post-quemadura. Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs ratas no inflamadas); n.s. no significativo;  $n = 6$  por grupo.

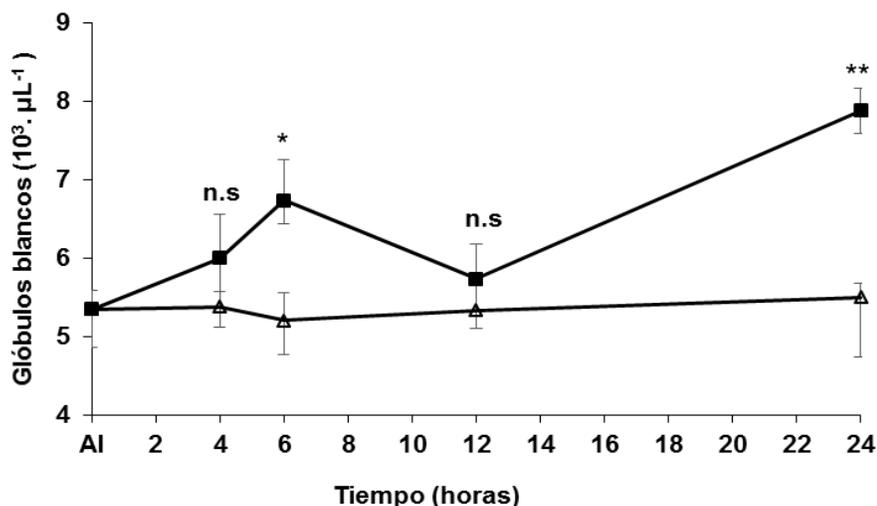
Por otra parte, el grupo control de ratas inflamadas pretratadas con solución salina, no mostró variación en el área del edema en comparación con el grupo de animales inflamados sin el vehículo 1444,38 mm<sup>2</sup> (1393,59-1543,54) vs 1457,50 mm<sup>2</sup> (1381,11-1534,86) ( $p > 0,05$ ) (datos no mostrados).



**Figura 13. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre el edema 4 h después de inducir la quemadura.** Se evaluó el porcentaje del área de la pata en ratas control SI, ratas inflamadas pretratadas con solución salina (barras blancas), ratas inflamadas pretratadas con enoxaparina (barras grises) e indometacina (barra negra). Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\**p* <0,05; \*\**p* <0,01; \*\*\**p* <0,001 vs salina con inflamación); n.s. no significativo; *n*= 6 por grupo.

#### 4.3 Contaje total de leucocitos en sangre periférica.

En la Figura 14 se muestra que el contaje de leucocitos en animales inflamados a las 6 y 24 h post-quemadura [ $6,7 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$  (6,4-7,3) y  $7,9 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$  (7,6-8,2)] incrementó significativamente en comparación con el grupo control SI [ $5,4 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$  (4,9-5,6) (*p*<0,05)]. No se observó incremento significativo del contaje de leucocitos a las 4 y 12 h post-quemadura. Se obtuvo un valor máximo de esta variable a las 24 h post-inflamación, con un incremento de leucocitos de 47,2% respecto al grupo control. Este tiempo se empleó como referencia para evaluar el efecto de enoxaparina.

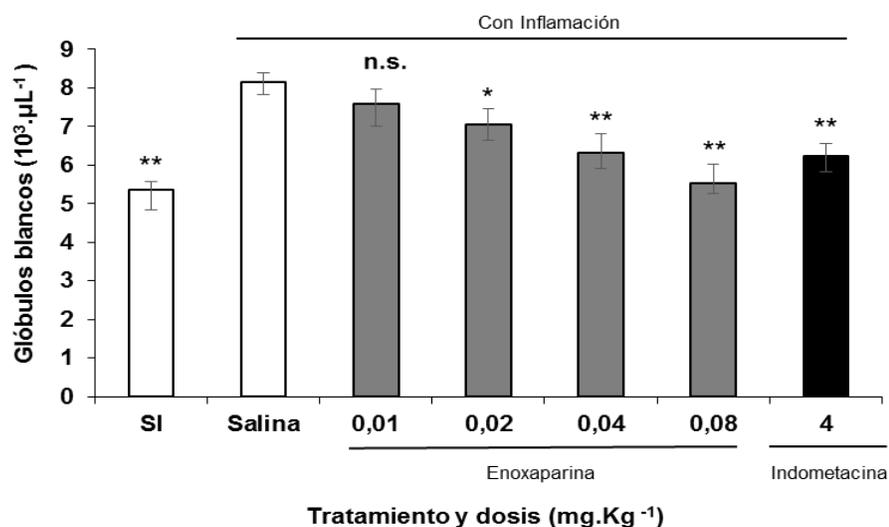


**Figura 14.** Contaje de leucocitos en sangre total luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente (grupo control SI, triángulos abiertos) o agua a 60°C por 60 seg. (grupos con inflamación, cuadros cerrados) medidos previamente (AI, antes de inflamar) y a las 4, 6, 12 y 24 h post-quemadura. Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\**p* <0,05; \*\**p* <0,01; \*\*\**p* <0,001 vs ratas no inflamadas); n.s. no significativo; *n*= 6 por grupo.

#### 4.4 Efecto de enoxaparina sobre el contaje total de leucocitos en sangre periférica.

En la Figura 15, se muestra un descenso progresivo significativo del recuento leucocitario en animales inflamados pretratados con enoxaparina a dosis 0,02; 0,04 y 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup> al compararlos con el grupo de animales inflamados pretratados con solución salina [7,1 x 10<sup>3</sup> · μL<sup>-1</sup> (6,6-7,5); 6,3 x 10<sup>3</sup> · μL<sup>-1</sup> (5,9-6,8) y 5,5 x 10<sup>3</sup> · μL<sup>-1</sup> (5,3-6,0), respectivamente vs 8,2 x 10<sup>3</sup> · μL<sup>-1</sup> (7,8-8,4) (*p*<0,05)]. Los porcentajes de descenso del recuento leucocitario en dichos grupos experimentales, respecto al grupo inflamado pretratado con solución salina fueron 13,4%, 23,2% y 32,9% respectivamente, siendo la dosis de 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup> la que tuvo el mayor efecto antiinflamatorio. El pretratamiento con indometacina también disminuyó significativamente el contaje de leucocitos, respecto al grupo de animales inflamados

pretratados con solución salina [ $6,2 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (5,8-6,6) vs  $8,2 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (7,8-8,4) ( $p < 0,05$ )].



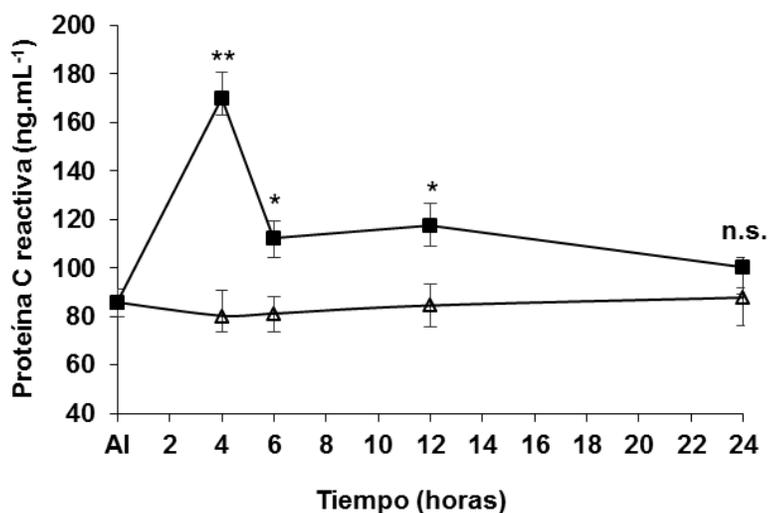
**Figura 15. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre el recuento de leucocitos en sangre periférica 24 h después de inducir la quemadura.** Se evaluó en ratas control SI, ratas inflamadas pretratadas con solución salina (barras blancas), ratas inflamadas pretratadas con enoxaparina (barras grises) e indometacina (barra negra). Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs salina con inflamación); n.s. no significativo;  $n = 6$  por grupo.

Por otro lado, el recuento leucocitario en animales inflamados pretratados con solución salina, no varió al compararlo con el grupo de animales inflamados sin pretratamiento alguno [ $8,2 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (7,8-8,4) vs  $7,9 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (7,6-8,2) ( $p > 0,05$ )] (datos no mostrados).

#### 4.5 Concentración plasmática de PCR.

Al evaluar el curso temporal de la concentración plasmática de PCR, se produjo un aumento significativo de este reactante de fase aguda a las 4 [ $170,09 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  (159,22-183,25)], 6 [ $112,37 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  (105,08-117,67)] y 12 h post-quemadura [ $117,68 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

(109,61-128,73)], respecto al grupo control SI [85,84 ng.mL<sup>-1</sup> (79,95-91,18) ( $p < 0,05$ )]. Sin embargo, a 24 h post-quemadura no hubo variación significativa de este marcador inflamatorio. La concentración máxima de este biomarcador de inflamación se alcanzó a 4 h post-quemadura, duplicando el valor del grupo control. Los grupos de animales inflamados correspondientes a 6 y 12 h post-quemadura, mostraron también incremento en los valores de PCR de 30,9% y 37,1% respectivamente, al comparar con el valor obtenido en el grupo control SI (Figura 16). El efecto de enoxaparina sobre esta proteína se evaluó a 4 h post-quemadura.

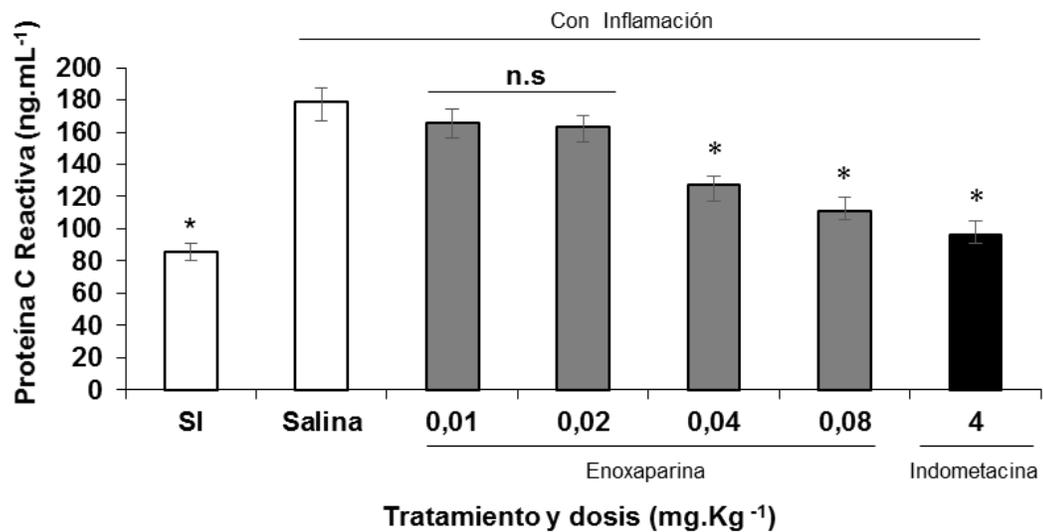


**Figura 16.** Concentración sérica de PCR luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente (grupo control SI, triángulos abiertos) o agua a 60°C por 60 seg. (grupos con inflamación, cuadros cerrados) medidos previamente (AI, antes de inflamar) y a las 4, 6, 12 y 24 h post-quemadura. Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs ratas no inflamadas); n.s, no significativo;  $n = 6$  por grupo.

#### 4.6 Efecto de enoxaparina sobre la concentración plasmática de PCR.

La Figura 17, muestra el efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre la concentración de PCR a 4 h post-quemadura, se observa que las dosis 0,04 [127,54 ng.mL<sup>-1</sup> (117,15-132,97)] y 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup> [111,06 ng.mL<sup>-1</sup> (105,51-119,88)] del inhibidor de FXa disminuyeron significativamente los valores séricos de PCR, respecto al grupo inflamado pretratado con solución salina [178,85 ng.mL<sup>-1</sup> (167,14-187,40) ( $p < 0,05$ )]. Las dosis del inhibidor de FXa 0,04 y 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup>, disminuyeron la concentración de PCR 28,7% y 37,9% respectivamente. Asimismo, el pretratamiento con indometacina redujo significativamente (46%) la concentración de PCR, respecto al grupo inflamado pretratado con el vehículo [96,51 ng.mL<sup>-1</sup> (91,01-105,25) vs 178,85 ng.mL<sup>-1</sup> (167,14-187,40) ( $p < 0,05$ )].

Cabe destacar que los valores de PCR en animales inflamados pretratados con solución salina, fueron estadísticamente similares a los obtenidos en el grupo inflamado sin pretratamiento [178,85 ng.mL<sup>-1</sup> (167,14-187,40) vs 170,09 ng.mL<sup>-1</sup> (159,22-183,25) ( $p > 0,05$ )], demostrando que el vehículo no tiene efecto alguno sobre la concentración de este marcador inflamatorio (datos no mostrados).



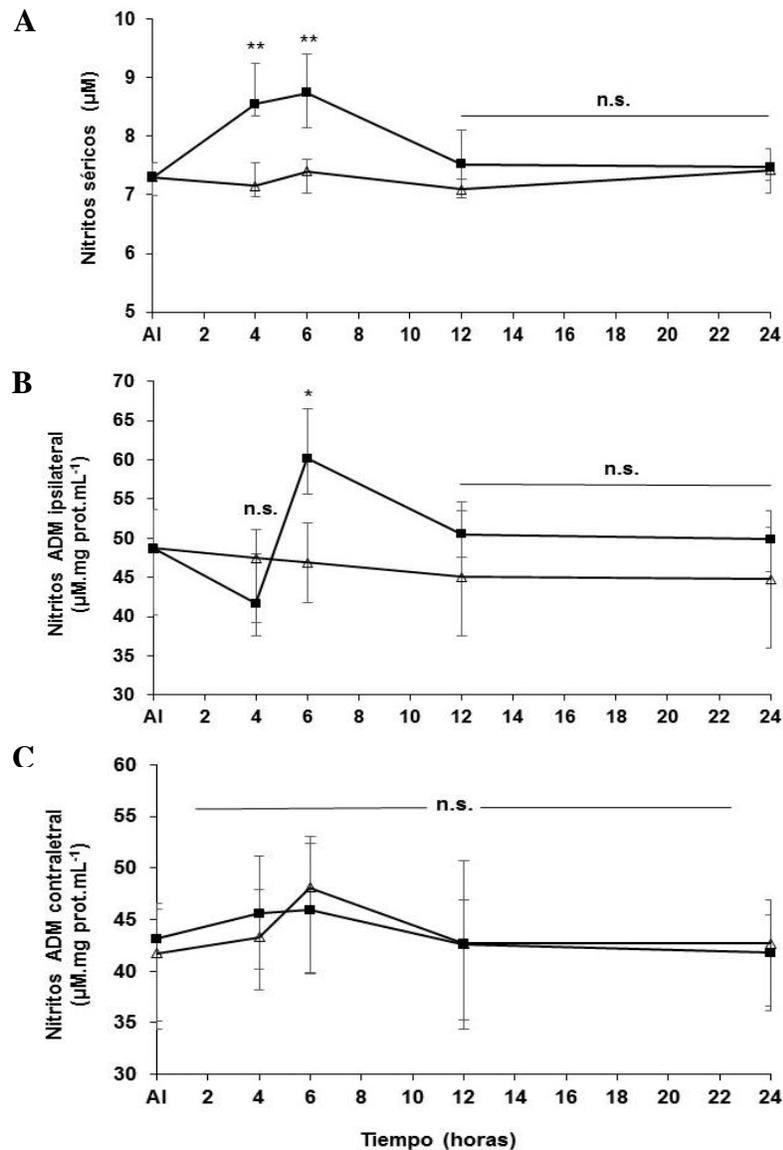
**Figura 17. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre la concentración de proteína C reactiva, 4 h después de inducir la quemadura.** Se evaluó en ratas control SI, ratas inflamadas pretratadas con solución salina (barras blancas), ratas inflamadas pretratadas con enoxaparina (barras grises) e indometacina (barra negra). Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\**p* <0,05; \*\**p* <0,01; \*\*\**p* <0,001 vs salina con inflamación); n.s. no significativo; *n*= 6 por grupo.

#### **4.7 Concentración de nitritos en suero, asta dorsal medular e índice nitritos ADM ipsilateral/contralateral en ratas con o sin inflamación inducida.**

En la Figura 18A, se muestra un incremento significativo en la concentración plasmática de nitritos a 4 h [8,55  $\mu\text{M}$  (8,35-9,25) (17,1%)] y a 6 h [8,74  $\mu\text{M}$  (8,14-9,40) (19,7%)] en comparación con los valores obtenidos en el grupo control SI [7,30  $\mu\text{M}$  (7,00-7,55) ( $p < 0,01$ )]

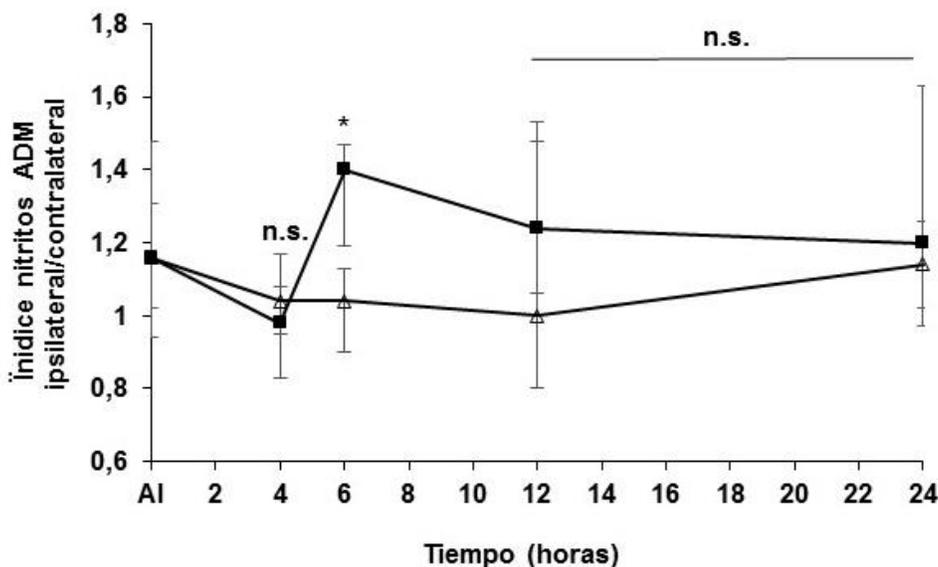
En la Figura 18B se puede observar un incremento significativo de 23,4% en la concentración de nitritos en asta dorsal medular ipsilateral en el grupo experimental correspondiente a 6 h post-quemadura, al comparar con el grupo al que no se le indujo la quemadura [60,18  $\mu\text{M.mg prot.mL}^{-1}$  (55,68-66,55) *vs* 48,78  $\mu\text{M.mg prot.mL}^{-1}$  (40,27-53,66) ( $p < 0,05$ )], mientras que en el resto de los grupos experimentales no hubo variación de la variable respecto al grupo control SI. Considerando estos resultados, se evaluó el efecto de enoxaparina sobre la concentración de nitritos en suero y asta dorsal ipsilateral a las 6 h post-quemadura.

La concentración de nitritos en asta dorsal medular contralateral de animales inflamados no varió significativamente al comparar con el grupo control SI (Figura 18C), por lo tanto, no se evaluó el efecto de enoxaparina sobre la variable en este tejido.



**Figura 18.** Concentración de nitritos en suero (A), asta dorsal medular (ADM) ipsilateral (B) y asta dorsal medular (ADM) contralateral (C), luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente (grupo control SI, triángulos abiertos) o agua a  $60^{\circ}\text{C}$  por 60 seg. (grupos con inflamación, cuadros cerrados) medidos previamente (AI, antes de inflamar) y a las 4, 6, 12 y 24 h post-quemadura. Los valores representan la mediana y  $P_{25} - P_{75}$  (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs ratas no inflamadas); n.s. no significativo;  $n = 6$  por grupo.

En la Figura 19, se observa un incremento significativo (34,6%) del índice nitritos ADM ipsilateral/contralateral en el grupo experimental correspondiente a 6 h post-quemadura, comparado con el grupo control SI [(1,4 (1,19-1,47) vs 1,04 (0,90-1,35); ( $p < 0,05$ )], no obstante, en el resto de los tiempos no hubo variación del índice ADM ipsilateral/contralateral entre los grupos de estudio.

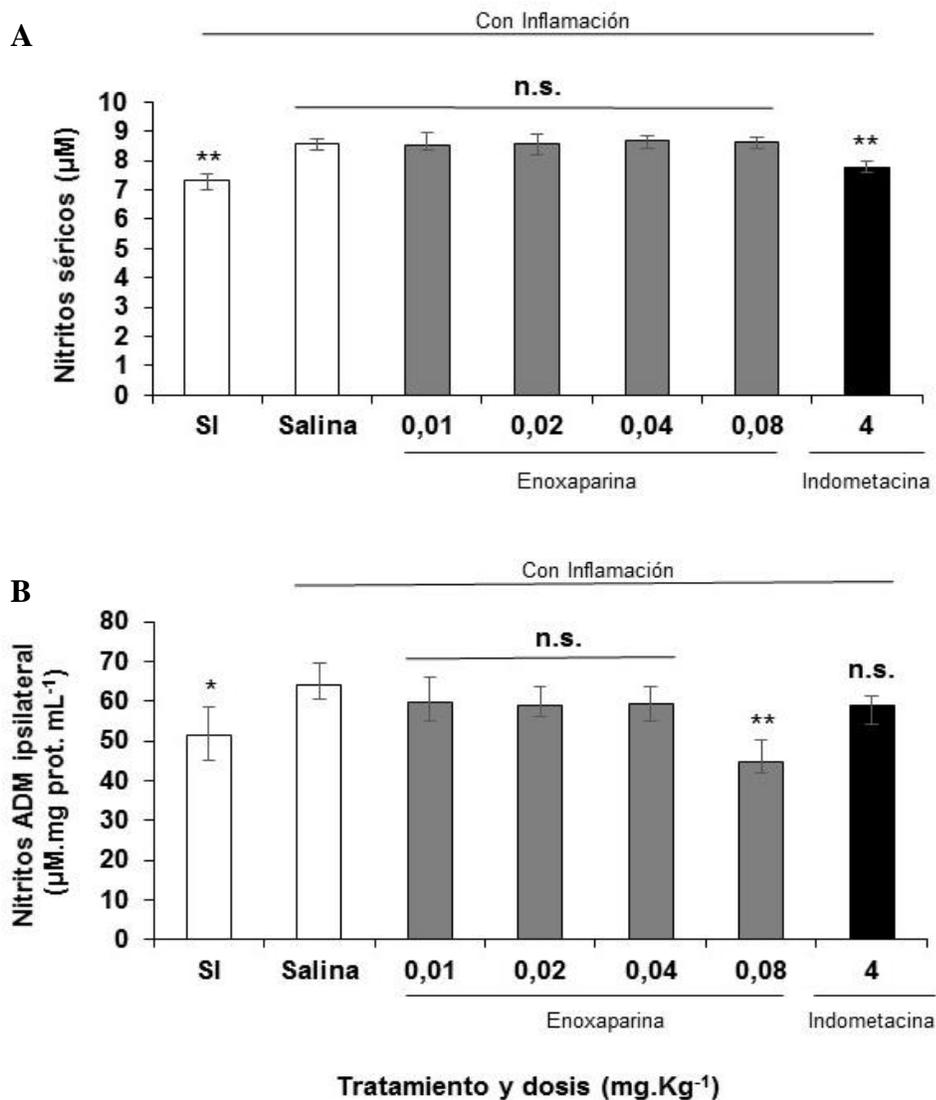


**Figura 19.** Índice nitritos ADM ipsilateral/contralateral luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente (grupo control SI, triángulos abiertos) o agua a 60°C por 60 seg. (grupos con inflamación, cuadros cerrados) medidos previamente (AI, antes de inflamar) y a las 4, 6, 12 y 24 h post-quemadura. Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs ratas no inflamadas); n.s. no significativo;  $n = 6$  por grupo.

