



Efecto de la indometacina sobre la expresión de proteínas y del canal de sodio $Na_v1.3$ en el asta dorsal medular de ratas, inducidos por una inflamación periférica aguda

Antonio Eblen-Zajjur ¹ .
Rossana Bosco-Bruno ² .
Emilia E. Barrios ³ .

¹Dr. en Ciencias Médicas Laboratorio de Neurofisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. P.O. Box 3798, El Trigal, Valencia, Venezuela.

²Médico, doctorando en Ciencias Médicas Laboratorio de Neurofisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. rbosco@uc.edu.ve

³Dra. en Ciencias (mención zoología) Instituto de Biología Molecular de Parásitos (BioMolP). Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

RESUMEN

En el presente estudio se caracterizó, mediante electroforesis, la expresión de proteínas y del canal de sodio Nav1.3, en ambas astas dorsales medulares (ADM) de rata, en condiciones controles y de inflamación periférica aguda unilateral, tratada o no con indometacina. En ratas Sprague-Dawley, (n=15), anestesiadas (Tiobarbital) se sumergió la pata posterior izquierda en agua a temperatura ambiente (26°C) por 60s (controles; n=5); 60°C (inflamado; n=5) o 60°C pretratadas con indometacina (pretratado; n=5). Luego de 15 horas, se determinaron, proteínas totales (Bradford y electroforesis) y proteína Nav1.3 (Western Blot) en ambas ADM. La inflamación incrementó las proteínas totales del ADM ipsilateral (+39.8%) y la redujo en la contralateral (-15%). La indometacina disminuyó la expresión de proteínas en inflamación e inhibió aquellas constitutivas ipsilaterales del grupo control con incremento (+14%) contralateral. El canal Nav1.3 no se expresó luego de 15 horas de inflamación. Estos resultados sugieren la respuesta diferencial de cada ADM ante un estímulo nocivo y la participación constitutiva como inducida de las ciclooxigenasas en este proceso de expresión protéica.

PALABRAS CLAVE: Asta dorsal medular, Canal de sodio Nav1.3, Electroforesis, Inflamación, Proteínas, Western Blot.

EFFECT OF INDOMETHACIN ON THE EXPRESSION OF PROTEINS AND SODIUM CHANNEL NAV1.3 IN THE DORSAL HORN OF THE SPINAL CORD OF RATS, INDUCED BY AN ACUTE PERIPHERAL INFLAMATION

SUMMARY

In the present study, the expression of proteins and sodium channel Na

KEY WORDS: Spinal dorsal horn, Sodium channel Nav1.3, Electrophoresis, Inflammation, Proteins, Western Blot.

EFFECTO 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

INTRODUCCIÓN

La estimulación nociceptiva inevitablemente activa una secuencia de fenómenos, genómicos o no, que conllevan a la expresión o supresión de un mosaico de sustancias neuroactivas y de receptores en las astas dorsales de la médula espinal (ADM) ⁽¹⁾. En la mayoría de los estudios llevados a cabo en este sentido, el efecto ha sido más pronunciado en el lado ipsilateral a la inflamación ^(2, 3). Estos cambios pueden ser dependientes tanto del modelo de inflamación utilizado como del tiempo transcurrido al momento de evaluarlos después de la inducción de la inflamación ⁽⁴⁾.

En modelos de dolor neuropático se han reportado cambios significativos en la expresión de 2 genes relacionados con nocicepción a nivel de médula espinal: el gen para el receptor bradikina-1 se sobreexpresó mientras que el correspondiente al receptor vaniloide-1 (TRPV-1) fue reprimido en los animales que exhibieron hiperalgesia luego de la lesión medular (4). La actividad de la fosfatasa ácida fluoruro-resistente (FRAP), fue significativamente mayor en el ADM ipsilateral en un grupo de ratas con inflamación periférica unilateral (5). Estudios previos han demostrado que procesos inflamatorios periféricos pueden incrementar los niveles de ciertas proteínas sin modificar los niveles de ARNm, tal es el caso del mismo TRPV-1 en el ganglio de la raíz dorsal (6). Así mismo, las evidencias de respuestas contralaterales a la inflamación vienen demostradas por la expresión de sustancias como ARNm de prodinorfina, el cual ha sido reportado como de menor magnitud con respecto al lado ipsilateral del ADM (7).

