



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**PARTICIPACIÓN PRONOCICEPTIVA DEL RECEPTOR 5-HT₇ A
NIVEL PERIFÉRICO LOCAL, ESPINAL Y SISTÉMICO EN
DIVERSOS MODELOS DE DOLOR**

TESIS QUE PRESENTA

C.D. HÉCTOR ADRIÁN SALDAÑA MARTÍNEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL

ASESORES DE TESIS:

M.C. HÉCTOR URQUIZA MARÍN

DR. VINICIO GRANADOS SOTO

MORELIA, MICH., AGOSTO DE 2006

La asesoría de esta tesis se realizó en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el Maestro en Ciencias Héctor Urquiza Marín.

La parte experimental de esta tesis se realizó en el laboratorio No. 12 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV, Sede Sur) bajo la dirección del Doctor Vinicio Granados Soto.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la UMSNH y de la beca de maestría No. 183510 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Maestro Héctor Urquiza Marín y al Doctor Vinicio Granados Soto por el apoyo brindado durante la realización del presente proyecto.

A los Doctores Zurisaddai Hernández Gallegos y Francisco J. Flores Murrieta por haber aceptado ser sinodales.

A todo el personal académico y administrativo del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas por hacer posible la realización del presente proyecto de investigación.

DEDICATORIAS

DEDICO ESTA TESIS:

A mi madre en la fe de Dios.

A mi padre por su invaluable consejo de superación.

A mi abuelita Lili por sus sabios consejos.

Con amor a Vero por su apoyo incondicional.

Con cariño a mis nenas Adriana y Mariam.

A Laura, Lucía, Brenda, Elda, Yunuen, Omar, Cesar, Rafael, Jesús, Alfonso y Leobardo por su compañerismo y amistad.

De manera especial a Tere, Nadia, Lupita, Deisy, Ivonne, Héctor, Fer y Carlitos por recibirme y apoyarme en el laboratorio.

A todas aquellas personas que han sido importantes en mi vida de alguna u otra manera y que por cuestión de espacio resulta imposible nombrarlas una por una.

GRACIAS

ÍNDICE

FIGURAS.....	IV
TABLAS.....	VI
1. RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 DOLOR.....	3
2.1.1 Generalidades.....	3
2.1.2 Fisiología del dolor.....	5
2.1.2.1 Nocicepción.....	5
2.1.2.2 Vías ascendentes.....	6
2.1.2.3 Tálamo y proyecciones corticales.....	15
2.1.2.4 Vías descendentes.....	17
2.1.2.5 Mecanismos moleculares.....	20
2.1.3 Serotonina.....	24
2.1.3.1 Historia.....	24
2.1.3.2 Estructura, síntesis, distribución y metabolismo...	25
2.1.3.3 Receptores y dolor.....	31
2.1.3.3.1 Receptor 5-HT _{1A}	32
2.1.3.3.2 Receptor 5-HT _{1B}	35
2.1.3.3.3 Receptor 5-HT _{1D}	37
2.1.3.3.4 Receptor 5-HT _{1E}	38
2.1.3.3.5 Receptor 5-HT _{1F}	38
2.1.3.3.6 Receptor 5-HT _{2A}	39
2.1.3.3.7 Receptor 5-HT _{2B}	40
2.1.3.3.8 Receptor 5-HT _{2C}	41
2.1.3.3.9 Receptor 5-HT ₃	43
2.1.3.3.10 Receptor 5-HT ₄	44
2.1.3.3.11 Receptor 5-HT _{5A}	45
2.1.3.3.12 Receptor 5-HT _{5B}	46
2.1.3.3.13 Receptor 5-HT ₆	46
2.1.3.3.14 Receptor 5-HT ₇	47
3. JUSTIFICACIÓN.....	50

4. HIPÓTESIS	51
5. OBJETIVO	52
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	52
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	52
6. MATERIAL Y MÉTODOS	53
6.1 ANIMALES.....	53
6.2 FÁRMACOS.....	53
6.3 PREPARACIÓN DE FORMALINA.....	53
6.4 PREPARACIÓN DE LA CÁNULA.....	54
6.5 METODOLOGÍA.....	54
6.5.1 Canulación intratecal.....	54
6.5.2 Modelo de plancha caliente.....	55
6.5.3 Prueba de la formalina.....	55
6.5.4 Modelo de neuropatía.....	56
6.5.5 Prueba de umbral táctil.....	56
6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	57
6.7 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	58
6.7.1 Curso temporal para el antagonista selectivo 5-HT ₇ por vía periférica, espinal y sistémica.....	58
6.7.2 Modelo de plancha caliente.....	58
6.7.3 Modelo de formalina.....	60
6.7.4 Coadministración del agonista no selectivo 5-HT ₇ con el antagonista selectivo 5-HT ₇ por vía periférica local en el modelo de formalina.....	61
6.7.5 Grupos controles en la prueba de la formalina.....	61
6.7.5.1 Vehículo.....	61
6.7.5.2 Tratamiento contralateral.....	62
6.7.6 Modelo de neuropatía.....	63
6.7.7 Grupo control en el modelo de neuropatía.....	63

7. RESULTADOS	65
7.1 EVALUACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT ₇ EN EL MODELO DE PLANCHA CALIENTE.....	65
7.1.1 Efecto del antagonista serotoninérgico a nivel sistémico en el modelo de plancha caliente.....	65
7.2 EVALUACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT ₇ EN EL MODELO DE LA FORMALINA.....	66
7.2.1 Efecto del antagonista serotoninérgico a nivel sistémico en el modelo de la formalina.....	66
7.2.2 Efecto del antagonista serotoninérgico a nivel espinal en el modelo de la formalina.....	67
7.2.3 Efecto del antagonista serotoninérgico a nivel periférico local en el modelo de la formalina.....	68
7.2.4 Efecto de la coadministración del agonista serotoninérgico con el antagonista selectivo 5-HT ₇ a nivel periférico local en el modelo de la formalina.....	69
7.3 EVALUACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT ₇ EN EL MODELO DE NEUROPATÍA.....	70
7.3.1 Efecto del antagonista serotoninérgico a nivel sistémico en el modelo de neuropatía(Kim y Chung).....	70
7.3.2 Efecto del antagonista serotoninérgico a nivel espinal en el modelo de neuropatía (Kim y Chung).....	71
8. DISCUSIÓN	72
8.1 PRUEBA DE PLANCHA CALIENTE.....	72
8.2 PRUEBA DE LA FORMALINA.....	75
8.3 MODELO DE NEUROPATÍA.....	82
8.4 CANULACIÓN INTRATECAL.....	87
9. CONCLUSIONES	90
9.1 CONCLUSIONES PARTICULARES.....	90
9.2 CONCLUSIÓN GENERAL.....	90
10. BIBLIOGRAFÍA	91
11. ANEXOS	111
11.1 ABREVIATURAS.....	111
11.2 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	113
11.3 JURADO.....	114

FIGURAS

Figura 1	Clasificación del dolor.....	5
Figura 2	Proceso del dolor.....	6
Figura 3	Clasificación de la sustancia gris de la médula espinal.....	9
Figura 4	Vías ascendentes del dolor.....	14
Figura 5	Circuitos supraespinales.....	15
Figura 6	Vías descendentes del dolor.....	19
Figura 7	Sensibilización periférica.....	22
Figura 8	Sensibilización central.....	23
Figura 9	Estructura química de la serotonina.....	25
Figura 10	Biosíntesis y metabolismo de la serotonina.....	26
Figura 11	Origen y vías ascendentes y descendentes serotoninérgicas.....	27
Figura 12	Localización de los diferentes subtipos de receptores a 5-HT en el asta dorsal y su participación en el procesamiento nociceptivo.	28
Figura 13	Clasificación de los receptores a serotonina según la IUPHAR....	32
Figura 14	Diagrama de flujo del diseño experimental para el modelo de plancha caliente.....	59
Figura 15	Diseño experimental para las curvas dosis-respuesta de los fármacos.....	60
Figura 16	Diseño experimental para las coadministraciones.....	61
Figura 17	Diagrama de flujo del diseño experimental para el modelo de la formalina.....	62
Figura 18	Diagrama de flujo del diseño experimental para el modelo de neuropatía.....	64
Figura 19	Falta de efecto antinociceptivo del antagonista selectivo 5-HT ₇ (SB-269970) sobre la conducta nociceptiva inducida por el modelo de plancha caliente a nivel sistémico.....	65

Figura 20	Efecto antinociceptivo del antagonista selectivo 5-HT ₇ (SB-269970) sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina (1%) a nivel sistémico.....	66
Figura 21	Falta de efecto antinociceptivo del antagonista selectivo 5-HT ₇ (SB-269970) sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina (1%) a nivel espinal.....	67
Figura 22	Efecto antinociceptivo del antagonista selectivo 5-HT ₇ (SB-269970) sobre la conducta nociceptiva inducida por formalina (1%) a nivel periférico local.....	68
Figura 23	Efecto de la administración del antagonista selectivo 5-HT ₇ (SB-269970) sobre la conducta pronociceptiva inducida por el agonista 5-carboxamidotriptamina (5-CT) cuando el antagonista se coadministra con el agonista a nivel periférico local 10 minutos antes de la inyección de formalina (0.5%).....	69
Figura 24	Efecto antinociceptivo del antagonista selectivo 5-HT ₇ (SB-269970) sobre la conducta nociceptiva inducida por el modelo de neuropatía a nivel sistémico.....	70
Figura 25	Efecto antinociceptivo del antagonista selectivo 5-HT ₇ (SB-269970) sobre la conducta nociceptiva inducida por el modelo de neuropatía a nivel espinal.....	71
Figura 26	Esquema que muestra los posibles sitios en los que se encuentra localizado el receptor 5-HT ₇ a nivel periférico, espinal y sistémico.	89

TABLAS

Tabla 1	Nervios periféricos: Características principales.....	7
Tabla 2	Clasificación y características de los nociceptores.....	8
Tabla 3	Nomenclatura propuesta por el subcomité sobre receptores a 5-HT de la NC-IUPHAR.....	30

1. RESUMEN

El receptor 5-HT₇ pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G y su activación incrementa los niveles de AMPc. En cuanto a su distribución en el sistema nervioso, se ha detectado la proteína y el RNAm en el ganglio de la raíz dorsal, asimismo se ha descrito la presencia de receptores en el asta dorsal de la médula espinal. Por su parte, la evidencia electrofisiológica relaciona al receptor 5-HT₇ con la apertura de canales de Ca²⁺ y la generación de una corriente de cationes no selectiva activada por hiperpolarización (I_H) que incrementa la excitabilidad de fibras A δ y A β . No obstante, a pesar de la evidencia que señala un papel pronociceptivo del receptor 5-HT₇ solo se tiene conocimiento de un estudio conductual a nivel periférico local y espinal en un modelo de dolor inflamatorio. En este trabajo se evaluó la posible participación del receptor 5-HT₇ en el procesamiento del dolor a nivel periférico local, espinal y sistémico. Para ello ratas Wistar hembra de 6 - 8 semanas de edad con un peso corporal entre 180 - 220 g fueron evaluadas con la prueba de plancha caliente, la prueba de la formalina y el modelo de dolor neuropático descrito por Kim y Chung. Para la evaluación periférica local, espinal y sistémica, las ratas recibieron una inyección subcutánea, intratecal o intraperitoneal, respectivamente, del antagonista selectivo del receptor serotoninérgico SB-269970 (antagonista 5-HT₇) 10 minutos antes de evaluarse en la prueba de plancha caliente y de la inyección de formalina en la pata derecha y 15 minutos antes de evaluar la alodinia táctil en el modelo de dolor neuropático. Para evaluar la posible participación de los receptores 5-HT₇ a nivel periférico local, la 5-CT (agonista del receptor 5-HT₇) fue co-administrada con el antagonista del receptor 5-HT₇ SB-269970. La administración sistémica de SB-269970 (3-10 mg/kg) no produjo cambios significativos en la latencia en la prueba de plancha caliente. La inyección periférica ipsilateral, pero no la contralateral, de SB-269970 (3-30 μ g/pata) redujo de manera dosis-dependiente el comportamiento inducido por formalina durante ambas fases de la prueba de formalina al 1%. El efecto pronociceptivo de 5-CT (1 μ g/pata) a nivel periférico local se redujo significativamente por la administración periférica del antagonista del receptor 5-HT₇ SB-269970 (30 μ g/pata) en la prueba de la formalina al 0.5%. A nivel espinal la administración del SB-269970 (1-30 μ g /rata) no produjo algún cambio significativo en el número de sacudidas en ambas fases de la prueba de la formalina. A nivel sistémico el SB-269970 (1-10 mg/kg) redujo de manera dosis dependiente el comportamiento inducido por la formalina solo en la fase 2 de la prueba de la formalina al 1%. El pretratamiento espinal con SB-269970 (37.5-50 μ g/rata), así como el pretratamiento sistémico con SB-269970 (3-10 mg/kg) redujo significativamente la alodinia inducida por la ligadura del nervio. Estos resultados sugieren que los receptores 5-HT₇ tiene un papel pronociceptivo en el procesamiento del dolor a nivel periférico, espinal y sistémico en modelos de dolor inflamatorio y neuropático.

ABSTRACT

The 5-HT₇ receptor is a member of the G-protein-coupled receptor superfamily, its activation stimulate cAMP production. In the nervous system, the mRNA encoding 5-HT₇ receptors and the protein for this receptor have been detected in the dorsal root ganglion, likewise the superficial dorsal horn is endowed with a modest level of 5-HT₇ receptors. On the other hand, electrophysiological studies have accumulated evidence which suggest that this receptor is associated with an increase in calcium influx through of the opening of calcium channels and with the generation of a hyperpolarisation-activated non selective cation current (I_H). This result in an enhancement of transmitter release, as well as an increase in the excitability and responsiveness of fibers A δ and A β . Nevertheless, the evidence that shows a possible pronociceptive role of the 5-HT₇ receptor, there is only one behavioral study in animal inflammatory pain model in peripheral and spinal level that demonstrates its participation in the proccesing of pain. In this regard, this work was undertaken to determine the possible participation of the local peripheral, spinal or systemic serotonergic 5-HT₇ receptors in the proccesing of pain. Female Wistar rats aged 6 - 8 weeks with body weight between 180 and 220 g were evaluated with the hot plate test, the formalin test, and a neurophatic model of Kim y Chung. For local peripheral, spinal and systemic evaluation, rats received a subcutaneous, intrathecal or intrapertoneal injection, respectively, of the selective serotonergic receptor antagonists SB-269970 (antagonist 5-HT₇) 10 minutes before evaluated in the hot plate and formalin injection into the right paw and 15 minutes before evaluated tactile allodynia in the neurophatic pain model. In order to assess the possible participation of local peripheral 5-HT₇ receptors on 5-CT (5-HT₇ receptor agonist) were co-administered with the 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970. The systemic administration of SB-269970 (3-10 mg/kg) produced no significant change in the latency of the hot plate test. The peripheral injection ipsilateral, but not contralateral, administration of SB-269970 (3-30 μ g/paw) reduced in a dose-dependent manner formalin-induced behaviour during both phases of the 1 % formalin test. Local peripheral pronociceptive effects of 5-CT (1 μ g/paw) were significantly reduced by local peripheral injection of the 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970 (30 μ g/paw), in the 0.5% formalin test. At the spinal level the intrathecal administration of SB-269970 (1-30 μ g /rat) produced no significant change in the number of flinches in both phases of the formalin test. At the systemic level of SB-269970 (1-10 mg/kg) reduced in a dose-dependent manner formalin-induced behaviour only in phase 2 of the 1% formalin test. Spinal pretreatment with SB-269970 (37.5-50 μ g/rat) and systemic pretreatment with SB-269970 (3-10 mg/kg) significantly reduced nerve ligation-induced allodynia. Results suggest that serotonergic 5-HT₇ receptor plays a pronociceptive role in peripheral, spinal and systemic sites in the processing of pain of inflammatory and neurophatic pain models.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 DOLOR

2.1.1 Generalidades

La Organización Internacional para el Estudio del Dolor (*International Association for the Study of Pain*) ha propuesto en la actualidad la definición de dolor más adecuada, al cual define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial que puede ser descrito en términos de la magnitud del daño (Merskey, 1979).

El dolor es un mecanismo de defensa cuya función es la de salvaguardar la integridad del organismo ante factores que pudieran ser destructivos. Sin embargo, cuando existe un funcionamiento anormal en las estructuras que regulan este mecanismo, el dolor sobrepasa su función y se vuelve patológico (Bowman y Rand, 1984).

El dolor no es una entidad sensorial homogénea ya que dentro de su clasificación existen varios tipos: nociceptivo, inflamatorio, neuropático y funcional.

Clasificación del dolor (Figura 1; Woolf, 2004)

1. *Nociceptivo*: Es un mecanismo de alarma que anuncia la presencia de un estímulo potencialmente dañino. Debe ser controlado solo bajo situaciones clínicas específicas, tales como durante una cirugía o procedimiento médico que dañe tejido y después de un trauma. El dolor nociceptivo es además una sensación fisiológica vital, la carencia de este mecanismo en pacientes con insensibilidad congénita al dolor debido a una mutación del receptor tirosin cinasa A resulta en una pérdida de neuronas sensitivas de alto umbral y reduce su expectativa de vida.

2. *Inflamatorio*: Si el tejido sufre daño a pesar del sistema defensivo nociceptivo (Por ejemplo, por trauma, cirugía, o enfermedades inflamatorias), el organismo desplaza su necesidad de protegerse en contra de un estímulo nocivo, potencialmente dañino hacia promover la recuperación del tejido dañado. En este estado, la sensibilidad está incrementada de tal forma que al estimular la parte afectada normalmente no debería sentir dolor pero en esta situación si. Como resultado, nosotros procuramos no hacer contacto o mover la parte dañada hasta que la reparación se complete, minimizando el daño. El dolor inflamatorio típicamente disminuye en tanto el daño y la respuesta inflamatoria sea resuelta.
3. *Neuropático*: Resulta de lesiones al sistema nervioso periférico, como en pacientes con polineuropatía diabética o debido al SIDA, neuralgia post-herpética, radiculopatía lumbar, o al sistema nervioso central, como en pacientes con daño a la médula espinal, esclerosis múltiple, etc.
4. *Funcional*: En esta forma de sensibilidad al dolor no se detecta ningún déficit neurológico o anomalía periférica. El dolor se debe a una respuesta anormal del sistema nervioso, en el cual el aparato sensorial amplifica los síntomas. Algunas condiciones con este tipo de dolor son: fibromialgia, síndrome de intestino irritable.