#### **4.8 Efecto de enoxaparina sobre la concentración de nitritos en suero, asta dorsal medular e índice nitritos ADM ipsilateral/contralateral.**

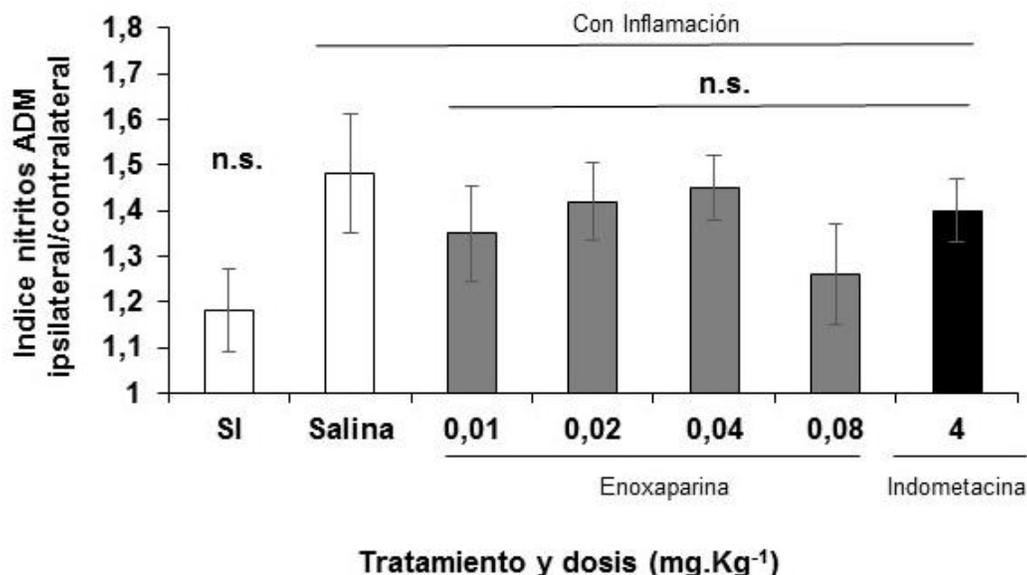
En la Figura 20A, se puede observar que en animales pretratados con el inhibidor de FXa no varió de manera significativa la concentración sérica de nitritos respecto del grupo inflamado pretratado con solución salina. Sin embargo, en el grupo de animales pretratados con indometacina, disminuyó significativamente este marcador [7,78  $\mu\text{M}$  (7,60-8,00) vs 8,55  $\mu\text{M}$  (8,37-8,56) ( $p < 0,05$ )].

Por otra parte, la administración del inhibidor disminuyó progresivamente los valores de nitritos en asta dorsal ipsilateral de animales inflamados, siendo la dosis de 0,08  $\text{mg.Kg}^{-1}$  la que mostró una reducción significativa de la concentración (30,6%), respecto al grupo inflamado pretratado con solución salina [44,56  $\mu\text{M.mg prot.mL}^{-1}$  (42,02-50,10) vs 64,22  $\mu\text{M.mg prot.mL}^{-1}$  (60,63-69,08) ( $p < 0,05$ )]. La administración de indometacina no tuvo efecto alguno sobre los niveles del marcador en este compartimiento (Figura 20B).



**Figura 20.** Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre la concentración de nitritos en suero (A) y asta dorsal medular (ADM) ipsilateral (B), 6 h después de inducir la quemadura. Se evaluó en ratas control SI, ratas inflamadas pretratadas con solución salina (barras blancas), ratas inflamadas pretratadas con enoxaparina (barras grises) e indometacina (barra negra). Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs salina con inflamación); n.s. no significativo;  $n = 6$  por grupo.

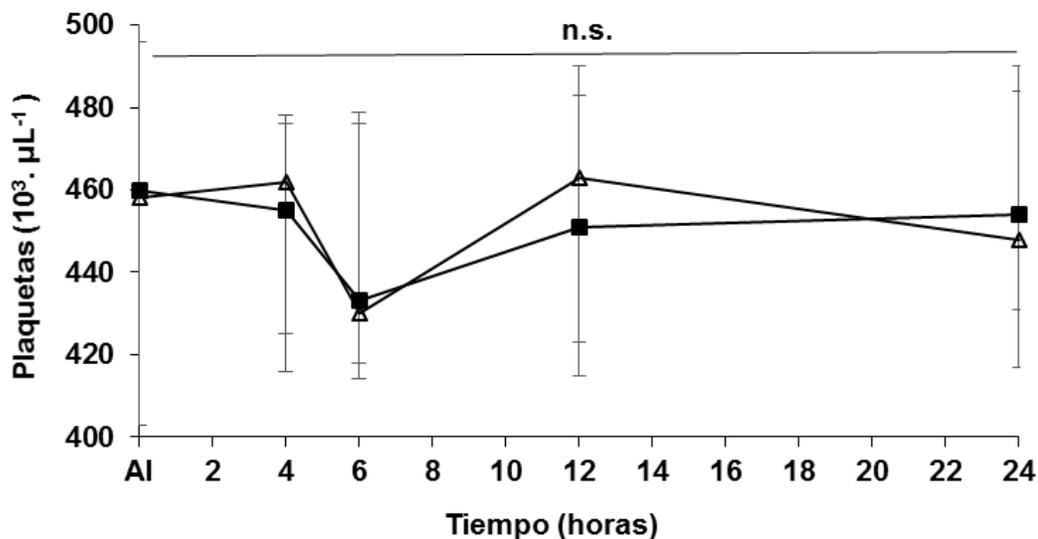
En la Figura 21, se observa que en el índice de nitritos ADM ipsilateral/contralateral en el grupo de animales inflamados pretratados con solución salina, se obtuvo un valor de 1,48 (1,35-1,61) y no hubo diferencias significativas al comparar con el grupo de animales inflamados pretratados con los fármacos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 21. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre el índice nitritos ADM ipsilateral/contralateral, 6 h después de inducir la quemadura.** Se evaluó en ratas control SI, ratas inflamadas pretratadas con solución salina (barras blancas), ratas inflamadas pretratadas con enoxaparina (barras grises) e indometacina (barra negra). Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs salina con inflamación); n.s. no significativo;  $n = 6$  por grupo.

#### 4.9 Contaje total de plaquetas en sangre periférica.

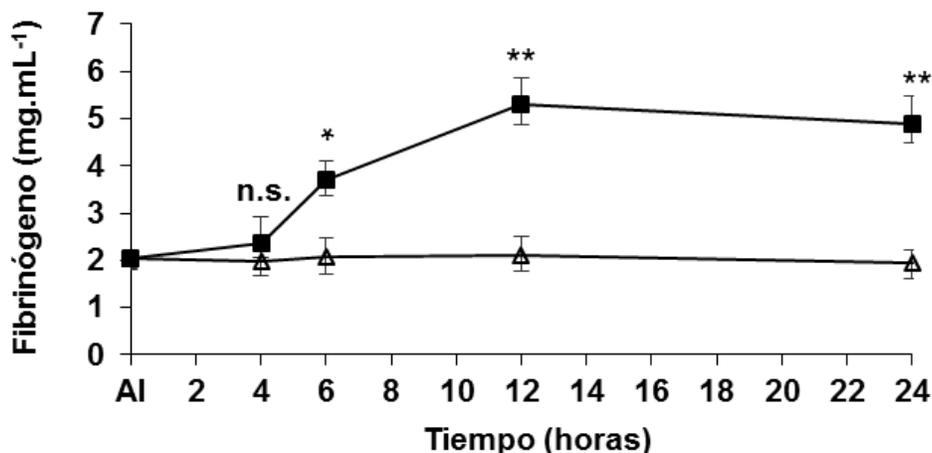
El recuento plaquetario en las ratas controles sin inflamación fue de  $460 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$  (403-518). Este valor no se modificó estadísticamente en los grupos con inflamación en cada uno de los tiempos post-quemadura ( $p > 0,05$ ), por lo tanto, no se evaluó el efecto de enoxaparina o indometacina sobre esta variable (Figura 22).



**Figura 22.** Contaje de plaquetas en sangre total luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente (grupo control SI, triángulos abiertos) o agua a 60°C por 60 seg. (grupos con inflamación, cuadros cerrados) medidos previamente (AI, antes de inflamar) y a las 4, 6, 12 y 24 h post-quemadura. Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001 vs ratas no inflamadas); n.s. no significativo; *n* = 6 por grupo.

#### 4.10 Concentración plasmática de Fg.

En la Figura 23, se observa un incremento significativo en la concentración plasmática de Fg a partir de 6 h post-quemadura [3,69 mg.mL<sup>-1</sup> (3,47-3,90) (81,8%)], alcanzando un valor máximo a 12 h [5,30 mg.mL<sup>-1</sup> (5,14-5,49) (161,1%)] y manteniéndose elevado 24 h posterior a la quemadura [4,9 mg.mL<sup>-1</sup> (4,77-4,98) (141,4%)], al comparar con el grupo control SI [2,03 mg.mL<sup>-1</sup> (1,81-2,23) (*p* < 0,05)]. El intervalo de 12 h post-quemadura, se empleó como referencia para evaluar el efecto del inhibidor de FXa.

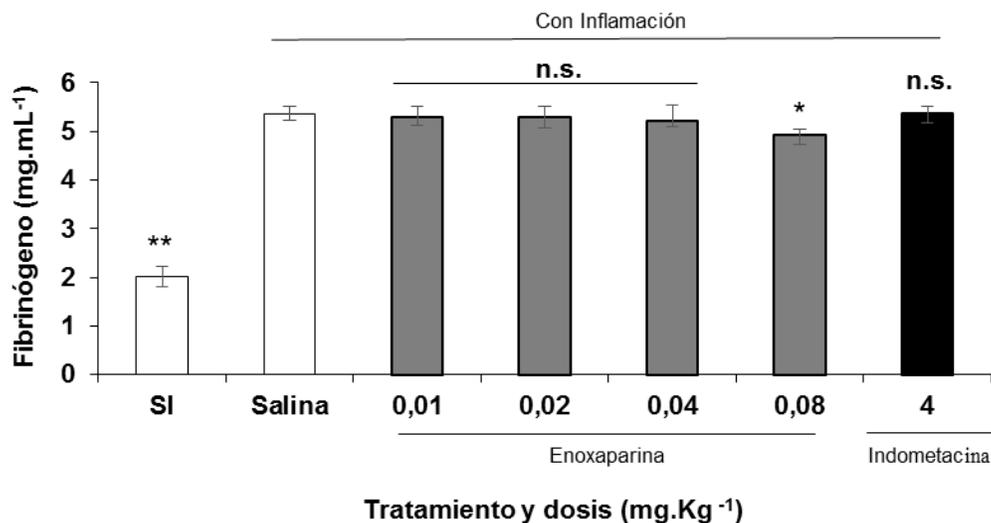


**Figura 23.** Concentración plasmática de Fg luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente (grupo control SI, triángulos abiertos) o agua a 60°C por 60 seg. (grupos con inflamación, cuadros cerrados) medidos previamente (AI, antes de inflamar) y a las 4, 6, 12 y 24 h post-quemadura. Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\**p* <0,05; \*\**p* <0,01; \*\*\**p* <0,001 vs ratas no inflamadas); n.s. no significativo; *n*= 6 por grupo.

#### 4.11 Efecto de enoxaparina sobre la concentración plasmática de Fg.

En la Figura 24, se observa que enoxaparina a dosis 0,01, 0,02 y 0,04 mg·Kg<sup>-1</sup> e indometacina no produjeron modificación de la fibrinogenemia en los grupos inflamados. Sin embargo, la dosis 0,08 mg·Kg<sup>-1</sup> del inhibidor de FXa, disminuyó significativamente los valores de fibrinógeno (8%), en comparación con el grupo control inflamado pretratado con solución salina [4,92 mg.mL<sup>-1</sup> (4,74-5,06) vs 5,35 mg.mL<sup>-1</sup> (5,22-5,52) (*p*<0,05)].

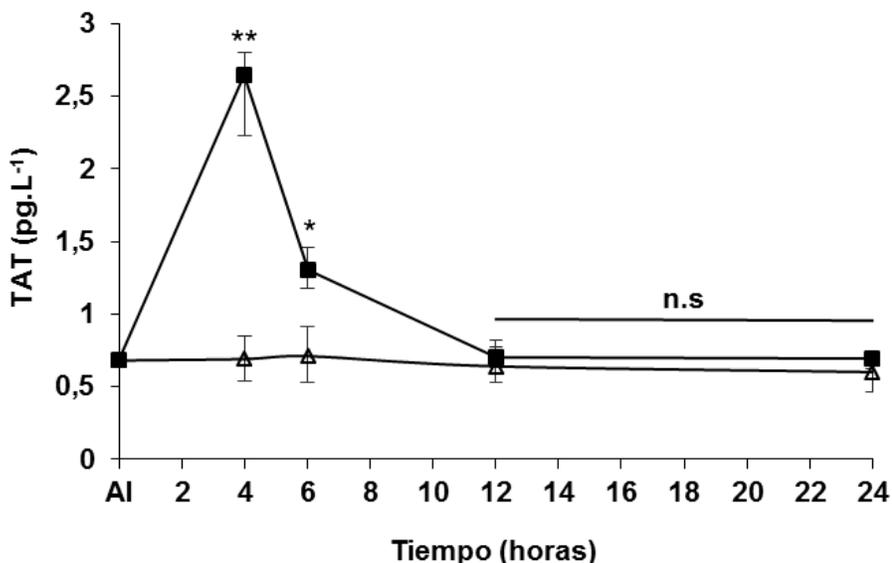
Es oportuno mencionar que los valores de Fg en animales inflamados pretratados con solución salina, no mostraron modificación respecto a los obtenidos en el grupo inflamado sin pretratamiento [5,35 mg.mL<sup>-1</sup> (5,22-5,52) vs 5,30 mg.mL<sup>-1</sup> (5,14-5,49) (*p*>0,05)] (datos no mostrados).



**Figura 24. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre la concentración de Fg, 12 h después de inducir la quemadura.** Se evaluó en ratas control SI, ratas inflamadas pretratadas con solución salina (barras blancas), ratas inflamadas pretratadas con enoxaparina (barras grises) e indometacina (barra negra). Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs salina con inflamación); n.s. no significativo;  $n = 6$  por grupo.

#### 4.12 Concentración plasmática de complejo TAT.

Como puede observarse en la Figura 25, los grupos de ratas correspondientes a 4 y 6 h post-quemadura, presentaron valores de TAT significativamente más elevados que los animales sin inflamación SI [2,65 pg.L<sup>-1</sup> (2,23-2,72) y 1,00 pg.L<sup>-1</sup> (0,76-1,16) respectivamente vs 0,68 pg.L<sup>-1</sup> (0,63-0,72) ( $p < 0,05$ )], alcanzando su valor máximo a las 4 h posterior a la quemadura, con incremento de 289,7%, respecto al valor del control. Por lo tanto, este tiempo fue empleado como referencia para evaluar el efecto del fármaco. El resto de los grupos correspondientes a 12 y 24 h post-quemadura, no registraron modificación alguna en la concentración de TAT al compararlos con el control SI.

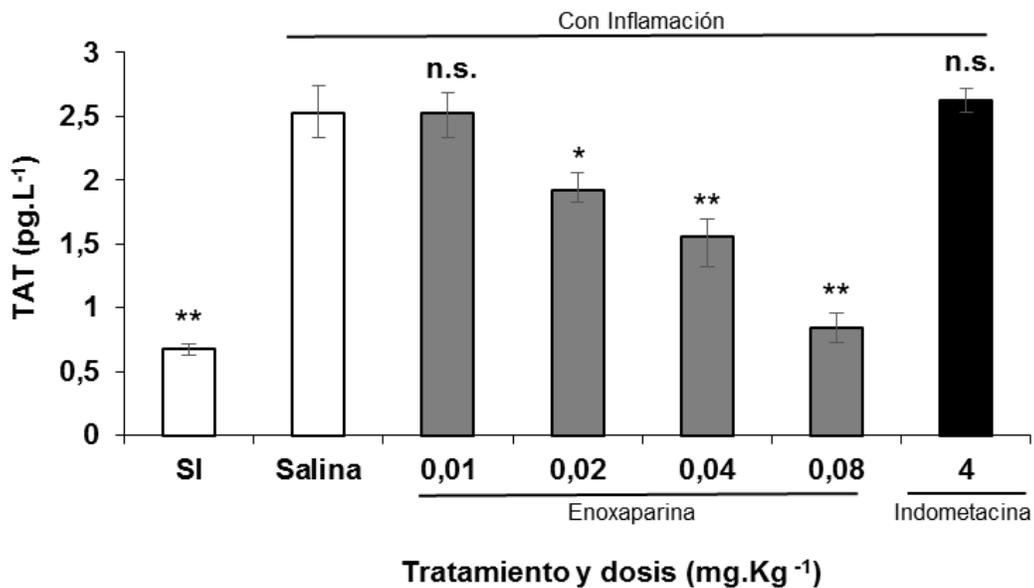


**Figura 25.** Concentración plasmática de TAT luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente (grupo control SI, triángulos abiertos) o agua a 60°C por 60 seg. (grupos con inflamación, cuadros cerrados) medidos previamente (AI, antes de inflamar) y a las 4, 6, 12 y 24 h post-quemadura. Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001 vs ratas no inflamadas); n.s. no significativo; *n* = 6 por grupo.

#### 4.13 Efecto de enoxaparina sobre la concentración plasmática de complejo TAT.

El pretratamiento con enoxaparina a dosis 0,02; 0,04 y 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup>, originó un descenso progresivo y significativo de la concentración de complejo TAT a 4 h post-quemadura, respecto a las ratas pretratadas con solución salina e inflamadas [1,92 pg.L<sup>-1</sup> (1,83-2,06); 1,56 pg.L<sup>-1</sup> (1,32-1,69) y 0,84 pg.L<sup>-1</sup> (0,73-0,96) respectivamente vs 2,52 pg.L<sup>-1</sup> (2,33-2,74) (*p* < 0,05)]; disminuyendo los valores plasmáticos de TAT 23,8%, 30,1% y 66,7% respectivamente. El pretratamiento con indometacina no modificó los valores de TAT al comparar los grupos de estudio (Figura 26).

Sobre este particular, el grupo inflamado pretratado con solución salina, no presentó variación en los valores de TAT al compararse con el grupo inflamado sin pretratamiento [ $2,52 \text{ pg.L}^{-1}$  (2,33-2,74) vs  $2,65 \text{ pg.L}^{-1}$  (2,23-2,72) ( $p > 0,05$ )] (datos no mostrados).



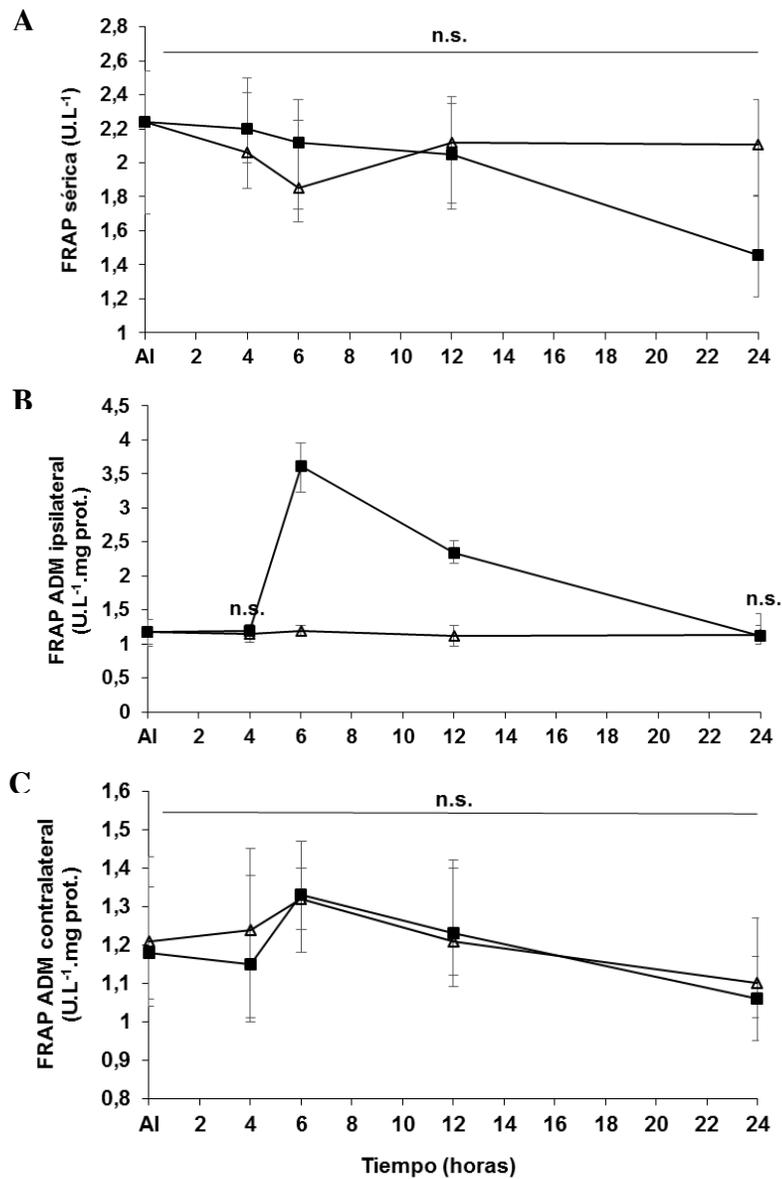
**Figura 26.** Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre la concentración de TAT, 4 h después de inducir la quemadura. Se evaluó en ratas control SI, ratas inflamadas pretratadas con solución salina (barras blancas), ratas inflamadas pretratadas con enoxaparina (barras grises) e indometacina (barra negra). Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs salina con inflamación); n.s. no significativo;  $n = 6$  por grupo.

#### **4.14 Actividad de FRAP en suero y ADM. Índice FRAP ADM ipsilateral/contralateral.**

En la Figura 27A se observa que el valor sérico de FRAP en el grupo control SI fue  $2,24 \text{ U.L}^{-1}$  (1,70-2,54) y no hubo variación significativa al comparar con los grupos experimentales inflamados ( $p>0.05$ ). Es por ello que, no se evaluó el efecto de enoxaparina o indometacina sobre este marcador sérico.

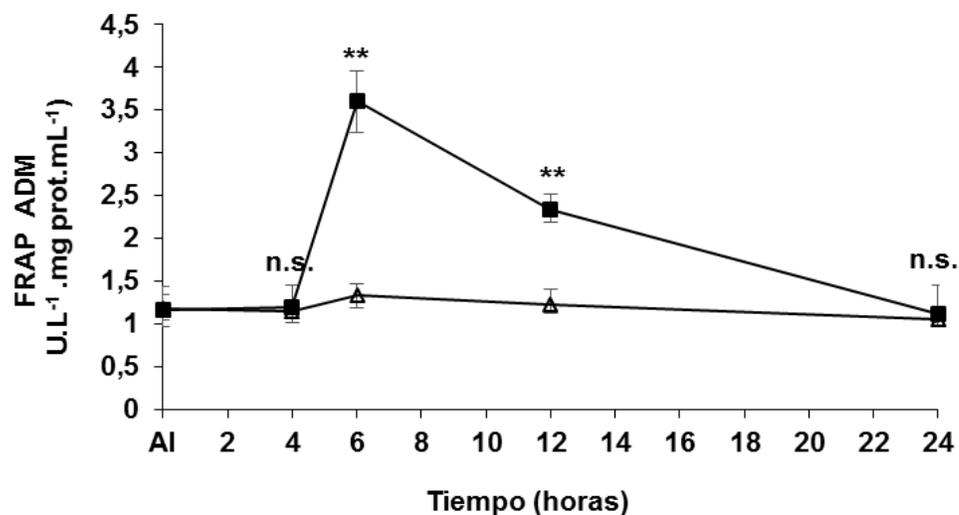
Los valores de FRAP se incrementaron significativamente en ADM ipsilateral en los grupos correspondientes a 6 y 12 h post-quemadura (208,6% y 99,2%, respectivamente), al comparar con el grupo control SI [ $3,61 \text{ U.L}^{-1} \cdot \text{mg prot.}$  (3,23-3,95) y  $2,33 \text{ U.L}^{-1} \cdot \text{mg prot.}$  (2,19-2,52) respectivamente vs  $1,17 \text{ U.L}^{-1} \cdot \text{mg prot.}$  (0,96-1,35) ( $p<0,05$ )] (Figura 27B). Para evaluar el efecto de enoxaparina sobre la actividad de FRAP en ADM ipsilateral se empleó el tiempo correspondiente a 6 h post-quemadura.