De modo similar, existen cambios electrofisiológicos susceptibles de ser medidos en los minutos sucesivos a la inducción de un proceso inflamatorio que además, sugiere una respuesta asimétrica de las redes neuronales que componen ambas ADM (8). Estos estudios funcionales han demostrado que la comunicación cruzada entre ambas astas puede producir respuestas contralaterales, las cuales son usualmente menores en magnitud y tienen un curso temporal más breve (8, 9). Es probable que, la asimetría observada en las respuestas electrofisiológicas tenga además una expresión bioquímica similar en dichas ADM.

Ciertos estados fisiopatológicos como la inflamación nociceptiva o el dolor neuropático, pueden inducir también cambios en la expresión de canales iónicos (10). Los canales de sodio voltaje dependientes (CSVD) son proteínas integrales de membrana, que permiten un flujo rápido de Na^+ al interior celular en respuesta a la despolarización de la membrana, siendo de vital importancia en la conducción del impulso nervioso y muscular. Las distintas isoformas de los CSVD tienen diferentes patrones de desarrollo y localización (sistema nervioso central y periférico, músculo esquelético y cardíaco) (11). Hasta el momento han sido identificados en mamíferos, 10 genes diferentes que codifican las subunidades CSVD α : Nav1.1-Nav1.9 y Nax. Cada una de ellas exhibe una secuencia de aminoácidos homóloga en un 85-95%, no obstante presentan características electrofisiológicas y farmacológicas diferentes (11, 12).

La expresión y actividad del Nav1.3 en el sistema nervioso es altamente dinámica, con una plasticidad significativa (11). Tales cambios pueden ocurrir en estadios distintos: transcripción, pretransducción y post-transducción, de forma que estos mecanismos pueden modular la densidad efectiva de proteínas Nav1.3, sus propiedades electrofisiológicas, su localización a nivel celular y la adaptación cualitativa y/o cuantitativa de la actividad del canal (12). Varios estudios han determinado la distribución de Nav1.3 ó de su ARNm en el sistema nervioso central (SNC) a través de técnicas como la hibridación o Western blot demostrando, en condiciones normales, su poca abundancia en el SNC de la rata adulta y su amplia expresión en el sistema nervioso embrionario de roedores y en el cerebro humano (13). El aumento en la expresión del Nav1.3 se ha hecho manifiesta en modelos experimentales crónicos como el de la ligadura laxa del nervio ciático, donde la expresión del canal aumenta entre los días 7 y 14

posteriores a la ligadura ⁽¹⁴⁾. A pesar de los numerosos reportes que afirman que el Nav1.3 es fuertemente sobreexpresado luego de una lesión en el SNC de mamíferos adultos, Lindia y Abbadie ⁽¹¹⁾, determinaron inmunohistoquímicamente su normal distribución tanto en el SNC como periférico de ratas; en la corteza cerebral, en la sustancia gris de la médula espinal y en fibras que terminan en las láminas profundas del ADM y asta ventral, entre otros.

Un mecanismo de acción común de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) es la inhibición de la enzima ciclooxigenasa en sus distintas isoformas (COX1 y COX2), la cual se encuentra constitutivamente en la médula espinal; particularmente la COX2. ⁽¹⁵⁾ Los niveles de COX2 pueden aumentar durante los procesos inflamatorios agudos o crónicos por acción de ciertas citocinas y factores de crecimiento ⁽¹⁶⁾. Su sobreexpresión conduce a su vez a un incremento en las concentraciones de prostaglandinas (PG) las cuales juegan un rol importante en la fisiopatología de la inflamación y el dolor, bien modulando la actividad neuronal a través de la liberación de aminoácidos excitatorios ⁽¹⁶⁾, o a través de la disminución del umbral de excitación neuronal y aumento de las descargas neuronales por incremento de las corrientes de Na⁺ e inhibición de las corrientes de K⁺ ⁽¹⁷⁾. La indometacina inhibe fuertemente la síntesis de PG no solo en el tejido periférico inflamado sino también a nivel espinal, efecto este que puede contribuir con su acción antinociceptiva ⁽¹⁷⁾ a través de la modulación de la expresión de macromoléculas.

El objetivo de esta investigación es caracterizar la expresión de las diferentes proteínas y del canal de sodio voltaje dependiente Nav1.3 en ambas ADM de rata, en condiciones controles y durante una inflamación periférica aguda unilateral, tratada o no con indometacina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo en 15 ratas macho adultas, Sprague Dawley (350-400g), con alimentación *ad libitum*, mantenidas bajo un esquema de luz/oscuridad de 12:12 horas y tratadas de acuerdo a los lineamientos del National Institute of Health (NIH, 1996). Se constituyeron 3 grupos experimentales de 5 ratas cada uno, identificados como: control, inflamación (A) e inflamación pretratado con indometacina (B).