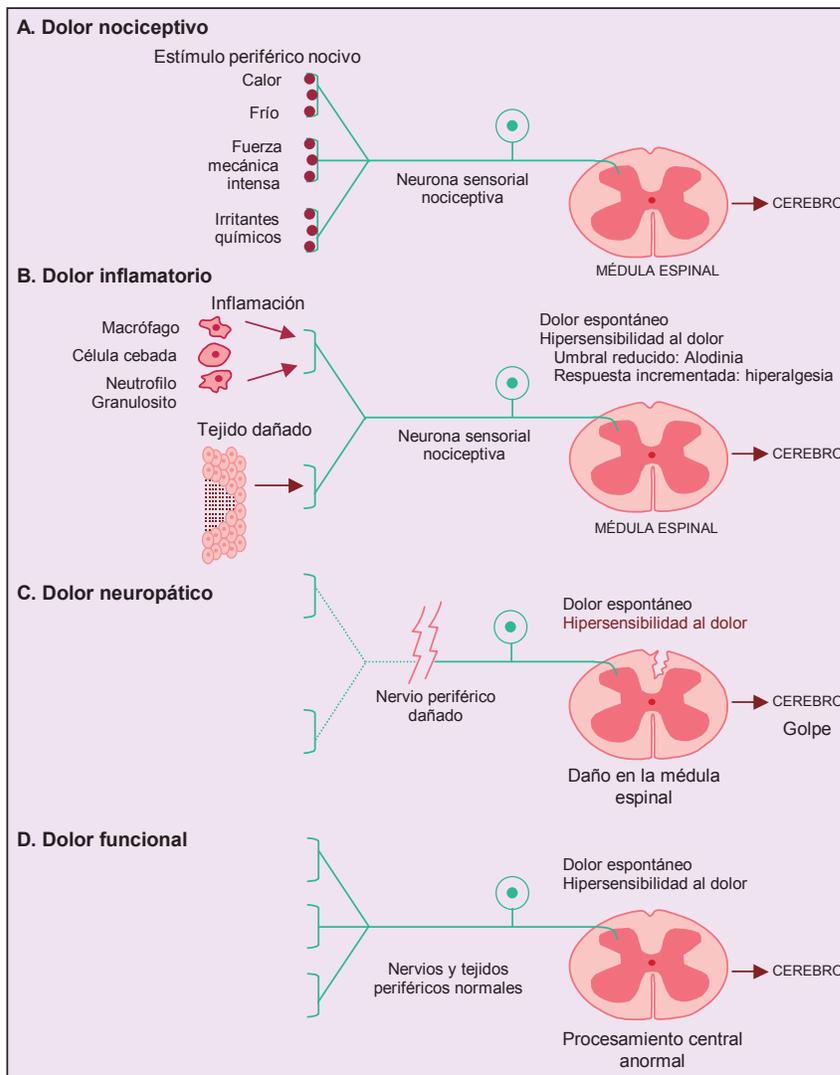


Figura 1. Los 4 tipos de dolor primarios de la clasificación del dolor (Modificado de Woolf, 2004).

2.1.2 Fisiología del dolor

2.1.2.1 Nocicepción

Es un término neurofisiológico que se refiere a los mecanismos neurales por los cuales se detectan los estímulos nocivos. La nocicepción comprende dos etapas: La transducción de los estímulos nocivos por las terminales periféricas de las fibras aferentes primarias y la transmisión de estas señales al sistema nervioso central. Para transmitir información nociceptiva la neurona debe ser selectiva, es decir debe ser capaz de distinguir entre estímulos inocuos y nocivos (Hyman y Cassem, 1995). En este sentido, los nociceptores poseen dos características importantes que ayudan

a realizar esta distinción: un umbral alto de estimulación y la capacidad de relacionar de manera directa la frecuencia de la descarga con la intensidad del estímulo (Besson, 1969).

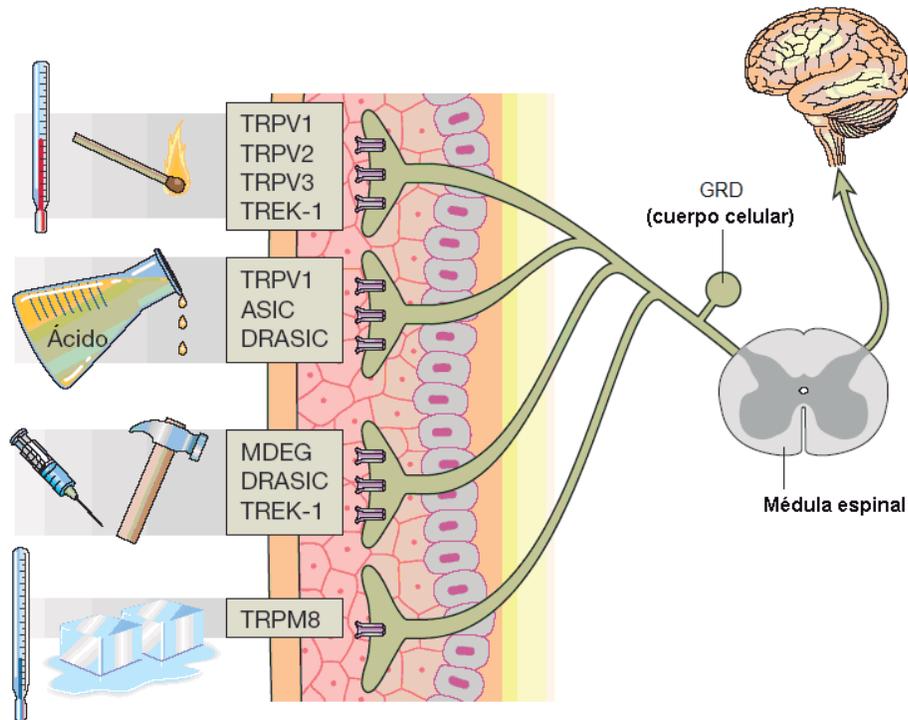


Figura 2. Proceso del dolor: Los estímulos térmicos, mecánicos o químicos nocivos para el organismo son transducidos a potenciales de acción mediante nociceptores aferentes primarios. Dichos potenciales son conducidos desde la periferia hasta la médula espinal para ser transmitidos a neuronas de segundo orden, encargadas de llevar y transmitir el estímulo a centros supraespinales donde se integra la percepción del dolor. Canal vainilloide con potencial de receptor transitorio (TRPV1, 2 y 3), canal de potasio de dos poros 1 (TREK-1), canal iónico sensible a ácido degerina mamífera (MDEG), canal a mentol con potencial de receptor transitorio 8 (TRPM8) y ganglio de la raíz dorsal (GRD). Modificado de Scholz y Woolf (2002).

2.1.2.2 Vías ascendentes

El proceso comienza con la detección de estímulos nocivos para el organismo y su conversión a potenciales de acción (*transducción*) mediante nociceptores aferentes primarios (Figura 2). Los nociceptores son fibras sensoriales de diámetro pequeño desmielinizadas (fibras-C) o ligeramente mielinizadas (fibras A- δ) (Tabla 1). Estas neuronas contienen sus cuerpos celulares en los ganglios de la raíz dorsal (que inervan tronco, extremidades y vísceras), el ganglio trigeminal (que inerva cabeza y cuello), y el ganglio nodoso (que inerva vísceras). Las fibras C con su cuerpo celular

en el ganglio de la raíz dorsal hacen sinapsis principalmente en la lámina II del asta dorsal de la médula espinal mientras que las fibras A- δ lo hacen en las láminas II y V (Sawynok y Liu, 2003).

Figura	Tipo de Fibra	Receptores	Velocidad de conducción	Diámetro	Grado de mielinización	Tipo de estímulo
	A- β	Merkel Rufini Meissner Pacini	30-120 m/s	5-15 μm	++++	Mecánico
	A- δ	Terminaciones libres	6-30 m/s	1-5 μm	++	Mecánico Térmico
	C	Terminaciones libres	0.5-2 m/s	0.5-2 μm		Mecánico Térmico Químico

Tabla 1. Nervios Periféricos. Características principales. Modificado de García y Herrero (1998). Arriba: Fibra mielinizada, Centro: Fibra poco mielinizada y Abajo: Fibra no mielinizada.

Las fibras C suelen clasificarse anatómicamente en dos grupos principales dependiendo de la presencia de neuropéptidos, de su regulación por factores de crecimiento y de su patrón de inervación en el asta dorsal de la médula espinal. Las fibras C peptidérgicas contienen sustancia P y el péptido relacionado al gen calcitonina (CGRP), expresan el receptor tirosincinasa A (TrkA), responden al factor de crecimiento neural (NGF) e inervan la lámina I y II externa. Por su parte, las fibras C no peptidérgicas expresan sitios de unión a isolectina B₄ (IB₄) y receptores P2X₃, responden al factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) y terminan en la lámina II interna del asta dorsal de la médula espinal. Ambas poblaciones expresan receptores vainilloides (VR-1) y son sensibles a capsaicina (Snider y McMahon, 1998; Sawynok y Liu, 2003). Por otro lado, las fibras A- δ suelen clasificarse funcionalmente en dos categorías (Tabla 2). Las fibras A- δ tipo I que se activan a temperaturas mayores de 52°C y las fibras A- δ tipo II que lo hacen a temperaturas mayores de 43°C (Tabla 2). Ambas categorías responden a estímulos mecánicos (Caterina y Julius, 2001).

Tabla 2. Clasificación y características de los nociceptores.

Tipo de Nociceptor	Tipo de Fibra	Tipo de Estímulos	Campo receptivo
Mecanociceptores de alto umbral	A- δ Tipo 1	Térmicos (>52 ^o C) Mecánicos	<1 mm ²
Mecanotermonociceptores	A- δ Tipo II	Térmicos (>43 ^o C) Mecánicos	< 5 mm ²
Nociceptores Polimodales C	C	Térmicos (>43 ^o C) Mecánicos (>1g) Químicos (ácidos, histamina o KCl)	17 mm ²
Nociceptores al Frío	A- δ o C	Frío (<15 ^o C)	1-145 mm ²

Datos tomados de Fields y Martín, 1994; Hyman y Cassem, 1995; Caterina y Julius, 2001.

Además de las fibras C y A- δ , existen en la periferia fibras mielinizadas A- β que en condiciones normales participan como mecanorreceptores de bajo umbral en la percepción táctil pero ante un proceso inflamatorio modifican su fenotipo convirtiéndose en fibras tipo A- δ de alto umbral (Costigan y Woolf, 2000) que ahora expresan receptores VR-1, SP y canales de sodio específicos de neuronas sensoriales, cabe señalar que todas estas características se encuentran normalmente en fibras tipo C.

Continuando con el procesamiento del dolor, una vez que el estímulo nocivo ha sido convertido a potenciales de acción, estos viajan desde la periferia hasta el asta dorsal de la médula espinal (*conducción*) a través de los axones de las fibras aferentes primarias nociceptivas donde pueden ser transferidos a neuronas de segundo orden (*transmisión*). La sustancia gris de la médula espinal se divide en 10 láminas (Rexed, 1952) (Figura 3), de las cuales tienen especial importancia en el procesamiento del dolor la capa marginal de Waldeyer (lámina I), la sustancia gelatinosa (lámina II), el núcleo propio (láminas III-VI), y el área que rodea el conducto central (lámina X) ya que los axones de la mayoría de las neuronas de dichas láminas constituyen el sistema espinotalámico (Sorkin, 1997). Las láminas del I - VI forman el asta dorsal de la medula espinal y dentro del asta dorsal los nociceptores primarios hacen sinapsis con neuronas intrínsecas que promueven la interacción de la información nociceptiva aferente y eferente y son responsables de la

transmisión del estímulo nociceptivo a centros supraespinales (Hyman y Cassem, 1995; Almeida y cols., 2004).

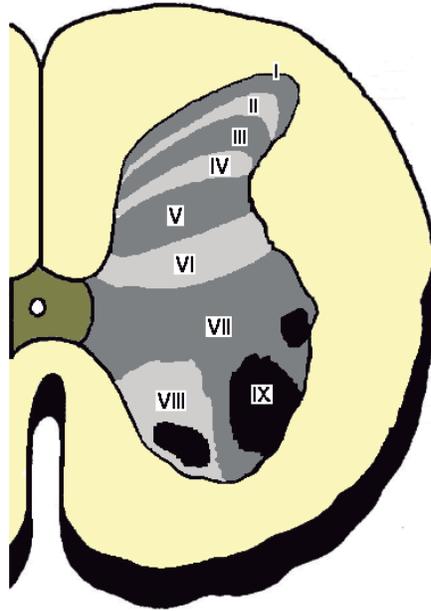


Figura 3. Clasificación de la sustancia gris de la médula espinal a nivel de la quinta vértebra lumbar. Modificado de Rexed, 1952.

Las neuronas intrínsecas de la médula espinal pueden clasificarse en base a la respuesta que presentan ante estímulos aferentes primarios o en términos de su proyección (Millan, 1999; Almeida y cols., 2004). De acuerdo a la respuesta que presentan ante estímulos aferentes primarios la clasificación establece neuronas nociceptivas específicas (SN), neuronas de amplio rango dinámico (WDR) y neuronas no nociceptivas (N-NOC), mientras que en base a su proyección las neuronas se clasifican en neuronas de proyección (PN), neuronas propioespinales intersegmentales (IPN) e interneuronas que pueden ser excitatorias (EXIN) o inhibitorias (ININ).

Las neuronas SN se localizan en las láminas I, II, V y VI, responden exclusivamente a estímulos nocivos y hacen sinapsis con fibras A- δ de alto umbral y fibras C polimodales. Sus campos receptivos son puntiformes y presentan una

organización somatotópica sobretodo en la lámina I por lo que están involucradas en la localización e identificación de la calidad del estímulo. Por su parte, las neuronas WDR se localizan en las láminas I, II, IV, V, VI, X y en el asta anterior, la principal característica es su capacidad para responder en forma gradual a estímulos inocuos y nociceptivos en una gama amplia de intensidades, reciben aferencias de fibras A- β , A- δ y C y sus campos receptivos son extensamente organizados en regiones más centrales del asta dorsal. Por último, las neuronas N-NOC se localizan en las láminas I, II y IV, reciben aferencias de fibras A- β y A- δ , responden a estímulos mecánicos y térmicos inocuos y actúan indirectamente en mecanismos de supresión segmental (Sorkin, 1997; Almeida y cols., 2004).

De acuerdo con la segunda clasificación, las neuronas IPN integran diversos niveles de la médula espinal, así como las regiones ipsilateral y contralateral de ésta. Las interneuronas modulan la información de las diferentes láminas y segmentos de la médula, en tanto que los axones procedentes de las neuronas de proyección forman las vías ascendentes que transmiten la información a estructuras supraespinales. Las vías ascendentes principales se agrupan en dos sistemas generales. El sistema de columnas dorsales-lemnisco interno y el sistema anterolateral (García y Herrero, 1998). El sistema de las columnas dorsales-lemnisco interno está formado por grandes fibras mielinizadas que en general transmiten información táctil no nociceptiva y de orientación espacial (Guyton y Hall, 1996).

Por otro lado, las fibras del sistema anterolateral se originan principalmente en las láminas I, IV-VII y X del asta dorsal, las cuales reciben aferencias de fibras A- δ y C (García y Herrero, 1998). Al salir del asta dorsal cruzan al lado opuesto y ascienden por las columnas laterales de la médula para terminar a distintas alturas del tronco encefálico (Figura 4). Se dividen filogenéticamente en dos diferentes sistemas: 1) El sistema neoespinotalámico que ocupa la región lateral del tallo cerebral y comprende los tractos espinotalámico ventral, espino cervical y la ruta postsináptica de la columna dorsal; 2) y el sistema paleoespinotalámico que ocupa la región media del tallo cerebral y está formado por los tractos espinotalámico medio,

espinorreticular, espinomesencefálico, espinohipotálamico, espínoparabraquioamigdaloides y espinoparabraquihipotálamico (Almeida y cols., 2004).

El tracto espinotalámico se origina principalmente de las láminas I y V aunque también salen fibras de las láminas II, IV, VI, VII, VIII y X. Basados en su origen y la proyección de sus fibras, algunos autores han descrito tres formas de aferencias para el tracto espinotalámico. Una es la vía neoespinotalámica monosináptica o tracto espinotalámico ventral que proyecta directamente a los núcleos del complejo ventral del tálamo involucrados en el componente sensorial-discriminativo del dolor (Dubner y Bennett, 1983). La segunda es la vía multisináptica paleoespinotalámica o tracto espinotalámico medio que hace conexión con los núcleos intralaminar y posterior medial del tálamo involucrados en el componente afectivo-motivacional del dolor. Por último, la vía espinotalámica monosináptica proyecta directamente al núcleo central medial del tálamo involucrado en la parte afectiva de la experiencia dolorosa (Millan, 1999; Almeida y cols., 2004).

El tracto espinorreticular se origina principalmente en las láminas V, VII y VIII aunque también proyecta fibras de las láminas I y X. Presenta dos proyecciones al tallo cerebral, una de ellas está dirigida al núcleo precerebelar localizado en la formación reticular lateral e involucrado en el control motor, mientras que la otra se dirige hacia la formación reticular pontobulbar medial involucrada en los mecanismos nociceptivos. Las aferencias del tracto espinorreticular participan en la parte afectiva-motivacional, así como en las respuestas autónomas al dolor. Es una vía importante en la modulación nociceptiva ya que activa estructuras del tallo cerebral responsables de la supresión descendente (Menetrey y cols., 1980; Willis y Westlund, 1997).

El tracto mesencefálico se origina principalmente en las láminas I, II, IV, V y VI aunque también proyecta aferencias de las láminas VII, X y del asta ventral, las cuales obedecen una organización somatotrópica. Las fibras que salen de la lámina I originan dos sistemas aferentes que ocupan el funículo dorsolateral, el primero, llamado tracto espinocervical asciende a la sustancia gris periacueductal (PAG),

mientras que el segundo, denominado tracto espinotectal alcanza las láminas profundas del colliculus superior. Cabe mencionar que la PAG recibe aferencias excitatorias e inhibitorias de esta vía, lo que nos sugiere una actividad autoregulatoria con diferentes conexiones y velocidades de propagación. Además, el tracto mesencefálico recibe influencia excitatoria e inhibitoria del tracto espinocervical a través de interneuronas colateralizadas entre ambos tractos; asimismo, este modelo de colaterización se ha observado entre los tractos espinotálamico y espinomesencefálico donde ambos tractos se activan uno al otro. Por último, la estimulación de las regiones inervadas por el tracto espinomesencefálico son capaces de provocar comportamientos aversivos ante el estímulo nocivo, además de respuestas motoras, autónomas, cardiovasculares y motivacional-afectivas (Wiberg y Blomqvist, 1984; Yeziarski y Mendez, 1991; Almeida y cols., 2004).

El tracto espinoparabraquial se origina de neuronas SN que parten de las láminas I y II de la médula espinal y proyectan al núcleo parabraquial donde se forman dos sistemas de aferencias hacia la amígdala y hacia el hipotálamo. Además el núcleo parabraquial recibe colateralizaciones de los tractos espinoreticular y espinomesencefálico y del núcleo parasimpático sacral. Este tracto se asocia con la regulación neuroendocrina, autónoma y motivacional-afectiva del dolor (Bester y cols., 1997; Willis y Westlund, 1997; Almeida y cols., 2004).

El tracto espinohipotálamico tiene su origen en las láminas I, V y X y en los núcleos, caudal y espinal. Estas neuronas responden a estimulación inocua y nociva proveniente de tendones, músculos, articulaciones, vísceras y piel; proyectan a diferentes núcleos hipotálamicos y presentan colaterales al núcleo rojo, colliculus superior, sustancia negra, núcleo pretectal, globo pálido, caudado putamen y sustancia innominata. Además, el hipotálamo recibe aferencias nociceptivas de los tractos trigeminalhipotálamico y reticularhipotálamico e integra al sistema nervioso autónomo mediante aferencias provenientes del núcleo vagal dorsal y de la columna intermediolateral, por lo que se sugiere que este sistema participa en las respuestas autónoma, neuroendocrina, motivacional-afectiva y de alerta en la experiencia

dolorosa de origen somático y visceral (Katter y cols., 1991 y 1996; Burstein y cols., 1996; Almeida y cols., 2004).