Se obtuvo un valor de FRAP  $1,18 \text{ U.L}^{-1} \cdot \text{mg prot.}$  (1,04-1,43) en ADM contralateral, el cual no se modificó significativamente al comparar con los grupos inflamados ( $p>0.05$ ) (Figura 27C), por lo tanto, no se evaluó el efecto de enoxaparina o indometacina sobre el marcador en este compartimiento.



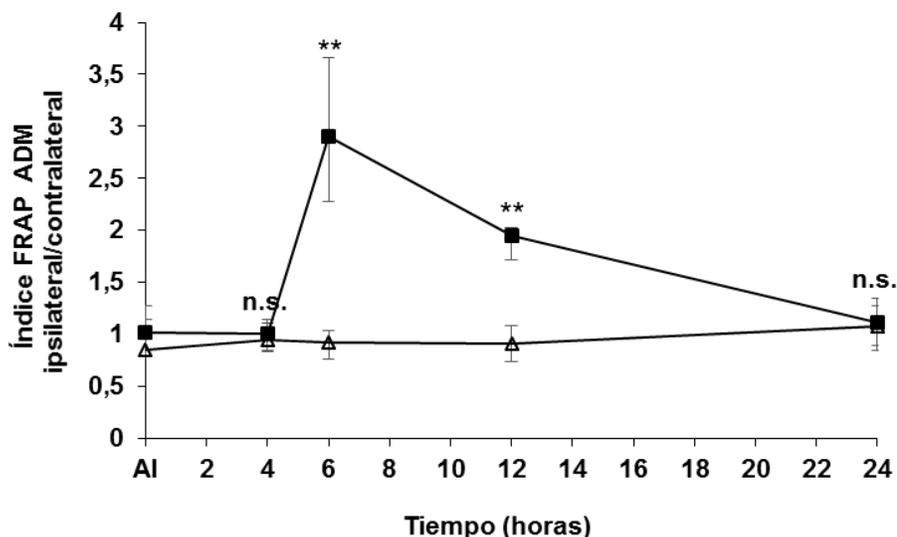
**Figura 27.** Actividad de FRAP en suero (A), asta dorsal medular (ADM) ipsilateral (B) y asta dorsal medular (ADM) contralateral (C), luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente (grupo control SI, triángulos abiertos) o agua a 60°C por 60 seg. (grupos con inflamación, cuadros cerrados) medidos previamente (AI, antes de inflamar) y a las 4, 6, 12 y 24 h post-quemadura. Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub>. (\**p* <0,05; \*\**p* <0,01; \*\*\**p* <0,001 vs ratas no inflamadas); n.s. no significativo; *n*= 6 por grupo.

La Figura 28, muestra un incremento significativo de la actividad de FRAP en ADM ipsilateral en comparación a la actividad de esta enzima en ADM contralateral a 6 h [3,61 mM.mg prot.mL<sup>-1</sup> (3,23-3,95) vs 1,32 mM.mg prot.mL<sup>-1</sup> (1,24-1,40) (173,5%)] y 12 h post-quemadura [2,33 mM.mg prot.mL<sup>-1</sup> (2,19-2,52) vs 1,21 mM.mg prot.mL<sup>-1</sup> (1,09-1,42) (92,6%) ( $p < 0,01$ )].



**Figura 28. Actividad de FRAP en ADM ipsilateral (cuadros cerrados) y ADM contralateral (triángulos abiertos) en ratas con inflamación inducida por inmersión de la pata trasera en agua a 60°C por 60 seg., medida previamente (AI, antes de inflamar) y a las 4, 6, 12 y 24 h post-quemadura.** Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs ratas no inflamadas); n.s. no significativo;  $n = 6$  por grupo.

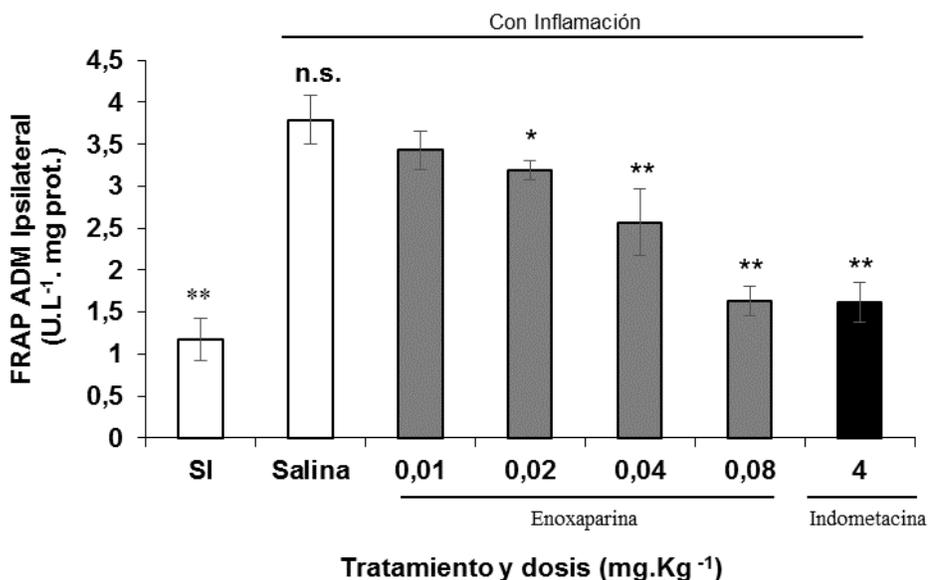
En la Figura 29, se observa un incremento significativo del índice FRAP ADM ipsilateral/contralateral en los grupos de animales inflamados correspondientes a 6 y 12 h post-quemadura, respecto al grupo control SI [(2,9 (2,28-3,66) vs 0,92 (0,76-1,03) y 1,95 (1,71-2,3) vs 0,91 (0,74-1,08), respectivamente ( $p < 0,01$ )]. No obstante, en el resto de los tiempos no hubo variación del índice entre los grupos de estudio



**Figura 29.** Índice FRAP ADM ipsilateral/contralateral luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente (grupo control SI, triángulos abiertos) o agua a 60°C por 60 seg. (grupos con inflamación, cuadros cerrados) medidos previamente (AI, antes de inflamar) y a las 4, 6, 12 y 24 h post-quemadura. Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001 vs ratas no inflamadas); n.s, no significativo; *n* = 6 por grupo.

#### 4.15 Efecto de enoxaparina sobre la actividad de FRAP en ADM ipsilateral.

La Figura 30, muestra que el pretratamiento de enoxaparina a dosis 0,02; 0,04; 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup> e indometacina redujeron progresivamente la actividad de FRAP en ADM ipsilateral en animales inflamados en comparación con el grupo inflamado pretratado con solución salina [3,19 U.L<sup>-1</sup>.mg prot. (3,10-3,32) (15,8%,); 2,57 U.L<sup>-1</sup>.mg prot. (2,25-2,82) (32,2%,); 1,63 U.L<sup>-1</sup>.mg prot. (1,48-1,84) (57%) y 1,62 U.L<sup>-1</sup>.mg prot. (1,38-1,95) (57,3%), respectivamente vs 3,79 U.L<sup>-1</sup>.mg prot. (3,35-3,94) (*p* < 0,05)]. La dosis de enoxaparina 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup> tuvo efecto similar al antiinflamatorio de referencia.

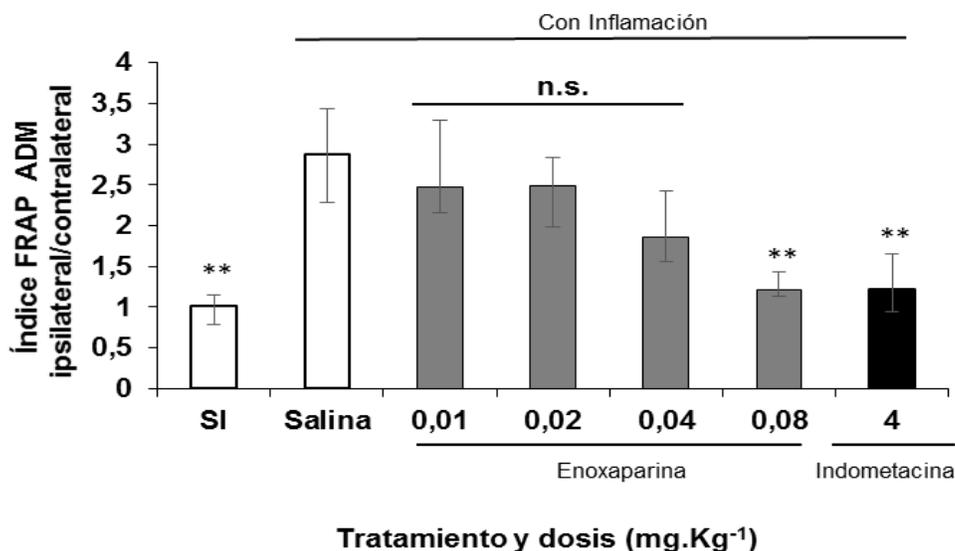


**Figura 30. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre la actividad de FRAP en ADM ipsilateral 6 h después de inducir la quemadura.** Se evaluó en ratas control SI, ratas inflamadas pretratadas con solución salina (barras blancas), ratas inflamadas pretratadas con enoxaparina (barras grises) e indometacina (barra negra). Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\**p* <0,05; \*\**p* <0,01; \*\*\**p* <0,001 vs salina con inflamación); n.s. no significativo; *n*= 6 por grupo.

En la Figura 31, se observa que el pretratamiento con enoxaparina a dosis 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup> e indometacina, produjeron descenso significativo del índice FRAP ADM ipsilateral/contralateral (57,8% y 57,5%, respectivamente) al comparar con el grupo de animales inflamados pretratados con solución salina [1,86 (1,56-2,43); 1,21 (1,13-1,43) y 1,22 (0,95-1,65) respectivamente vs 2,87 (2,29-3,44) (*p*<0,05)]. Cabe destacar que el pretratamiento con enoxaparina a 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup> e indometacina, alcanzaron valores de índice FRAP ADM ipsilateral/contralateral, similares al grupo de animales SI [1,02 (0,79-1,14)].

Por otra parte, los resultados obtenidos evidencian que la actividad de FRAP en ADM ipsilateral no se modificó en animales inflamados pretratados con solución

salina, al comparar con ratas inflamadas sin pretratamiento alguno [1,67 U.L<sup>-1</sup>.mg prot. (1,52-2,18) vs 1,80 U.L<sup>-1</sup>.mg prot. (1,35-2,07) ( $p>0,05$ )] (datos no mostrados).

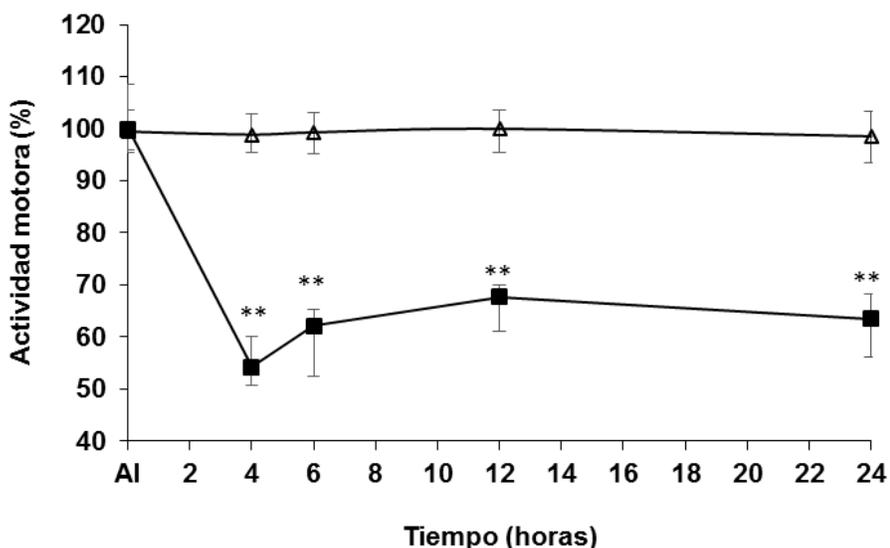


**Figura 31. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre el índice FRAP ADM ipsilateral/contralateral 6 h después de inducir la quemadura.** Se evaluó en ratas control SI, ratas inflamadas pretratadas con solución salina (barras blancas), ratas inflamadas pretratadas con enoxaparina (barras grises) e indometacina (barra negra). Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs salina con inflamación); n.s, no significativo;  $n = 6$  por grupo.

#### 4.16 Variación en la actividad motora.

Al evaluar la actividad motora, se observa que todos los grupos experimentales post-quemadura, mostraron significativamente menor distancia recorrida al comparar con el grupo control SI; siendo el grupo correspondiente a 4 h post-quemadura, el que presentó menor porcentaje de desplazamiento (54,3%;  $p < 0,01$ ). La reducción de la actividad motora a 6 h fue de 62,1%, a 12 h 67,8% y 24 h post-quemadura 63,5%

( $p < 0,01$ ), respecto al valor sin inflamación SI. De acuerdo con estos resultados, se empleó el tiempo correspondiente a 4 horas post-quemadura para evaluar el efecto de enoxaparina sobre la variable (Figura 32).



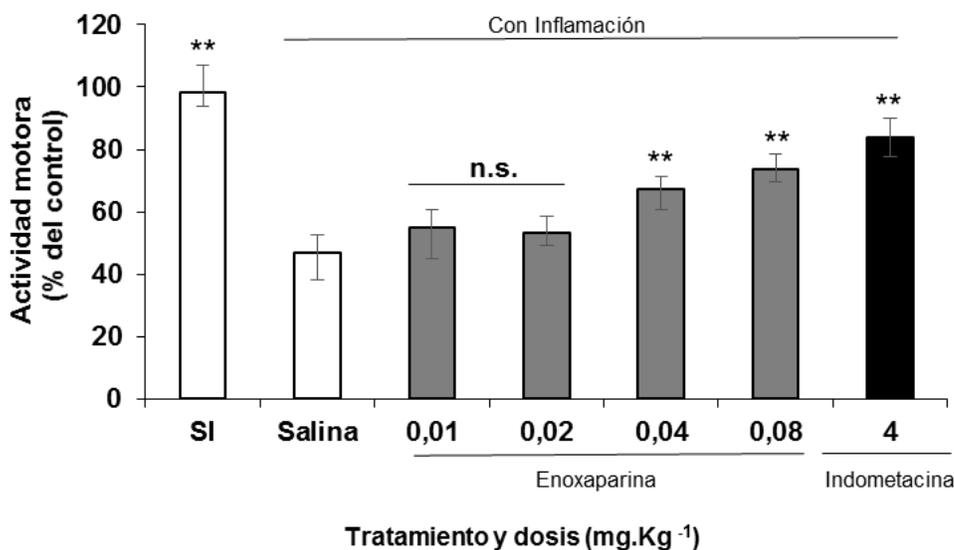
**Figura 32. Actividad motora luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente (grupo control SI, triángulos abiertos) o agua a 60°C por 60 seg. (grupos con inflamación, cuadros cerrados) medidos previamente (AI, antes de inflamar) y a las 4, 6, 12 y 24 h post-quemadura.** Los valores representan la mediana y  $P_{25} - P_{75}$  (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs ratas no inflamadas); n.s., no significativo;  $n = 6$  por grupo.

#### 4.17 Efecto de enoxaparina sobre la actividad motora.

Como se muestra en la Figura 33, el pretratamiento con el inhibidor de FXa a dosis 0,04; 0,08  $\text{mg.Kg}^{-1}$  e indometacina, restablecieron significativamente la actividad motora en el grupo de ratas inflamadas, al comparar con el grupo inflamado pretratado con solución salina (66,3%; 73,5% y 84,2%, respectivamente vs 46%  $p < 0,01$ ). La dosis de enoxaparina 0,08  $\text{mg.Kg}^{-1}$  tuvo mayor efectividad sobre la actividad motora, incrementando el desplazamiento 27,5%, respecto a los animales inflamados pretratados con solución salina, mientras que la indometacina lo incrementó 38,2%.

Por otro lado, el valor de porcentaje de distancia recorrida en animales sin inflamar, pretratados con enoxaparina a dosis de 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup> e indometacina a dosis de 4 mg.Kg<sup>-1</sup>, no se modificó, al compararlo con el de referencia, demostrando que en ausencia de inflamación, las drogas administradas no tienen efecto sobre la actividad motora (91,8% y 95,9% respectivamente vs 100%) ( $p>0,05$ ) (datos no mostrados).

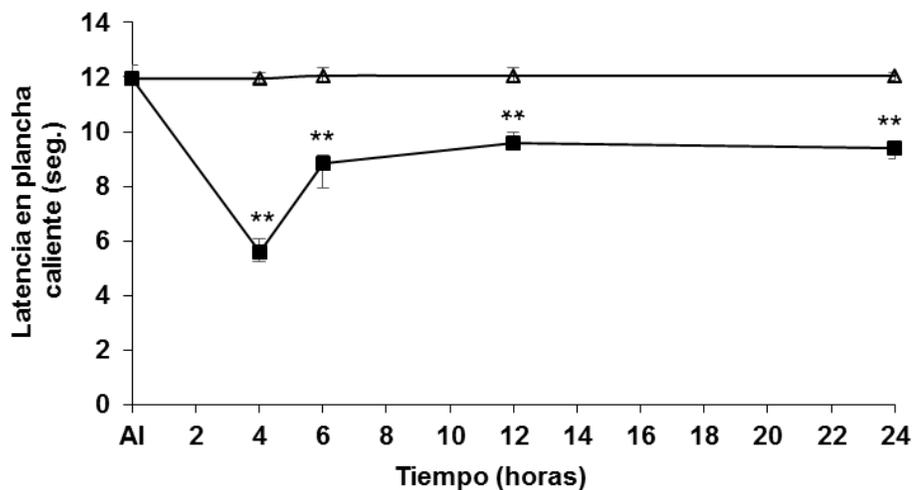
Es importante señalar, que la actividad motora no varió en animales inflamados pretratados con solución salina, al comparar con el valor de ratas inflamadas sin pretratamiento (46,04% vs 54,26%;  $p>0,05$ ) (datos no mostrados).



**Figura 33. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre la actividad motora, 4 h después de inducir la quemadura.** Se evaluó en ratas control SI, ratas inflamadas pretratadas con solución salina (barras blancas), ratas inflamadas pretratadas con enoxaparina (barras grises) e indometacina (barra negra). Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs salina con inflamación); n.s., no significativo;  $n = 6$  por grupo.

#### 4.18 Umbral nociceptivo térmico.

Al evaluar la sensibilidad al dolor tras el estímulo térmico, se obtuvo un valor de latencia de 11,95 seg. (11,78-12,43) en el grupo control sin inflamación, mientras que todos los grupos de animales inflamados 4, 6, 12 y 24 h postquemadura, mostraron reducción significativa del umbral nociceptivo térmico [5,60 seg. (5,23-6,08) (53,1%); 8,85 seg. (7,93-9,13) (25,9%); 9,60 seg. (9,38-10,08) (19,7%); 9,40 seg. (9,23-9,63) (21,3%), respectivamente] ( $p < 0,01$ ), al comparar con el valor del control SI (Figura 34). El tiempo de 4 h post-quemadura fue empleado como referencia para evaluar el efecto de enoxaparina.

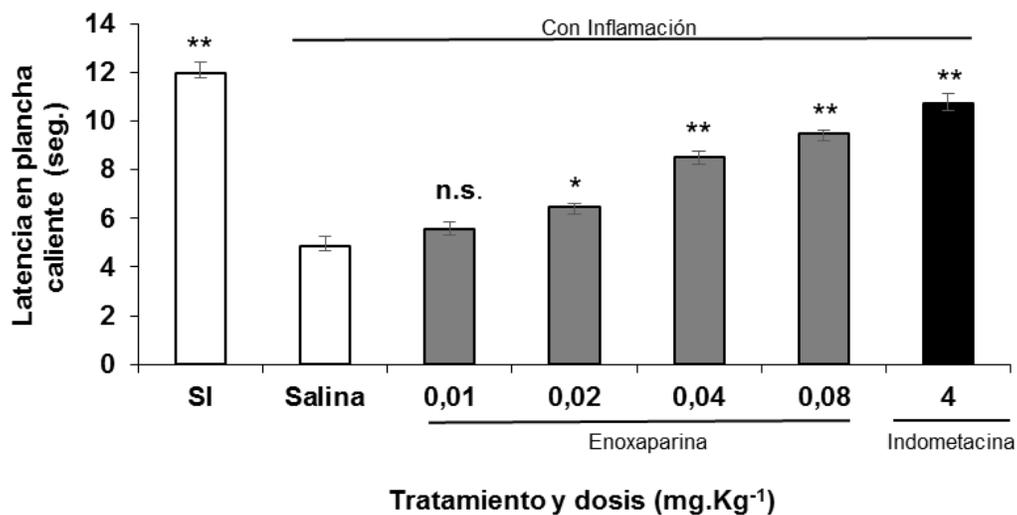


**Figura 34.** Umbral nociceptivo térmico luego de la inmersión de la pata trasera en agua a temperatura ambiente (grupo control SI, triángulos abiertos) o agua a 60°C por 60 seg. (grupos con inflamación, cuadros cerrados) medidos previamente (AI) y a las 4, 6, 12 y 24 h post-quemadura. Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs ratas no inflamadas); n.s, no significativo;  $n = 6$  por grupo.

#### 4.19 Efecto de enoxaparina sobre el umbral nociceptivo térmico

En la Figura 35, se muestra que las dosis 0,02; 0,04; 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup> del inhibidor de FXa y el antiinflamatorio de referencia, incrementaron de forma progresiva y significativa el valor de latencia en ratas inflamadas, respecto al grupo control inflamado pretratado con solución salina [6,45 seg. (6,18-6,78); 8,50 seg. (8,20-8,75); 9,5 seg. (9,18-9,63) y 10,70 seg. (10,43-11,10) vs 4,85 seg. (4,68-5,25) ( $p < 0,05$ )], restaurando el umbral térmico 33%; 75,3%; 95,9% y 120,6%, respectivamente en comparación al grupo inflamado pretratado con el vehículo. No obstante, ningún tratamiento logró restituir el umbral térmico a valores de latencia similares al de animales sin inflamación.

Por otra parte, el valor de latencia en animales sin inflamar pretratados con enoxaparina 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup> e indometacina 4 mg.Kg<sup>-1</sup>, no varió significativamente respecto al grupo de animales sin inflamar sin pretratamiento alguno, quedando en evidencia que en condiciones basales, sin inflamación, los fármacos no tienen efecto sobre el umbral térmico [12,15 seg. (11,95-12,33) y 12,00 seg. (11,85-12,20) vs 11,95 seg. (11,78-12,43) ( $p > 0,05$ )] (datos no mostrados).



**Figura 35. Efecto del pretratamiento de enoxaparina sobre el umbral nociceptivo térmico 4 h después de inducir la quemadura.** Se evaluó en ratas control SI, ratas inflamadas pretratadas con solución salina (barras blancas), ratas inflamadas pretratadas con enoxaparina (barras grises) e indometacina (barra negra). Los valores representan la mediana y P<sub>25</sub> - P<sub>75</sub> (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs salina con inflamación); n.s., no significativo;  $n = 6$  por grupo.