Inflamación

Los animales fueron anestesiados con tiopental sódico (60mg.kg⁻¹, intraperitonealmente), luego se administró 0,05mg de atropina diluidos en 0,5ml de solución fisiológica, por vía subcutánea para reducir las secreciones respiratorias. La temperatura se mantuvo constante (37,5±0,5°C; media±DE) gracias a una manta eléctrica colocada en la superficie ventral del animal, regulada mediante retroalimentación.

A los animales del grupo A se les introdujo la pata trasera izquierda en agua a 60°C/60 segundos para inducir una inflamación periférica local ⁽¹⁸⁾; 15 horas después, se realizó una laminectomía de los segmentos T11-L3 para exponer el engrosamiento lumbar, bajo las mismas condiciones de anestesia descritas previamente. Al grupo B, una vez anestesiado el

animal, se administró indometacina (4mg.k^{-1} , por vía intraperitoneal) ⁽¹⁹⁾, pasados 30 minutos, se procedió a tratar el animal de la misma manera que al grupo A. Los animales del grupo control se sometieron a la misma manipulación pero sumergiendo la pata en agua a temperatura ambiente (26°C).

Posterior a la laminectomía, el engrosamiento lumbar de la médula fue resecado y crioprotegido a -4°C en solución buffer Tris HCl, pH 8.0 (Tris base 50mM; EDTA 10mM; Triton X-100 1%; NaF 50mM) y se administró 0,1cc de succinilcolina intracardiaco, para sacrificar al animal.

Muestras ipsi y contralaterales de cada ADM (1mm^3) fueron obtenidas mediante punches de 1mm de diámetro, a partir de cortes transversales medulares colocados en una lámina de aluminio sobre una cama de hielo seco. Los fragmentos tisulares fueron almacenados por separado en viales de acuerdo al grupo respectivo, y homogeneizados en solución buffer Tris HCl, pH 8,0 (1mg.mL^{-1}). La concentración de proteínas totales en los homogeneizados se determinó mediante lectura espectrofotométrica a 595 nm.

Electroforesis

Los homogenatos de ADM y un marcador de PM comercial de rango variable (Blue Rangers, Promega) se migraron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10% (p/v), en condiciones reductoras, en una cámara vertical; se cargaron $20\mu\text{g}$ de proteínas totales/pozo de cada una de las muestras, previamente tratadas con Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8; dodecilsulfato de sodio (SDS) al 20%; glicerol bidestilado 1mL; azul de bromofenol 10mg; 2- β mercaptoetanol $500\mu\text{L}$ y calentadas a 70°C por 10 minutos. La migración se hizo en una mini-cámara (Bio-Rad modelo1000/500) a corriente constante de 200V por 45 minutos a 4°C en buffer Tris-glicina pH 8,3 (Tris 20 mM; glicina 192 mM, SDS al 1% v/v). Las proteínas totales fueron reveladas en los geles mediante la tinción con Coomassie blue combinado ⁽²⁰⁾.

Expresión de Anti Nav1.3 mediante Western Blot

Las proteínas migradas, se electrotransfirieron a papel de nitrocelulosa ($0,45\text{ }\mu\text{m}$, Pierce) a 100V por 1h. Luego, se incubaron por 1 hora con el anticuerpo anti Nav1.3 ⁽¹¹⁾, dirigido a un péptido purificado (aminoácidos 511-524) de la subunidad α del Nav1.3 de rata (Chemicon International), diluido 1:200 con agua destilada. Se empleó un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa, diluido 1:20000 en solución de bloqueo buffer TBS-Tween (Tris-HCL 20mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,05% v/v) y posterior revelado por luminografía. El revelado de los inmunocomplejos se hizo empleando luminol y peróxido de hidrógeno diluido 1:1 (Supersignal, Pierce, USA). Con la quimioluminiscencia se impresionó una película de rayos X (Pierce, USA), seguido de revelado fotográfico ⁽²¹⁾.

Análisis cuantitativo de las imágenes

Los geles de electroforesis fueron digitalizados y sus bandas medidas mediante perfiles densitométricos a través del software de procesamiento digital de imágenes Image Tool®. Los valores de densidades relativas obtenidos en las bandas correspondientes al ADM contralateral se sustrajeron de los correspondientes al ADM ipsilateral (D-I), posteriormente se

graficaron y se trataron mediante promediación móvil de 10 términos estableciéndose los intervalos de confianza con los percentiles 5 y 95. Con el mismo software, se calculó el área bajo la curva para determinar las diferencias relativas (%) en la expresión de proteínas totales de las ADM ipsi y contralaterales a la inflamación periférica de todos los grupos experimentales.