El tracto espinocervical parte principalmente de las láminas III y IV aunque inerva en menor proporción las láminas I, II y V. Las neuronas que parten de las láminas III y IV originan proyecciones al núcleo cervical lateral y al núcleo del tracto solitario y reciben proyecciones descendentes de estas estructuras. Además, se han descrito que la activación de este tracto estimula la activación de los tractos espinomesencefálico, espinotalámico, espinocervical y espinorreticular mediante colateralizaciones. Este tracto está relacionado con los componentes emocional-afectivos, sensorial-discriminativos y autónomos del dolor (Downie y cols., 1988; Millan, 1999; Almeida y cols., 2004).

Por último, la vía postsináptica de la columna espinal tiene su origen en las láminas III, V, VI y VII de la unión sacro-lumbar y de la columna torácica que proyectan al núcleo gracilis y tálamo: Es la vía aferente más larga que transmite información visceral y en base a sus proyecciones talámicos se le ha involucrado en los componentes emocional-afectivos y sensorial-discriminativos del dolor (Hirshberg y cols., 1996; Almeida y cols., 2004).

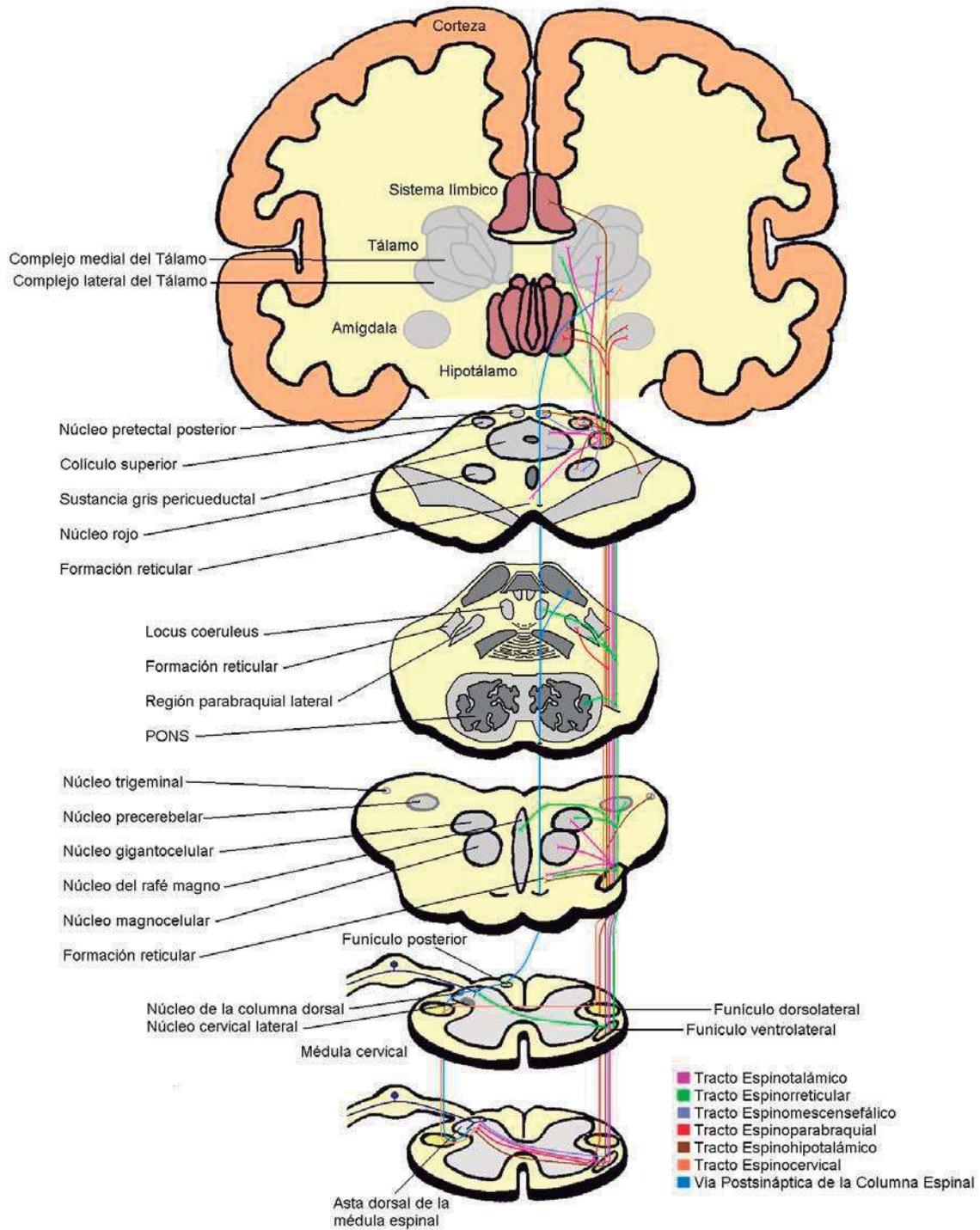


Figura 4. Vías ascendentes del dolor. Modificado de Almeida y cols., 2004.

2.1.2.3 Tálamo y proyecciones corticales

Una vez que las vías aferentes nociceptivas han transmitido el impulso a estructuras supraespinales, la experiencia dolorosa se integra y adquiere su carácter desagradable (*percepción*). Diversos estudios indican que el cerebro medio, tálamo, hipotálamo, núcleo lentiforme, corteza somatosensorial (SI y SII) y los cíngulos insular, prefrontal, anterior y parietal son estructuras básicas en la percepción del dolor (Millan, 1999). De estas estructuras el tálamo es el principal centro de relevo de la información sensorial destinada a la corteza (Figura 5) y son sus núcleos los que definen el procesamiento de esta información (Almeida y cols., 2004).

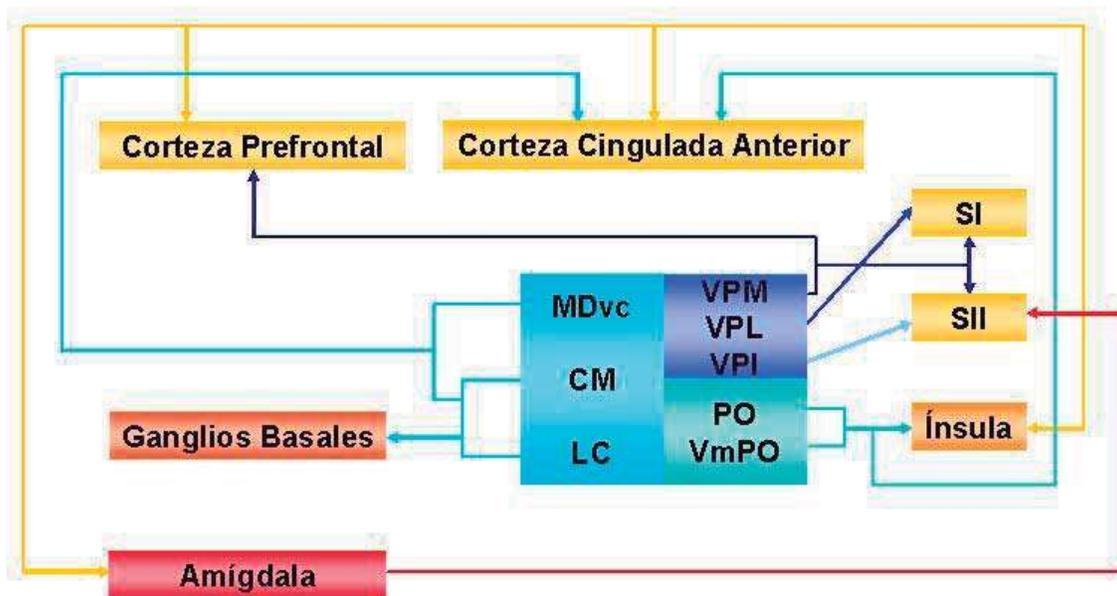


Figura 5. Circuitos supraespinales. El complejo lateral talámico está integrado por los núcleos ventroposterolateral (VPL), ventroposteromedial (VPM), ventroposteroinferior (VPI). El complejo posterior por los núcleos posterior (PO), ventromedial posterior (VmPO) y el complejo medial por los núcleos medial dorsal (MDvc), centromedial (CM) y central lateral (LC). Modificado de Almeida y cols., 2004.

El complejo nuclear lateral está integrado por los núcleos ventroposterolateral (VPL), ventroposteromedial (VPM) y ventroposteroinferior (VPI). Recibe aferencias de los tractos espinotalámico, espinoreticular, espinocervical y espinoparabraquial

(Almeida y cols., 2004), sus neuronas presentan una organización somatotrópica, proyectan a la corteza somatosensorial secundaria (SII) y responden a estímulos térmicos y mecánicos. En este sentido, el núcleo VPL es reconocido como el principal centro somatosensorial de relevo y tiene conexiones con la corteza somatosensorial primaria (SI); responsable de la localización e intensidad del dolor (Willis y cols., 2001). Al igual que el núcleo VPL, el núcleo VPM está involucrado en el aspecto sensorial-discriminativo del dolor; además de aspectos emocionales, autónomos y psicomotores en virtud de que sus fibras proyectan a la corteza prefrontal y se encuentra interconectado con la amígdala, hipotálamo y PAG. Además, en este núcleo convergen fibras provenientes de la región parabraquial y del núcleo paratrigeminal (Li y cols., 1997; Gauriau y Bernard, 2002; Almeida y cols., 2004).

El complejo posterior del tálamo está integrado por el núcleo pulvinar oralis, el núcleo posterior (PO) y la división del núcleo ventromedial posterior (VmPO). Recibe aferencias de los tractos espinotalámico, espinohipotalámico, espinoparabraquial y la vía postsináptica de la columna dorsal y establece un circuito reverberante con la corteza reforzando la activación de las neuronas talámicas y corticales ante estímulos nocivos (Roberts y cols., 1992; Millan, 1999). Los núcleos PO y VmPO forman parte integral del sistema nociceptivo medial estableciendo conexiones con la corteza insular y singular; involucradas en el componente afectivo-emocional del dolor. Estos núcleos responden a información térmica nociva y a estímulos mecánicos inocuos y nocivos (Yeziarsk, 1990; Treede y cols., 1999).

Por su parte, el complejo medial del tálamo está integrado por el núcleo medial dorsal (MDvc) y el núcleo intralaminar. Recibe aferencias de los tractos espinotalámico, espinomescencefálico y espinohipotalámico y proyecta a la corteza singular sugiriendo una contribución en el aspecto afectivo-motivacional del dolor. Además, interconecta con estructuras responsables de la atención y respuestas motoras como el estriado y el cerebelo con lo que probablemente participa en la conducta de escape ante un estímulo nocivo (Willis y Westlund, 1997; Millan, 1999).

2.1.2.4 Vías descendentes

Las vías descendentes permiten al organismo conocer y responder a un estímulo nocivo facilitándolo o inhibiéndolo (*modulación*) (Akil y cols., 1976). En 1965, Melzack y Wall como parte de su teoría de la compuerta propusieron la existencia de un sistema específico capaz de modular el dolor. Hoy en día se sabe que incluso los centros supraespinales más altos influyen en el procesamiento nociceptivo llevado a cabo en el asta dorsal a través de vías descendentes mono y polisinápticas (Millan, 2002) (Figura 6). En este sentido, las cortezas frontocortical, somatosensorial y parietal proyectan terminales directas al asta dorsal de la médula espinal produciendo antinocicepción (Miller, 1987). Mientras que la corteza insular y ventral orbital producen inhibición descendente vía relevos con otras estructuras supraespinales como la PAG (Zhang y cols., 1997; Millan, 2002). Asimismo, la corteza frontal participa en la inhibición descendente vía su relevo con el núcleo del rafé magno (NRM), en tanto, que la estimulación de la corteza del cíngulo anterior produce respuestas aversivas al dolor que facilitan la información nociceptiva (Miller, 1987; Calejesan y cols., 2000).

El hipotálamo se encuentra ampliamente interconectado con el NTS, PAG, bulbo raquídeo rostroventrolateral (RVM) y estructuras corticolímbicas por lo que está implicado en la dimensión afectiva y cognitiva del dolor (Millan, 1999). El sistema hipotálamo-espinal se origina de los núcleos hipotalámico paraventricular (PVN), arcuato, tuberomamilar y posterior periventricular. Este sistema participa produciendo tanto facilitación como inhibición descendente (Bonica, 1990; Millan, 2002). En lo que se refiere a las vías polisinápticas, el núcleo preóptico medial proyecta intensamente a PAG y RVM participando en la respuesta motora al dolor e inhibición descendente (Murphy y cols., 1999).

La PAG se encuentra recíprocamente interconectada con el hipotálamo, PBN, NTS y estructuras corticolímbicas incluyendo la corteza frontal y la amígdala por lo que participa en el control emocional (Gray y Magnuson, 1992; Odeh y Antal, 2001).

Por un lado, el sistema PAG-espinal participa en la facilitación descendente, está integrado en su mayoría por neuronas que contienen péptidos excitatorios; las cuales descienden por el funículo dorsolateral proyectándose directamente al asta dorsal de la médula espinal (Skirboll y cols., 1983). Mientras que por el otro lado, las vías polisinápticas de la PAG involucran la participación de neuronas serotoninérgicas y glutamatérgicas al RVM y noradrenérgicas al núcleo A₇, aunque también se han reportado proyecciones de neuronas GABAérgicas y encefalinérgicas a estos núcleos. Todas estas proyecciones traen como consecuencia un efecto antinociceptivo sobre el asta dorsal (Wiklund y cols., 1988; Millan 2002).

El bulbo raquídeo rostroventromedial (RVM) es una región heterogénea que recibe proyecciones de vías descendentes originadas de la PAG, PBN, NTS y otras estructuras involucradas en recibir y procesar información nociceptiva. Esta región manda proyecciones inhibitorias y excitatorias a láminas superficiales y profundas del asta dorsal (Fields y Basbaum, 1994; Millan, 2002) y es en el RVM donde se localiza el núcleo del rafé magno (NRM) rico en neuronas serotoninérgicas (Feldman y cols., 1997).

El núcleo del tracto solitario (NTS) al igual que el núcleo parabraquial (PBN) funciona como una interfase entre el sistema sensorial y autónomo. Está recíprocamente conectado con el hipotálamo y regiones corticolímbicas. Su estimulación produce antinocicepción vía PAG o directamente en el asta dorsal de la médula espinal (Mtui y cols., 1993 y Millan, 2002), aunque también participa en la facilitación descendente a través de la RVM (Morgan y cols., 1989; Wiertelak y cols., 1997). Por otro lado, el PBN participa suprimiendo la respuesta nociceptiva vía el NTS, RVM o directamente en el asta dorsal (Yoshida y cols., 1997). Por último, el núcleo reticular dorsal recibe y proyecta directamente a láminas profundas y superficiales manteniendo un circuito reverberante que al estimularse produce principalmente estados de hiperalgesia (Almeida y cols., 1996; 1999), aunque algunos autores señalan la existencia de controles inhibitorios a través de este circuito (Bouhassira y cols., 1992).

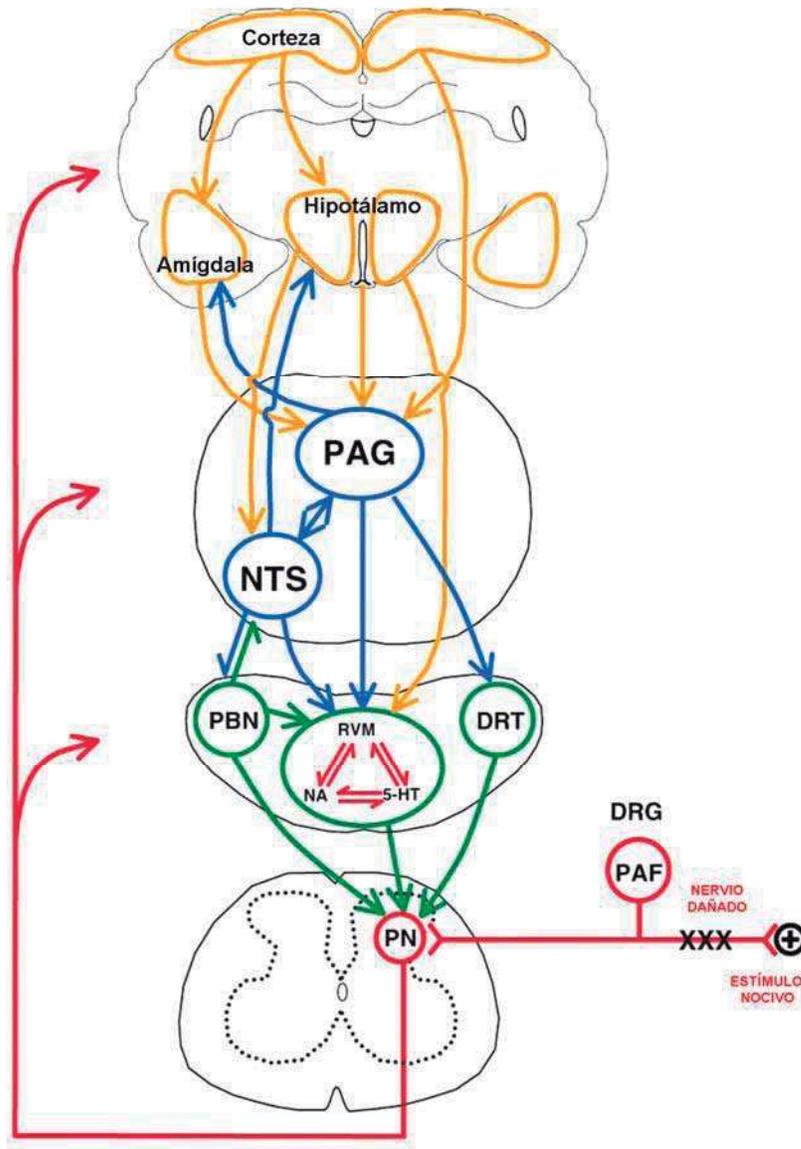


Figura 6. Vías descendentes. Sustancia gris pericueductal (PAG), núcleo del tracto solitario (NTS), núcleo parabraquial (PBN), bulbo raquídeo rostroventrolateral (RVM), núcleo reticular dorsal (DRT), neurona de proyección (PN), fibra aferente primaria (PAF) y ganglio de la raíz dorsal (DRG). Modificado de Millan, 2002.

2.1.2.5 Mecanismos moleculares

El dolor es el resultado de diversos mecanismos moleculares. Algunos de estos son únicos a una condición dolorosa, otros se encuentran presentes en múltiples síndromes clínicos o pueden expresarse a diferentes tiempos (Scholz y Wolf, 2002). En este sentido, un estímulo intenso pero sin daño al tejido, da como respuesta un dolor transitorio de pocos segundos, bien localizado que no desencadena procesos de sensibilización. Esta señal intensa es transducida por receptores especializados a corrientes despolarizantes y conducidas al sistema nervioso central (SNC) a través de los axones de las fibras aferentes primarias. En este tipo de dolor (*transitorio o nociceptivo*) participan receptores que responden a agentes físicos y químicos nocivos. Dentro de estos receptores tenemos a los receptores de la familia TrpV y el receptor TrpM8 (Patapoutian y cols., 2003) que detectan estímulos térmicos nocivos, o bien aquellos que responden a estímulos mecánicos intensos y están estructuralmente relacionados a los canales de sodio sensibles a ácido (ASICs), denominados DRASIC, MDEG y TREK-1 (García-Añoveros, 2001). Todos estos receptores son más bien canales iónicos que actúan despolarizando a la neurona (Costigan y Woolf, 2000; Scholz y Wolf, 2002).