## 5. DISCUSION

Los datos del presente estudio demuestran que el pretratamiento con enoxaparina en ratas inflamadas post-quemadura tuvo efecto antiinflamatorio de tipo local (disminución de edema), sistémico (disminución de leucocitos, PCR, Fg, TAT) y antinociceptivo (disminución de ON, FRAP, de la hiperalgesia y restauración de la actividad locomotora).

La respuesta inflamatoria local conlleva a la aparición de edema como consecuencia del incremento de la permeabilidad vascular, ocasionado por la liberación de aminas vasoactivas (HT y 5HT) y de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6), producto de la degranulación de mastocitos y/o plaquetas (Moilanen, 2014; Christoffersen *et al.*, 2015).

Al evaluar el área del edema post-quemadura, se obtuvo un valor máximo a las 4 h, lo cual representa un incremento de 65% respecto al grupo control, manteniéndose elevado hasta las 24 h post-quemadura. Estos resultados concuerdan con otros estudios donde se aplicó este mismo modelo inflamatorio (Torres *et al.*, 2016) y mediante el modelo de  $\lambda$  carragenina (Cicala *et al.*, 2007; Vásquez *et al.*, 2015). Tanto el pretratamiento con enoxaparina a dosis de 0,02; 0,04 y 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup> como el de indometacina, disminuyeron el edema post-quemadura (10,8%; 25,6%; 32,1% y 28,1%, respectivamente), sugiriendo que uno de los mecanismos inflamatorios que favorece la aparición del edema en el modelo de quemadura, es mediado vía enzima ciclooxigenasa en sus isoformas (COX<sub>1</sub> y COX<sub>2</sub>). Al respecto, estudios señalan que FXa ejerce sus efectos edematogénicos mediados vía PAR-1 (Kawabata *et al.*, 1999), y que la inyección subplantar de FXa en la rata promueve el reclutamiento de

mastocitos y consiguiente degranulación y liberación de aminas vasoactivas; conllevando a la aparición del edema, lo cual es inhibido por la administración de antagonistas de HT/5HT (Cirino *et al.*, 1997). Por otra parte, existe evidencia de que FXa, induce la liberación de mediadores inflamatorios (IL-6, IL-8 y MCP-1) en fibroblastos, células mononucleares y endoteliales, los cuales son conocidos iniciadores de la coagulación por promover la expresión de FT (Borensztajn *et al.*, 2008; Esmon, 2008; Spronk *et al.*, 2014); y en el caso específico de IL-6, promover la activación de mastocitos (Hu *et al.*, 1997; Kinoshita *et al.*, 1999). Una posible hipótesis del efecto de enoxaparina sobre el edema, es la disminución en la secreción de IL-6 e IL-8, producto de la inhibición de FXa, lo que incide negativamente sobre la degranulación de mastocitos y consiguiente liberación de HT. Otro posible mecanismo indirecto reside en el bloqueo de generación de trombina, que conlleva a reducción de la actividad celular inflamatoria que ejerce ésta proteasa (Vicci *et al.*, 2015; Ellinghaus *et al.*, 2016), específicamente en la liberación de HT y 5HT a partir de mastocitos y plaquetas, respectivamente; y la síntesis de prostaciclina PGI<sub>2</sub> en células endoteliales (Licari y Kovacic, 2009), dando como resultado, relajación de células musculares lisas vasculares, disminución de la permeabilidad vascular y de la vasodilatación; y por consiguiente, del edema.

Una de las manifestaciones sistémicas observadas en respuesta a la quemadura es el incremento del conteo total de leucocitos, el cual presentó dos momentos de elevación durante el curso temporal: el primero a las 6 h y otro con un valor máximo a las 24 h posterior a la quemadura. Estos resultados coinciden con lo reportado por Torres *et al.* (2016), quienes observaron leucocitosis en ratas a las 24 h post-quemadura en respuesta a la inducción inflamatoria. En previo estudio realizado por Navarro (2010), también se observó elevación temporal de leucocitos en sangre periférica, pero con un valor máximo del recuento leucocitario a las 12 h post-inflamación, mediante el modelo de inyección intraplantar con carragenina, mientras que Cicala *et al.* (2007), no observaron variación en el conteo de leucocitos a las 3 y 24 h posteriores al estímulo inflamatorio mediante el mismo modelo. La respuesta inflamatoria a carragenina se

caracteriza por migración celular, fundamentalmente de polimorfonucleares (PMN), los cuales se acumulan en circulación a las 4 h de iniciado el proceso inflamatorio y alcanzan un valor máximo entre 18-24 h post-inflamación, por efecto de IL-1 y TNF $\alpha$ , cuya liberación es mediada por la síntesis de prostaglandinas PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub> (Muñoz, 2014). La leucocitosis observada en el presente estudio, podría deberse al paso de estos elementos celulares desde el pool marginal (6 h) o a partir del compartimiento de almacenamiento medular al espacio vascular (24 h).

Los datos presentados en este estudio demostraron que el pretratamiento con diferentes dosis de enoxaparina, tuvo efecto dosis-respuesta, reduciendo el recuento de leucocitos hasta 32,2%, con la máxima dosis empleada (0,08 mg.Kg<sup>-1</sup>). Previos estudios demostraron un efecto similar de K5NOSepiLMW, un derivado de heparina de bajo peso molecular, cuyo pretratamiento disminuyó el número de PMN en un modelo de pleuritis inducido por carragenina. (Ceccarelli *et al.*, 2009). Navarro (2010), demostró que inhibidores de trombina (hirudina, dipetarudina, PEG-hirudina y PEG-dipetarudina) disminuyeron la leucocitosis inducida por inyección intraplantar de carragenina. Por su parte, Santos *et al.* (2014), demostraron que HNF a bajas dosis, disminuye el número de PMN circulantes en un modelo experimental de peritonitis en ratas, inducida por la inyección intraperitoneal de tioglicolato, mientras que, Iba *et al.* (2012), en un modelo inflamatorio inducido por administración de LPS en la rata, observaron que el número de leucocitos adherentes en endotelio fue suprimido por enoxaparina, lo que se tradujo en una disminución del daño endotelial.

El efecto antiinflamatorio de las HBPM está relacionado con su capacidad de interferir con casi todas las etapas de la transmigración de leucocitos, incluyendo rodamiento sobre el endotelio inflamado, activación de quimiocinas unidas al endotelio y adherencia de leucocitos activados al endotelio (Wan *et al.*, 2001). Las HBPM se unen a selectinas P y L, las cuales favorecen las interacciones tempranas entre el endotelio y leucocitos durante el rodamiento de estos. (Dotan, *et al.*, 2001). Asimismo,

interactúan con moléculas integrinas de adhesión tales como Mac-1 y quimiocinas, impidiendo la adhesión firme de leucocitos al endotelio y su activación (Yan *et al.*, 2017).

El pretratamiento con enoxaparina, disminuyó la leucocitosis asociada al proceso inflamatorio, sugiriendo que FXa, trombina y PARs, intervienen en la etapa de reclutamiento y migración de leucocitos, como consecuencia de la injuria tisular. Por otra parte, la indometacina empleada como antiinflamatorio de referencia, también redujo la leucocitosis, sugiriendo que interviene más de un mecanismo, incluyendo la actividad de COX y que mediadores inflamatorios tales como: PGE<sub>2</sub>, TNF $\alpha$  e IL-1, pueden ser los efectores finales de ambas vías.

La secreción de mediadores inflamatorios favorece la respuesta inflamatoria sistémica, caracterizada por la síntesis de reactantes de fase aguda. En el presente estudio, la concentración plasmática de PCR en ratas inflamadas se incrementó hasta 2 veces, respecto al grupo control, con un valor máximo a las 4 h posterior a la quemadura. Estos resultados coinciden con lo reportado por Abbas *et al.* (2014), quienes encontraron incremento de PCR hasta 2,3 veces por encima del valor basal, a las 4 h post-inflamación y por Vásquez *et al.* (2015) a partir de las 2 h post-inflamación, con un valor máximo entre las 4 y 12 h post-carragenina. Es bien conocido, que posterior a un estímulo inflamatorio y bajo el control transcripcional de IL-6, la PCR es sintetizada por los hepatocitos (Pepys y Hirschfield, 2003) siendo capaz de inducir la expresión de FT en la superficie celular (Cermak *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009), suprimir la expresión de TM y PC, e incrementar la expresión PAI-1 (Nan *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008), favoreciendo la activación del sistema de la coagulación. Por otra parte, estudios han demostrado que la inhibición de IL-6 abroga completamente la generación de trombina a partir de FT (Levi, 2010), estableciendo un enlace cerrado entre inflamación y coagulación.

El pretratamiento con enoxaparina disminuyó 37,9% la concentración plasmática de PCR en los animales inflamados, con valores cercanos a los animales sin inflamar y máximo efecto a una dosis de 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup>. Al respecto, estudios clínicos han demostrado las propiedades antiinflamatorias de heparina, suprimiendo los niveles de IL-6 y PCR en pacientes con trombosis venosa y alteraciones cardíacas (Roumen-Klappe *et al.*, 2002; Nasiripour *et al.*, 2014). En contraposición a lo anterior, Dalteparina (inhibidor de FXa de bajo peso molecular), no mostró efecto sobre la concentración plasmática de PCR en modelo de endotoxemia (Derhaschnig *et al.*, 2003), atribuido a las bajas dosis del inductor LPS. Asimismo, otros estudios demostraron que el inhibidor de la vía de factor tisular TFPI (inhibidor del FXa), no mitiga la liberación de IL-8 y PCR, inducida por LPS (de Jonge *et al.*, 2001), evidenciando que no todos los inhibidores de FXa muestran acción antiinflamatoria, probablemente por diferencias en su estructura molecular y la afinidad por sus ligandos. Considerando que, existe evidencia que la enoxaparina inhibe la expresión del factor de transcripción NF-K $\beta$  (Manduteanu *et al.*, 2003) y que tanto IL-6 como TNF $\alpha$  son inductores de la síntesis de PCR, es probable en nuestro estudio, que la enoxaparina suprima la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  e IL-6, por inhibición de FXa o indirectamente mediante disminución de la generación de trombina (Spronk *et al.*, 2014).

El óxido nítrico es un mediador reactivo multifuncional que puede actuar como vasodilatador, neurotransmisor y efector molecular de células inmunes. Dada la corta vida media en circulación, los niveles de NO son estimados indirectamente por la determinación de sus metabolitos (Kleinbongard *et al.*, 2003; Alusik *et al.*, 2008).

Los datos del presente estudio demuestran que tras la inducción inflamatoria hubo incremento de la concentración nitritos en suero y ADM ipsilateral a la quemadura, con un valor máximo a las 6 h post-quemadura; siendo esta concentración una medida indirecta de la concentración NO y actividad de NOS. En otros estudios, el tiempo de

medición de dichas variables depende del modelo inflamatorio, de la farmacocinética de las drogas a evaluar y de la ubicación tisular de los parámetros. Los resultados presentados coinciden con lo reportado por Vane *et al.* (1994), en un modelo de inflamación aguda inducida por la administración de coadyuvante de Freund's (CFA) en ratones, observando incremento de la actividad de iNOS en homogenatos de biopsia de piel, con un valor máximo a las 6 h siguientes a la inducción inflamatoria, mientras que Östürk *et al.* (2006), observaron incremento de los niveles de nitritos en suero de ratas (119,6 %), 4 h después de la inyección de LPS y Ceccarelli *et al.* (2009), reportaron incremento en la expresión de iNOS en tejido pulmonar y la concentración de nitritos en exudado pleural de ratas, 4 h después de la administración de carragenina. Por su parte, Dotan *et al.* (2001), demostraron elevación de la actividad de NOS en mucosa colónica con un pico máximo a los 3 días siguientes a la inducción inflamatoria mediante un modelo de colitis, y resulta interesante que en modelos de artritis en ratas se produce una elevada generación de nitritos en líquido peritoneal, la cual es exacerbada por la administración de L-arginina pero inhibida por nitro-arginina- L-metil-ester (L-NAME) (Ialenti *et al.*, 1993), quedando demostrado en estos ensayos que NOS es activada bajo condiciones inflamatorias, que NO es un marcador de inflamación y que la concentración de nitritos es una medida de la síntesis de NO durante la inflamación.

En general, la síntesis de NO como producto de la actividad de NOS constitutiva, se asocia a efectos antiinflamatorios, mediados a través de la síntesis de GMPc, siendo un efectivo vasodilatador, además, de suprimir la proliferación de células T, la actividad y quimiotaxis de monocitos, la adhesión y migración de PMN, inhibir la síntesis de IL-6 y PGE<sub>2</sub> por parte de macrófagos, inhibir la liberación de factor activador de plaquetas e HT por mastocitos (Stichtenoth y Frolich, 1998), traduciéndose en disminución de la permeabilidad vascular, disminución de la trans migración leucocitaria y de la agregación plaquetaria, entre otros. Sin embargo, en modelos animales, bajo estímulos inflamatorios como LPS, se incrementa la

expresión de iNOS en PMN y macrófagos activados, incrementando la síntesis de NO de forma continua, más de 1000 veces superior a la sintetizada por cNOS (Bishop *et al.*, 1997; Mebazaa *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2002; Viridis *et al.*, 2005; Östürk *et al.*, 2006); asimismo, NO activa tanto a COX<sub>1</sub> y COX<sub>2</sub> (Salvemini, 1997), promoviendo la síntesis de prostanoïdes, originando la liberación de citocinas proinflamatorias y conllevando a un ciclo cerrado de inflamación.

La evolución inflamatoria producto de quemaduras cutáneas conlleva a disrregulación de iNOS, con síntesis de NO y elevación de la concentración plasmática de NO<sub>2</sub>-NO<sub>3</sub>, lo que ha sido asociado a fallo multiorgánico en pacientes quemados (Paulsen *et al.*, 1998), en cuyos casos, el tratamiento con drogas antiinflamatorias no esteroideas, inhibidores selectivos de COX-2 e inhibidores de NOS perjudica la recuperación de las lesiones (Shin *et al.*, 2005; Takeuchi *et al.*, 2006); de ahí que, las HBPM ofrecen beneficios terapéuticos con un menor riesgo de hemorragia, demostrado en enfermedades inflamatorias y tratamiento local de quemaduras (Troshev y Dimitrov, 2001; Lakshmi *et al.*, 2011). No obstante, en el presente estudio no se encontró efecto de enoxaparina sobre la concentración plasmática de nitritos, contrario a lo planteado en trabajos previos, donde la aplicación de enoxaparina disminuyó la actividad de iNOS en homogenatos de tejido colónico, posterior a colitis inducida por administración de ácido sulfónico dinitrobenceno (DNBS) (Dotan *et al.*, 2001), probablemente por el modelo inflamatorio y muestra empleados. Otro estudio previo reportó que el derivado de heparina K5NOSepiLMW disminuyó la expresión de iNOS en tejido pulmonar y la concentración de nitritos en exudado pleural en un modelo de pleuritis inducida por carragenina (Ceccarelli *et al.*, 2009); mientras que enoxaparina disminuyó la expresión de iNOS en tejido de heridas y la concentración plasmática de NO<sub>2</sub>-NO<sub>3</sub> en pacientes quemados (Lakshmi *et al.*, 2011), las causas de tal diferencia con el presente estudio pueden obedecer al tiempo de evolución de la quemadura, la dosis empleada del fármaco y la frecuencia en su administración.

Un hallazgo del presente estudio fue el incremento de 23,4% en la concentración de nitritos en asta dorsal ipsilateral a la inflamación a las 6 h post-quemadura, respecto a sus niveles basales y de 32,1% respecto al asta dorsal contralateral a la inflamación. Estudios previos han demostrado que nNOS es expresada constitutivamente en neuronas de la lámina II, en fibras plexo de las láminas I y II del ADM y en menor proporción en neuronas de DRG (Valtschanoff, *et al.*, 1992; Ruscheweyh *et al.*, 2006). Las neuronas que expresan nNOS en el ADM son interneuronas inhibitorias GABAérgicas (Valtschanoff, *et al.*, 1992; Bernardi *et al.*, 1995), las cuales son reguladas positivamente durante el dolor evocado por estímulos inflamatorios (inyección intraplantar de formalina, zymosan o CFA), mientras que los aferentes primarios nNOS positivos en DRG, son neuronas excitatorias peptidérgicas que contienen CGRP y SP (Schmidtko *et al.*, 2009).

Las vías de señalización en el ADM contribuyen a la sensibilización ante el dolor (Woolf, 2004; D'Mello y Dickenson, 2008) y en particular NO y GMPc son importantes mediadores en el procesamiento nociceptivo, puesto que la administración intratecal (i.t.) de L-NAME y N-monometil-L-arginina (L-NMMA) (inhibidores inespecíficos de las 3 isoformas de NOS conllevan a inhibición de la síntesis de NO en médula espinal y reducción de la respuesta nociceptiva en modelos animales de dolor inflamatorio y neuropático (Meller y Gebhart, 1993; Luo y Cizkova, 2000; Woolf, 2004). Por otra parte, ensayos con inhibidores selectivos de NOS y en ratones genéticamente deficientes de NOS, demostraron que, durante el desarrollo del dolor inflamatorio nNOS es la isoforma más importante para la síntesis de NO en la médula espinal (Tao *et al.*, 2004; Boettger *et al.*, 2007), seguida de la isoforma inducible iNOS que puede contribuir con el procesamiento del dolor inflamatorio; mientras que la eNOS, no está involucrada en el procesamiento del dolor (Tao *et al.*, 2004; Schmidtko *et al.*, 2009). La contribución de NO en la sensibilización al dolor ha sido confirmada por el hecho que, la inhibición de tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), un cofactor esencial para la síntesis de NO a partir de NOS, atenúa el dolor inflamatorio y neuropático en

roedores. Además, el polimorfismo del gen que codifica para GTP ciclohidrolasa (GCH1), enzima limitante para la síntesis de BH<sub>4</sub>, está asociado con reducción de la sensibilidad en experimentos de hiperalgesia inflamatoria en humanos (Tegeder *et al.*, 2006). Los datos del presente estudio suponen que vías nociceptivas asociadas a la liberación de NO en ADM intervienen en la sensibilización al dolor inducido por la quemadura, hecho que contraviene lo reportado por Wang *et al.* (2011), quienes encontraron reducción de la expresión de iNOS y nNOS en ADM ipsilateral mediante un modelo de quemadura, lo que puede atribuirse al tiempo empleado para la medición de las variables (7 días posterior a la quemadura), suficiente para la activación de los mecanismos de retroalimentación negativa de la expresión de NOS.

El presente estudio demostró que el pretratamiento con enoxaparina a la máxima dosis empleada (0,08 mg.Kg<sup>-1</sup>) redujo 30,61% la concentración de nitritos en ADM ipsilateral a las 6 h post-quemadura, siendo éste el primer reporte del efecto del fármaco sobre esta variable en ADM, mediante el modelo de quemadura. La enoxaparina exhibe efectividad en la inhibición de la síntesis de NO, asociada a un menor número de oligosacáridos heterogéneos presentes en su estructura, a diferencia de otras HBMP. En tal sentido, fondaparinux un derivado sintético que sólo contiene la secuencia pentasacárida, esencial para su actividad anticoagulante, no es capaz de inhibir la síntesis de NO, sugiriendo que el efecto antiinflamatorio asociado a la disminución de la síntesis de NO es independiente de la actividad anticoagulante regulada por la secuencia de unión a ATIII (Shastri *et al.*, 2013, Yan *et al.*, 2017). Por otra parte, los mecanismos inhibitorios de enoxaparina, pudieran estar asociados a la modulación de la actividad de quinasas pronociceptivas, liberación de neurotransmisores espinales y activación de la vía GMPc mediados por NO, tal y como se ha demostrado en otros modelos inflamatorios (Chacur *et al.*, 2010).

Como parte de los mecanismos de coagulación, la activación de FXa conlleva a la generación de trombina, cuyos efectos hemostáticos incluyen la activación y

agregación plaquetaria (Vicci *et al.*, 2015). En este estudio, a diferencia del recuento de leucocitos, el conteo total de plaquetas en sangre no sufrió modificación en animales a los que se les indujo la quemadura, en comparación con animales no inflamados. Nuestros datos concuerdan con lo descrito por Cicala, *et al.* (2007), donde no se observó variación en el número de plaquetas circulantes a las 3 y 24 h post-inflamación y por Navarro (2010), quien no encontró cambios en el número de plaquetas durante las 96 h siguientes a la inducción inflamatoria; ambas mediante inyección intraplantar de carragenina; asimismo, Torres, *et al.* (2016), no observaron cambios en el recuento plaquetario durante 24 h posterior a la quemadura, en un modelo similar al empleado en el presente estudio; sugiriendo que los eventos inflamatorios inducidos por la quemadura, al igual que carragenina, involucran las funciones de agregación plaquetaria más que un incremento en el número de plaquetas circulantes, tal y como ha sido demostrado en otros ensayos, empleando ADP como agonista de la agregación plaquetaria (Cicala *et al.*, 2007). No obstante, estudios clínicos realizados por Tsujimoto, *et al.* (2016), demostraron que rivaroxaban no reduce la agregación plaquetaria inducida por colágeno (Tsujimoto *et al.*, 2016); por lo tanto, resulta importante evaluar dicha función mediante el modelo inflamatorio de quemadura y posteriormente el efecto de otros inhibidores de FXa, incluyendo enoxaparina.

El Fg es una proteína de fase aguda, cuya concentración plasmática se incrementa bajo condiciones inflamatorias y tiene un rol importante en los mecanismos de coagulación para la formación de fibrina por unión de la trombina; así como también, inductor de la agregación plaquetaria y de la expresión de FT, promoviendo la aparición de enfermedades trombóticas y constituyendo un enlace entre la inflamación y hemostasia (Ernst, 1993; Hernández *et al.*, 2000; La Greca, 2012; Foley y Conway, 2016). En el presente estudio, se obtuvo un incremento de Fg de 2,6 veces en animales inflamados, respecto al grupo control, con un valor máximo a las 12 h post-quemadura. Ello concuerda con los estudios de Torres *et al.* (2016), a partir del modelo de quemadura y de Cicala *et al.* (2007) por el modelo de inflamación inducida por

carragenina. Por su parte, Vázquez *et al.* (2015) reportaron hiperfibrinogenemia desde las 8 h post-inflamación, con un pico a las 36 h post-carragenina, a diferencia del presente estudio, cuyo incremento se inició más temprano (6 h post-quemadura); no obstante, en el estudio de Vázquez *et al.* (2015), el incremento de Fg en animales inflamados fue de 2,9 veces, muy similar a lo obtenido en nuestro estudio. La causa de hiperfibrinogenemia, probablemente se deba a incremento en la síntesis y secreción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) que inducen una mayor secreción hepática de ésta proteína (Vicci *et al.*, 2015). En el presente estudio, el pretratamiento con enoxaparina a dosis de 0,08 mg.Kg<sup>-1</sup> suprimió la fibrinogenemia (8%); mientras que la indometacina no tuvo efecto alguno, lo que sugiere que la vía de las ciclooxigenasas no interviene directamente sobre la elevación de Fg, pero sí al menos, por efecto de enoxaparina sobre la reducción en la generación de trombina y sus efectos proinflamatorios. Estudios *in vivo* mediante otros modelos inflamatorios demostraron que la administración de enoxaparina y dalteparina suprimen la respuesta inflamatoria por disminución de la concentración plasmática de TNF $\alpha$  (Dotan *et al.*, 2001; Tsukada, *et al.*, 2003). Sin embargo, estudios en pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) (Vila *et al.*, 2001) y en modelos de endotoxemia en ratas (Iba y Takayama, 2009; Iba *et al.*, 2012), reportaron que el tratamiento con enoxaparina no atenuó el incremento de los niveles plasmáticos de Fg. La discrepancia con este estudio puede estar relacionada con la persistencia de disfunción endotelial, en el caso del SCA y la exacerbada respuesta inflamatoria en la endotoxemia, las cuales no fueron atenuadas por la administración del fármaco. Considerando lo antes planteado, la modulación de la expresión de TNF- $\alpha$ , mediado por trombina, es un mecanismo mediante el cual la enoxaparina puede regular la síntesis de Fg, reduciendo la respuesta inflamatoria.