RESULTADOS

Las bandas de migración electroforética de las muestras de proteínas obtenidas de cada ADM: izquierda (I) o derecha (D) de cada condición: control (c), inflamado (i) o inflamado y pretratado con indometacina (t) de animales, así como una muestra de calibración de pesos moleculares referenciales, se presentan en la figura 1. A pesar de que la corrida electroforética no fue totalmente homogénea, se puede observar como en Ic y Dc se revelaron 4 bandas ubicadas entre 250-120KDa y 3 bandas ubicadas entre 84-28KDa; en Ii se revelaron 5 bandas entre 250-120KDa y 3 bandas entre 84-28KDa. En Di e It se revelaron 7 bandas entre 250-120KDa y 3 bandas ubicadas entre 84-28KDa; por el contrario, en Dt se observaron 5 bandas por encima de 215 KDa y 4 bandas entre 84-28 KDa.

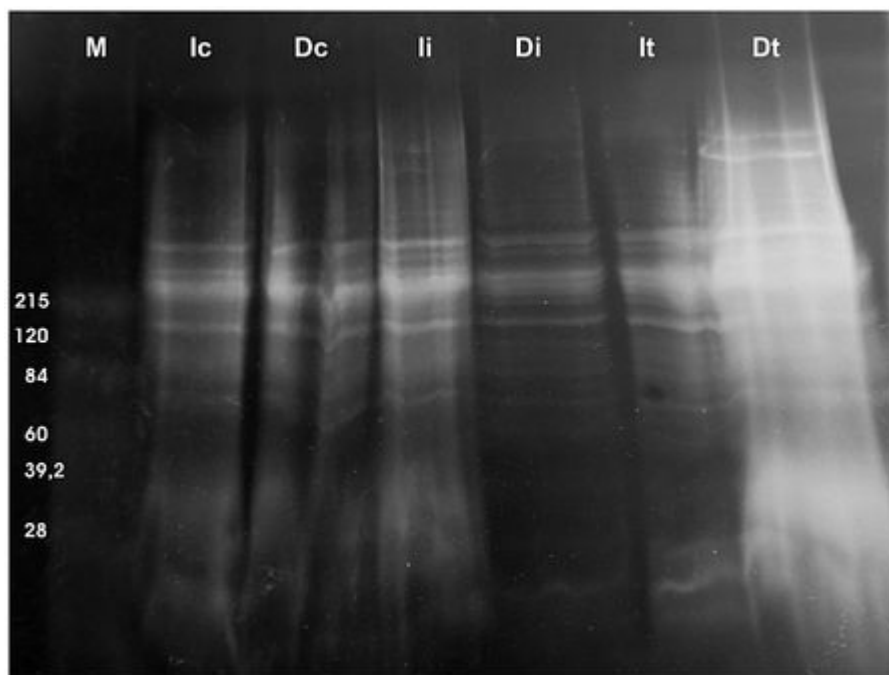


Figura 1: Electroforesis de proteínas totales de las ADM de las ratas controles y de los grupos A y B. Marcador de pesos moleculares (M), con sus respectivas bandas (215, 120, 84, 60, 39.2 y 28KDa); muestras del ADM ipsilateral (Ic) o contralateral (Dc) de ratas no inflamadas o controles; muestra del ADM ipsilateral (Ii) o contralateral (Di), posterior a la inflamación; muestra del ADM ipsilateral (It) o contralateral (Dt), posterior a la inflamación y pretratadas con indometacina.

En la figura 2 se observan los cambios de la expresión proteica en el ADM ipsilateral a la inflamación. El proceso inflamatorio indujo un incremento generalizado de las mismas de +39,82%, en relación con el grupo control, manteniéndose los picos en los PM predominantes, pero más intensamente en las proteínas de PM>200. Llama la atención que el pretratamiento con indometacina, no solo produjo disminución de la expresión de las proteínas postinflamación (-33,57%), sino que además inhibió las proteínas constitutivamente expresadas en el grupo control, siendo este efecto más intenso para proteínas de PM<350. Por el contrario, en el ADM contralateral, el proceso inflamatorio redujo la expresión de proteínas totales en -15%, suprimió las proteínas que estaban presentes en el grupo control en los picos de PM 160-320KDa, suprimió la expresión constitutiva de proteínas con PM de 20-80KDa e incrementó la expresión de aquellas con PM ≥ 450 KDa. La administración de indometacina favoreció el incremento de la expresión protéica de bajo PM (20-80KDa), mientras que en el resto de la curva se evidenció un incremento de la expresión en comparación al grupo inflamado e inclusive, un aumento en la densidad proteica total de +14,2% con respecto del grupo control (Figura 3).