Por otro lado, cuando el estímulo es capaz de producir daño al tejido, una gran cantidad de sustancias endógenas son liberadas en el sitio de lesión, que pueden excitar o sensibilizar las fibras aferentes primarias y forman parte de la “sopa inflamatoria” responsable de este tipo de dolor (*inflamatorio o agudo*) (Woolf y Costigan, 1999; Sawynok y Liu, 2003). En primer lugar, el daño producido a las células del tejido libera protones y ATP que actúan despolarizando las fibras aferentes primarias por activación de los receptores ASICs y P2X₃, respectivamente (Costigan y Woolf, 2000). La activación de fibras aferentes primarias (principalmente fibras C) genera potenciales antidrómicos y ortodrómicos que liberan neuropéptidos como la sustancia P y CGRP (Wall y Devor, 1983; Willis, 1999) que a su vez despolarizan terminales nerviosas vecinas y son

responsables de la vasodilatación y extravasación plasmática, así como también de la regulación de la secreción de diversos mediadores inflamatorios en diversas células (Szolcsanyi, 1988; Costigan y Woolf, 2000).

Las células endoteliales activadas expresan moléculas de adherencia como la selectina E, selectina P, ICAM-1 (molécula de adherencia intracelular) y VCAM-1 (molécula de adherencia de células vasculares) que intervienen de modo fundamental para preconditionar y orientar a las células circulantes hacia el sitio de inflamación (Roberts y Morrow, 2002). La migración de células al tejido dañado causa la liberación de numerosos mediadores del dolor, entre los cuales se encuentra la serotonina, que es liberada por plaquetas, mastocitos y células endoteliales (Taiwo y Levine, 1992). Además de la serotonina los mastocitos añaden a la “sopa inflamatoria” histamina, prostaglandinas y bradicinina (Costigan y Woolf, 2000;). Por su parte, los macrófagos liberan citocinas (IL-1, IL-6 y TNF- α) y factores de crecimiento (NGF y LIF). Todos estos mediadores actúan sobre sus respectivos receptores sensibilizando o despolarizando a las fibras aferentes primarias (Fajardo y cols., 2001; Kidd y Urban, 2001).

La sensibilización periférica (Figura 7) ocurre inicialmente mediante la activación de diversas cinasas, que a su vez fosforilan múltiples proteínas, entre ellas canales iónicos dependientes de voltaje y canales iónicos operados por ligando ocasionando así un incremento de corrientes de Na⁺ y Ca²⁺ y una disminución de corrientes de K⁺ (Gold, 1999; Millan, 2002). Seguido de estos cambios tempranos (segundos), comienza a haber cambios transcripcionales (minutos), debidos a las proteincinasas activadas, que fosforilan factores de transcripción y neurotrofinas como el NGF, el cual se internaliza junto con su receptor de membrana TrkA al núcleo celular donde inicia cambios transcripcionales (Leslie y cols., 1995). Estos cambios refuerzan la excitabilidad neuronal ya que se incrementa la síntesis de moléculas involucradas en la transmisión nociceptiva como SP y CGRP (Apfel, 2000; Costigan y Wolf, 2000) que no solo afectan a las fibras C, sino también a las fibras A β y A δ que modifican

su fenotipo e inervación en el asta dorsal (Woolf y cols., 1992, 2000; Sawynok y Liu, 2003).

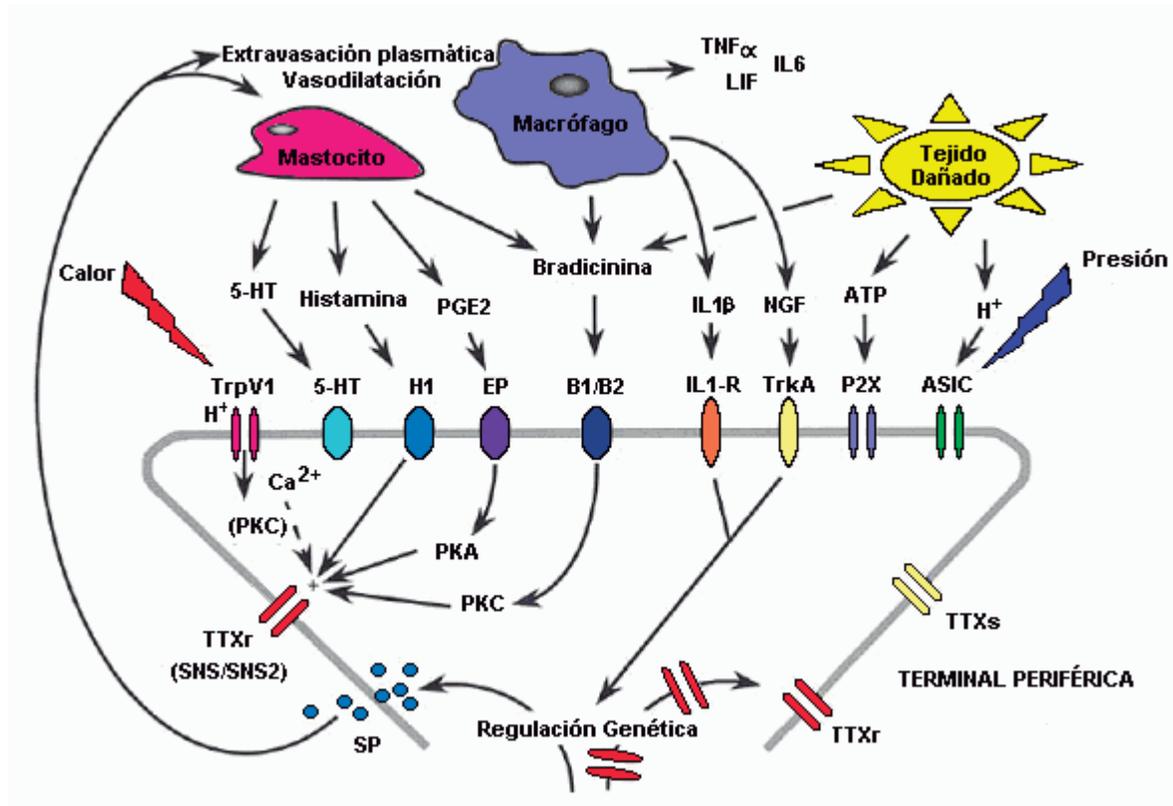


Figura 7. Sensibilización Periférica. Modificado de Costigan y Wolf, 2000.

Dentro del asta dorsal de la médula espinal, un estímulo nocivo, pero sin daño al tejido, libera glutamato de las terminales centrales de las fibras aferentes primarias. El glutamato transmite el impulso nociceptivo a través de receptores AMPA que generan potenciales post-sinápticos excitatorios rápidos que señalan la duración, intensidad y localización del estímulo periférico nocivo y por ende, sirven como un sistema de advertencia al organismo (Woolf y Costigan, 1999). Por otro lado, si existe daño al tejido, los potenciales generados son más intensos o sostenidos liberando además neuropéptidos como SP y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), los cuales a su vez activan receptores post-sinápticos desencadenando múltiples cascadas de transducción (Michael y cols.,

1997; Costigan y Woolf, 2000; Khasabov y cols., 2002). En primer lugar el glutamato activa receptores AMPA que despolarizan las neuronas post-sinápticas, dicha despolarización remueve al ión Mg^{2+} que bloquea los canales NMDA permitiendo al glutamato activar a estos receptores trayendo como consecuencia un incremento en el Ca^{2+} intracelular (Woolf y Salter, 2000). El incremento de Ca^{2+} y los múltiples receptores activados estimulan la participación de diversas enzimas (NOS, COX) y múltiples proteincinasas (PKA, PKC, MAPK) (Woolf y Costigan, 1999).

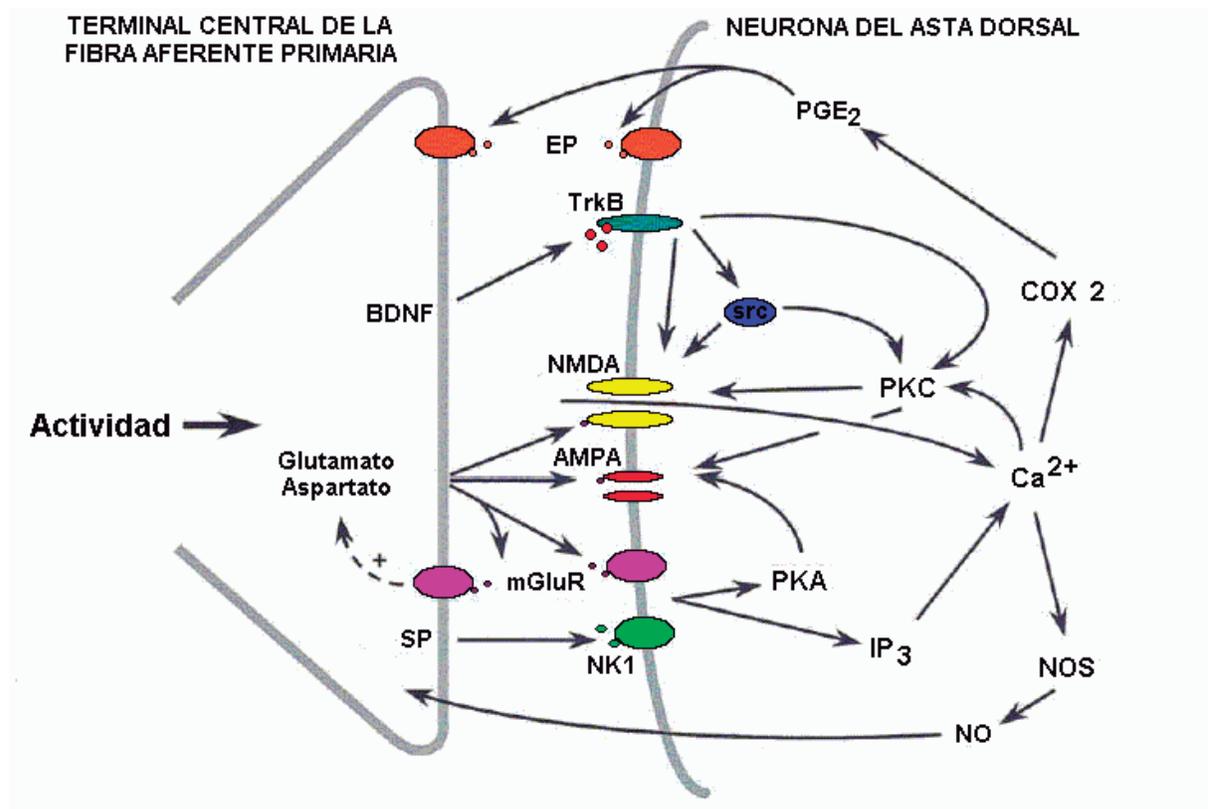


Figura 8. Sensibilización central. Modificado de Costigan y Wolf, 2000.

Las proteincinasas fosforilan receptores de membrana y canales iónicos haciendo más excitable a la neurona, como en el caso del receptor NMDA que al ser fosforilado puede permanecer más tiempo abierto y ser más sensible a la presencia de glutamato, por su parte la NOS y la COX sintetizan metabolitos como

óxido nítrico y prostaglandinas (respectivamente) que pueden actuar tanto pre como post-sinápticamente (Costigan y Woolf, 2000). Todos estos cambios producen sensibilización central (Figura 8) que además activa cambios transcripcionales como el incremento en el mRNA del receptor TrkB después de dos horas de producido el daño al tejido (Mannion y cols., 1999).

En resumen, la actividad y el metabolismo de las fibras sensoriales se puede alterar profundamente por una variedad de mediadores que se generan por el daño tisular y la inflamación. Estos mediadores incluyen sustancias liberadas por el tejido dañado, sustancias de origen vascular, de fibras aferentes, fibras simpáticas y diversas células inmunes. El efecto de estos mediadores consiste en activar o sensibilizar las fibras aferentes produciendo cambios en los canales iónicos y receptores de membrana. Estos cambios tienen el potencial de alterar la transcripción de genes e inducir a largo plazo alteraciones en la bioquímica de las neuronas sensoriales (Dray, 1995). A continuación se hace una revisión de uno de estos mediadores, motivo de esta tesis.

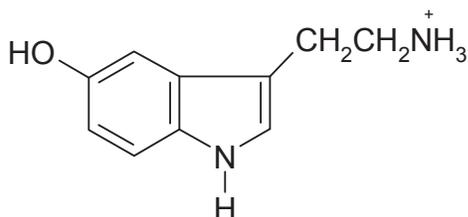
2.1.3 Serotonina

2.1.3.1 Historia

En la década de 1930 Erspamer, utilizando un colorante para indoles encontró que las concentraciones más altas de enteramina se encontraban en las células enterocromafines del tubo digestivo, plaquetas y SNC (Erspamer y Asero 1952). Casi dos décadas después el grupo de Page (Rapport y cols., 1948) aisló y caracterizó desde un punto de vista químico una sustancia vasoconstrictora liberada por las plaquetas de la sangre coagulada que recibió el nombre de serotonina. Sin embargo, no fue sino hasta 1976 cuando Page mostró que esta sustancia era idéntica al indol aislado por Erspamer (Page, 1976; Sanders y Mayer, 2002). Cabe mencionar que fue a mediados de 1950 cuando se sugirió que

la serotonina podía funcionar como neurotransmisor en el cerebro de mamíferos (Brodie y Shore, 1957).

2.1.3.2 Estructura, síntesis, distribución y metabolismo



Serotonina (5-HT)

3-(β-aminoetil)-5-hidroxiindol

C₁₀H₁₂N₂O

PM. 176.22 g/mol

Estable en soluciones acuosas a pH 2 - 6.4

p.f. 167 – 168 °C como clorhidrato de 5-HT

Figura 9. Estructura química de la serotonina.

La serotonina se sintetiza por una vía de dos etapas a partir del aminoácido esencial triptófano (Figura 10). El cual se capta activamente en el encéfalo por medio de un transportador que también transporta a otros grandes aminoácidos naturales y de cadena ramificada (Denizeau y Sourkes, 1977; Mandell y Knapp, 1977). El primer paso de la biosíntesis se lleva a cabo por la hidroxilasa de triptófano, la cual requiere oxígeno molecular y tetrahidropteridina, no sufre inhibición por producto terminal pero es activada por fosforilación mediante la CaM-KII, esta reacción es el paso limitante de la biosíntesis. Una vez formado el L-5-hidroxitriptófano, la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos lo convierte en serotonina, esta reacción requiere vitamina B₆ para poder llevarse a cabo (Boadle-Biber, 1993).

La serotonina se metaboliza principalmente en el SNC a ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) mediante un proceso de dos etapas (Udenfriend, 1959). El primer paso se lleva a cabo por la enzima monoaminoxidasa (MAO_A) que convierte a la serotonina en acetaldehído del 5-hidroxiindol, el cual se

convierte a 5-HIAA por la enzima aldehído deshidrogenasa (Feldman y cols., 1997). Cabe señalar que ésta es la principal vía de metabolismo para la serotonina pero cuando las concentraciones de NADH se incrementan bajo ciertas circunstancias como la ingesta de alcohol, la ruta por la cual se metaboliza el acetaldehído del 5-hidroxiindol cambia de la vía oxidativa hacia la vía reductiva. Este fenómeno tiende a incrementar la excreción de 5-hidroxitriptofol, y reducir en correspondencia la de 5-HIAA.

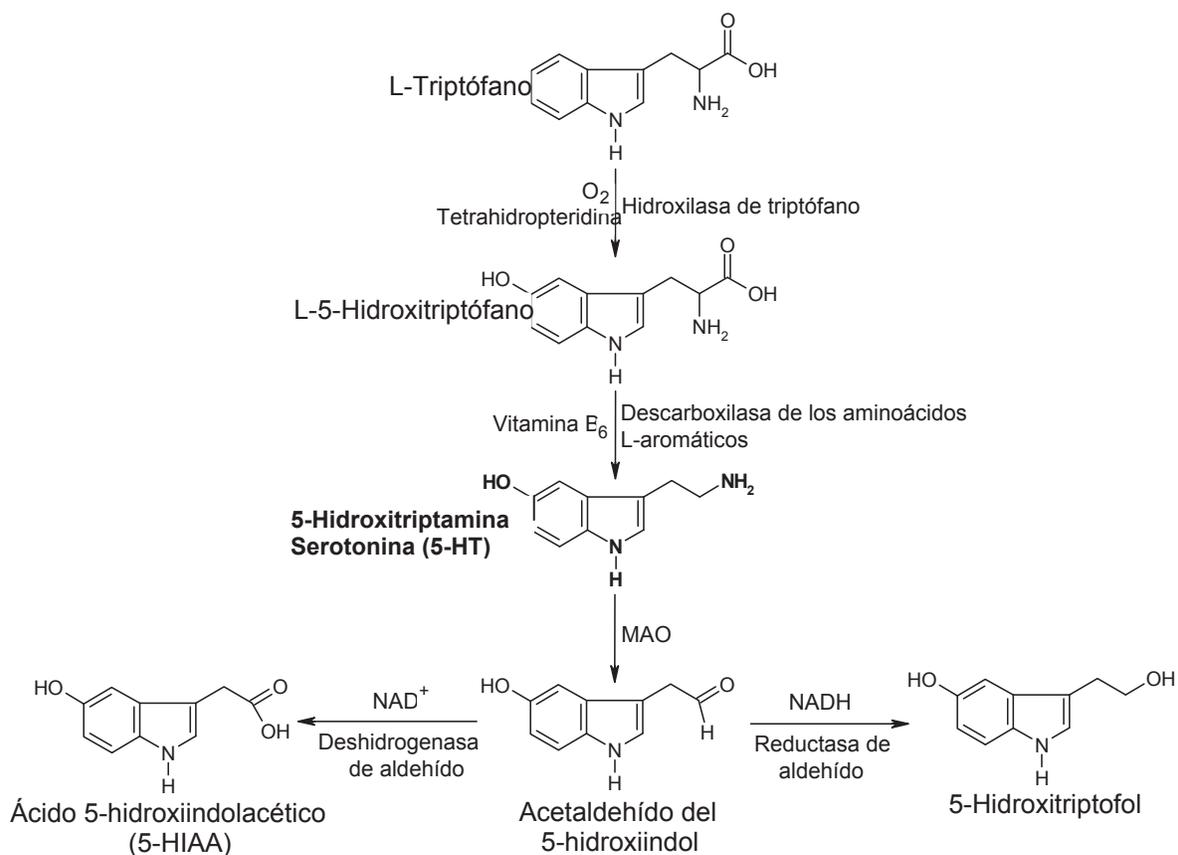


Figura 10. Biosíntesis y metabolismo de la serotonina.