El complejo TAT es un marcador de actividad de trombina (Ten Cate y Hemker, 2016), comúnmente empleado para evaluar el grado de activación del sistema de la coagulación, especialmente en estudios de coagulación intravascular diseminada (CID) y sepsis (Koyama *et al.*, 2014). Los niveles de este biomarcador se incrementaron 3,9

veces en animales inflamados, respecto al grupo de animales sin inflamación, con un valor máximo a las 4 h post-quemadura, siendo éste el primer reporte que demuestra generación de trombina inducida a partir del modelo de quemadura; aunque mediante el modelo de endotoxemia con LPS se ha reportado incremento de TAT a las 3 h post-inducción inflamatoria (Iba *et al.*, 2012). Por otra parte, en un modelo de isquemia cerebral, se demostró elevación de TAT en tejido cerebral (aproximadamente 10 veces, respecto al control), a las 24 h posteriores al evento isquémico (Dittmeier *et al.*, 2016); la discrepancia de éste último con nuestros resultados podría deberse al modelo y tipo de muestra empleados.

El pretratamiento con enoxaparina a dosis de  $0,08 \text{ mg.Kg}^{-1}$  disminuyó 66,7% la concentración plasmática de TAT a las 4 h post-quemadura. Estos datos son similares a los reportados por Iba y Takayama, (2009) e Iba *et al.* (2012), quienes emplearon un modelo de endotoxemia con LPS, agregando que la administración de enoxaparina fue vía i.v. y posterior al estímulo inflamatorio. Por su parte, Perzborn *et al.* (2014), evidenciaron que bajas dosis de rivaroxaban ( $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) disminuyó 9 veces (88,9%), los niveles plasmáticos de TAT, en un modelo *in vivo* de hipercoagulabilidad inducido por FT en la rata, pero a diferencia del presente estudio, el fármaco fue administrado vía i.v. Al respecto, Dittmeier *et al.* (2016) señalaron que el tratamiento oral con rivaroxaban ( $12 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), antes y durante la inducción de isquemia cerebral disminuyó 1,7 veces (39,4%) la concentración de TAT en tejido cerebral. Estos hechos plantean, que el tratamiento con inhibidores directos de FXa, disminuyen la generación de trombina posterior a la inducción de un proceso inflamatorio, reduciendo a su vez, los efectos celulares proinflamatorios de FXa y trombina.

La enzima FRAP es una glicoproteína sintetizada en células epiteliales secretorias de la glándula prostática (Vihko *et al.*, 1978; Graddis *et al.*, 2011) y su estructura ha sido caracterizada para varias especies, mostrando 80% en homología de secuencia con la rata y conservación del sitio activo entre las especies de mamíferos (Hassan *et al.*,

2010; Muniyan *et al.*, 2013). Al determinar la actividad sérica de FRAP en animales inflamados, no se encontró modificación respecto a los que no se les indujo la quemadura. Este resultado puede atribuirse a que la determinación de FRAP en suero no se relaciona con procesos inflamatorios, sino que, se ha empleado como indicador diagnóstico de cáncer prostático (Muniyan *et al.*, 2013). FRAP también ha sido expresada en tejido no prostático (neuronas de DRG, sustancia gelatinosa del ADM y neuronas del ADM cervical, torácica y lumbar) (Kantner y Kirby, 1982; Bosco *et al.*, 2010; Sosa *et al.*, 2013), es por ello que, se determinó los cambios en la actividad de FRAP en ADM, generados por un proceso inflamatorio unilateral, a partir de un estímulo térmico nocivo.

Los datos obtenidos sugieren que en condiciones basales, la actividad de FRAP es similar tanto en ADM izquierda como en ADM derecha, posiblemente por la baja actividad de aferentes nociceptivos en ambas astas dorsales, no obstante, en condiciones inflamatorias, se encontró un incremento de 208,6% (6 h post-quemadura) y 99,2% (12 h post-quemadura) en la actividad enzimática de FRAP en el ADM ipsilateral a la lesión inflamatoria, respecto a su actividad basal, y de 173,5% y 92,6% respectivamente, en relación al ADM contralateral a la inflamación, constituyendo evidencia de su participación en el proceso nociceptivo medular y confirmando que esta enzima es un marcador medular funcional de la actividad sensorial en los mecanismos nociceptivos, lo que coincide con el estudio de Glykys *et al.* (2003) quienes mediante análisis histoquímico reportaron incremento de la actividad de FRAP a las 8 h posteriores a la inducción inflamatoria de ADM a través de un modelo de quemadura similar al empleado en el presente estudio, sugiriendo incremento de la actividad de aferentes nociceptivos, específicamente, activación de fibras C. Este efecto ha sido también apreciado para las fosfatasa total en la sustancia gelatinosa reportándose un aumento en su actividad luego de 4 h de la inducción de dolor con formalina al 5 % de acuerdo a lo señalado por Kantner y Kirby (1982).

Esto reconoce la participación de FRAP en los mecanismos nociceptivos no sólo en las astas dorsales sino también en la sustancia blanca dorsal posterior de la médula espinal. En tal sentido, estudios realizados en ratones genéticamente deficientes de FRAP han reportado incremento de hiperalgesia en modelos animales de dolor inflamatorio y más importante aún se ha mostrado que la inyección intratecal de FRAP produce efectos antinociceptivos mucho más potentes que morfina, atenuando la alodinia mecánica inducida en modelo de cáncer óseo, cuyo efecto es mediado por la liberación de adenosina (Zylka *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013), un metabolito normal, pero especialmente anóxico del ATP que ha mostrado tener un efecto inhibitorio sobre la excitación del nociceptor, especialmente sobre la amplitud y la frecuencia de los potenciales postsinápticos excitatorios (Lao *et al.*, 2001; Eblén-Zajjur, 2005a), por consiguiente, FRAP se considera un efectivo analgésico en el tratamiento del dolor inflamatorio.

De acuerdo a esta conceptualización, el presente trabajo demuestra la primera evidencia del efecto antinociceptivo de un inhibidor de FXa, puesto que el pretratamiento con enoxaparina disminuyó la actividad de FRAP en ADM ipsilateral a la quemadura. En relación a esto, se ha demostrado que SNC expresa varias proteasas de serina (protrombina y FXa) (Dihanich *et al.*, 1991, Yamada y Nagai, 1996), lo que hace posible la formación de trombina en SNC en áreas que expresan FXa (Fang *et al.*, 2003). La trombina no sólo interviene en el sistema de la coagulación mediante escisión de fibrinógeno en fibrina sino que también inicia cascadas de señalización celular activando PARs, los cuales son expresados en neuronas aferentes primarios (Zhu *et al.*, 2005, Dale y Vegnolle, 2008; García *et al.*, 2010). La trombina activa PAR-1, PAR-3 y PAR-4 (Vergnolle *et al.*, 2001a). PAR-1 está presente en SNC en desarrollo y maduro, SNP y DRG (Niclou *et al.*, 1994; Weinstein *et al.*, 1995; Niclou *et al.*, 1998). Su activación en SNC está relacionada con la activación glial y respuestas inflamatorias, activación y proliferación de astrocitos con producción de citocinas proinflamatorias y modulación de la actividad sensorial (Smith y Winkelstein, 2017).

Al respecto Narita *et al.* (2005) evaluaron el papel del binomio trombina/PAR-1 a partir de la aplicación intratecal de trombina, lo que indujo hiperalgesia térmica y alodinia táctil, efectos que fueron abolidos por el pretratamiento intratecal con hirudina, un inhibidor directo de trombina, demostrando así el efecto de la proteasa sobre los mecanismos de nocicepción. Si bien es cierto, PAR-2 no es activado por trombina, si es activado por tripsina, triptasa y los factores de la coagulación VIIa y Xa (Cenac *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2011; Rothmeier y Ruf, 2012), siendo expresado en neuronas sensoriales, cuya activación estimula la liberación de SP y CGRP en tejidos periféricos y sensibiliza neuronas de DRG (Steinhoff *et al.*, 2000). En tal sentido, existe evidencia de que PAR-2 interviene funcionalmente en los mecanismos periféricos asociados al dolor (Steinhoff *et al.*, 2000; Hoogerwerf *et al.*, 2001), mediado en parte por sensibilización del receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) (Hoogerwerf *et al.*, 2001; Kawabata *et al.*, 2001; Amadesi *et al.*, 2004) y también por estimulación de la liberación de SP y CGRP en los terminales de las neuronas aferentes (Steinhoff, *et al.*, 2000; Vergnolle *et al.*, 2001b; Grant *et al.*, 2007), disminuyendo el umbral nociceptivo; además, el bloqueo de receptores espinales de PAR-2 y TRPV1 atenúan el dolor neuropático, debido a la disminución de la liberación de SP y CRGP en la superficie del ADM (Chen *et al.*, 2015). Todas estas evidencias soportan la noción de que PAR-2 interviene favoreciendo la transmisión nociceptiva. Por otro lado, la indometacina, agente antiinflamatorio, también mostró efecto antinociceptivo al disminuir la actividad de FRAP en ADM ipsilateral a la inflamación, de manera proporcional a la acción de enoxaparina. En tal sentido, estudios indican que la hiperalgesia producida por la activación de PAR-2 es mediada centralmente por PGs y la supresión sistémica de COX por administración subcutánea de indometacina abroga completamente la respuesta hiperalgésica a agonistas de PAR-2 (Takasaki *et al.*, 2001; Vergnolle *et al.*, 2001a; Bao *et al.*, 2014).

Considerando lo antes planteado, es probable que tanto FXa como inductor de PAR-2 y trombina de PAR-1 promuevan la transmisión nociceptiva en el modelo de quemadura empleado en este estudio, ya que la enoxaparina inhibe FXa e

indirectamente la generación de trombina, resultando en inhibición de la actividad de FRAP en ADM.

El dolor es parte de los signos clásicos de inflamación, caracterizados por eventos mediados químicamente, tales como: cambios en el flujo vascular local y la permeabilidad, infiltrado de leucocitos y liberación de sustancias algógenas (Dawes *et al.*, 2013). Con la finalidad de evaluar la respuesta nocidefensiva ante el estímulo térmico, se determinó la latencia de retirada de la pata, observando que la inducción de la quemadura en la pata de la rata produjo hiperalgesia, disminuyendo el umbral de sensibilidad, en comparación con ratas a las que no se les indujo la quemadura periférica. Los datos obtenidos en este estudio concuerdan con el pico de hiperalgesia reportado por trabajos previos a partir de la estimulación intraplantar con carragenina, Hargreaves *et al.* (1988), demostraron que esta manifestación nocidefensiva tiene un pico a 2-3 h y se mantiene durante 8 h siguientes a la inyección de carragenina, siendo confirmado por Vásquez *et al.* (2015), quienes mediante el mismo modelo inflamatorio obtuvieron resultados similares, pero la hiperalgesia se extendió durante 12 h posterior a la inducción inflamatoria, no obstante, en el presente estudio la reducción de la latencia de retirada de la pata ante el estímulo térmico en animales inflamados, se mantuvo durante 24 h posterior a la quemadura, probablemente porque el estímulo nocivo con agua caliente resulta ser más agresivo e induce una respuesta inflamatoria de mayor proporción. Otro ensayo realizado mediante el modelo de quemadura con agua caliente demostró hiperalgesia térmica que se hizo evidente a los 2 días post-quemadura, persistiendo durante 14 días, pero a diferencia del presente estudio, se indujo a una mayor temperatura (85 °C) y menor tiempo de exposición (12 seg.) (Wang *et al.*, 2011); mientras que, Fowler *et al.* (2014), reportaron un pico de hiperalgesia térmica a las 72 h a partir de un modelo de quemadura por soldadura en la pata de la rata, siendo evidente durante 2 semanas posterior a la inflamación; la discrepancia con el presente estudio puede deberse a que la lesión infringida se indujo a una mayor temperatura (100 °C) y el curso temporal de evaluación fue más prolongado.

La respuesta temprana al daño tisular como el producido por la quemadura, es mediada por patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, por sus siglas en inglés), los cuales son moléculas endógenas liberadas en respuesta al daño (ATP, IL-1 $\alpha$ , ácido úrico, proteínas de alta movilidad). Los DAMPs activan el sistema inmunológico mediante la unión a receptores, principalmente de tipo Toll (TLRs), dando lugar a la transcripción de genes que codifican para citocinas proinflamatorias (Newton y Dixit, 2012; Walker *et al.*, 2014) y liberación de factores quimiotácticos (CXCL1), factores tróficos (BDNF), PGs y sustancias vasoactivas (HT y 5-HT); los cuales promueven la sensibilización de neuronas aferentes primarios para la aparición del dolor.

La acción de citocinas y activación del endotelio inducen a su vez la quimiotaxis y activación de células proinflamatorias (neutrófilos y macrófagos), con consecuente liberación de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 que contribuyen a la reducción del umbral de descarga en el aferente primario promoviendo su sensibilización, además, aumentan la liberación de aminoácidos excitatorios como glutamato y SP, e incrementan la actividad de COX<sub>2</sub>, favoreciendo la síntesis de PGE<sub>2</sub>, que tiene efectos sensibilizadores periféricos y desencadena potenciales de acción centrípeta u ortodrómica de los nociceptores (Eblén-Zajjur, 2005a; Oliveira, 2014; Kawahara *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016).

Por otra parte, BDNF y NGF promueven la sensibilización periférica por activación de microglia y modulan la expresión de otros mediadores inflamatorios (Oliveira *et al.*, 2016). Asimismo, la liberación de SP, bradiquinina (BK), PGs, ATP e HT, conllevan a la activación de la fosfolipasa C (PLC) con el consiguiente incremento de [Ca<sup>++</sup>] potenciado por la permeabilización de la membrana a neurotransmisores excitatorios y al sodio, causando despolarización de la célula. Adicionalmente, la PLC disminuye la permeabilidad de la membrana neuronal al potasio originando mayor despolarización, mientras que 5HT, CGRP, HT y PG incrementan la actividad de la adenilato ciclasa, aumentando los niveles de AMPc intracelular, lo que despolariza la

neurona debido a la reducción en la permeabilidad al potasio y aumento en la permeabilidad al sodio (Eblén-Zajjur, 2005a; Oliveira *et al.*, 2016). La despolarización generada por las múltiples vías incrementa la excitabilidad neuronal y disminuye el umbral de dolor, evidenciado por la hiperalgesia.

Con la finalidad de evaluar la acción de ciertos fármacos sobre el dolor, se han empleado pruebas conductuales, tales como: la hiperalgesia térmica; en el presente estudio se encontró que la enoxaparina revirtió la reducción del umbral nociceptivo inducido por la quemadura en los animales inflamados. Estos resultados coinciden con los estudios de Navarro (2010), quien demostró que el tratamiento con diferentes inhibidores de trombina tuvo efecto antihiperalgésico en un modelo inflamatorio inducido por la inyección intraplantar de carragenina en la pata de la rata, lo que se atribuye en parte, a la falta de activación de receptores PARs, puesto que la trombina induce la respuesta neuroinflamatoria a partir de la activación de PAR-1 y PAR-4, además PAR-2 puede ser activado por FXa, promoviendo la liberación de neuromoduladores (SP y CGRP) en los aferentes primarios, con la consiguiente sensibilización periférica, que origina reducción del umbral de activación térmico y posterior sensibilización central a nivel de neuronas sensoriales medulares; evidenciado por hiperalgesia térmica, entre otras manifestaciones (Green *et al.*, 2000; de Garavilla *et al.*, 2001; Latremoliere y Woolf, 2009; Seybold, 2009).

Por su parte Wang *et al.* (2011), postulan que los mecanismos nociceptivos están asociados a la vía de NMDA, principales receptores de las proyecciones de fibras C aferentes (Liu *et al.*, 1994), cuya activación es favorecida por trombina vía PAR-1 (Gingrich *et al.*, 2000) y por la liberación de neuromoduladores como SP y BDNF, conllevando al incremento del flujo de  $Ca^{+2}$ , la excitabilidad neuronal y reducción del umbral de activación (Meldrun, 2000; Keller *et al.*, 2007; Basbaum, *et al.*, 2009), efectos que fueron atenuados por la administración de dextrometorfano, un antagonista de NMDA, que redujo efectivamente la hiperalgesia térmica y atenuó la expresión de

vías inflamatorias (receptor-1 de NMDA, PKC, nNOS e iNOS) en ratas lesionadas por quemadura.

El dolor inflamatorio influye sobre la conducta motora en los animales en términos de actividad general y sobre el funcionamiento de una particular conducta locomotora (Whittaker y Howarth, 2014). En modelos experimentales animales, la novedad de un ambiente a campo abierto es un incentivo para que estos lo exploren, de manera que, es concebible que la deambulación en dicho ambiente sirva como un estímulo mecánico y ante una situación nociva que origine la sensación de dolor, conlleve a la autoprotección del animal, discapacidad locomotora y reducción de la conducta exploratoria, siendo susceptible de ser cuantificado objetivamente.

La actividad exploratoria ha sido empleada experimentalmente para evaluar la nocicepción ante una lesión tisular o nerviosa, observándose reducción de la misma en modelos de dolor en roedores: pancreatitis aguda (Houghton *et al.*, 1997), dolor inducido por lesión en médula espinal (Mills *et al.*, 2001), artritis inducida por monoiodoacetato (Nagase *et al.*, 2012) y CFA (Matson *et al.*, 2007), dolor postquirúrgico por laparotomía (Martin *et al.*, 2004). En el presente estudio se evidenció discapacidad motora en los animales inflamados a partir de 4 h posterior a la quemadura, extendiéndose durante 24 h post-quemadura, evidenciado por disminución de 46,7% en la distancia total recorrida, respecto a los animales sin inducción inflamatoria. Estos datos concuerdan con los estudios de Zhu *et al.* (2012), quienes demostraron reducción significativa de la actividad locomotora a partir de 2 h posterior a la inflamación, en un modelo de discapacidad inducido por inyección intraplantar de carragenina en la pata de la rata, encontrando disminución en la actividad horizontal, vertical y distancia recorrida, acompañado de hiperalgesia térmica. De igual forma, coinciden con los estudios de Zhu *et al.* (2015), quienes demostraron reducción de la actividad exploratoria de ratas en un campo abierto, evidenciado por disminución en la distancia recorrida a las 6 h, posterior al estímulo nocivo inducido por inyección

intraplantar de CFA; esto sugiere que la inducción inflamatoria por quemadura empleada en el presente estudio, puede ser considerada un modelo alternativo para el estudio de la nocicepción.

Sobre la base de lo anterior y según lo revisado en la literatura, el presente estudio representa la primera evidencia de que la aplicación previa del inhibidor de FXa revierte parcialmente el efecto discapacitante de la quemadura en los animales inflamados, incrementando el desplazamiento exploratorio, que se evidenció por una mayor distancia recorrida. Con relación a esto, se han realizado trabajos previos a partir de los modelos de inyección intraplantar con CFA y carragenina, en los que la administración de antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) tales como: diclofenac, ibuprofeno y celecoxib, mostraron revertir los efectos de CFA y carragenina sobre la actividad exploratoria, incrementando la distancia recorrida, actividad horizontal y vertical; mientras que la administración de gabapentina y duloxetina, fármacos comúnmente empleados en el tratamiento de dolor neuropático y depresión, respectivamente, no mostraron ningún efecto sobre la pérdida de actividad locomotora inducida por la inflamación (Joshi *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2015). Sin embargo, la concurrencia del dolor y la depresión en el contexto de inflamación sugiere mecanismos neuroinmunes, puesto que, comparten síntomas asociados a la llamada “conducta de enfermedad”; caracterizada principalmente por fiebre, aislamiento social, anorexia, debilidad muscular y fatiga (Kroenke *et al.*, 2009; McCusker y Kelley, 2013; Walker *et al.*, 2014).

En tal sentido, Bonsall *et al.* (2015), demostraron que la administración intraventricular y periférica de IL-1 $\beta$  disminuye de forma dosis dependiente, la actividad locomotora en ratones, lo cual, no fue modificado por el pretratamiento con el analgésico buprenorfina; sosteniendo la tesis de que la pérdida de actividad locomotora inducida por IL-1 $\beta$ , no depende de la sensibilización al dolor, sino de fatiga, caracterizada por letargia y falta de motivación del animal para realizar la

actividad física; sustentada en la voluntad del animal de marchar en la rueda. Por lo expuesto, es posible que la disminución del edema local, por efecto de enoxaparina solo explique en parte la recuperación parcial de la actividad motora, sugiriendo otros mecanismos asociados a componentes afectivos y depresivos.

Por el contrario, Cobos *et al.* (2012), refieren que en ratones, la conducta locomotora de no marchar en la rueda, está asociada al dolor más que a la inflamación *per se*, puesto que un analgésico no antiinflamatorio como morfina, restaura la voluntad de marchar, atenuada por la administración de CFA. Asimismo, la inyección intraplantar de CFA, disminuyó la voluntad de realizar actividad locomotora en ratones; esta conducta sugiere que la supresión voluntaria de la marcha en la rueda es una medida del dolor evocado a partir de la extremidad afectada, más que el procesamiento supraespinal del dolor, el cual es independiente del sitio de inflamación (Grace *et al.*, 2014), tal y como se demostró mediante un modelo animal de hepatectomía parcial, donde no se encontró diferencias en la actividad locomotora al comparar los animales inflamados y el grupo control (Tubbs *et al.*, 2011).

Considerando lo antes planteado, los resultados del presente estudio demuestran que el modelo inflamatorio de quemadura con agua caliente es efectivo para la evaluación de nuevos fármacos antiinflamatorios y/o antinociceptivos; y que el bloqueo de FXa por una heparina de bajo peso molecular como la enoxaparina atenúa en parte, los cambios hemostáticos, inflamatorios y nociceptivos inducidos a partir del modelo inflamatorio. De ahí que, los inhibidores de FXa pueden ser empleados como coadyuvantes en el tratamiento de procesos inflamatorios agudos asociados a alteraciones trombóticas.

## 6. CONCLUSIONES

- El modelo experimental inflamatorio de quemadura con agua caliente induce respuesta inflamatoria tanto local, evidenciada por la aparición del edema; como también sistémica, al originar cambios en los niveles de leucocitos, nitritos en suero y ADM ipsilateral; además de activar la respuesta de fase aguda, evidenciada por cambios en la concentración de proteína C reactiva y fibrinógeno.
  
- El conteo plaquetario no es afectado por la inducción inflamatoria mediante el modelo de quemadura con agua caliente. No obstante, se activa el mecanismo de la coagulación, con consiguiente generación de trombina, evidenciado por elevación de los niveles de complejo TAT.
  
- El modelo de quemadura con agua caliente es eficaz para evaluar los mecanismos nociceptivos, puesto que originó variación en la actividad de FRAP en ADM ipsilateral a la quemadura y redujo la actividad motora y umbral nociceptivo térmico.
  
- La enoxaparina mostró efecto antiinflamatorio local, antiedematogénico, con respuesta dosis-dependiente y efecto antiinflamatorio sistémico, disminuyendo el recuento leucocitario, niveles plasmáticos de PCR y fibrinógeno, y nitritos en ADM ipsilateral.

- La enoxaparina tiene efecto antihemostático, no solo por reducción de la fibrinogenemia sino también de la generación de trombina, evidenciada por disminución de complejo TAT.
  
- El inhibidor de FXa previene la hiperalgia térmica, demostrado por disminución en la actividad de FRAP en ADM ipsilateral a la quemadura y la restauración de la actividad motora y umbral nociceptivo térmico.

## 7. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto del inhibidor de FXa mediante un estudio similar pero administrarlo posterior a la quemadura.
  