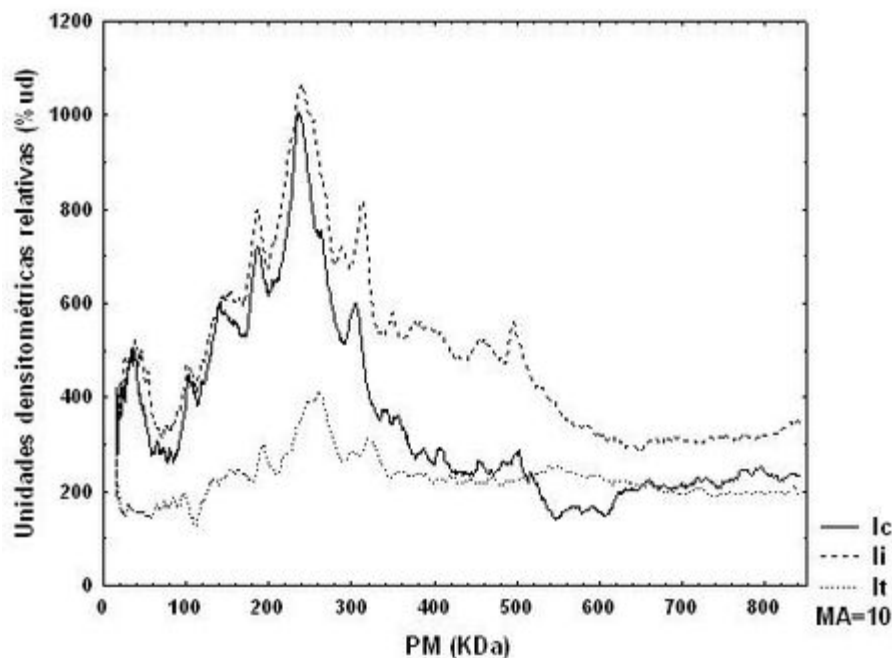


Figura 2: Diferencias en la expresión de proteínas totales de las ADM ipsilaterales a la inflamación periférica de todos los grupos experimentales (Ic, li, It). n=5; PM= peso molecular; MA= average móvil de 10 términos.

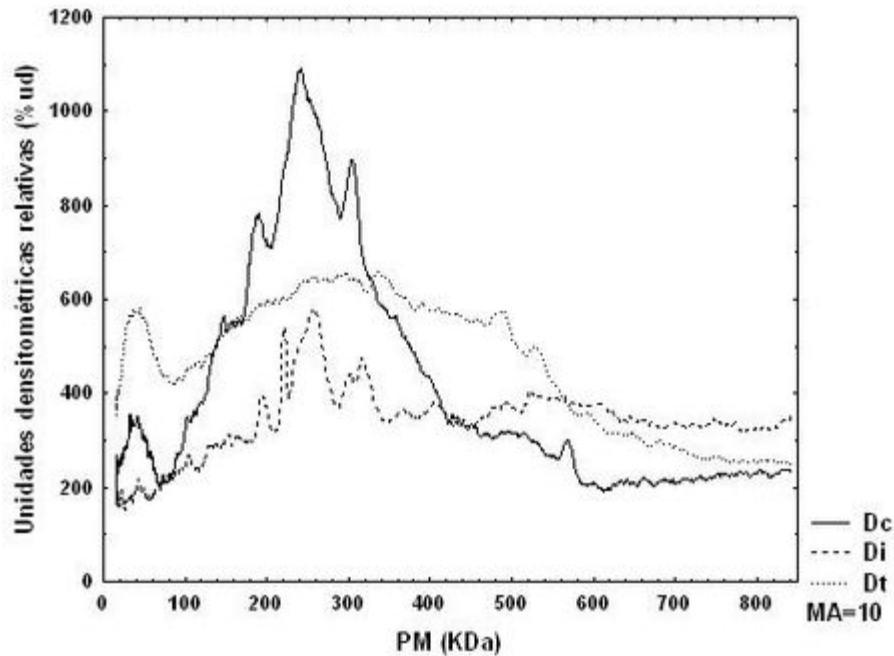


Figura 3: Diferencias en la expresión de proteínas totales de las ADM contralaterales a la inflamación periférica de todos los grupos experimentales (Dc, Di, Dt). n=5; PM= peso molecular; MA= average móvil de 10 términos.