El 5-HIAA se transporta al exterior del encéfalo por un proceso sensible al inhibidor probenecid (Forn, 1972) y se excreta por orina junto con pequeñas cantidades de 5-hidroxitriptofolsulfato o de conjugados glucuronados. La excreción ordinaria de 5-HIAA es de 2 -10 mg/día (Sanders y Mayer, 2002). Además del metabolismo por acción de la MAO, existe un proceso de captación mediado por un cotransportador de Na^+ que se encuentra localizado en la membrana exterior

de las terminaciones axonianas serotoninérgicas y en la membrana exterior de las plaquetas. Este cotransportador es muy específico y al ser fosforilado sufre internalización. Cabe mencionar, que a diferencia de estos transportadores, el transportador de aminas vesicular es inespecífico (Graham y Langer, 1992; Feldman y cols., 1997).

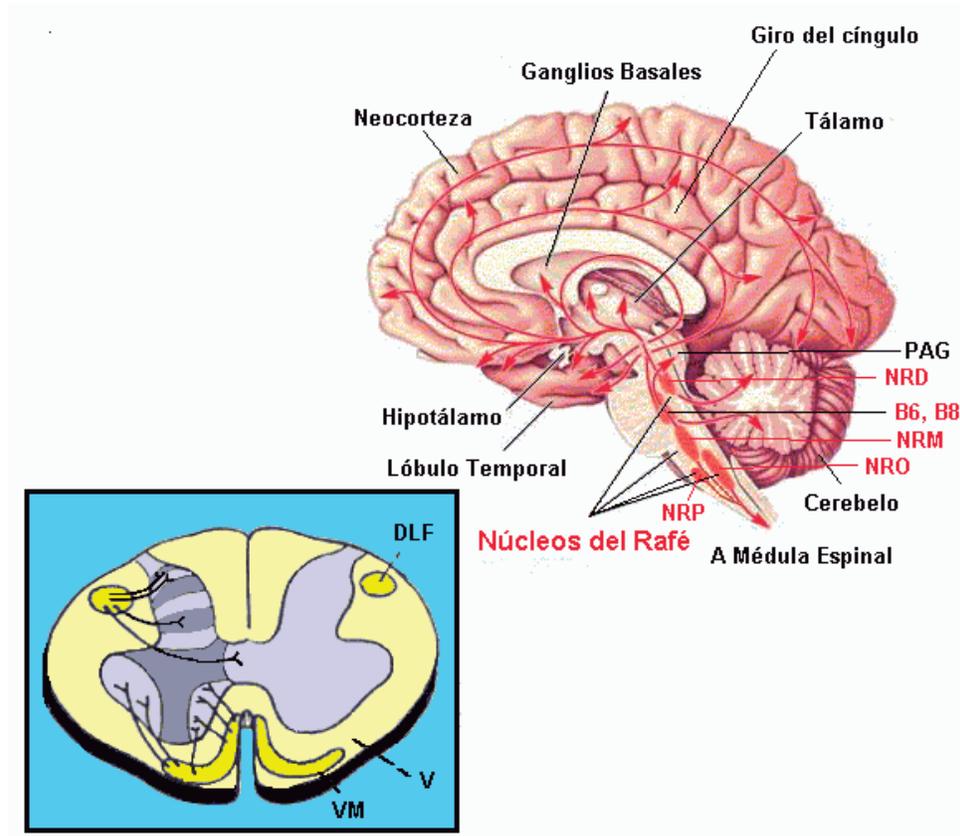


Figura 11. Origen y vías ascendentes y descendentes serotoninérgicas. Modificado de Bonica y cols., 1990; Purves y cols., 2001.

En cuanto a su distribución en el sistema nervioso central (Figura 11) las neuronas serotoninérgicas encontradas en el asta dorsal de la médula espinal se originan de neuronas descendentes del tallo cerebral ya que la transección espinal crónica resulta en una depleción completa de los niveles de 5-HT (Dubner y Bennett, 1983). Los cuerpos celulares de estas neuronas se encuentran localizados principalmente en los núcleos del rafe magno (NRM), rafe oscuro (NRO), rafe pálido (NRP) y rafe dorsalis (NRD). El NRM proyecta sus axones a través del funículo dorsolateral a las láminas I, II, IV, V y cerca del canal central

mientras que el NRO y el NRP descienden sus axones a motoneuronas localizadas en el asta ventral (Ruda y cols., 1986).

En relación a las vías ascendentes se han descrito dos vías principales denominadas ventral y dorsal. La vía ascendente ventral se origina de los núcleos B6, B8 y NRD y proyecta a numerosas partes del diencefalo, ganglios basales, sistema límbico y corteza mientras que la vía ascendente dorsal inicia en los núcleos NRD y B8 y proyecta a PAG aunque la mayoría de sus axones asciende para unirse con el sistema ventral. Cabe mencionar que también se han descrito proyecciones al cerebelo y diversas estructuras del puente y bulbo raquídeo (Feldman y cols., 1997).

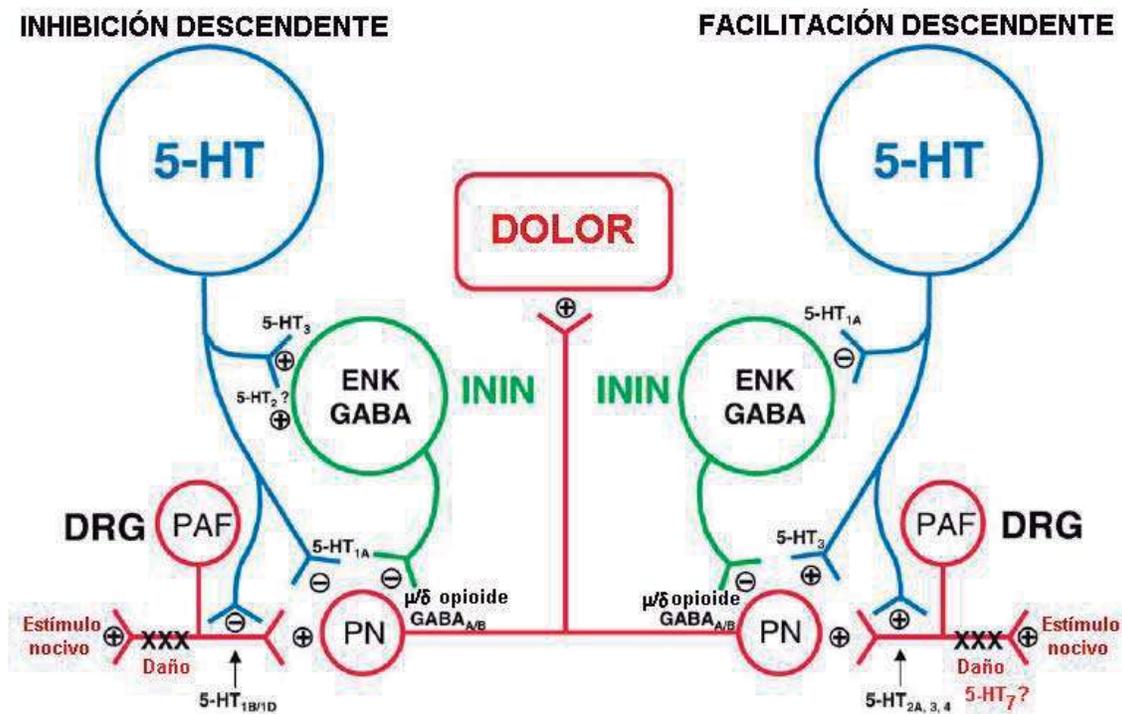


Figura 12. Localización de los diferentes subtipos de receptores a 5-HT en el asta dorsal y su participación en el procesamiento nociceptivo. Modificado de Millan 2002.

No hay una separación anatómica absoluta en las estructuras involucradas en los sistemas descendentes de inhibición y facilitación serotoninérgicos ya que

en la actualidad se aceptan al menos 14 subtipos de receptores, los cuales pueden mediar tanto sistemas descendentes excitatorios como inhibitorios dependiendo del mecanismo de transducción intracelular al cual se encuentren acoplados y al sitio funcional donde se encuentren localizados en el asta dorsal (Figura 12) (Millan, 2002).

Tabla 3. Nomenclatura propuesta por el subcomité sobre receptores a 5-HT de la NC-IUPHAR. Datos tomados de Alexander y cols., 2005.

Receptor	Otros nombres	Localización cromosómica	Mecanismo Transduccional	Agonistas	Antagonistas	Efecto neuronal
5-HT _{1A}		5q11.2-q13	(-) AC	8-OH-DPAT ^a	(±) WAY 100635 (8.7)	Hiperpolarización
5-HT _{1B}	5-HT _{1DB}	6q13	(-) AC	L 694247 Sumatriptán ^b	GR 55562 (7.4) SB 224289 (8.5) SB 236057 (8.9)	Hiperpolarización
5-HT _{1D}	5-HT _{1Dα}	1p34.3-36.3	(-) AC	PNU 109291 Sumatriptán	BRL 15572 (7.9)	Hiperpolarización
5-HT _{1E}		6q14-15	(-) AC			Hiperpolarización
5-HT _{1F}	5-HT _{1EFβ} 5-HT ₆	3p11-p14.1	(-) AC	LY 334370 Sumatriptán		Hiperpolarización
5-HT _{2A}	D 5-HT ₂	13q14-q21	PLC	DOI ^c	Ketanserina (8.5 - 9.5) MDL 100907 (9.4)	Despolarización
5-HT _{2B}	5-HT _{2F}	2q36.3-q37.1	PLC	BW 723C86	SB 204741 (7.8)	Despolarización
5-HT _{2C}	5-HT _{1C}	Xq24	PLC	Ro 600175	Mesulegina (9.1) SB 242084 (9.0) RS 102221 (8.4)	Despolarización
5-HT ₃	M	11q23.1-q23.2	Canal Na ⁺ /K ⁺ /Ca ²⁺	SR 57227 m-clorofenilbiguanida	Granisetron (10) Ondansetrón (8 - 10) Tropisetron (10 - 11)	Despolarización
5-HT ₄		5q31-33	(+) AC	BIMU 8 RS 67506 ML 10302	GR 113808 (9 - 9.5) SB 204070 (10.8) RS 100235 (11.2)	Despolarización
5-HT _{5A}	5-HT _{5α}	7q36.1	(-) AC			Hiperpolarización
5-HT _{5B}		2q11-q13	?			?
5-HT ₆		1p35-36	(+) AC	5MeOT [≥] 5HT ^{>} 5CT Sumatriptán inactivo	Ro 630563 (7.9) SB 271046 (7.8) SB 357134 (8.5)	Despolarización
5-HT ₇	5-HT _X 5-HT _{1-like}	10q23.3-24.3	(+) AC	5CT ^{>} 5HT [≥] 5MeOT ^{>} 8-OH-DPAT Sumatriptán inactivo	SB 258719 (7.9) SB 269970 (9.0)	Despolarización

^a También actúa como agonista parcial 5HT₇.

^b También es agonista a los receptores 5-HT_{1D} y 5-HT_{1F}.

^c También activa al receptor 5-HT_{2C}.

2.1.3.3 Receptores y dolor

La clasificación de los receptores serotoninérgicos comenzó en 1957 cuando Gaddum y Picarelli demostraron que la respuesta funcional del íleo de cobayo a serotonina podía ser bloqueada parcialmente por morfina (M), mientras que el remanente de la respuesta era inhibido por dibenzilina (D). De esta manera, propusieron una subdivisión de estos receptores novedosos, a los cuales denominaron M y D. Posteriormente, Peroutka y Snyder (1979) demostraron la presencia de dos sitios distintos a 5-HT, utilizando los radioligandos [³H]-5-HT, [³H]-espiperona y [³H]-LSD. Así, los sitios se llamaron 5-HT₁ y 5-HT₂, donde el 5-HT₂ correspondía al receptor D. Una década después, en 1986 Bradley y cols. basándose en la evidencia existente hasta el momento propusieron tres grupos principales llamados 5-HT_{1-like}, 5-HT₂ y 5-HT₃, donde el último correspondía al receptor M descrito por Gaddum y Picarelli. Tiempo después se adoptó como criterio primordial para clasificar a los receptores de la familia 5-HT₁ la gran afinidad que desplegaban por 5-HT. Pero esta clasificación resultó inválida ya que un receptor expresado en el plexo coroideo denominado 5-HT_{1C}, no compartía las propiedades farmacológicas, mecanismo transduccional o secuencia de aminoácidos con los miembros de su familia. Esto generaba un problema ya que el receptor 5-HT_{1C} (posteriormente 5-HT_{2C}) podía clasificarse de una manera más adecuada en la familia 5-HT₂ (Humphrey y cols., 1993).

Así, el Comité para la Nomenclatura de Receptores del Club de Serotonina, propuso un nuevo sistema de clasificación basado en información operacional, estructural y transduccional. Esto implicaba que ningún criterio podría ser exclusivo o predominante y que el término de receptor solo podría aplicarse a una entidad de la cual fueran disponibles los tres tipos de información y que además se tuviera evidencia razonable de su papel funcional (Hoyer y cols., 1994). Estos principios fueron posteriormente aceptados por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Farmacología (NC-IUPHAR) y se adaptó progresivamente para

acomodar información nueva (Figura 13). Actualmente se reconocen 14 subtipos de receptores divididos en 7 familias

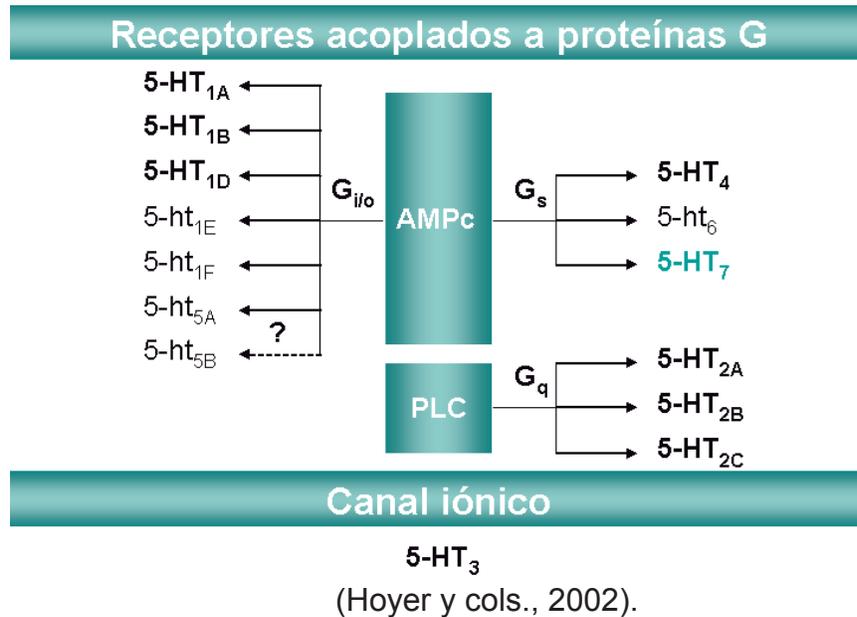


Figura 13. Clasificación de los receptores a serotonina de acuerdo con la IUPHAR. Modificado de Hoyer y cols., 2002.

2.1.3.3.1 Receptor 5-HT_{1A}

El receptor 5-HT_{1A} se encuentra acoplado negativamente a adenilato ciclasa (AC) y su activación causa hiperpolarización neuronal, un efecto mediado a través de proteínas G acopladas directamente a la apertura de canales de K⁺ (Aghajanian y Marek, 1995) y cierre de canales de Ca²⁺. Consta de 422 aminoácidos (aa) y tiene sitios de glicosilación y fosforilación. El receptor humano se encuentra localizado en el cromosoma 5q11.2-q13 (Barnes y Sharp, 1999). Se ha observado que dentro de sus efectos neuroendócrinos y neuroquímicos, la activación del receptor 5-HT_{1A} por un lado aumenta la liberación de ACTH, prolactina, NA y Ach; mientras que por el otro disminuye la liberación de 5-HT y glutamato. Sus efectos principales son el síndrome serotoninérgico, hipotermia, hiperfagia, ansiolisis e incremento en el comportamiento sexual.

En cuanto a la farmacología el 8-OH-DPAT es el agonista más selectivo hasta la fecha, aunque se sabe que también se une a receptores 5-HT₇. El WAY-100635 es el antagonista más potente, aunque el NAD-299 parece ser más selectivo (Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y cols., 2002).

En cuanto a su distribución en el SNC, se han encontrado en una alta concentración en el asta dorsal, sobre todo en las láminas superficiales, aunque también existen en láminas profundas y en la lámina X (Thor y cols., 1993), pero pobre expresión en el asta ventral (VH) y columna intermediolateral (IML). Reproduciblemente, se han reportado cantidades sustanciales del mRNA en el ganglio de la raíz dorsal (DRG) (Pierce y cols., 1996; Chen y cols., 1998; Wu y cols., 2001). En niveles supraespinales se encuentran en áreas mesencefálicas (núcleo del rafe), estructuras límbicas (hipocampo y septo lateral) y corticales (corteza entorrinal y cíngulo) (Barnes y Sharp, 1999).

Doak y Sawynok (1997) reportaron la participación de receptores 5-HT₁ en terminales periféricas utilizando el agonista 5-CT en la prueba de formalina, pero cabe señalar, que este compuesto también actúa como agonista 5-HT₇, por lo que posiblemente el efecto observado se deba a la activación de este receptor ya que produce despolarización neuronal, contrario a los 5-HT₁ que producen hiperpolarización.

A nivel del asta dorsal, la administración de agonistas 5-HT_{1A} en numerosos estudios conductuales reportan acciones hiperalgésicas. Asimismo, la estimulación de estos receptores revierte la antinocicepción producida por antidepresivos, nicotina, calcitonina, estrés, agonistas α_2 y agonistas GABAérgicos, sugiriendo la participación de estos receptores en el sistema descendente facilitatorio, el cual se activa por estimulación del bulbo raquídeo ventromedial (RVM), excitación del nervio vago o inflamación periférica (Millan, 2002)..

Se piensa que las acciones pronociceptivas del receptor 5-HT_{1A} están mediadas por interneuronas inhibitorias (ININ) GABAérgicas, en apoyo a esta teoría, la administración intratecal de agonistas GABA bloquea la alodinia mecánica evocada por activación de receptores 5-HT_{1A} (Millan y cols., 1996). Además, se ha observado que la activación del receptor 5-HT_{1A} induce la expresión genética de dinorfina en el asta dorsal, un opioide, del cual se han reportado propiedades pronociceptivas (Millan, 2002).

No obstante, dependiendo del parámetro a evaluar, la modalidad del estímulo y varios otros factores, diversos autores han reportado también acciones antinociceptivas en estudios conductuales (Bardin y cols., 2000, 2001). Esta evidencia junto con estudios electrofisiológicos, que demuestran que los agonistas 5-HT_{1A} producen hiperpolarización en neuronas del asta dorsal y núcleo trigeminal (Grudt y cols., 1995), sugieren que estos receptores se encuentran localizados en neuronas de proyección (PN). Además, se ha sugerido la participación de la vía descendente de la sustancia gris pericueductal (PAG) en estos efectos (Lin y cols., 1996).