- Comparar el efecto de enoxaparina e inhibidores de trombina a partir del mismo modelo inflamatorio, para determinar el aporte real individual del inhibidor de FXa sobre los parámetros estudiados.
  
- Evaluar el efecto de enoxaparina, empleando agonistas e inhibidores de PAR-1 y PAR-2 en tejido de la pata, órganos y ADM, con el fin de dilucidar si ambos receptores intervienen como mediadores en los mecanismos inflamatorios y nociceptivos a partir del modelo inflamatorio ensayado.
  
- Aplicar el modelo de quemadura con agua caliente para evaluar el efecto de inhibidores orales de FXa, otras HBMP y HUBPM sobre los parámetros estudiados
  
- Realizar ensayos de adhesión y agregación plaquetaria en el mismo modelo inflamatorio y de obtener una respuesta positiva, evaluar el efecto de enoxaparina sobre ambas funciones.
  
- Realizar ensayos inmunohistoquímicos para determinar IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en tejidos (hígado, riñón) y evaluar el daño a órganos, producto de la inflamación sistémica inducida por la quemadura.

## REFERENCIAS

- Abbas, S., M. Schaalan, A. Bahgat, E. El-Denshary. 2014. Possible Potentiation by Certain Antioxidants of the Anti-Inflammatory Effects of Diclofenac in Rats. *The Scientific World Journal*.doi.1155/2014/731462.
- Abdullahi, A., S. Amini-Nik, M. Jeschke. 2014. Animal models in burn research. *Cell. Mol. Life Sci.* doi 10.1007/s00018-014-1612-5
- AEMPS, 2014. Ficha técnica enoxaparina (Clexane®). Disponible en: [http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/63002/FT\\_63002.pdf](http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/63002/FT_63002.pdf). [Consulta: Julio 20, 2017]
- Aihara, K., H. Azuma, A. Masashi, M. Sata, T. Matsumoto. 2009. Heparin cofactor II as a novel vascular protective factor against atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 16 (5): 523.
- Alfaro, M. 2003. Quemaduras. [Documento en línea].Hospital San Juan de Dios de Costa Rica]. Disponible: <http://www.binasss.sa.cr/quemaduras.pdf>. [Consulta: Julio 15, 2012]
- Allen, G., D.M. Monroe, H. Roberts, M. Hoffman. 2000. The effect of factor X level on thrombin generation and the procoagulant effect of activated factor VII in a cell-based model of coagulation. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 11(Suppl 1): S3.
- Alusik, S., V. Jedlickova, Z. Paluch, S. Zecova. 2008. Plasma levels of nitrite/nitrate and inflammation markers in elderly individuals. *Bratis Lek Listy*. 109 (7): 289.
- Amadesi, S., J. Nie, N. Vergnolle, G. Cottrell, E. Grady, M. Trevisani, C. Manni, P. Geppetti, J. Mcroberts, H. Ennes, J. Davis, E. Mayer, N. Bunnett. 2004. Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J Neurosci*. 24 (18): 4300.
- Arora, P., T. Ricks, J. Trejo 2007. Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer. *Journal of cell Science*. 120 (Pt 6): 921.
- Arzamendi, D., X. Freixa, M. Puig, M. Heras. 2006. Mecanismo de acción de los fármacos antitrombóticos. *Rev Esp Cardio. Suppl*. 6: 2H.

- Asfaha, S., V. Brussee, K. Chapman, D. Zochodne, N. Vergnolle. 2002. Proteinase-activated receptors-1 agonists attenuate nociception in response to noxious stimuli. *British Journal of Pharmacology*. 135: (5): 1101.
- Asfaha, S., N. Cenac, S. Houle, C. Altier, M. Papez, C. Nguyen, M. Steinhoff, K. Chapman, G. Zamponi, N. Vergnolle. 2007. Protease-activated receptor-4: a novel mechanism of inflammatory pain modulation. *Br J Pharmacol*. 150 (2): 176.
- Bao, Y., H. Wei, H. Baojin. 2014. Protease-activated receptor 2 signalling pathways: a role in pain processing. *Expert Opin. Ther. Targets*. 18 (1):15.
- Basbaum, A., D. Bautista, G. Scherrer, D. Julius. 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 139 (2): 267.
- Bauer, K., B. Kass, H. Ten Cate, M. Bednarek, J. Hawiger, R. Rosenberg. 1989. Detection of factor X activation in humans. *Blood*. 74 (6): 2007.
- Benavides, M. y A. Pinzón. 2008. Óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. *Rev. Col. Anest*. 36: 45.
- Bennett, D., G. Michael, N. Ramachandran, J. Munson, S. Averill, Q. Yan, S. McMahon, J. Priestley. 1998. A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *Journal of Neurosciencie*. 18 (8): 3059.
- Bernardi, P., J. Valtchanoff, R. Weinberg R, H. Schmidt, A. Rustioni. 1995. Synaptic interactions between primary afferent terminals and GABA and nitric oxide-synthesizing neurons in superficial laminae of the rat spinal cord. *J. Neurosci*. 15 (2):1363.
- Bishop-Bailey, D., S. Larkin, W. Warner, T. Chen, J. Mitchell. 1997. -Bailey, D., S. Larkin, W. Warner, T. Chen, J. Mitchell. 1997. Characterization of the induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase in rat aorta in organ culture. *Br. J. Pharmacol*. 121: 125. *Br. J. Pharmacol*. 121(1):125.
- Bizios, R., L. Lai, J. Fenton, A. Malik. 1986. Thrombin induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *Journal of Cellular Physiology*. 128 (3): 485.
- Boettger, M., N. Uceyler, M. Zelenka, A. Schmitt, A. Reif, Y. Chen, C. Sommer. 2007. Differences in inflammatory pain in nNOS, iNOS and eNOS deficient mice. *Eur. J. Pain*. 11 (7): 810.

- Bonsall, D., H. Kim, C. Tocci, A. Ndiaye, A. Petronzio, G. McKay-Corkum, P. Molyneux, T. Scammell, M. Harrington. 2015. Suppression of Locomotor Activity in Female C57Bl/6J Mice Treated with Interleukin-1 $\beta$ : Investigating a Method for the Study of Fatigue in Laboratory Animals. PLOS ONE. doi:10.1371/journal.pone.0140678.
- Borensztajn, K., M. Peppelenbosch, C. Spek. 2008. Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. Trends Mol Med. 14 (10):429.
- Borensztajn, K., M. P. Peppelenbosch, C. Spek. 2009. Coagulation factor Xa signaling: the link between coagulation and inflammatory bowel disease?. Trends Pharmacol Sci. 30: (1):8.
- Borisoff, J., H. Spronk, S. Heeneman, H. Ten Cate. 2009. Is thrombin a key player in the "coagulation atherogenesis" maze?. Cardiovasc Res. 82 (3): 392.
- Bosco-Bruno, R., E. Barrios, A. Eblén Zajjur. 2011. Efecto de la indometacina sobre la expresión de proteínas y del canal de sodio Nav1.3 en el asta dorsal medular de ratas, inducidos por una inflamación periférica aguda. VITAE Academia Biomédica Digital. 49:1.
- Bosco, R., S. Alvarado, D. Quiroz, A. Eblén-Zajjur. 2010. Digital cytomorphometry of neurons from dorsal root ganglion of the rat. J. Histotechnol. 33 (3): 113.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248.
- Breitenstein, A., F. Tanner, T. Lüscher. 2010. Tissue Factor and Cardiovascular Disease: Quo Vadis?. Circ. J. 74 (1): 3.
- Campos, G. 2012. Inflammation as an animal development phenomenon. Clinical and Developmental Immunology. doi.org/10.1155/2012/983203
- Carretero, M. 2006. Fondaparinux sódico Prevención de los episodios tromboembólicos venosos. Actualidad científica: Medicamentos de vanguardia. 25 (5): 126.
- Carrillo, R. y J. A. González. 2002. Inflamación-endotelio-coagulación en sepsis. Conceptos actuales. Cir Ciruj. 70 (6): 433.
- Carrillo, R., Y. Antigua, J. R. Carrillo. 2007. Modelo celular de la hemostasia y utilidad del factor VII recombinante activado en la práctica clínica. Acta Médica Grupo Angeles. 5 (1):27.

- Castañón, M. 2008. Glicosaminoglicanos en hemostasia: Acción del dermatán sulfato sobre el sistema fibrinolítico. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 42 (4): 509.
- Castelli, R., E. Cassinerio, M. Cappellini, F. Porro, G. Graziadei, F. Fabris. 2007. Heparin Induced Thrombocytopenia: Pathogenetic, Clinical, Diagnostic and Therapeutic Aspects. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 7: (3):153.
- Ceccarelli, M., D. Bani, L. Cinci, S. Nistri, C. Uliva, E. Ragazzo, A. Vannacci, M. Manoni, A. Gori, R. Abbate, G. Gensini, E. Masini. 2009. Anti-inflammatory effects of low molecular weight heparin derivative in a rat model of carrageenan-induced pleurisy. *J. Cell. Mol. Med.* 13 (8B): 2704.
- Cecilliani, F., A. Giordano, V. Spagnolo. 2002. The systemic reaction during inflammation: The acute-phase proteins. *Protein Pept Lett.* 9 (3): 211.
- Cenac, N., R. García-Villar, L. Ferrier, M. Larauche, N. Vergnolle, N. Bunnett, A. Coelho, J. Fioramonti, L. Bueno. 2003. Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. *J Immunol.* 170 (8): 4296.
- Cermak, J., N. Key, R. Bach, J., Balla, H. Jacob, G. Vercellotti. 1993. C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood.* 82 (2):513.
- Cesarman-Maus, G. and K. A. Hajjar. 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol.* 129 (3): 307.
- Chacur, M., R. Matos, A. Alves, A. Rodrigues, V. Gutierrez, Y. Cury, L. Britto. 2010. Participation of neuronal nitric oxide synthase in experimental neuropathic pain induced by sciatic nerve transection. *Braz J Med Biol Res.* 43(4): 367.
- Chattopadhyay, R., R. Lacob, S. Sen, R. Majumder, K. Tomer, B. Lentz. 2009. Functional and structural characterization of factor Xa dimer in solution. *Biophysical Journal.* 96: 974.
- Chen, C., B. Nan, P. Lin, Q. Yao. 2008. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression in human endothelial cells. *Thromb Res.* 122 (1): 125.
- Chen, K., Z. Zhang, M. Liao, W. Yao, J. Wang, X. Wang. 2015. Blocking PAR2 attenuates oxaliplatin-induced neuropathic pain via TRPV1 and releases of substance P and CGRP in superficial dorsal horn of spinal cord. *J Neurol Sci.* 352 (1-2): 62.
- Chen, L., L. Zhu, K. Wang, W. Wang, X. Mei, T. Liu, F. Zhang, W. Wang, T. Chen, Y. Li. 2013. Antinociceptive Effect of Prostatic acid phosphatase in a rat model of cancer-induced bone pain. *Pain Physician.* 16 (6):533.

- Chen, Y., J. Wang, Y. Yao, W. Yuan, M. Kong, Y. Lin, D. Geng, R. Nie. 2009. CRP regulates the expression and activity of tissue factor as well as tissue factor pathway inhibitor via NF-kappaB and ERK 1/2 MAPK pathway. *FEBS Lett.* 583 (17):2811.
- Chen, Y., C. Yang, Z. Wang. 2011. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Neuroscience.* 193: 440.
- Cicala, C. and G. Cirino G. 1998. Linkage between inflammation and coagulation: an update on the molecular basis of the crosstalk. *Life Science.* 62 (20): 1817.
- Cicala, C., S. Morello, A. Alfieri, V. Vellecco, S. Marzocco, G. Autore. 2007. Haemostatic imbalance following carrageenan induced rat paw oedema. *Eur J Pharmac.* 577 (1-3): 156
- Cirino, G., C. Cicala, M. Bucci, L. Sorrentino, J. Maragnore, S. Stone. 1996. Thrombin functions as an inflammatory mediator through activation of its receptor. *J Exp Med.* 183 (3): 821.
- Cirino, G., C. Cicala, M. Bucci, L. Sorrentino, J. Maragnore, G. Ambrosini, G. DeDominicis, D. Altieri. 1997. Factor Xa as an interface between coagulation and inflammation molecular mimicry of factor Xa association with effector cell protease receptor-1 induces acute inflammation *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 99 (10): 2446.
- Cobos, E., N. Ghasemlou, D. Araldi, D. Segal, K. Duong, C. Woolf. 2012. Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: A nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia. *Pain.* 153 (4):876.
- Coleman, J. 2002. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clín Exp Immunol.* 129 (1): 4.
- Coughlin, S.R. 2000. Thrombin signaling and protease-activated receptors. *Nature.* 407 (6801): 258.
- Coughlin, S.R. 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost.* 3 (8): 1800.
- Crawley, J., S. Zanardelli, C. Chion, A. Lane. 2007. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost.* 5 (Suppl. 1): 95.
- Christoffersen, B., S. Jensen, T. Ludvigsen, S. Nilsson, A. Grossi, P. Heegaard. 2015. Age- and sex-associated effects on acute-phase proteins in Gottingen minipigs. *Comp Med.* 65 (4): 333.

- Cuenca, J., C. Álvarez, J. Serrano. 2001. Fase inflamatoria en el paciente quemado. *Cirugía plástica*. 11 (2): 90.
- Cunha, T., W. Verri, J. Silva, S. Poole, F. Cunha, S. Ferreira. 2005. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci*. 102 (5): 1755.
- Czaplinski, M., C. Abad, A. Eblen-Zajjur. 2005. Normal expression and inflammation-induced changes of Na and Na/K ATPase activity in spinal dorsal horn of the rat. *Neurosci Lett*. 374:147.
- Dahlbäck, B. 2005. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J Intern Med*. 257 (3): 209.
- Dale, C. and N. Vergnolle. 2008. Protease signaling to G protein-coupled receptors: implications for inflammation and pain. *J Recept Signal Transduct Res*. 28 (1-2): 29.
- Davie, E. and J. Kulman. 2006. An overview of the structure and function of thrombin. *Semin Thromb Hemost*. 32 (Suppl. 1): 3.
- Davis, C., J. Fisscher, K. Ley, J. Sarembock J. 2003. The role of inflammation in vascular injury and repair. *J Thromb Haemost*. 1 (8): 1699.
- Dawes, J., D. Anderson, D. Bennett, S. Bevan, S. McMahon. 2013. Inflammatory mediators and modulators of pain. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 5:48.
- De Garavilla, N. Vergnolle, S. Young, H. Ennes, M. Steinhoff, V. Ossovskaya, M. D'Andrea, E. Mayer, J. Wallace, M. Hollenberg, P. Andrade-Gordon, N. Bunnnett. 2001. Agonists of proteinase-activated receptor 1 induce plasma extravasation by a neurogenic mechanism. *Br J Pharmacol*. 133 (7): 975.
- De Jonge, E., P. Dekkers, A. Creasey, C. Hack, S. Paulson, A. Karim, J. Kesecioglu, M. Levi, S. Van Deventer, T. Van der Poll. 2001. Tissue factor pathway inhibitor does not influence inflammatory pathways during human endotoxemia. *J Infect Dis*. 183 (12): 1815.
- De Leo, J. A. and R. P. Yezierski. 2001. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain*. 90: 1.
- De Lisa, E., C. Otero, J. Janssen. 2011. Rol de las heparinas de bajo peso molecular y pentasacáridos en la tromboprolifaxis. *Arch Med Interna*. 33 (Suppl. 3): 8.

- Derhaschnig, U., T. Pernerstorfer, M. Knechtelsdorfer, U. Hollenstein, S. Panzer, B. Jilma. 2003. Evaluation of anti-inflammatory and antiadhesive effects of heparins in human endotoxemia. *Crit Care Med.* 31 (4):1108.
- Derian, C., B. Damiano, M. D'Andrea, P. Andrade-Gordon. 2002. Thrombin regulation of cell function through protease-activated receptors: implications for therapeutic intervention. *Biochemistry.* 67 (1): 56.
- Déry, O., C. Corvera, M. Steinhoff, N. Bunnett. 1998. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol.* 274 (6 Pt 1): C1429.
- Dianarello, C. 2000. Proinflammatory Cytokines. *Chest.* 118 (2): 503.
- Díaz, A. y D. Almagro 2001. Estado actual del mecanismo de la coagulación sanguínea. *Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia.* 17 (2): 77.
- Dihanich, M., M. Kaser, E. Reinhard, D. Cunningham, D. Monard. 1991. Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. *Neuron.* 6 (4): 575.
- Di Nisio, M., M. Middeldorp, H. Büller. 2005. Direct Thrombin Inhibitors. *N Engl J Med.* 353 (10): 1028.
- Ding, R., D. Zhao, R. Guo, M. Zhang. 2011. Treatment with unfractionated heparin attenuates coagulation and inflammation in endotoxemic mice. *Thromb Res.* 128 (6): 160.
- Dittmeier, M., P. Kraft, M. Schuhmann, F. Fluri, C. Kleinschnitz. 2016. Pretreatment with rivaroxaban attenuates stroke severity in rats by a dual antithrombotic and anti-inflammatory mechanism. *Thromb Haemost.* 115 (4):835.
- D'Mello, R. and A. Dickenson. 2008. Spinal cord mechanisms of pain. *Br. J. Anaesth.* 101 (1): 8.
- Dotan, I., R. Hershkoviz, F. Karmeli, E. Brazowskià, Y. Peled, D. Rachmilewitz y Z. Halpern. 2001. Heparin and low-molecular-weight heparin (enoxaparin) significantly ameliorate experimental colitis in rats. *Aliment Pharmacol Ther.* 15 (10): 1687.
- Duboscq, C., J. Ceresetto, G. Stemmelin, C. Shanley, O. Rabinovich, S. Palmer, E. Bullorsky. 2013. Effect of first and second generation LMWH on thrombin generation parameters. *Hematología.* 17 (3):231.
- Dubruc, C., N. Karimi-Anderesi, C. Lunven, M. Zhang, M. Grossmann, H. Potgieter. 2009. Pharmacokinetics of a new, ultra-low molecular weight heparin, semuloparin (AVE5026), in healthy subjects. Results from the first phase I studies. 51th ASH

- Annual Meeting. Poster: 1073. Disponible en: <http://ash.confex.com/ash/2009/webprogram/> [Consulta: Enero 15, 2017].
- Dugina, T., I. Kiseleva, B. Chistov, S. Strukova. 2002. Receptors of the PAR family as a link between blood coagulation and inflammation. *Biochemistry*. 67 (1): 65.
- Eblén-Zajjur, A. 2005a. Neurofisiología de la nocicepción. *Gac Méd Caracas*. 113 (4): 466.
- Eblén-Zajjur, A. 2005b. Inmunología de la Nocicepción. *Dolor Clin Terap*. 3: 17.
- Eblén-Zajjur, A. and J. Sandkühler. 1997. Synchronicity of nociceptive and non-nociceptive adjacent neurons in the spinal dorsal horn of the rat: stimulus-induced plasticity. *Neuroscience*. 76 (1): 39.
- Eblén-Zajjur, A., R. Marín, H. Vanegas, F. Proverbio, T. Proverbio. 2015. Diurnal changes in ouabain-sensitive Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-atpase activity in the rat spinal dorsal horn. *Neurochem J*. 9:266.
- Eddy, N. B. and D. Leinbach. 1953. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 107: 385.
- Eikelboom, J.W. and J.I. Weitz. 2010. Update on antithrombotic therapy. New anticoagulants. *Circulation*. 121 (13): 1523.
- Ellinghaus, P., E. Perzborn, P. Hauenschild, C. Gerdes, S. Heitmeier, M. Visser, H. Summer, V. Laux. 2016. Expression of pro-inflammatory genes in human endothelial cells: Comparison of rivaroxaban and dabigatran. *Thromb Res*. 142:44.
- El-Shenawy, S., O. Abdel-Salam, A. Baiuomy, S. El-Batran, M. Arbid. 2002. Studies on the anti-inflammatory and antinociceptive effects of melatonin in the rat. *Pharmacol Res*. 46 (3): 235.
- Enciso, E. y J. Arroyo. 2011. Antiinflammatory and antioxidant effects of *Jungia rugosa* Less (matico de puna) leaves' flavonoids in rats. *An Fac Med*. 72(4):231.
- Ernst, E. 1993. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor-interrelationship with infections and inflammation. *Eur Heart J*. 14 (Suppl. K): 82.
- Esmon, C.T. 2003. The protein C pathway. *Chest*. 124 (3 Suppl.): 26S.
- Esmon, CT. 2008. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas*. 61 (1-2):122.
- Espinosa, R. 2002. Fibrinogen: a cardiovascular risk factor. *Invest Clín*. 43 (4): 291.

- Fang, M., K. Kovács, L. Fisher, A. Larson. 2003. Thrombin inhibits NMDA-mediated nociceptive activity in the mouse: possible mediation by endothelin. *J Physiol.* 549 (Pt 3): 903.
- Faure, G., V. Gowda, R. Maroun. 2007. Characterization of a human coagulation factor Xa-binding site on *Viperidae* snake venom phospholipases A2 by affinity binding studies and molecular bioinformatics. *BMC Structural Biology.* 7 (1): 82.
- Fernández, A. y A. Borrascas A. 1992. Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. (Vol. III). Ediciones Universidad de Salamanca, España.
- Fernández, A. 2002. Características de las heparinas de bajo peso molecular (HBPM). *Emergencias.* 14 (Suppl. 2): S38.
- Ferrero-Miliani, L., O. Nielsen, P. Andersen, S. Girardin. 2006. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukine-1 $\beta$  generation. *Clin Exp Immunol.* 147 (2): 227.
- Flórez, J. 2003. *Farmacología Humana.* (4ta. Ed.). Editorial Masson, Barcelona, España.
- Foley, J. and E. Conway. 2016. Cross talk Pathways between Coagulation and inflammation. *Circ Res.* 118 (9):1392.
- Fontenay, M. 2007. Los nuevos antitrombóticos. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 41 (3): 437.
- Fowler, M., J. Clifford, T. Garza, T. Slater, H. Arizpe, J. Novak, L. Petz, D. Loyd. 2014. A rat model of full thickness thermal injury characterized by thermal hyperalgesia, mechanical allodynia, pronociceptive peptide release and tramadol analgesia. *Burns.* 40 (4): 759.
- Fragachán, L. 1984. *Manual de hemostasia y coagulación sanguínea.* Universidad Central de Venezuela, Venezuela.
- Frenette, P. and D. Wagner. 1996. Adhesion molecules Part II: Blood vessels and blood cells. *N Engl J Med.* 335 (1): 43.
- Gao, C., S. Liu, H. Hu., N. Gao, G. Kim, Y. Xia, J. Wood. 2002. Serine proteases excite myenteric neurons through protease-activated receptors in guinea pig small intestine. *Gastroenterology* 2002. 123 (5): 1554
- García, D., A. Baglin, J. Weitz, M. Samama. 2012. Parenteral anticoagulants: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest,* 141(2): e24S.