Expresión de proteínas de las ADM en condiciones controles

La diferencia de proteínas en el grupo control (Dc-Ic) muestra una mayor expresión de las mismas en las ADM contralaterales con PM entre 260-340KDa (Figura 4). A pesar de la magnitud de la expresión proteica hallada, esta no fue significativa.

Figura 4: Diferencias en la expresión de proteínas totales entre las ADM ipsi y contralaterales de ratas controles (Dc-Ic) expresadas como unidades densitométricas relativas (%ud), n=5; niveles de confiabilidad P5 y P95. PM: peso molecular; MA: average móvil de 10 términos.

Expresión de proteínas de las ADM en condiciones de inflamación periférica unilateral

El proceso inflamatorio incrementó la expresión de proteínas con PM de 180-260KDa del ADM ipsilateral. Por el contrario, en el ADM contralateral aumentaron las proteínas con PM comprendidos entre 580-640KDa (Figura 5).

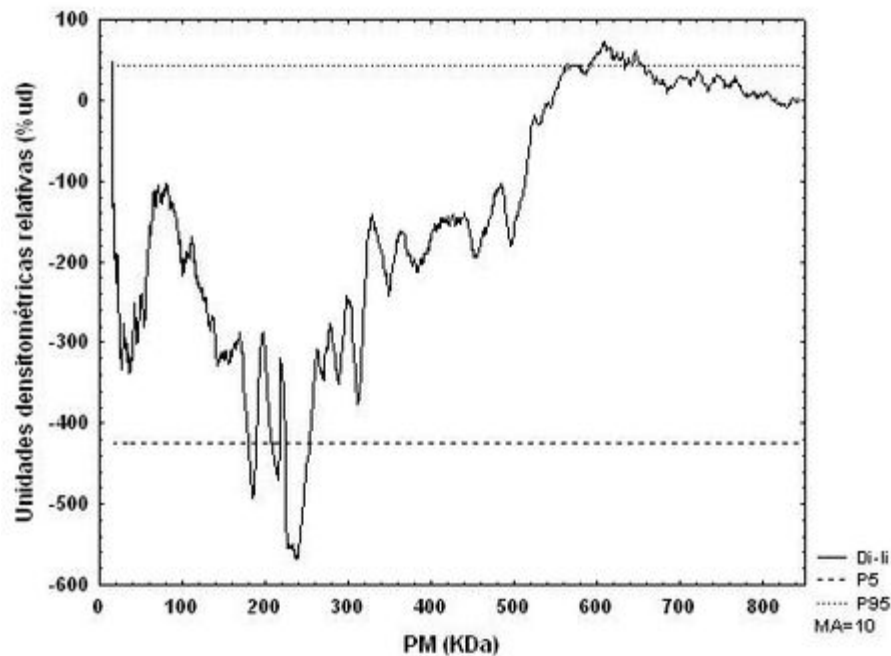


Figura 5: Diferencias en la expresión de proteínas totales entre las ADM ipsi y contralaterales en las ratas del grupo A (Di-li) expresadas como unidades densitométricas relativas (%ud), n=5; niveles de confiabilidad P5 y P95. PM: peso molecular; MA: average móvil de 10 términos.

Expresión de proteínas de las ADM en condiciones de inflamación periférica unilateral pretratadas con indometacina

En el grupo B, se registró una inhibición a nivel del ADM ipsilateral, de la expresión de proteínas con $PM \geq 720KDa$. Por el contrario, la expresión de las mismas en el ADM contralateral aumentó, particularmente en dos bandas de proteínas con PM 4 a 8KDa y de 340 a 360KDa (Figura 6).