A nivel supraespinal, el receptor 5-HT_{1A} ejerce una influencia facilitatoria indirecta en el locus cerúleo por inhibición del disparo de ININ GABAérgicas (Gobert y cols., 2000). Por otro lado, los autorreceptores 5-HT_{1A} localizados en el núcleo del rafé magno y otros núcleos serotoninérgicos ejercen un pronunciado efecto inhibitorio (Millan y cols., 1999). En el PAG, la activación de receptores 5-HT_{1A} junto con receptores μ refuerzan el sistema descendente inhibitorio (DI), ya que sinérgicamente suprimen la liberación de GABA (Kishimoto y cols., 2001). Finalmente, también se ha asociado de manera indirecta al receptor 5-HT_{1A} con la antinocicepción producida por modulación del sistema colinérgico (Galeotti y cols., 1997).

2.1.3.3.2 Receptor 5-HT_{1B}

El receptor 5-HT_{1B} fue originalmente caracterizado en roedores de acuerdo a criterios operacionales (Pedigo y cols., 1981). Años más tarde se detectó otro receptor en bovinos y se clasificó inicialmente como 5-HT_{1D} (Heuring y Peroutka, 1987). Sin embargo, ambos receptores presentaban similitudes en su mecanismo transduccional, función y distribución, pero no en su farmacología.

En el humano, el receptor 5-HT_{1B} se clasificó originalmente como 5-HT_{1D}, y en base a su homología con el receptor RDC4 en perro se reclasificó como 5-HT_{1D α} y 5-HT_{1D β} , debido a que se encontraron dos genes homólogos a este receptor en el humano, que al ser expresados presentaban la farmacología descrita para el receptor 5-HT_{1D}.

La controversia se aclaró cuando el receptor 5-HT_{1B} de roedor y 5-HT_{1D β} en el humano fueron clonados y se encontró que compartían una homología del 97%. De hecho, las diferencias farmacológicas de estos dos homólogos son atribuidas a una mutación puntual del aminoácido Asp¹²³ por Arg¹²³. De acuerdo con esto, el receptor humano 5-HT_{1D β} ahora se conoce como 5-HT_{1B} y se encuentra localizado en el cromosoma 6q13, sin embargo, es importante señalar que ahora las características operacionales son definidas por el receptor 5-HT_{1B} humano. En este sentido, este receptor al igual que todos los de la familia 5-HT₁ se encuentra acoplado negativamente a adenilato ciclasa y su activación refuerza corrientes de K⁺ contribuyendo inhibitoriamente en la excitabilidad neuronal (Le Grand y cols., 2000).

En el SNC, se ha reportado que este receptor puede servir como autorreceptor o heterorreceptor controlando la liberación de acetilcolina, glutamato, dopamina, noradrenalina y GABA (Pauwels, 1997). Dentro de las aplicaciones terapéuticas destaca su propiedad antimigrañosa. Tentativamente se le han atribuido otros efectos al receptor que incluyen hipofagia, hipotermia y erección. Además, el ratón KO tiene un comportamiento altamente agresivo.

En cuanto a su farmacología, existen diversos agonistas caracterizados, como el RU 24969, MK 462 (rizatriptán), BW 311C90 (zolmitriptán), SKF 99101H, GR 46611, L 694247, CP 93129, LY 334370 y sumatriptán. Pero algunas de estas moléculas podrían tener alta afinidad por los receptores 5-HT_{1F} (sumatriptán, LY 334379) o 5-HT_{1D} (L 694247). En la actualidad, existen dos agonistas que permiten distinguir entre el receptor humano 5-HT_{1B} (SB 216641) y 5-HT_{1D} (BRL 15572). Con respecto a los antagonistas, los más comúnmente utilizados en roedores, son el pindolol, cianopindolol y SDZ 21009, pero son equipotentes con el receptor 5-HT_{1A} (Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y cols., 2002).

En relación a su distribución en el SNC, los receptores 5-HT_{1B} se han localizado principalmente en la post-sinapsis de las láminas I y IV del asta dorsal, mientras que su expresión en las terminales centrales de las PAF parece ser mínima. Interesantemente diversos estudios demuestran que tanto el mRNA como el receptor se encuentran presentes en fibras C y A δ , sugiriendo un papel en la reducción de la extravasación neurogénica. La extravasación neurogénica está implicada junto con la vasodilatación directa de vasos cerebrales en la patogénesis de la migraña. De hecho, hay un interés creciente de tratar la migraña utilizando agonistas 5-HT_{1B} que actúen a nivel post-sináptico del núcleo trigeminal (Mitsikostas y Del Río, 2001; Millan, 2002).

Por lo que concierne al nivel supraespinal, hay una densidad marcada de receptores 5-HT_{1B} en la PAG y NTS, pero no hay evidencia que demuestre que el receptor ejerce una modulación nociceptiva en estas vías descendentes. Por el contrario, se ha reportado que el receptor 5-HT_{1B} ejerce una influencia inhibitoria en las vías ascendentes colinérgicas y en las vías descendentes del NRM, sitio de acción del acetaminofén (Millan, 2002).

2.1.3.3.3 Receptor 5-HT_{1D}

El receptor humano inicialmente llamado 5-HT_{1D α} (ahora llamado 5-HT_{1D}) por su similitud farmacológica con el receptor 5-HT_{1D β} (ahora llamado 5-HT_{1B}) resultó ser homólogo al receptor 5-HT_{1D} descubierto en rata, que se encuentra localizado sobre el cromosoma humano 1p34.3-p36.3, tiene un acoplamiento celular negativo a adenilato ciclasa y es capaz de formar heterodímeros con el receptor 5-HT_{1B} (Barnes y Sharp, 1999; Xie y cols., 1999).

En relación a su farmacología diversos compuestos que tienen alta afinidad por el receptor 5-HT_{1D}, también la tienen por el receptor 5-HT_{1B} (GR 127935, GR 125743). Aunque recientemente se ha reportado un agonista selectivo 5-HT_{1D} (PNU 109291) que promete ser un agente terapéutico para tratar la migraña (Barnes y Sharp, 1999; Cutrer y cols., 1999).

Este receptor se expresa en DGR y TG de fibras C peptidérgicas tanto en cobayos, como en humanos. Al igual que el receptor 5-HT_{1B} participa en la inhibición de la liberación de neurotransmisores en la periferia, su participación para modificar la liberación de neurotransmisores en la terminal central permanece por demostrarse (Hou y cols., 2001).

Respecto a la expresión intrínseca del receptor 5-HT_{1D}, existe evidencia que se expresa en la lámina X de la médula espinal y en el núcleo trigeminal del tallo cerebral. Esta localización tanto en terminales centrales de PAF como en neuronas intrínsecas de la DH sugiere un papel antinociceptivo de este receptor. Sin embargo, su papel preciso en comparación con los receptores 5-HT_{1B} requiere estudios funcionales. A nivel supraespinal el receptor está concentrado en ciertas regiones como el globo pálido y la sustancia negra pero en ninguna que tenga que ver con estructuras involucradas en la modulación descendente (Barnes y Sharp, 1999; Millan, 2002).

2.1.3.3.4 Receptor 5-ht_{1E}

El receptor 5-ht_{1E} se identificó en estudios de “binding” en homogenados de corteza frontal humana. Se encuentra acoplado negativamente a adenilato ciclasa, su secuencia peptídica contiene 365 aa y su gen se ha mapeado en el cromosoma humano 6q14-q15, sin embargo su funcionalidad hasta la fecha es desconocida. Asimismo, no existen ligandos selectivos para este receptor, pero se sabe que tiene alta afinidad por 5-HT y baja por 5-CT y sumatriptán. En cuanto a la distribución de este receptor, se ha encontrado su mRNA en la corteza entorinal, caudado, putamen, amígdala y regiones hipotalámicas (Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y cols., 2002).

2.1.3.3.5 Receptor 5-ht_{1F}

El gen del receptor 5-ht_{1F} originalmente se detectó en ratón en base a la homología de su secuencia con los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} (Amlaiky y cols., 1992). Inicialmente fue llamado 5-ht_{1Eβ} basándose en su similitud farmacológica, incluyendo su baja afinidad por 5-CT. Sin embargo, la distribución del mRNA es diferente en ambos receptores (Barnes y Sharp, 1999).

El receptor consiste de una proteína de 366 aa acoplada negativamente a adenilato ciclasa y cuyo gen humano se encuentra localizado en el cromosoma 3p11. En cuanto a su distribución y función poco se conoce, pero se ha identificado el mRNA de este receptor en regiones del SNC como el hipocampo, estriado, corteza, hipotálamo, tálamo, núcleo del rafé dorsal, PAG y NTS; pudiendo ser estas últimas cinco regiones importantes en la modulación del dolor. Su distribución sugiere que el receptor podría estar desempeñando un papel como autorreceptor (Hoyer y cols., 2002; Millan, 2002).

En relación a su farmacología el sumatriptán tiene alta afinidad por este receptor. Además, recientemente se ha desarrollado un agonista selectivo (LY

334370) que pudiera ser importante como agente antimigrañoso. En este sentido, se ha reportado que el receptor 5-HT_{1F} podría estar implicado en el control de la extravasación neurogénica en PAF que inervan las meninges pero no todos los datos publicados concuerdan al respecto. Se ha observado también que estos receptores se expresan en terminales centrales y en neuronas intrínsecas del núcleo trigeminal, lo que sugiere un papel antinociceptivo pre- y post-sináptico a este nivel, mientras que a nivel de la médula espinal la modulación parece llevarse solo a nivel pre-sináptico (Millan, 2002).

2.1.3.3.6 Receptor 5-HT_{2A}

Históricamente el receptor 5-HT_{2A} se clasificó como receptor D (Gaddum y Picarelli, 1957) y 5-HT₂ (Peroutka y Snyder, 1979). Se encuentra localizado en el cromosoma humano 13q14-q21, contiene 471 aa (rata, ratón y humano), al igual que todos los miembros de esta familia, se encuentra acoplado positivamente a fosfolipasa C y disminuye corrientes de K⁺. Además, contiene sitios para glicosilación, fosforilación y palmitoilación (Hoyer y cols., 2002).

La familia de receptores 5-HT₂ se caracteriza por su baja afinidad a 5-HT y una alta afinidad por agonistas (DOI, DOB y DOM) y antagonistas 5-HT₂ (ritanserina e ICI 170809). En este sentido, los antagonistas ketanserina y espiperona son cerca de dos órdenes de magnitud más selectivos para el 5-HT_{2A} en relación con los otros miembros de esta familia, sin embargo, tienen afinidad por otros receptores de monoaminas. Recientemente se han desarrollado nuevos antagonistas potentes y selectivos para el receptor 5-HT_{2A} (MDL 100907, SB 200646, SB 206553).

En cuanto a sus acciones neuroendócrinas y neuroquímicas, se ha demostrado que aumenta la liberación de cortisol, ACTH, oxitocina, renina, prolactina y disminuye la de noradrenalina. Conductualmente es responsable de síndromes como las sacudidas de perro mojado y del tren posterior en rata, y las sacudidas de cabeza en ratón. La aplicación terapéutica principal radica en el uso de antagonistas

no selectivos (olanzapina, clozapina, seroquel) como antipsicóticos. Además, cabe señalar que el efecto alucinógeno producido por el LSD es debido a su acción sobre el receptor 5-HT_{2A} (Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y cols., 2002).

En relación a su distribución, se ha reportado que existe una cantidad de receptores 5-HT_{2A} moderada en las terminales centrales de las PAF, aunque hay que tener en mente diversos reportes que los localizan en PN e inhibiendo la liberación de NA de manera indirecta. Estos reportes le dan al receptor 5-HT_{2A} un papel pronociceptivo en la médula espinal, pero también existen reportes de su participación antinociceptiva a este nivel, estimulando ININ GABAérgicas y glicinérgicas que hacen sinapsis en terminales de PAF y PN. De hecho, algunos estudios han documentado que pueden mediar acciones antialodínicas y suprimir la nocicepción inflamatoria. Además, se ha postulado la participación de estos receptores en la antinocicepción producida por administración espinal de inhibidores COX-2 (Millan, 2002).

A nivel supraespinal, se encuentran localizados en corteza y ganglios basales, así como en núcleos importantes en la modulación descendente del dolor (PBN, NTS, RVM, PAG, NRM y LC), aunque hasta la fecha no existe evidencia directa de su participación, se cree que el receptor 5-HT_{2A} está involucrado en la antinocicepción inducida por morfina en la RVM y PAG (Hoyer y cols., 2002; Millan, 2002).

2.1.3.3.7 Receptor 5-HT_{2B}

La última introducción a la familia de receptores 5-HT₂ fue el receptor 5-HT_{2B}. Este receptor media la contracción del músculo liso del fondo del estómago y aunque originalmente fue clasificado como 5-HT_{1-like}, 5-HT_{1F} o SRL, en la actualidad ha sido reclasificado como 5-HT_{2B}. Contiene 481 aa y se encuentra localizado en el cromosoma humano 2q36.3-2q37.1, al igual que los otros dos miembros de esta familia, su activación estimula la hidrólisis de fosfatidilinositol.

De acuerdo a su farmacología los agonistas que presentan alguna selectividad son 5-MeOT, α -Me-5-HT y BW723C86, mientras que los antagonistas más selectivos desarrollados hasta la fecha son el SB 204741 y RS 127445. Estudios conductuales han reportado que la activación de este receptor posee propiedades ansiolíticas, produce hiperfagia, reduce la frecuencia de acicalamiento y media la vasorelajación de manera dependiente del endotelio en diversos vasos. Por lo que el antagonista SB 200646 se ha indicado para el tratamiento de la migraña (Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y cols., 2002).

En cuanto a su distribución, el receptor se encuentra presente principalmente en células endoteliales, en tanto, que en el sistema nervioso exhibe muy bajos niveles. Aunque se han detectado niveles bajos en amígdala, hipotálamo dorsal, septo lateral, cerebelo, DRG y neuronas intrínsecas del asta dorsal (Barnes y Sharp, 1999; Millan, 2002).

2.1.3.3.8 Receptor 5-HT_{2C}

El receptor 5-HT_{2C} se describió originalmente en diversas especies del plexo coroideo mediante estudios de “binding” con [³H]-5-HT. Este receptor podía ser marcado con [³H]-mesulergina, [³H]-LSD, pero no [³H]-ketanserina (Pazos y cols., 1984). Se clasificó originalmente como 5-HT_{1C} por su alta afinidad a 5-HT, sin embargo, una vez que fue clonado y se obtuvo más información acerca de él, se le reclasificó a la familia 5-HT₂ como 5-HT_{2C}. Se encuentra acoplado positivamente a fosfolipasa C, el gen que codifica al receptor está localizado en el cromosoma humano Xq24 y al menos hay 14 isoformas de este receptor debido a la edición que lleva a cabo la adenina desaminasa en el mRNA del receptor (Fitzgerald y cols., 1999; Barnes y Sharp, 1999).

La mayoría de los agonistas (DOI, mCPP) y antagonistas (ritanserina, LY53857, mesulergina, mianserina) no distinguen lo suficiente entre los receptores (Hoyer y cols., 1994). Sin embargo, los receptores 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} pueden ser

distinguidos del receptor 5-HT_{2A} por su alta afinidad para el SB 200646A y SB 206553 y baja afinidad por los antagonistas MDL 100907, ketanserina y espiperona. Recientemente se han desarrollado dos antagonistas (SB 242084, RS-102221) con al menos dos ordenes de magnitud, respecto a los otros dos receptores de esta familia; así también se han reportado agonistas moderadamente selectivos como el Ro 600175 y MK 212 (Barnes y Sharp, 1999).

Dentro de sus funciones, la activación del receptor produce ansiogenésis, hipoactividad, hipofagia, incremento en la erección penil y dicinesia oral. Además, se ha observado que su activación produce la inhibición tónica de la transmisión dopaminérgica y adrenérgica, pero no serotoninérgica en la corteza frontal. Por otro lado, los ratones “KO” para el receptor 5-HT_{2C} presentan convulsiones espontáneas, deterioro en la memoria, incremento en la ingesta de comida y obesidad (Hoyer y cols., 2002).

A nivel del asta dorsal existen poblaciones del receptor 5-HT_{2C} en láminas superficiales y profundas del asta dorsal, incluyendo la lámina X, están localizados principalmente sobre neuronas de proyección, pero también se encuentran sobre las terminales centrales de las PAF. Su distribución concuerda con su papel pronociceptivo en el asta dorsal. Hasta la fecha solo existe un estudio funcional en el modelo de “tail-flick”, en el cual se propone que los receptores 5-HT_{2C} potencian las acciones pronociceptivas de agonistas 5-HT_{1A} en el asta dorsal (Bervoets y cols., 1990; Millan y cols., 1997).

A nivel supraespinal, el receptor 5-HT_{2C} se encuentra localizado principalmente en el plexo coroideo, pero también se ha identificado su mRNA en núcleos importantes en la modulación del dolor como PAG, PBN, NTS, RVM y LC. Cabe mencionar que en este último núcleo el receptor se encuentra sobre ININ GABAérgicas ejerciendo una influencia inhibitoria pronunciada e indirecta en la transmisión dopaminérgica y noradrenérgica. Sin embargo, también se ha reportado

una influencia excitatoria en vías histaminérgicas provenientes de los cuerpos tuberomamilares al asta dorsal (Millan, 2002).

2.1.3.3.9 Receptor 5-HT₃

El receptor 5-HT₃ es el receptor M descrito por Gaddum y Picarelli (1957), contiene 487 aa y presenta una gran identidad con la superfamilia de receptores acoplados a canales iónicos (nicotínicos, glicina y GABA_A), su gen se encuentra localizado en el cromosoma 11q23.1-q23.2 y su estructura cuaternaria está formada por 5 subunidades. La activación de este receptor dispara una despolarización rápida debida a una corriente transitoria no selectiva de cationes (Na⁺, K⁺, Ca²⁺). Hasta la fecha, se han caracterizado dos isoformas con perfil farmacológico similar, distribución y características electrofisiológicas cuando son expresadas como homómeros. Aunque recientemente la literatura ha reportado la clonación de una tercera subunidad, de la cual no ofrecen más detalles.

Dentro de su farmacología se encuentran los antagonistas ondansetrón, granisetron y tropisetron.

Se ha reportado que dentro de sus acciones neuroquímicas, la activación del receptor 5-HT₃ aumenta la liberación de serotonina, GABA, CCK y dopamina, pero inhibe la liberación de glutamato y acetilcolina, estas acciones probablemente contribuyen de manera directa o indirecta a los efectos conductuales observados. En este sentido, la administración de antagonistas 5-HT₃ produce ansiólisis, refuerza la memoria y disminuye la psicosis. Además, la principal aplicación terapéutica de los antagonistas 5-HT₃ se da en quimioterapia y radioterapia para inhibir la náusea y el vómito que provocan estos tratamientos y se ha postulado su aplicación en el tratamiento de la migraña, pero su uso no ha logrado materializarse en estudios clínicos (Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y cols., 2002).

En cuanto a su participación en dolor, se ha observado que los receptores 5-HT₃ se encuentran localizados en las terminales centrales de las fibras C que inervan principalmente la lámina I del asta dorsal donde al parecer aumentan la liberación de SP vía la generación de ON, también se ha comprobado su distribución en ININ GABAérgicas y opioidérgicas en láminas superficiales (I y II) y profundas que ramifican a las láminas superficiales, las cuales reciben inervación de vías descendentes serotoninérgicas. Sin embargo, no se debe descartar su distribución en EXIN y PN. Por otro lado, su localización en terminales periféricas aumenta la inducción del dolor inflamatorio, el cual se potencia por la presencia de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₄ localizados en las terminales.