- García, P., A. Gulati, J. Levi. 2010. The role of thrombin and protease-activated receptors in pain mechanisms. *Thromb Haemost.* 103 (6): 1145.
- Gebhart, G. F. 2000. Scientific issues of pain and distress. In definition of pain and distress and reporting requirements for laboratory animals. National academy press, Washington D.C.
- Giffen, S., J. Turton, C. Andrews, P. Barret, C. Clarke, K. Fung, M. Munday, I. Roman, R. Smyth, K. Walshe, M. York. 2003. Markers of experimental acute inflammation in the Wister Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. *Molecular Toxicology.* 77 (7): 392.
- Gingrich, M., C. Jung, P. Lyuboslavsky, S. Traynelis. 2000. Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin. *J Neurosci.* 20 (12): 4582.
- Giordano, J. 2005. The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. *Pain Physician.* 8 (3): 277.
- Glykys, J., M. Guadama, L. Marcano, E. Ochoa, A. Eblen-Zajjur A. 2003. Inflammation induced increase of fluoride resistant acid phosphatase (FRAP) activity in the spinal dorsal horn in rats. *Neurosci Lett.* 37 (3): 167.
- Goldberg, R. 2009. Cytokine and Cytokine-Like Inflammation Markers, Endothelial Dysfunction, and Imbalanced Coagulation in Development of Diabetes and Its Complications. *J Clin Endocrinol Metab.* 94 (9): 3171.
- Goldsby, R., T. Kindt, B. Osborne, J. Kuby. 2004. *Inmunología.* (5ta. ed). McGraw-Hill Interamericana, México.
- Gomez, K., J. McVey, E. Tuddenham. 2005. Inhibition of coagulation by macromolecular complexes. *Haematologica.* 90 (11): 1570.
- Gómez-Outes, A., M. Suárez-Gea, R. Lecumberri, E. Rocha, C. Pozo-Hernández, E. Vargas-Castrillón. 2011. Nuevos anticoagulantes parenterales en desarrollo clínico. *Actualidad en Farmacología y Terapéutica.* Septiembre 9 (3): 167.
- González, H. 2006. De la hipótesis de la trombina a la inflamación. ¿Es una realidad? *Arch. Cardiol. Méx.* 76 (Supl. 2): 233.
- Gori, A., M. Attanasio, A. Gazzini, L. Rossi, L. Lucarini, S. Miletto, J. Chini, M. Manoni, R. Abbate, G. F. Gensini. 2004. Cytokine gene expression and production by human LPS-stimulated mononuclear cells are inhibited by sulfated heparin-like semi-synthetic derivatives. *J Thromb Haemost.* 2 (9): 1657.

- Grace, P., K. Strand, S. Maier, L. Watkins. 2014. Suppression of Voluntary Wheel Running in Rats Is Dependent on the Site of Inflammation: Evidence for Voluntary Running as a Measure of Hind Paw-Evoked Pain. *J Pain*. 15 (2): 121.
- Graddis, T., C. McMahan, J. Tamman, K. Page, J. Trager. 2011. Prostatic acid phosphatase expression in human tissues. *Int.J.Clin.Exp.Pathol*. 4 (3): 295.
- Graefe-Mody, E.U., U. Schühly, K. Rathgen, H. Stähle, J. M. Leitner, B. Jilma. 2006. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of BIBT 986, a novel small molecule dual inhibitor of thrombin and factor Xa. *J Thromb Haemost*. 4 (7): 1502.
- Grant, A., G. Cottrell, S. Amadesi, M. Trevisani, P. Nicoletti, S. Materazzi, C. Altier, N. Cenac, G. Zamponi, F. Bautista-Cruz, C. Lopez, E. Joseph, J. Levine, W. Liedtke, S. Vanner, N. Vergnolle, P. Geppetti, N. Bunnett. 2007. Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. *J Physiol*. 578 (Pt 3):715.
- Gray, E., B. Mulloy, T. Barrowcliffe. 2008. Heparin and low-molecular-weight heparin *Thromb Haemost*. 99 (5): 807.
- Green, B., N. Bunnett, A. Kulkarni-Narla, M. Steinhoff, D. Brown. 2000. Intestinal type 2 proteinase-activated receptors: expression in opioid-sensitive secretomotor neural circuits that mediate epithelial ion transport. *J Pharmacol Exp Ther*. 295 (1): 410.
- Green, L.C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, S.R. Tannenbaum. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 126 (1): 131.
- Grignani, G. and A. Maiolo. 2000. Cytokines and hemostasis. *Haematologica*. 85 (9): 967.
- Guerrero, B. y M. López. 2015. Generalidades del sistema de la coagulación y pruebas para su estudio. *Invest Clin*. 56 (4): 432.
- Guertin, K. R. and Y. M. Choi. 2007. The discovery of the Factor Xa inhibitor otamixaban: from lead identification to clinical development. *Curr Med Chem*. 14 (23): 2471.
- Guo, F., J. Liu, C. Wang, N. Liu, L. Peipei. 2009. Fibrinogen, fibrin, and FDP induce C-reactive protein generation in rat vascular smooth muscle cells: Pro-inflammatory effect on atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 390 (3): 942.
- Hamasaki, M., M. Machado, F. Pinheiro da Silva. 2017. Animal models of neuroinflammation secondary to acute insults originated outside the brain. *J Neuro Res*. 96 (3): 371.
- Hammer, O., D. Harper, P. Ryan. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4 (1): 9.

- Hargreaves, K., R. Dubner, F. Brown, C. Flores, J. Joris. 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 32 (1):77.
- Harker, L. 1994. Strategies for inhibiting the effects of thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 5 (Suppl. 1):S47.
- Hassan, M., A. Aijaz, F. Ahmad. 2010. Structural and functional analysis of human prostatic acid phosphatase. *Expert Rev. Anticancer Ther*. 10 (7):1055.
- Hernández, A., R. Núñez, N. Godoy, E. Socarras, Z. González, J. Chávez, C. Cano, V. Bermúdez, G. Suárez. 2002. Comparación de los niveles séricos de óxido nítrico y malondialdehído en pacientes con pie diabético con y sin infección. *Kasmera*. 30 (1): 74.
- Hernández, L., U. Lundberg, C. Arocha-Pinango. 2000. Experimental thrombosis I: relation with fibrinogen and other haemostatic parameters. *Thromb. Res*. 99 (3):295.
- Hezi-Yamit, A., P. W. Wong, N. Bien-Ly, L. G. Komuves, K. S. Prasad, D. R. Phillips, U. Sinha U. 2005. Synergistic induction of tissue factor by coagulation factor Xa and TNF: evidence for involvement of negative regulatory signaling cascades. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102 (34): 12077.
- Hinder, M., A. Frick, P. Jordan, G. Hesse, A. Gebauer, J. Maas, A. Paccaly. 2006. Direct and rapid inhibition of factor Xa by otamixaban: A pharmacokinetic and pharmacodynamic investigation in patients with coronary artery disease. *Clin Pharmacol Ther*. 80 (6): 691.
- Hirsh, J. and R. Raschke. 2004. Heparin and low-molecular- weight heparin: the seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest*. 126 (3): 188S.
- Hirsh, J., M. O'Donnell, J. Weitz. 2005. New anticoagulants. *Blood*. 105 (2):453.
- Hoffman, M. 2003. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev*. 17 (Suppl. 1): S1.
- Hoffman, M. and D. Monroe. 2001. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 85 (6):958.
- Hoogerwerf, W., L. Zou, M. Shenoy, M. D. Sun, M. Micci, H. Lee-Hellmich, S. Xiao, J. Winston, P. Pasricha. 2001. The proteinase-activated receptor 2 is involved in nociception. *J Neurosci*. 21 (22):9036.
- Houghton, A., S. Kadura, K. Westlund. 1997. Dorsal column lesions reverse the reduction of homecage activity in rats with pancreatitis. *Neuro Report*. 8 (17): 3795.

- Hu, Z., K. Kobayashi, N. Zenda, T. Shimamura. 1997. Tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-6-triggered mast cell development from mouse spleen cells. *Blood*. 89 (2):526.
- Hunt, S. and H. Bester. 2005. The ascending pain pathways. Molecular and cellular neurobiology series: The neurobiology of pain. Oxford University Press, England.
- Hunt, S. and P. Mantyh. 2001. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci*. 2 (2): 83.
- Huntington, J. A. 2003. Mechanisms of glycosaminoglycan activation of the serpins in hemostasis. *J Thromb Haemost*. 1 (7): 1535.
- Ialenti, A., S. Moncada, M. Di Rosa. 1993. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. *J Pharmacol*. 110 (2):701.
- Iba, T. and T. Takayama. 2009. Enoxaparin attenuates endothelial damage with less bleeding compared with unfractionated heparin in endotoxemic rats. *Shock*. 32 (5):530.
- Iba T, K. Okamoto, T. Ohike, T. Tajirika, K. Aihara, S. Watanabe, H. Kayhanian. 2012. Enoxaparin and fondaparinux attenuates endothelial damage in endotoxemic rats. *J Trauma*. 72: 177.
- Imamura, T., K. Hiroshi y S. Nakamura. 2002. New functions of neutrophils in the Arthus reaction: Expression of Tissue factor, the clotting initiator, and fibrinolysis by elastase. *Lab Invest*. 82 (10):1287.
- Ingram, G.I.C. 1952. The determination of plasma fibrinogen by the clot-weight method. *Biochem J*. 51 (5): 583.
- Inoue, N., S. Ito, T. Koyuki, M. Nogawa, Y. Takashashi, T. Sasagawa, A. Nakamura, T. Kyoj. 2009. Etodolac attenuates mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *J Pharmacol Sci*. 109 (4): 600.
- Inoue, T., K. Croce, T. Morooka, M. Sakuma, K. Node, D. Simon. 2011. Vascular inflammation and repair implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis. *JACC: Cardiovasc interv*. 4 (10): 1057.
- Izaguirre, A.R. 2005. The centennial of blood coagulation doctrine. *Arch Cardiol Mex*. 75 (Suppl 3): S3-118.
- Jeschke, M., R. Mlcak, C. Finnerty, W. Norbury, G. Gauglitz, G. Kulp, D. Herndon. 2007. Burn size determines the inflammatory and hypermetabolic Response. *Critical Care*. 11 (4): 1.

- Johnson, K., Y. Choi, E. DeGroot, I. Samuels, A. Creasey, L. Aarden. 1998. Potential mechanisms for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation. *Journal of Immunol.* 160 (10): 5130.
- Joshi, S., G. Hernández, J. Mikusa, C. Zhu, C. Zhong, A. Salyers, C. Wismer, P. Chandran, M. Decker, P. Honore. 2006. Comparison of antinociceptive actions of standard analgesics in attenuating capsaicin and nerve-injury-induced mechanical hypersensitivity. *Neuroscience.* 143 (2): 587.
- Julius, D. and A. Basbaum. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 413 (6852): 203.
- Kahn, M., Y. Zheng, C. Huang, V. Bigornia, D. Zeng, S. Moff, R. Farese, C. Tam, S. Coughlin. 1998. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature.* 394 (6694): 690.
- Kantner, R. and M. Kirby. 1982. Changes in acid phosphatase activity in the substantia gelatinosa in response to pain. *Brain Res.* 238 (2):451.
- Kataoka, H., J. Hamilton, D. McKemy, E. Camerer, Y. Zheng, A. Cheng, C. Griffin, S. Coughlin. 2003. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. *Blood.* 102 (9): 3224.
- Kawabata, A., N. Kawao, R. Kuroda, A. Tanaka, H. Itoh, H. Nishikawa. 2001. Peripheral PAR-2 triggers thermal hyperalgesia and nociceptive responses in rats. *Neuroreport.* 12 (4):715.
- Kawabata, A., R. Kuroda, H. Nishikawa, T. Asai, K. Kataoka, M. Taneda. 1999. Enhancement of vascular permeability by specific activation of protease-activated receptor-1 in rat hindpaw: a protective role of endogenous and exogenous nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 126 (8):1856.
- Kawahara, K., H. Hohjoh, T. Inazumi, S. Tsuchiya, Y. Sugimoto. 2015. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1851(4):414.
- Keller, A., S. Beggs, M. Salter, Y. De Koninck. 2007. Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Mol. Pain.* 3 (1): 27.
- Kerr, R., D. Stirling, C. Ludlam. 2001. Interleukin 6 and Haemostasis. *Br J Haematol.* 115 (1): 3.
- Kidd, B. L. and L.A. Urban. 2001. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth.* 87 (1): 3.

- Kindt, T., R. Goldsby, B. Osborne. 2007. *Inmunología de Kuby*. (6ta Ed). Mc Graw Hill, México.
- Kinoshita, T., N. Sawai, E. Hidaka, T. Yamashita, K. Koike. 1999. Interleukin-6 directly modulates stem cell factor-dependent development of human mast cells derived from CD34(+) cord blood cells. *Blood*. 94 (2):496.
- Kleinbongard, P., A. Dejam, T. Lauer, T. Rassaf, A. Schindler, O. Picker, T. Scheeren, A. Godeke, J. Schrader, R. Schultz, G. Heusch, G. Schaub, N. Bryan, M. Feelisch, M. Kelm. 2003. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med*. 35 (7): 790.
- Kolios, G., V. Valatas, S. Ward. 2004. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*. 113 (4): 427.
- Koltzenburg, M., P. D. Wall, S. B. McMahon. 1999. Does the right side know what the left is doing? *Trends Neurosci*. 22 (3): 122.
- Koyama, K., S. Madoiwa, S. Nunomiya, T. Koinuma, T. Wada, A. Sakata, T. Ohmori, J. Mimuro, Y. Sakata. 2014. Combination of thrombin-antithrombin complex, plasminogen activator inhibitor-1, and protein C activity for early identification of severe coagulopathy in initial phase of sepsis: a prospective observational study. *Crit Care*. 18(1):R13.
- Kroenke, K., M. Bair, T. Damush, J. Wu, S. Hoke, J. Sutherland, W. Tu. 2009. Optimized antidepressant therapy and pain self-management in primary care patients with depression and musculoskeletal pain: a randomized controlled trial. *JAMA*. 301 (20):2099.
- La Greca R. 2012. Potential of inflammatory biomarkers in the early detection of cardiovascular disease. *Rev. Med. Clin. Condes*. 23 (6): 666.
- Lakshmi, R., T. Priyanka, J. Meenakshi, K. Mathangi, V. Jeyaraman, M. Babu. 2011. Low molecular weight heparin mediated regulation of nitric oxide synthase during burn wound healing. *Ann Burns Fire Disasters*. 24 (1): 24.
- Lane, D., H. Philippou, J. Huntington. 2005. Directing thrombin. *Blood*. 106: 2605.
- Lao, L., E. Kumamoto, C. Luo, H. Furue, M. Yoshimura. 2001. Adenosine inhibits excitatory transmission to substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord through the activation of presynaptic A (1) adenosine receptor. *Pain*. 94 (3):315.
- Latremoliere, A. and C. Woolf. 2009. Central Sensitization: A generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*. 10 (9):895.

- Levi, M. 2010. The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hämostaseologie*. 30 (1): 10.
- Levi, M., T. Keller, E. Van Gorp, H. Ten Cate. 2003. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res*. 60 (1):26.
- Levi, M. and T. Van der Poll. 2005. Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med*. 15 (7): 254.
- Levi, M. and T. Van der Poll. 2010. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med*. 38 (2): S26.
- Levi, M., T. Van der Poll, M. Schultz. 2012. Systemic versus localized coagulation activation contributing to organ failure in critically ill patients. *Semin Immunopathol*. 34 (1): 167.
- Levy, J., R. Sniecinski, I. Welsby, M. Levi. 2016. Antithrombin: anti-inflammatory properties and clinical applications. *Thromb Haemost*. 115 (4): 712.
- Ley venezolana para la protección de la fauna doméstica libre y en cautiverio Gaceta oficial de la República Bolivariana de Venezuela de 2010. No. 39.338. (Ene. 4, 2010).
- Li, X., H. Schneider, A. Peters, C. Macaulay, E. King, Y. Sun, L. Liu, E. Dai, J. Davids, G. McFadden, A. Lucas. 2008. Heparin alters viral serpin, serpin-1, anti-thrombolytic activity to anti-thrombotic activity. *Open Biochem J*. 2: 6.
- Licari, L and J. Kovacic. 2009. Thrombin physiology and pathophysiology. *J Vet Emerg Crit Care*. 19 (1):11.
- Licastro, F., G. Candore, D. Lio, E. Porcellini, G. Colonna-Romano, C. Franceschi, C. Caruso. 2005. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immun Ageing*. 2 (8): 1.
- Lio, D. and C. Caruso. 2004. IL-10, Genetic Polymorphism and Its Relevance to Age-related Diseases. *Interleukin-10*. Eureka.com. Georgetown, Texas, U.S.A.
- Liou, J., F. Liu, C. Mao, Y. Lai, Y. Day. 2011. Inflammation confers dual effects on nociceptive processing in chronic neuropathic pain model. *Anesthesiology*. 114 (3): 660.
- Liu, H., H. Wang, M. Sheng, L. Jan, Y. Jan, A. Basbaum. 1994. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. *Proc Natl Acad Sci*. 91 (18): 8383.

- Luo, Z. and D. Cizkova. 2000. The role of nitric oxide in nociception. *Curr. Rev. Pain.* 4 (6): 459.
- Ma, Q., U. Cornelli, I. Hanin, W. Jeske, R. Linhardt, J. Walenga, J. Fareed, J. Lee. 2007. Heparin Oligosaccharides as Potential Therapeutic Agents in Senile Dementia. *Curr Pharm Des.* 13 (15): 1607.
- Mackman, N., R. Tilley, N. Key. 2007. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27 (8):1687.
- Mañez, C. y M. S. Moya. 2006. Nuevas posibilidades de prevención y tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa. *Emergencias.* 18: 297.
- Manduteanu, I., M. Voinea, F. Antohe, E. Dragomir, M. Capraru, L. Radulescu, M. Simionescu. 2003. Effect of enoxaparin on high glucose induced activation of endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 477 (3):269.
- Mann, K., M. Nesheim, W. Chirch, P. Haley, S. Krishnaswamy. 1990. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood.* 76 (1): 1.
- Mann, K., S. Butenas, K. Brummel. 2003. The Dynamics of Thrombin Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:17.
- Martin, T., N. Buechler, W. Kahn, J. Crews, J. Eisenach. 2004. Effects of laparotomy on spontaneous exploratory activity and conditioned operant responding in the rat: A model for postoperative pain. *Anesthesiology.* 101 (1): 191.
- Matson, D., D. Broom, S. Carson, J. Baldassari, J. Kehne, D. Cortright. 2007. Inflammation-induced reduction of spontaneous activity by adjuvant: A novel model to study the effect of analgesics in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 320 (1):194.
- McCleskey, E. and M. Gold. 1999. Ion channels and nociception. *Ann Rev Physiology.* 61: 835.
- McCusker, R. and K. Kelley. 2013. Immune–neural connections: how the immune system’s response to infectious agents influences behavior. *J Exp Biol.* 216 (1): 84.
- McEver, R. P. 1992. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr Opin Cell Biol.* 4 (5): 840.
- Mebazaa, A., G. De Keulenaer, X. Paqueron, L. Andries, P. Ratajczak, S. Lanone, C. Frelin, D. Longrois, D. Payen, D. Brutsaert, S. Sys. 2001. Activation of cardiac endothelium as a compensatory component in endotoxin-induced cardiomyopathy: role of endothelin, prostaglandins, and nitric oxide. *Circulation.* 104 (25): 3137.

- Meldrum, B. 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutri.* 130 (4): 1007.
- Meller, S. and G. Gebhart. 1993. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 52 (2): 127.
- Millan, M. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol.* 57 (1): 1.
- Mills, C., J. Grady, C. Hulsebosch. 2001. Changes in exploratory behavior as a measure of chronic central pain following spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 18 (10):1091.
- Mitchell, R.N. and R. S. Cotran. 2003. Acute and Chronic Inflammation. In *Robbins Basic Pathology* Saunders, Philadelphia, USA.
- Moilanen, E. 2014. Two faces of inflammation: An Immunopharmacological View. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 114: 2
- Molino, M., N. Blanchard, E. Belmonte, A. P. Tarver, C. Abrams, J. A. Hoxie, C. Cerletti L. F. Brass. 1995. Proteolysis of the human platelet and endothelial cell thrombin receptor by neutrophil-derived cathepsin G. *J. Biol Chem.* 270 (19): 11168.
- Molliver, D., D. Immke, L. Fierro, M. Paré, F. Rice, E. McCleskey. 2005. ASIC3, an acid-sensing ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons. *Molecular Pain.* 1 (35): 1.
- Muller, W.A. 2002. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab. Invest.* 82 (5): 521.
- Muniyan, S., N. Chaturvedi, J. Dwyer, C. Lagrange, W. Chaney, M. Lin. 2013. Human Prostatic Acid Phosphatase: Structure, Function and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (5): 10438.
- Muñoz, M. 2014. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos de santa maría (*Piper peltarum*) mediante el test de edema inducido en ratas (*Rattus norvegicus*). Trabajo de grado Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba.
- Nagase, H., S. Kumakura, K. Shimada. 2012. Establishment of a novel objective and quantitative method to assess pain-related behavior in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rat knee. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 65 (1): 29.
- Nan, B., H. Yang, S. Yan, P. Lin, A. Lumsden, Q. Yao, C. Chen. 2005. C-reactive protein decreases expression of thrombomodulin and endothelial protein C receptor in human endothelial cells. *Surgery.* 138 (2):212.

- Narita, M., A. Usui, M. Narita, K. Niikura, H. Nozaki, J. Khotib, Y. Nagumo, Y. Yajima, T. Suzuki. 2005. Protease-Activated Receptor-1 and Platelet-Derived Growth Factor in Spinal Cord Neurons Are Implicated in Neuropathic Pain after Nerve Injury. *J Neurosci.* 25 (43):10000.
- Nasiripour, S., K. Gholami, S. Mousavi, A. Mohagheghi, M. Radfar, M. Abdollahi, Z. Khazaeipour, G. Vahabzadeh, M. Mojtahedzadeh. 2014. Comparison of the effects of enoxaparin and heparin on inflammatory biomarkers in patients with ST-segment elevated myocardial infarction: A prospective open label pilot clinical trial. *Iran J Pharm Res.* 13 (2): 583.
- Navarro, M. 2010. Influencia de los inhibidores de trombina en un modelo de inflamación aguda. Trabajo de grado *Philosophus Scientiarum* en Biología. Mención Bioquímica. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas.
- National Institute of Health. Guide for the care and use of laboratory animals [Internet]. Washington: National Academy Press. 2011 [quoted on April 15, 2017]. Available URL: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guidefor-the-Care-and-use-of-laboratoryanimals.pdf>.
- Nelson, M., P. Joksovic, E. Perez-Reyes, S.Todorovic. 2005. The endogenous redox agent L-cysteine induces T-type Ca<sup>2+</sup> channel- dependent sensitization of a novel subpopulation of rat peripheral nociceptores. *J Neurosci.* 25 (38): 8766.
- Nesheim, M. and L. Bajzar. 2005. The discovery of TAFI. *J Thromb Haemost.* 3 (10): 2139.
- Newton, K. and V. Dixit. 2012. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4 (3): a006049.
- Niclou, S., H. Suidan, A. Pavlik, R. Vejsada, D. Monard. 1998. Changes in the expression of protease-activated receptor 1 and protease nexin-1 mRNA during rat nervous system development and after nerve lesion. *Eur J Neurosci* 10 (5): 1590.
- Niclou, S., H. Suidan, M. Brown-Luedi, D. Monard. 1994. Expression of the thrombin receptor mRNA in rat brain. *Cell Mol Biol Res.* 40 (3): 421.
- Noorbakhsh, F., N. Vergnolle, M. Hollenberg, C. Power. 2003. Proteinase-activated receptors in the nervous system. *Nat Neurosci.* 4 (12): 981.
- Oliveira, J. 2014. A cronificação da dor. O papel dos analgésicos anti-inflamatórios como os inibidores da ciclo-oxigenase do tipo 2 e dos anticonvulsivantes como os gabapentinóides na transição da dor aguda para crônica. *Revisão clínica.* 71:7.