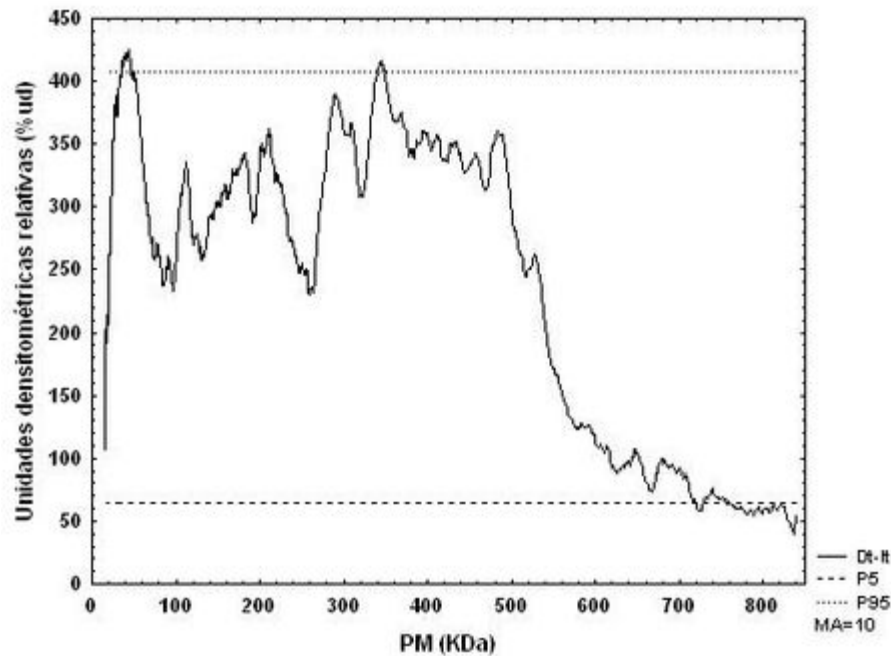


Figura 6: Diferencias en la expresión de proteínas totales de las ADM ipsi y contralaterales previo tratamiento con indometacina (Dt-It) expresadas como unidades densitométricas relativas (%ud), n=5; niveles de confiabilidad P5 y P95. PM: peso molecular; MA: average móvil de 10 términos.

Expresión de proteínas del canal Nav1.3 en las ADM

De acuerdo a los niveles de especificidad del Western blot y bajo las condiciones experimentales descritas, no se observó la presencia de bandas reactivas que sugirieran la expresión del canal Nav1.3.

REFERENCIAS

1. Willis WD, Coggeshall RE: Sensory Mechanisms of the Spinal Cord. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York, 2004.
2. Zhang YQ, Gao X, Ji GC, Huang YL, Wu GC, Zhao ZQ: Expression of 5-HT1A receptor mRNA in rat lumbar spinal dorsal horn neurons after peripheral inflammation. Pain. 2002; 98: 287-95.
3. Zacharova G, Sojka D, Palecek J. Changes of Parvalbumin Expression in the Spinal Cord after Peripheral Inflammation. Physiol. Res. 2009;58: 435-42.
4. DomBourian MG, Turner NA, Gerovac TA, Vemuganti R, Miranpuri GS, Türeyen K, et al. B1 and TRPV-1 receptor genes and their relationship to hyperalgesia following spinal cord injury. Spine. 2006;31:2778-82.
5. Glykys J, Guadama M, Marcano L, Ochoa E, Eblen-Zajjur A. Inflammation induced increase of fluoride resistant acid phosphatase (FRAP) activity in the spinal dorsal horn in rats. Neurosci Lett. 2003;337:167-9.
6. Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. Neuron. 2002;36:57-68.
7. Ruda MA, Iadarola MJ, Cohen LV, Young WS 3rd. 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 U S A. 1988; 85: 622-26.
8. Koltzenburg M, Wall PD, McMahon SB. Does the right side know what the left is doing? Trends Neurosci. 1999; 22: 122-7.
9. Shenker N, Haigh R, Roberts E, Mapp P, Harris N, Blake D. A review of contralateral responses to a unilateral inflammatory lesion. Rheumatology 2003, 42:1279-86.
10. Safronov BV, Wolff M, Vogel W. Functional distribution of three types of Na⁺ channel on soma and processes of dorsal horn neurones of rat spinal cord. J Physiol. 1997;503:371-85.
11. Lindia J, Abbadie C. Distribution of the voltage gated sodium channel Nav 1.3-like immunoreactivity in the adult rat central nervous system. Brain Research. 2003;960:132-41.
12. Diss JKJ, Fraser SP, Djamgoz MBA. (2004). Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. Eur Biophys. 2004;33:180-93.