A nivel supraespinal, los receptores 5-HT₃ se encuentran localizados en el área postrema, hipocampo, núcleo motor dorsal y NTS. En este sentido, los receptores 5-HT₃ se expresan en fibras aferentes vagales que inervan el NTS, el cual transmite la información nociceptiva a controles descendentes localizados en la RVM. Además, la expresión de receptores 5-HT₃ en terminales periféricas de estas fibras participa en la inducción del dolor cardíaco y visceral.

Por último, debemos señalar que algunos fármacos como el óxido nitroso y anestésicos generales producen sus efectos antinociceptivos a través de este receptor, mientras que otros como el halotano e isoflurano potencian la apertura del canal catiónico (Hoyer y cols., 2002; Millan y cols., 2002).

2.1.3.3.10 Receptor 5-HT₄

El receptor 5-HT₄ inicialmente se caracterizó a finales de la década de los 80's (Bockaert y cols., 1992) aunque su existencia fue especulada 20 años antes en el colículo de la rata. Se encuentra acoplado positivamente a adenilato ciclasa donde su activación cierra corrientes de K⁺ y abre corrientes de Na⁺ de canales resistentes a tetrodotoxina. Su gen se ha mapeado en el cromosoma humano 5q31-33 y se han identificado diversas isoformas generadas por "splicing" (5-HT_{4A-H}).

Dentro de sus funciones se encuentra mediando la secreción y motilidad del intestino mediante la liberación de acetilcolina, en músculo cardíaco la activación del receptor 5-HT₄ produce un efecto cronotrópico e inotrópico positivo en diversas especies, en SNC aumenta la liberación de diversos neurotransmisores como dopamina, GABA, 5-HT y acetilcolina, por lo que se ha observado que su activación mejora la memoria. Asimismo se ha reportado se existencia en músculo liso.

En la actualidad hay diversos agonistas (BIMU 8, RS 67506, ML 10302) y antagonistas (GR 113808, SB 204070, SB 203186, RS 23597-190, RS 39604) potentes y selectivos que podrían tener aplicación terapéutica en diversos desórdenes como la arritmia cardíaca, incontinencia urinaria, trastornos gastrointestinales y enfermedades neurodegenerativas. La cisaprida se emplea como gastroprotector y el tegaserod en constipación (Hoyer y cols., 2002).

En cuanto al sistema nervioso, el receptor 5-HT₄ se encuentra localizado en PAF de tipo C, tanto en terminales periféricas como en terminales centrales ejerciendo un papel pronociceptivo, además se sugiere su existencia en PN complementando este papel en el DH de la médula espinal. A nivel supraespinal el receptor se encuentra principalmente en PAG, NTS y PBN, pero el efecto antinociceptivo observado por administración i.c.v. de agonistas 5-HT₄ no se debe a vías descendentes serotoninérgicas, por lo que se sugiere, aunque no ha sido comprobado que el efecto antinociceptivo involucra vías descendentes colinérgicas, ya que se ha establecido bien que el receptor 5-HT₄ facilita la transmisión ascendente colinérgica (Millan, 2002).

2.1.3.3.11 Receptor 5-ht_{5A}

El receptor 5-ht_{5A} se ha mapeado en el cromosoma humano 7q36.1 y se ha sugerido que se encuentra acoplado negativamente a adenilato ciclasa en astrocitos (Carson y cols., 1996) y líneas celulares C6, HEK 293 y Sf9 (Francken y cols., 2000), sin embargo, puede estar acoplado positivamente a AMPc y a canales de K⁺

rectificadores. En cuanto a su distribución, se encuentra localizado principalmente en la glia de hipotálamo, hipocampo, cuerpo calloso y ventrículos cerebrales (Hoyer y cols., 2002).

En cuanto a su distribución en regiones importantes en la transmisión del dolor, se ha reportado su presencia en el núcleo trigeminal y aunque no se examina la localización precisa del receptor 5-ht_{5A} en las PAF, la identificación del mRNA sugiere la expresión en estas fibras, así también, parece probable su presencia en neuronas intrínsecas a la médula espinal. Pero el verdadero interés sobre este receptor radica en el hecho de que su distribución a nivel supraespinal, se concentra en núcleos importantes en la modulación descendente del dolor (hipotálamo, NTS, RVM, NRM, PAG, LC), pero hasta la fecha no existen estudios directos que demuestren su papel (Millan, 2002).

2.1.3.3.12 Receptor 5-ht_{5B}

El receptor púttativo 5-ht_{5B} ha sido mapeado en el cromosoma humano 2q11-q13, sin embargo, se ha observado que este gen falla en codificar una proteína funcional debido a la presencia de codones de paro en su secuencia, por lo que no parece ser funcional en humanos (Hoyer y cols., 2002, Millan, 2002).

2.1.3.3.13 Receptor 5-ht₆

El receptor 5-ht₆ fue clonado en base a su homología con otros receptores (Monsma y cols., 1993; Ruat y cols., 1993), contiene 438 aa y se encuentra localizado en el cromosoma humano 1p35-p36, se encuentra acoplado positivamente a adenilato ciclasa, se distribuye principalmente en tejido neuronal, concretamente en estriado, núcleo accumbens, corteza, hipocampo y tubérculo olfatorio. Actualmente existen diversos agonistas (EMDT) y antagonistas (Ro 630563, SB 271046, SB 357134) que presentan cierta selectividad por el receptor 5-ht₆.

Con la finalidad de determinar sus posibles funciones fisiológicas diversos estudios han reportado que la administración de antagonistas 5-ht₆ y/o oligonúcleotidos antisentido refuerza la memoria, disminuye la ingesta de comida y el peso corporal y produce un síndrome dependiente de la liberación de acetilcolina que consiste en bostezos, masticaciones y estiramientos. En este mismo sentido, se ha observado que el receptor putativo podría estar participando en la patogénesis de desordenes psiquiátricos debido a que diversos agentes antipsicóticos (clozapina, olanzapina, fluperlapina, seroquel) y antidepresivos (clomipramina, amitriptilina, doxepina y nortriptilina) actúan como antagonistas 5-ht₆ (Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y cols., 2002).

En relación a su posible papel en dolor, la evidencia publicada en relación a la presencia del receptor 5-ht₆ en DRG y neuronas intrínsecas de la médula espinal resulta contradictoria hasta la fecha, por lo que su presencia queda por confirmarse en estudios posteriores, así también, a nivel supraespinal la presencia del receptor putativo (5-ht₆) no parece ser importante en regiones de modulación descendente (Millan, 2002).

2.1.3.3.14 Receptor 5-HT₇

Ahora ha quedado bien establecido que este receptor, es el receptor descrito como 5-HT₁-like que media la relajación del íleo de cobayo y vena safena del gato (Feniuk y cols., 1983). Su cadena peptídica contiene 445 aa y se encuentra localizado en el cromosoma humano 10q23.3-q24.4. Presenta una alta homología interespecie (>90 %) pero baja homología con otros miembros de la familia 5-HT (<50 %) (Hoyer y cols., 2002).

Este receptor incrementa los niveles de AMPc mediante la activación de las isoformas de adenilato ciclasa insensibles a calcio (AC1 y AC8), así como la isoforma sensible AC5 (Baker y cols., 1998), aunque también se ha observado que activa a la proteincinasa activada por mitógenos (MAPK) en cultivos primarios neuronales

(Errico y cols., 2001). El cDNA contiene dos intrones, uno localizado en la segunda asa intracelular (Bard y cols., 1993) y el segundo en el extremo carboxilo (Ruat y cols., 1993), responsable de al menos cuatro isoformas reportadas para el receptor (5-HT_{7A-D}) que difieren en su extremo carboxilo terminal (Heidmann y cols., 1997), pero no en su farmacología, distribución o mecanismo de transducción (Heidmann y cols., 1998). Además, el receptor tiene sitios consenso para N-glicosilación en el extremo amino terminal y sitios de fosforilación para PKA y PKC en la tercer asa intracelular y carboxilo terminal (Heidmann y cols., 1997).

El perfil farmacológico de este receptor se caracteriza por su alta afinidad por agonistas 5-HT₁ (5-CT, 5-MeOT, 8-OH-DPAT), así como por agonistas (LSD) y antagonistas 5-HT₂ (ritanserina, metergolina, metisergida, mesulergina). Actualmente se tienen antagonistas selectivos a este receptor, particularmente SB 258719 y SB 269970 (Thomas y cols., 1998; Hagan y cols., 2000).

En cuanto a su distribución en el SNC, se ha detectado un modesto nivel de receptores 5-HT₇ en el asta dorsal de la médula espinal, pero posiblemente, estos se encuentren localizados en las terminales centrales de las PAF ya que el mRNA se ha detectado en el ganglio trigeminal (Terrón y cols., 2001) y DRG, pero no en la médula espinal (Gustafson y cols., 1996; Pierce y cols., 1996; Wu y cols., 2001).

En relación a las terminales centrales de las PAF, hay evidencia electrofisiológica que sugiere un papel pronociceptivo de estos receptores vía la generación de AMPc, el cual genera una corriente de cationes activada por hiperpolarización (I_H), lo que refuerza la liberación de neurotransmisores e incrementa la excitabilidad de estas fibras (A δ). Interesantemente, este mismo fenómeno se ha observado en terminales centrales de fibras A β , lo que sugiere la participación de estos receptores en la mediación de la alodinia mecánica (Cardenas y cols., 1999, 2001; Chapin y Andrade, 2001 a,b). Asimismo, se ha postulado que estos receptores participan en el padecimiento de la migraña debido al efecto excitador que ejercen sobre las PAF y la vasodilatación cerebral que producen (Terrón, 1998).

A nivel supraespinal, las regiones que ofrecen una concordancia fuerte entre el mRNA y la expresión del receptor incluyen al hipotálamo, tálamo y regiones corticales, aunque otras regiones como el hipocampo, núcleo del rafé dorsal, sustancia negra y PAG presentan moderados niveles del receptor (Gustafson y cols., 1996). Estudios recientes de inmunohistoquímica demostraron evidencia de la localización pre y postsináptica del receptor 5-HT₇ a nivel de la medula espinal dorsal de rata (Doly y cols., 2005).

A pesar de la evidencia que señala un papel pronociceptivo del receptor 5-HT₇, solo se ha realizado un estudio conductual a nivel periférico local y espinal en un modelo de dolor inflamatorio (Rocha y cols., 2005) que demuestra el papel que desempeña este receptor en la transmisión del dolor.

3. JUSTIFICACIÓN

El receptor 5-HT₇ pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (Vanhoenacker y cols., 2000), su activación incrementa los niveles de AMPc (Tsou y cols., 1994) y existen al menos cuatro isoformas (5-HT_{7A-D}) que difieren en su extremo carboxilo terminal (Heidmann y cols., 1997), pero no en su farmacología, distribución o mecanismo de transducción (Heidmann y cols., 1998). En cuanto a su distribución en el sistema nervioso, se ha detectado la proteína y el mRNA en el ganglio de la raíz dorsal (Pierce y cols., 1996; Meuser y cols., 2002), asimismo se han descrito receptores 5-HT₇ en el asta dorsal de la médula espinal (Gustafson y cols., 1996; Meuser y cols., 2002; Doly y cols., 2005). Por su parte, la evidencia electrofisiológica relaciona al receptor 5-HT₇ con la apertura de canales de Ca²⁺ (Baker y cols., 1998; Lenglet y cols., 2002) y la generación de una corriente de cationes activada por hiperpolarización (I_H) que refuerzan la liberación de neurotransmisores e incrementan la excitabilidad de fibras A δ y A β (Cardenas y cols., 1999, 2001; Chapin y Andrade, 2001 a,b). No obstante, a pesar de la evidencia que señala un papel pronociceptivo del receptor 5-HT₇, solo se tiene conocimiento de un estudio conductual a nivel periférico local y espinal en un modelo de dolor inflamatorio (Rocha y cols., 2005). Como se ha mencionado existen varios tipos de dolor y así diversos mecanismos que participan a diversos niveles por lo que se hace necesario utilizar además del modelo de dolor inflamatorio, también modelos de dolor nociceptivo y neuropático a nivel no solo periférico local y espinal, sino también sistémico que nos sugerirá la posible participación del receptor 5-HT₇ también a nivel central y demostrar el papel que desempeña este receptor en el procesamiento de los diversos tipos de dolor.

4. HIPÓTESIS

- ✓ El receptor 5-HT₇ participa en el procesamiento del dolor a diferentes niveles en diversos modelos de dolor en rata.

5. OBJETIVO

5.1 OBJETIVO GENERAL

✓ Determinar la participación del receptor 5-HT₇ en diversos modelos de dolor.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto del antagonista selectivo 5-HT₇ (SB-269970) a nivel periférico, espinal y sistémico empleando el modelo de plancha caliente.
- Evaluar el efecto del antagonista selectivo 5-HT₇ (SB-269970) a nivel periférico, espinal y sistémico empleando el modelo de formalina al 1%.
- Determinar el efecto de SB-269970 sobre el efecto pronociceptivo de la 5-CT a nivel periférico en el modelo de formalina al 0.5%.
- Evaluar el efecto de SB-269970 a nivel periférico, espinal y sistémico en el modelo de Kim y Chung de neuropatía.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar hembra con un peso corporal de 180-220 g provenientes del Bioterio del CINVESTAV (Sede Sur). Las ratas se mantuvieron con libre acceso a agua y alimento. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las guías sobre aspectos éticos para la investigación del dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983). Adicionalmente, el estudio fue aprobado por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales del Departamento (Farmacobiología, CINVESTAV). Cada rata se utilizó sólo una vez y se sacrificó en una cámara con CO₂ al final de cada experimento.

6.2 FÁRMACOS

En el presente estudio se utilizaron los siguientes fármacos comprados en Sigma: Cloruro de (R)-3-(2-(2-(4-metilpiperidin-1-il)etil)pirrolidin-1-sulfonil)fenol (SB-269970) y 5-Carboxamidatriptamina (5-CT). Los fármacos se diluyeron en solución salina isotónica que sirvió como vehículo para su administración.

6.3 PREPARACIÓN DE FORMALINA

La formalina es una solución diluida de formaldehído comercial (37% w/v Merck-México, S.A., México, D.F.). El formaldehído al 37% se considera como formalina al 100% y de éste se realizaron las diluciones adecuadas para obtener formalina al 1% y 0.5%.

6.4 PREPARACIÓN DE LA CÁNULA

Inicialmente el catéter de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) se corta en pedazos de aproximadamente 10 cm. Después, cada fragmento se anuda ligeramente por la mitad, el nudo se fija con metilmetacrilato y la cánula se estira al doble por uno de sus extremos. Finalmente, la cánula se corta en el extremo que fue estirado 8 cm después del nudo. Previo a la cirugía las cánulas se mantuvieron inmersas en una solución de etanol al 70% y antes de utilizarse se limpiaron con solución salina.

6.5 METODOLOGÍA

6.5.1 Canulación intratecal

Para evaluar el papel que tiene el receptor 5-HT₇ en el procesamiento del dolor a nivel espinal fue necesario llevar a cabo el método de canulación intratecal crónico descrito por Yaksh y Rudy (1976). Las ratas se prepararon para cirugía con una mezcla de ketamina-xilazina intraperitoneal (65 y 14 mg, respectivamente, en un volumen de 0.2 mL). Una vez anestesiada la rata, ésta se afeitó de la cabeza y se desinfectó adecuadamente. Posteriormente se colocó en un estereotáxico de tal manera que la cabeza permaneciera en posición horizontal. Se llevó a cabo un ligero corte de la piel que cubre la base del cráneo, se cortó el músculo de manera transversal y se separó del cráneo hasta localizar la membrana atlanto-occipital donde se realizó una incisión ligera y se insertó en dirección caudal un catéter de polietileno (PE-10) aproximadamente 8 cm a lo largo del espacio intratecal. El catéter fue fijado y se suturó la piel. Al finalizar la cirugía, las ratas recibieron 5 mL de solución salina de forma subcutánea para permitirles recuperar algo de líquido perdido durante la cirugía y se colocaron en cajas individuales de acrílico con libre acceso a agua y alimento permitiéndoles un período de recuperación de cinco días antes de ser evaluadas. Cada 24 horas las ratas se evaluaron y aquellas que presentaron deficiencias post-operativas como

flacidez, alodinia, agitación, incoordinación motora, pérdida de peso y deficiencias en los reflejos se descartaron del estudio.

6.5.2 Modelo de plancha caliente

Las ratas fueron entrenadas en el aparato (sin encender) por 10 minutos por 3 días antes de iniciar la prueba. La superficie de la plancha caliente se calentó a una temperatura constante de $52 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Las ratas se colocaron sobre la plancha caliente, la cual estuvo rodeada por un cilindro transparente de Plexiglas, y al presionar el interruptor el medidor de tiempo fue activado. La latencia de respuesta al lamido de la pata trasera o salto hacia el borde del cilindro se consideró como la respuesta nociceptiva. La rata se retiró inmediatamente de la plancha caliente y se devolvió a su caja. Si una rata no reaccionaba dentro de los 30 segundos (punto de corte), la prueba era terminada y la rata retirada de la plancha caliente. Los animales se evaluaron una vez y se sacrificaron en una cámara de CO_2 .

6.5.3 Prueba de la formalina

Las ratas se colocaron en un cilindro de observación (Plexiglas) de 30 centímetros de diámetro con espejos en la parte posterior durante 30 minutos con la finalidad de permitirles adaptarse a su entorno. Después de este período, la rata se retiró de la cámara de observación para realizar la administración de los fármacos. Diez minutos después de la administración de los fármacos la rata se retiró nuevamente para llevar a cabo la administración (subcutánea) de 50 μL de formalina al 0.5 % o 1% (diluida con solución salina 0.9%) en el dorso de la pata posterior derecha utilizando una aguja del No. 30. Después de la administración las ratas se colocaron nuevamente en los cilindros de acrílico y se cuantificó la conducta dolorosa como el número de sacudidas de la pata inyectada en intervalos de 1 minuto cada 5 minutos por 60 minutos ya que se ha descrito que esta conducta es la más consistente (Wheeler-Aceto y Cowan, 1991; Malmberg y Yaksh, 1993). En este modelo la disminución en el número de sacudidas se

traduce como antinocicepción, mientras que un aumento se considera pronociceptivo. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura ambiente entre 25 y 27°C (Tjølsen y cols., 1992).

6.5.4 Modelo de neuropatía

Para producir la neuropatía se realizó el procedimiento descrito por Kim y Chung (1992). Las ratas se prepararon bajo anestesia con una mezcla ketamina-xilazina (45 y 12 mg/kg, respectivamente) administrada intraperitonealmente. Se hizo una incisión parcial en el área lumbar transversa izquierda para aislar y ligar los nervios espinales izquierdos L5 y L6 con una sutura de seda 6-0 justo distal al ganglio de la raíz dorsal y próximo a la formación del nervio ciático. Posteriormente se procedió a suturar la herida. Después de 10-15 días de recuperación postcirugía se evaluó que las ratas no presentaran lesión neuromotora, de ser así se sacrificaba. A un grupo de ratas se les sometió a una segunda cirugía para la colocación de una cánula intratecal.