- Oliveira, J., C. Andrade, C. Panossian. 2016. Inflammatory mediators of neuropathic pain. *Rev Dor. São Paulo*.17 (Supl.1): S35.
- Oliver, J., D. Monroe, H. Roberts, M. Hoffman. 1999. Thrombin activates factor XI on activated platelets in absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19 (1):170.
- OMS. 2009 WHO drug information 23:74. Disponible en: <http://www.who.int/medicines/publications/druginformation/en/>. [Consulta: Noviembre 27, 2014].
- Ossovskaya, V. and N. Bunnett. 2004. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev*. 84 (2): 579.
- Öztürk, O., A. Çetin, S. Özdem, N. Uysal, Ü. Kayisli, Ü. Sentürk, A. Yesilkaya. 2006. Plasma levels of nitrites,  $\text{PGF}_{1\alpha}$  and nitrotyrosine in LPS-treated rats: functional and histochemical implications in aorta. *J Physiol Biochem*. 62 (1): 27.
- Padilla, N., W. Bleeker, Y. Lubbers, R. Gemma, G. Van Mierlo G, M. Daha, E. Hack. 2003. Rat C-reactive protein activates the autologous complement system. *Immunology*. 109 (4): 564.
- Parada, C., C. Tambeli, F. Cunha, S. Ferreira. 2001. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience*. 102 (4): 937.
- Páramo, J., E. Panizo, C. Pegenaute, R. Lecumberri. 2009. Coagulación 2009: una visión moderna de la hemostasia. *Revista de Medicina Universidad de Navarra*. 53(1): 19.
- Parham, P. 2006. *Inmunología*. (2da. Ed.). Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Paty, I., M. Trelu, J. M. Destors, P. Cortez, E. Boëlle, G. Sanderink. 2010. Reversibility of the anti-FXa activity of idrabiotaparinux (biotinylated idraparinux) by intravenous avidin infusion. *J Thromb Haemost*. 8 (4): 722.
- Paulsen, S., S. Wurster, L. Nanney. 1998. Expression of inducible nitric oxide synthase in human burn wounds. *Wound Repair Regen*. 6 (2): 142.
- Pepys, M. and M. Hirschfield. 2003. C-protein: a critical update. *J Clin Invest*. 111(12): 1805.
- Perzborn, E., S. Heitmeier, U. Buetehorn, V. Laux. 2014. Direct thrombin inhibitors, but not the direct factor Xa inhibitor rivaroxaban, increase tissue factor-induced hypercoagulability in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost*. 12 (7): 1054.

- Petitou, M., V. Nancy-Portebois, G. Dubreucq, V. Motte, D. Meuleman, M. de Kort, C. Van Boeckel, G. Vogel, J. Wisse. 2009. From heparin to EP217609: the long way to a new pentasaccharide-based neutralisable anticoagulant with an unprecedented pharmacological profile. *Thromb Haemost.* 102 (5): 804.
- Petrillo, G., P. Cirillo, G. D'Ascoli, F. Maresca, F. Ziviello y M. Chiariello. 2010. Tissue Factor/Factor FVII Complex Inhibitors in Cardiovascular Disease. Are Things Going Well?. *Curr Cardiol Rev.* 6 (4): 325.
- Pier, G., J. Lyczak, L. Wetzler. 2004. *Inmunology, infection and immunity.* (1era. ed). Library of Congress Cataloging-in-Publication data. Washington, USA.
- Popovic, M., K. Smiljanic, B. Dobutovic, T. Syrovets, T. Simmet, E. Isenovic. 2012. Thrombin and vascular inflammation. *Mol Cell Biochem.* 359 (1-2): 301.
- Posadas, I., M. Bucci, F. Roviezzo, A. Rossi, L. Parente, S. Sautebin, C. Giuseppe. 2004. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol.* 142 (2): 331.
- Puga, S. y S. Villaldea. 1930. *Aplicaciones diagnósticas y terapéuticas del estudio fisicoquímico de la sangre.* Ediciones Javier Morata, España.
- Quintero, I., C. Araujo, A. Pulkka, R. Wirkkala, A. Herrala, E. Eskelinen, E. Jokitalo, P. Hellstrom, H. Tuominen, P. Hirvikoski, P. Vihko. 2007. Prostatic acid phosphatase is not a prostate specific target. *Cancer Res.* 67 (14): 6549.
- Rahman, A., A. True, N. Khandaker, R. Ye, T. Voyno-yasenetskaya, A. Malik. 2002.  $G\alpha_q$  and  $G\beta\gamma$  regulate PAR-1 signaling of thrombin-induced NF- $\kappa\beta$  activation and ICAM-1 transcription in endothelial cells. *Circ Res.* 91 (5): 398.
- Ramachandran, R. and M. Hollenberg. 2008. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Pharmacol.* 153 (Suppl.1): S263.
- Ramirez, L., E. Fuentes, D. Pavone, R. Pacheco. (2013). *Guía de prácticas de laboratorio de biología celular.* Universidad de Carabobo, Venezuela.
- Rang, H., M. Dale, J. Ritter. 2000. *Fármacos analgésicos en Farmacología.* (4ta Ed.) Harcourt, España.
- Rao, N., B. Argyle, X. Xu, P. Reynolds, J. Walenga, M. Prechel, G. Prestwich, R. MacArthur, B. Walters, J. Hoidal, T. Kennedy. 2010. Low anticoagulant heparin targets multiple sites of inflammation, suppresses heparin-induced thrombocytopenia, and inhibits interaction of RAGE with its ligands. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299 (1): C97.

- Riewald, M., V. Kravchenko, R. Petrovan, P. O'Brien, L. Brass, R. Ulevitch, W. Ruf. 2001. Gene induction by coagulation factor Xa is mediated by activation of protease-activated receptor 1. *Blood*. 97 (10): 3109.
- Rijken, D. and H. Lijnen. 2009. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost.* 7 (1): 4.
- Rittner, H., H. Machelska, C. Stein. 2005. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. *J. Leukoc. Biol.* 78:1215.
- Roberts, H.R., D. M. Monroe, M. Hoffman. 2001. Molecular biology and biochemistry of the coagulation factors and pathways of hemostasis. *Williams Hematology*. (6ta. Ed.) McGraw-Hill. New York, USA.
- Roberts, H.R., D. Monroe, M. Escobar. 2004. Current Concepts of Hemostasis Implications for Therapy. *Anesthesiology*. 100 (3): 722.
- Roiko, K., O. Janne, P. Vihko. 1990. Primary structure of rat secretory acid phosphatase and comparison to other acid phosphatases. *Gene*. 89:223.
- Roitt, I., J. Brostoff, D. Male. 2000. *Inmunología*. (5ta Ed.). Elsevier S.A. España.
- Rosenberg, R. D. 2001. Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states: clinical utility of activation peptide assays in predicting thrombotic events in different clinical populations. *Thromb Haemost.* 86 (1): 41.
- Rossi, E., C. Dubosq, L. Kordich. 1999. Cofactor II de la heparina (HCII), un inhibidor de trombina cuyo rol fisiológico no está completamente esclarecido. *Medicina*. 59 (1): 95.
- Rothmeier, A. and W. Ruf. 2012. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. *Semin Immunopathol.* 34 (1): 133.
- Roumen-Klappe, E., M. den Heijer, S. Van Uum, J. Van der Ven-Jongekrijg, F. Van der Graaf, H. Wollersheim. 2002. Inflammatory response in the acute phase of deep vein thrombosis. *J Vasc Surg.* 35 (4): 701.
- Ruda, M. A., M. J. Iadarola, L. V. Cohen, W. S. Young. 1988. In situ hybridization histochemistry and immunocytochemistry reveal an increase in spinal dynorphin biosynthesis in a rat model of peripheral inflammation and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci.* 85 (2): 622.

- Ruscheweyh, R A. Goralczyk, G. Wunderbaldinger, A. Schober, J. Sandkühler. 2006. Possible sources and sites of action of the nitric oxide involved in synaptic plasticity at spinal lamina I projection neurons. *Neuroscience*. 141(2): 977.
- Saito, T. and N.W. Bunnett. 2005. Protease-activated receptors: regulation of neuronal function. *Neuromolecular Med*. 7 (1-2): 79.
- Sala, N., J. Fontcuberta, M. Ruttlund. 1993. New biological concepts on coagulation inhibitor. *Intensive Care Med*. 19: S3.
- Salas, A., M. Sans, A. Soriano, J. Reverter, D. Anderson, J. Piqué, J. Panés. 2000. Heparin attenuates TNF $\alpha$  induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism. *Gut*. 47 (1): 88.
- Salvemini, D. 1997. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell Mol. Life Sci*. 53 (7): 576.
- Sánchez, P. y P. Talamás. 2002. Importancia de las prostaglandinas en la amibiasis. *Salud Pública de México*. 44 (3): 247.
- Santos, D., A. da Silva, F. Marques, G. Paiva, V. de Andrade, S. Ferreira. 2014. Heparin fails to inhibit the leukocyte recruitment for an extended time following inflammatory stimulus. *Pharm Biol*. 53(1): 72.
- Scaldaferri F., S. Lancellotti, M. Pizzoferrato, R. De Cristofaro. 2011. Haemostatic system in inflammatory bowel diseases: New players in gut inflammation *World J Gastroenterol*. 17 (5): 594.
- Schmidtko, A., I. Tegeder, G. Geisslinger. 2009. No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends Neurosci*. 32 (6):339.
- Seybold, V. 2009. The Role of Peptides in Central Sensitization. *Handb Exp Pharmacol*. 194:451.
- Shastri, M., C. Johns, J. Hutchinson, M. Khandagale, R. Patel. 2013. Ion exchange chromatographic separation and isolation of oligosaccharides of intact low-molecular-weight heparin for the determination of their anticoagulant and anti-inflammatory properties. *Anal Bioanal Chem*. 405 (18): 6043.
- Shenker, N., R. Haigh, E. Roberts, P. Mapp, N. Harris, D. Blake. 2003. A review of contralateral responses to a unilateral inflammatory lesion. *Rheumatology*. 42 (11): 1279.

- Shin, S., J. Kang, K. Lee, H. Lee, J. Han, W. Choi. 2005. Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages by sesquiterpene lactones. *J Toxicol Environ Health*. 68 (23-24): 2119.
- Shpacovitch, V., M. Feld, M. D. Hollenberg, T. A. Luger, M. Steinhoff. 2008. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol*. 83 (6): 1309.
- Shu, X. and L. Mendell. 1999. Neurotrophins and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 96 (14): 7693.
- Smith, J. and B. Winkelstein. 2017. The role of spinal thrombin through protease-activated receptor 1 in hyperalgesia after neural injury *J Neurosurg Spine*. 26 (4): 532.
- Snider, W. and S. McMahon. 1998. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*. 20 (4): 629.
- Sosa, D., D. Velasco, S. Valenzuela, A. Eblén-Zajjur. 2013. Mapping of the Fluoride Resistant Acid Phosphatase (Frap) Activity in Cervico Thoracic Lumbar Spinal Dorsal Horn in Rats. *Neurochemical J*. 7(4): 313.
- Spronk, H. A., H. Crijns, U. Schotten, I. Van Gelder, H. Ten Cate. 2014. Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants. *Cardiovasc Res*. 101 (3): 344.
- Stamford, J. 1995. Descending control of pain. *Br J Anaesth*. 75: 217.
- Steeland, H., S. Ko, L. Wu, M. Zhuo. 2006. Hot receptors in the brain. *Mol Pain*. 2 (1): 34.
- Steinhoff, M., J. Buddenkote, V. Shpacovitch, A. Rattenholl, C. Moormann, N. Vergnolle, T. Luger y M. Hollenberg. 2005. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev*. 26 (1): 1.
- Steinhoff, M., N. Vergnolle, S. Young, M. Tognetto, S. Amadesi, H. Ennes, M. Trevisani, M. Hollenberg, J. Wallace, G. Caughey, S. Mitchell, L. Williams, P. Geppetti, E. Mayer, N. Bunnett. 2000. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med*. 6 (2):151.
- Stichtenoth., D. and J. Frolich. 1998. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. *Br J Rheumatol*. 37 (3): 246.
- Strukova, S. 2000. Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues. *Biochemistry*. 66 (1):14.

- Strukova, S. 2006. Blood-coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis. *Front Biosci.* 11: 59.
- Stucky, C. y G. Lewin. 1999. Isolectin B<sub>4</sub>-positive and negative nociceptores are functionally distinct. *J Neurosci.* 19 (15): 6497.
- Stucky, C., S. Michael y X. Zhang. 2001. Mechanisms of pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (21): 11845.
- Summer, G., K. Puntillo, C. Miaskowski, P. Green y J. Levine. 2007. Burn Injury Pain: The Continuing Challenge. *J Pain.* 8 (7): 533.
- Svensson, T. H. and G. Thieme. 1969. An investigation of a new instrument to measure motor activity of small animals. *Psychopharmacology.* 14 (2):157.
- Sweitzer, S. M., R. W. Colburn, M. Rutkowski, J. A. DeLeo. 1999. Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1 $\beta$  expression that correlates with pain behavior in the rat. *Brain Res.* 829 (1-2): 209.
- Takasaki, I., T. Andoh, H. Nojima, K. Shiraki, Y. Kuraishi. 2001. Gabapentin antinociception in mice with acute herpetic pain induced by herpes simplex virus infection. *J Pharmacol Exp Ther.* 296 (2):270.
- Takeuchi, K., A. Yokota, A. Tanaka, Y. Takahira. 2006. Factors involved in upregulation of inducible nitric oxide synthase in rat small intestine following administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Dig Dis Sci.* 51 (7): 1250.
- Tao, F., Y. Tao, C. Zhao, S. Doré, W. Liaw, S. Raja, R. Johns. 2004. Differential roles of neuronal and endothelial nitric oxide synthases during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia. *Neuroscience.* 128 (2):421.
- Taylor, B. and M. Zylka. 2010. Prostatic acid phosphatase is expressed in peptidergic and nonpeptidergic nociceptive neurons of mice and rats. *PLoS ONE.* 5 (1):e8674.
- Tegeder, I., M. Costigan, R. Griffin, A. Abele, I. Belfer, H. Schmidt, C. Ehnert, J. Nejm, C. Marian, J. Scholz, T. Wu, A. Allchorne, L. Diatchenko, A. Binshtok, D. Goldman, J. Adolph, S. Sama, S. Atlas, W. Carlezon, A. Parsegian, J. Lötsch, R. Fillingim, W. Maixner, G. Geisslinger, M. Max, C. Woolf. 2006. GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence. *Nat. Med.* 12 (11): 1269.
- Tello, A., B. Rubio, P. Íñiguez, E. Reboloso, D. García, M. Páramo, A. Nava. 2011. Conceptos generales sobre dímero-D, coagulación y patología trombótica. *El residente.* 6 (1): 51.

- Ten Cate, H. and C. Hemker. 2016. Thrombin Generation and Atherothrombosis: What does the evidence indicate?. *J Am Heart Assoc.* 5(8):1.
- Toros, H., R. Castellanos, J. Fernández-Britto. 2005. Fibrinógeno y riesgo trombótico cardiovascular: algunas reflexiones. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 24 (3):1.
- Torregrosa, S. 1994. Mecanismos y vías del dolor. *Boletín Escuela de Medicina Universidad Católica de Chile.* 23: 202.
- Torres, W., L. Mendoza, H. Vicci, A. Eblen-Zajjur, M. Navarro. 2016. Assessment of local and systemic inflammatory parameters of peripheral burn in an animal model. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 33 (4):713.
- Troshev, K. y R. Dimitrov. 2001. Application of heparin in the local treatment of burns. *Acta Chir Plast.* 43 (4): 143.
- Tsujimoto, M., G. Kuroyanagi, R. Matsushima-Nishiwaki, K. Yuko, Y. Enomoto, H. Iida, S. Ogura, T. Otsuka, H. Tokuda, O. Kozawa, T. Iwama. 2016. Factor Xa inhibitor suppresses the release of phosphorylated hsp27 from collagen- stimulated human platelets: inhibition of hsp27 phosphorylation via p44/p42 map kinase. *PLOS ONE.* doi:10.1371/journal.pone.0149077.
- Tsukada, S., N. Enomoto, Y. Takei, M. Hirose, K. Ikejima, T. Kitamura, N. Sato. 2003. Dalteparin sodium prevents liver injury due to lipopolysaccharide in rat through suppression of tumor necrosis factor-alpha production by Kupffer cells. *Alcohol. Clin Exp Res.* 27 (8 Suppl.):7S.
- Tubbs, J., G. Kissling, G. Travlos, D. Goulding, J. Clark, A. King-Herbert, T. Blankenship-Paris. 2011. Effects of buprenorphine, meloxicam, and flunixin meglumine as postoperative analgesia in mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 50 (2): 185.
- Turpie, A. 2007. Oral, Direct Factor Xa Inhibitors in Development for the Prevention and Treatment of Thromboembolic Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27 (6): 1238.
- Valtschanoff, J., R. Weinberg, A. Rustioni, H. Schmidt. 1992. Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 148 (1-2): 6.
- Vane, J., J. Mitchell, I. Appleton, A. Tomlinson, D. Bishop-Bailey, J. Croxtall, D. Willoughby. 1994. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci.* 91 (6): 2046.
- Vanegas, H. and H.G. Schaible. 2001. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog Neurobiol.* 64 (4): 327.

- Vásquez, E., M. Navarro, Y. Salazar, G. Crespo, G. Bruges, C. Osorio, V. Tortorici, H. Vanegas, M. López. 2015. Systemic changes following carrageenan-induced paw inflammation in rats. *Inflamm Res.* 64:333.
- Vergnolle, N. 2009. Protease-activated receptors as drug target in inflammation and pain. *Pharmacol Ther.* 123 (3):292.
- Vergnolle, N., C. Derian, M. D'Andrea, M. Steinhoff, P. Andrade-Gordon. 2002. Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: A potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. *J Immunol.* 169 (3):1467.
- Vergnolle, N., J. Wallace., N. Bunnett y M. Hollenberg. 2001b. Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol Sci.* 22 (3): 146.
- Vergnolle, N., N. Bunnett, K. Sharkey, V. Brussee, S. Compton, E. Grady, G. Cirino, N. Gerard, A. Basbaum, P. Andrade-Gordon, M. Hollenberg, J. Wallace. 2001a. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. *Nat Med.* 7 (7):821.
- Vicci, H., M. Navarro, A. Eblén-Zajjur. 2015. La trombina más allá de la coagulación. *Vitae Academia Biomédica Digital.* 63:1.
- Vihko, P., M. Kontturi, L. Korhonen. 1978. Purification of human prostatic acid phosphatase by affinity chromatography and isoelectric focusing. Part I. *Clin. Chem.* 24 (3): 466.
- Vila, V., V. Martínez-Sales, E. Réganon, E. Peris, F. Pérez, M. Ruano, J. Aznar. 2001. Effects of unfractionated and low molecular weight heparins on plasma levels of hemostatic factors in patients with acute coronary syndromes. *Haematologica.* 86 (7): 729.
- Viles-González, J., V. Fruster y J. Badimon 2005. Thrombin/inflammation paradigms: A closer look at arterial and venous thrombosis. *Am Heart J.* 149 (1 Suppl.): S19.
- Virdis, A., R. Colucci, M. Fornai, C. Blandizzi, E. Duranti, S. Pinto, N. Bernardini, C. Segnani, L. Antonioli, S. Taddei, A. Salvetti, M. Del Tacca. 2005. Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock: role of inducible nitric-oxide synthase and oxidative stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312 (3): 945.
- Viskov, C., M. Just, V. Laux, P. Mourier y M. Lorenz. 2009. Description of the chemical and pharmacological characteristics of a new hemisynthetic ultra-low-molecular-weight heparin, AVE5026. *J Thromb Haemost.* 7 (7): 1143.
- Walker, A., A. Kavelaars, C. Heijnen y R. Dantzer. 2014. Neuroinflammation and Comorbidity of Pain and Depression. *Pharmacol Rev.* 66 (1):80.

- Wan, M., X. Zhang, L. Torkvist, H. Thorlacius. (2001). Low molecular weight heparin inhibits tumor necrosis factor alpha-induced leukocyte rolling. *Inflamm Res.* 50 (12): 581.
- Wang, S., L. Zhang, Y. Ma, L. Chen, Y. Tian, J. Mao y J. Martyn. 2011. Nociceptive behavior following hindpaw burn injury in young rats: Response to systemic morphine. *Pain Med.* 12(1): 87.
- Weinstein, J., S. Gold, D. Cunningham, M. Gall. 1995. Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA. *J Neurosci* 15 (4): 2906.
- Whittaker, A. and G. Howarth. 2014. Use of spontaneous behaviour measures to assess pain in laboratory rats and mice: How are we progressing?. *Applied Animal Behaviour Science.* 151:1.
- Wickenden, A., R. Roeloffs, G. McNaughton-Smith y G. Rigdn. 2004. KCNQ potassium channels: drug targets for the treatment of epilepsy and pain. *Expert Opin. Ther.* 14 (4): 2.
- Winters, M., D. Spellman, J. Lambris, 2005. Solvent accessibility of native and hydrolyzed human complement protein 3 analyzed by hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *J Immunol.* 174 (6): 3469.
- Wizemann, T. M. and M. L. Pardue. 2001. Exploring the biological contributions to human health: does sex matter?. National Academy Press, Washington, DC.
- Woolf, C. J. 2004. Pain: moving symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann. Intern. Med.* 140 (6): 441.
- Wu, J., M. Stevenson, J. Brown, E. Grunz, T. Strawn, W. Fay. 2008. C-reactive protein enhances tissue factor expression by vascular smooth muscle cells: mechanisms and in vivo significance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28 (4):698.
- Xia, B., H. Han, K. Zhang, J. Li, G. Guo, L. Gong, X. Zeng, J. Liu. 2004. Effects of low molecular weight heparin on platelet surface P-selectin expression and serum interleukin-8 production in rats with trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *World J Gastroenterol.* 10 (5): 729.
- Xianxiang, Xu Y. 2010. Heparin: an intervenor in cell communication. *J. Cell. Mol. Med.* 14 (1-2): 175
- Xing, Z., J. Gauldie, G. Cox, H. Baumann, M. Jordana, L. Xue-Feng y M. Achong. 1998. IL-6 is an Antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest.* 101(2): 311.

- Xu, X., D. Li, L. Chi, X. Du, X. Bai, L. Chi. 2015. Fragment profiling of low molecular weight heparins using reversed phase ion pair liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Carbohydr Res.* doi:10.1016/j.carres.2015.01.016.
- Yamada, T. and Y. Nagai. 1996. Immunohistochemical studies of human tissues with antibody to factor Xa. *Histochem J.* 28 (1): 73.
- Yan, Y., J. Yang, S. Nan, M. Xiang, W. Yi, D. Shanshan, Z. Wenming, Z. Chong, L. Yuan, X. Xin-Hui. 2017. Non-anticoagulant effects of low molecular weight heparins in inflammatory disorders: A review. *Carbohydr Polym.* 160:71.
- Yoshimura, M. and H. Furue. 2006. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *J Pharmacol Sci.* 101 (2): 107.
- Yunjong, L., L. Chang-Hun, O. Uhtack. 2005. Painful channels in sensory neurons. *Mol Cells.* 20(3): 315.
- Zegarska, B., A. Lelińska, T. Tyrakowski. 2006. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Pharmacol Rep.* 58 (1): 13.
- Zhu, C., C. Mills, G. Hsieh, C. Zhong, J. Mikusa, L. Lewis, D. Gauvin, C. Lee, M. Decker, A. Bannon, L. Rueter, S. Joshi. 2012. Assessing carrageenan-induced locomotor activity impairment in rats: Comparison with evoked endpoint of acute inflammatory pain. *Eur J Pain.* 16 (6): 816.
- Zhu, C., A. Bannon, S. Joshi. 2015. Complete Freund's adjuvant-induced reduction of exploratory activity in a novel environment as an objective nociceptive endpoint for sub-acute inflammatory pain model in rats. *Eur J Pain.* doi:10.1002/ejp.686.
- Zhu, W., H. Yamanaka, K. Obata, Y. Dai, K. Kobayashi, T. Kozai, A. Tokunaga, K. Noguchi. 2005. Expression of mRNA for four subtypes of the proteinase-activated receptor in rat dorsal root ganglia. *Brain Res.* 1041 (2):205.
- Zylka, M., N. Sowa, B. Taylor, M. Twomey, A. Herrala, V. Voikar, P. Vihko. 2008. Prostatic acid phosphatase is an ectonucleotidase and suppresses pain by generating adenosine. *Neuron.* 60 (1): 111.