13. Waxman SG, Kocsis JD, Black JA. Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol.* 1994; 72:466-71.
14. Hains BC, Saab CY, Klein JP, Craner MJ, Waxman SG. Altered sodium channel expression in second-order spinal sensory neurons contributes to pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci.* 2004;24:4832-9.
15. Willingale HL, Gardiner NJ, McLymont N, Giblett S, Grubb BD. Prostanoids synthesized by cyclo-oxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. *Br J Pharmacol.* 1997;122:1593-604.
16. Vanegas H, Schaible HG. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog Neurobiol.* 2001;64:327-63.
17. Matsumura K, Sharma HS, Cao C, Watanabe Yu, Yamagata K, Ozaki M, et al. Prostaglandin system in the spinal cord: a neuroanatomical study in the pathophysiological states. In Stalberg E, Sharma HS, Olsson Y, editores. New York: Springer; 1998. p. 108.
18. Czaplinski M, Abad C, Eblen-Zajjur A. Normal expression and inflammation-induced changes of Na and Na/K ATPase activity in spinal dorsal horn of the rat. *Neurosci Lett.* 2005;374:147-51.
19. Vasquez E, Bar KJ, Ebersberger A, Klein B, Vanegas H, Schaible HG. Spinal prostaglandins are involved in the development but not the maintenance of inflammation-induced spinal hyperexcitability. *J Neurosci.* 2001;21:9001-8.
20. De Moreno M, Smith J, Smith R. Silver Staining of proteins in polyacrylamide Gels. Increased Sensitivity through a Combined Coomassie Blue-Silver procedure. *Annal Biochem.* 1985; 151:466-470.
21. Towbin H, Staehelin T, Goeden J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some of immunodiagnosis in Schistosomiasis. *TDR/SCH/IMM-DIA*;1979;92: 3.
22. Petko M, Veress G, Vereb G, Storm-Mathisen J, Antal M. Commissural propriospinal connections between the lateral aspects of laminae III-IV in the lumbar spinal cord of rats. *J Comp Neurol* 2004; 480:364-77.
23. Chen J, Zheng XF, Brown EJ, Schreiber SL. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92:4947-51.
24. Miletic G, Driver AM, Miyabe-Nishiwaki T, Miletic V. Early changes in Homer1 proteins in the spinal dorsal horn are associated with loose ligation of the rat sciatic nerve. *Anesth Analg.* 2009;109:2000-7.
25. Patak E, Pinto FM, Story ME, Pintado CO, Fleming A, Page NM, et al. Functional and molecular characterization of tachykinins and tachykinin receptors in the mouse uterus. *Biol Reprod.* 2005, 72:1125-33.
26. Ribeiro-daSilva A, De Koninck Y. Morphological and neurochemical organization of the spinal dorsal horn. In: Pain. Bushnell C and Basbaum AI ed. New York: Academic Press. 2008. p 279-310.
27. Loh HH, Smith AP. Molecular characterization of opioid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990;30:123-47.
28. Boeckers TM. The postsynaptic density. *Cell Tissue Res* 2006;326:409-22.

29. McCarson KE, Krause JE. NK-1 and NK-3 type tachykinin receptor mRNA expression in the rat spinal cord dorsal horn is increased during adjuvant or formalin-induced nociception. *J Neurosci.* 1994;14:712-20.
30. DeLeo JA, Yezierski RP. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain.* 2001;90:1-6.
31. Sweitzer SM, Colburn RW, Rutkowski M, DeLeo JA. Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1 expression that correlates with pain behavior in the rat. *Brain Res.* 1999;829:209-21.
32. Winters M, Spellman D, Lambris J. Solvent accessibility of native and hydrolyzed human complement protein 3 analyzed by hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *J Immunol.* 2005;174: 3469-74.
33. Croul S, Radziewsky A, Sverstiuk A, Murray M. NK1, NMDA, 5HT1a, and 5HT2 receptor binding sites in the rat lumbar spinal cord: modulation following sciatic nerve crush. *Exp Neurol.* 1998;154:66-79.
34. Pellegrini-Giampietro DE, Fan S, Ault B, Miller BE, Zukin RS. Glutamate receptor gene expression in spinal cord of arthritic rats. *J Neurosci.* 1994;14:1576-83.
- 35.Coderre TJ, Gonzales R, Goldyne ME, West ME, Levine JD. Noxious stimulus-induced increase in spinal prostaglandin E2 is noradrenergic terminal-dependent. *Neurosci Lett.*1990;115: 253-58.
36. Nakayama Y, Omote K, Namiki A. Role of prostaglandin receptor EP1 in the spinal dorsal horn in carrageenan-induced inflammatory pain. *Anesthesiology.* 2002;97:1254-62.
37. Lee Y, Lee CH, Oh U. Painful channels in sensory neurons. *Mol Cells.* 2005;20:315-24.
38. Sharma HS,Westman J. Prostaglandins modulate constitutive isoform of heat shock protein(72 kD) response following trauma to the rat spinal cord. *Acta Neurochir Suppl.*1997;70:134-7.