6.5.5 Prueba de umbral táctil

Para la prueba las ratas se colocaron en cajas de plástico individualmente con un fondo de malla metálica y se ambientaron durante 30 minutos. La prueba de umbral táctil evoca el retiro de la pata con el nervio ligado (izquierdo) al estimular con los filamentos de von Frey. El área estimulada es la parte media de la superficie plantar, sobre la distribución del nervio ciático, evitando la almohadilla de la pata. Se determinó el 50% de umbral de retiro empleando el método arriba-abajo (Dixon, 1980; Chaplan et al., 1994). En el paradigma arriba-abajo, la prueba se inicia con el filamento de 4.31 g, a la mitad de la serie de 20 filamentos de von Frey con incrementos logarítmicos de rigidez o dureza y se ascendió o descendió (1.65 – 6.65 g; Dixon, 1980; Chaplan et al., 1994) en función de la respuesta del animal. Se midió el umbral de retiro tomando como respuesta positiva el retiro de la pata estimulada en un lapso de 10 segundos, denotándose con un símbolo “x”.

La respuesta negativa fue aquella en la que al estimular la pata ésta no era retirada y se marcó con un símbolo “o”. Después del primer cambio, ya sea respuesta positiva o negativa, se llevó a cabo la estimulación otras 4 veces tomando una serie de 6 patrones de respuestas positivas y negativas, así como el último filamento utilizado. Esta estimulación se llevó a cabo a tiempos de 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 minutos después de administrar los compuestos. Los patrones de respuesta fueron tabulados y el 50 % de umbral de respuesta se calculó usando la fórmula (Dixon 1980; Chaplan et al., 1994):

$$50\% \text{ Umbral (g)} = (10^{[Xf + k\delta]}) / 10,000$$

Donde:

Xf : Es el valor del último filamento de von Frey usado (en unidades log).

k : Es el factor de corrección basados en los patrones de respuesta de la tabla de calibración y al valor tabulado en base al patrón de respuestas positivas y negativas.

δ : Son las diferencias de promedio entre estímulos (unidades log).

6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron curvas del número de sacudidas contra el tiempo y se obtuvo el área bajo la curva (ABC) mediante el método de trapezoides (Tallarida y Murray, 1981) de la primera y segunda fase de la prueba de formalina. El ABC se consideró como una expresión global de la intensidad y duración del efecto. Para el modelo de plancha caliente, se graficó la latencia en minutos y el ABC de la latencia contra el tiempo. Para el modelo de neuropatía se calculó el 50% de umbral de retiro y el ABC del umbral de retiro vs tiempo (Chaplan et al., 1994).

Los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media para cada grupo experimental (n =6).

Los datos (ABC) se graficaron en el programa Graphpad Prism 4.0 y el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa SigmaStat 2.03 en

donde una $p < 0.05$ se consideró significativa. Cuando se compararon las diferencias entre más de dos tratamientos se realizó un análisis de varianza seguido de la prueba de Tukey, mientras que cuando se compararon solo dos tratamientos se llevó a cabo una prueba t-Student.

6.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

6.7.1 Curso temporal para el antagonista selectivo 5-HT₇ por vía periférica, espinal y sistémica

La administración periférica, espinal y sistémica del antagonista serotoninérgico se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado en la literatura y a datos preliminares obtenidos en el laboratorio. En este protocolo de investigación se utilizó formalina al 1% para ver un efecto antinociceptivo. Además, formalina al 0.5% para ver un efecto pronociceptivo de 5-carboxamidatriptamina y coadministrar el fármaco antagonista del receptor 5-HT₇ (SB-269970). La administración de los fármacos se realizó 10 min antes de la prueba de plancha caliente (Figura 14) y formalina (Figura 17) y 15 min antes en el modelo de neuropatía (Figura 18). Todos los fármacos se disolvieron previamente en solución salina isotónica y se prepararon el mismo día en que fueron evaluados.

6.7.2 Modelo de plancha caliente

La administración periférica local no se llevó a cabo por razones técnicas, donde no es posible administrar simultáneamente en ambas patas y esperar una respuesta similar. La administración por vía espinal se realizaría de obtener resultados positivos en la administración sistémica.

La administración sistémica se llevó a cabo por vía intraperitoneal en dosis crecientes de SB-269970 (3-10 mg/kg). Con la finalidad de averiguar si la solución salina isotónica administrada por vía sistémica modifica la conducta nociceptiva inducida por la plancha caliente o si ésta es capaz de producir la conducta de

lamido de patas traseras o brinco al borde del cilindro por sí sola se realizó un grupo a nivel sistémico de manera similar tanto en volumen como en tiempo a el antagonista serotoninérgico. En el grupo control se administró salina (intraperitoneal) 10 minutos antes de la evaluación con la plancha caliente en vez del antagonista serotoninérgico.

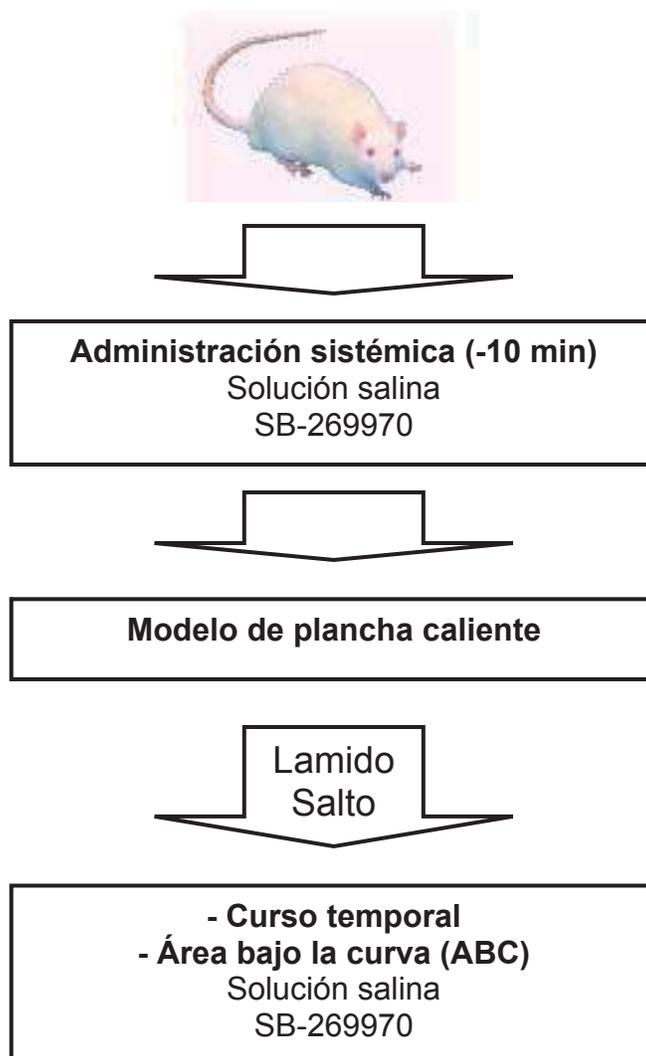


Figura 14. Diagrama de flujo del diseño experimental para el modelo de plancha caliente.

6.7.3 Modelo de formalina



Figura 15. Diseño experimental para las curvas dosis-respuesta de los fármacos.

La administración sistémica se llevó a cabo por vía intraperitoneal en dosis crecientes de SB-269970 (1-10mg/kg). Después de la administración de formalina la conducta de sacudidas se evaluó durante 1 minuto cada 5 minutos por los siguientes 60 minutos.

Por otro lado, la administración por vía espinal se realizó a través de la cánula previamente colocada. Aquí, dosis crecientes de SB-269970 (1-30 μ g) fueron administradas en un volumen de 10 μ L en el espacio intratecal a nivel lumbar 10 minutos antes de administrar formalina. Después de la administración de formalina la conducta de sacudidas se evaluó durante 1 minuto cada 5 minutos por los siguientes 60 minutos.

La administración periférica local se llevó a cabo por vía subcutánea, en donde, dosis crecientes de SB-269970 (1-30 μ g) se administraron en un volumen de 50 μ L en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata 10 minutos antes de administrar formalina. Después de la administración de formalina la conducta de sacudidas se evaluó durante 1 minuto cada 5 minutos por los siguientes 60 minutos.

En base a los mismos criterios utilizados a nivel periférico, espinal y sistémico se utilizó formalina al 1% para evaluar el efecto producido por SB-269970.

6.7.4 Coadministración del agonista no selectivo 5-HT₇ con el antagonista selectivo 5-HT₇ por vía periférica local en el modelo de formalina .

Se coadministró (-10 min) una dosis efectiva del agonista (5-CT) con el antagonista (SB-269970). La concentración de formalina utilizada en la coadministración fue la misma que la utilizada para el agonista sólo y la coadministración se llevó a cabo de la misma manera en tiempo, forma y volumen, de acuerdo a lo anteriormente descrito para la administración del fármaco solo (Figura 15). Con este protocolo (Figura 16) se quiso comprobar la posible participación del receptor 5-HT₇ en el procesamiento del dolor a nivel periférico local en un modelo de dolor de tipo inflamatorio.



Figura 16. Diseño experimental para las coadministraciones.

6.7.5 Grupos controles en la prueba de la formalina

6.7.5.1 Vehículo

Con la finalidad de averiguar si la solución salina isotónica administrada por vía periférica local, espinal o sistémica modifica la conducta nociceptiva inducida por formalina o si ésta es capaz de producir la conducta de sacudidas por sí sola (sin formalina) se realizaron grupos a nivel periférico, espinal y sistémico de manera similar tanto en volumen como en tiempo a el antagonista serotoninérgico. En el primero, segundo y tercer grupo se administró salina (i.t., i.p. ó s.c.) 10 minutos antes de la administración de formalina subcutánea (0.5 ó 1%), mientras que el cuarto grupo recibió solución salina subcutánea en vez de formalina.

6.7.5.2 Tratamiento contralateral

Para averiguar si el efecto nociceptivo o antinociceptivo producido por los fármacos a nivel periférico era debido a una acción local y no a un efecto sistémico se comparó la eficacia del fármaco administrado de manera ipsilateral y contralateral contra el grupo control (salina). Para la estrategia anterior se eligió aquella dosis que mostró la mayor eficacia, la cual sería utilizada para la coadministración.

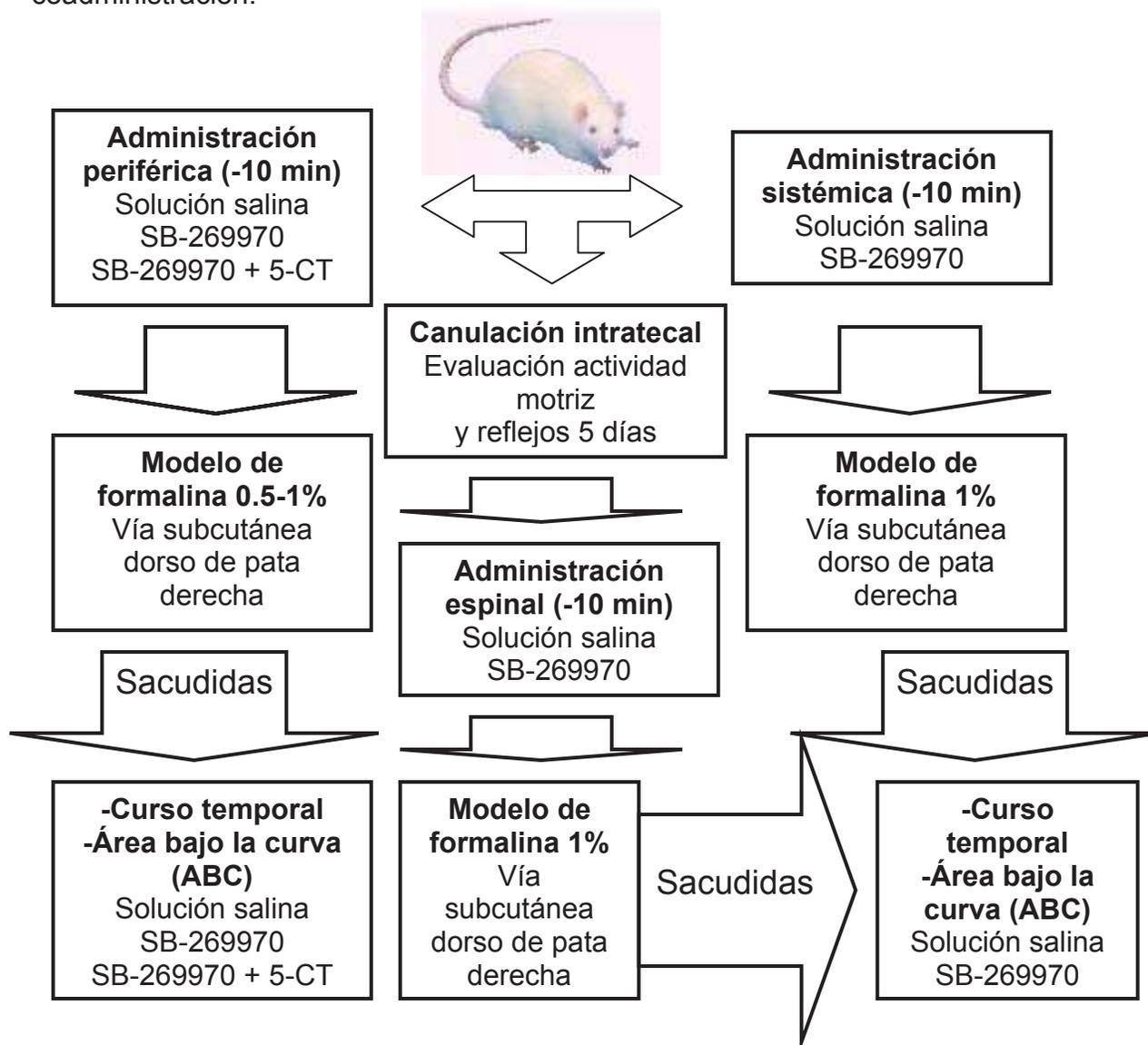


Figura 17. Diagrama de flujo del diseño experimental para el modelo de la formalina.

6.7.6 Modelo de neuropatía

La administración sistémica se llevó a cabo por vía intraperitoneal, en dosis crecientes de SB-269970 (1-10 mg/kg).

La administración por vía espinal se realizó a través de la cánula previamente colocada. Aquí, dosis crecientes de SB-269970 (12.5-50 μ g) fueron administradas en un volumen de 10 μ L en el espacio intratecal 15 minutos antes de evaluar el umbral táctil.

La administración periférica local no se realizó por razones técnicas, donde la administración periférica local intraplantar afecta la evaluación de la alodinia táctil al realizarse en la misma área.

6.7.7 Grupo control en el modelo de neuropatía

Con la finalidad de averiguar si la solución salina isotónica administrada por vía espinal y sistémica modifica la conducta nociceptiva inducida por la ligadura de nervios L-5/L-6 se realizó un grupo a nivel espinal y otro a nivel sistémico de manera similar tanto en volumen como en tiempo a el antagonista serotoninérgico. En el grupo espinal se administró salina (intratecal) 15 minutos antes de la prueba de umbral táctil y en el grupo sistémico se administró salina (intraperitoneal) 15 minutos antes de la prueba de umbral táctil en vez del antagonista serotoninérgico.

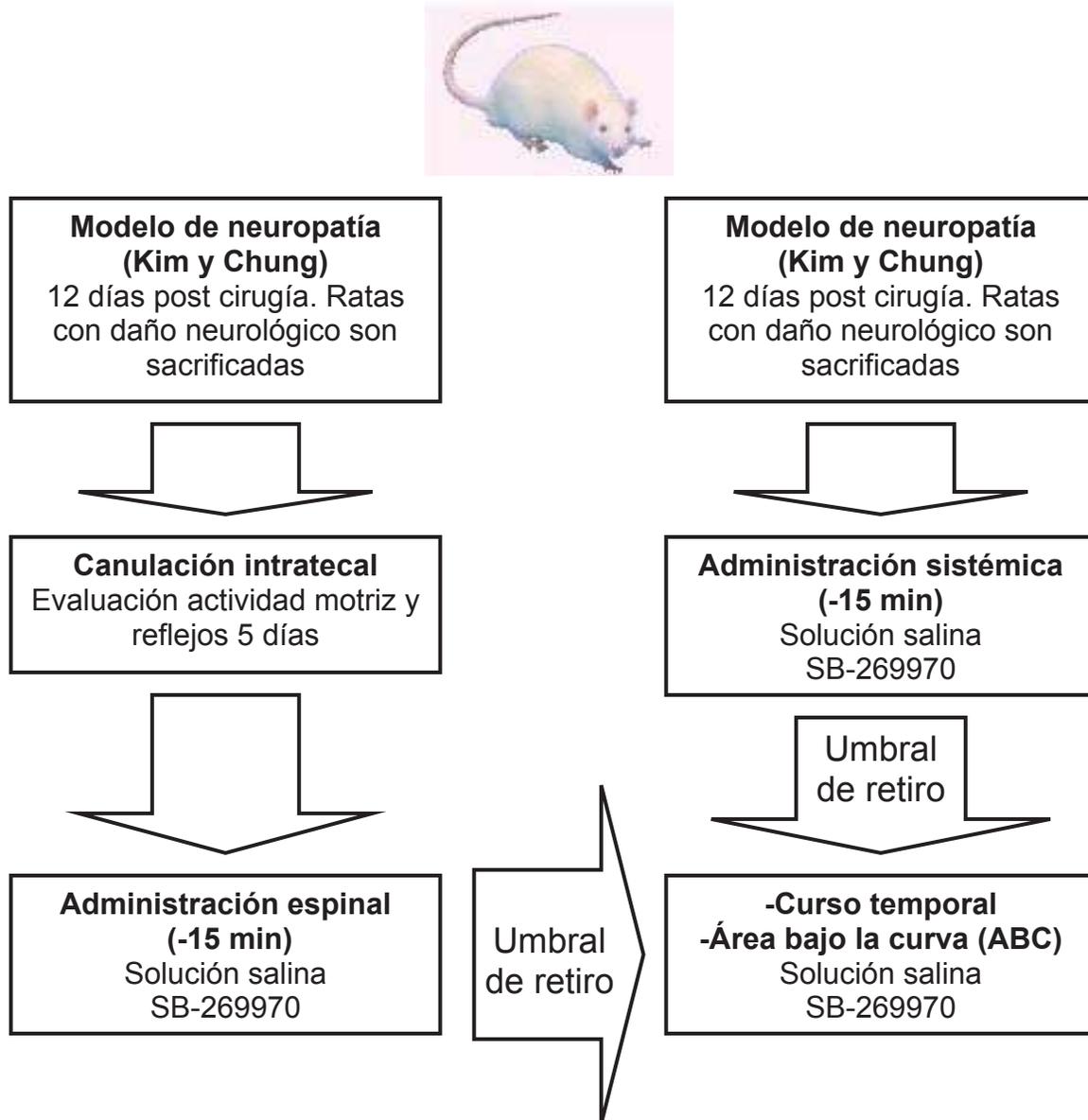


Figura 18. Diagrama de flujo del diseño experimental para el modelo de neuropatía.

7. RESULTADOS

7.1 EVALUACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT₇ EN EL MODELO DE PLANCHA CALIENTE

7.1.1 Efecto del antagonista serotoninérgico a nivel sistémico en el modelo de plancha caliente

La administración sistémica del antagonista del receptor 5-HT₇ SB-269970 mostró una tendencia de aumento de latencia en el modelo de plancha caliente (3-10 mg/kg), pero sin alcanzar diferencia estadística significativa (Figura 19).

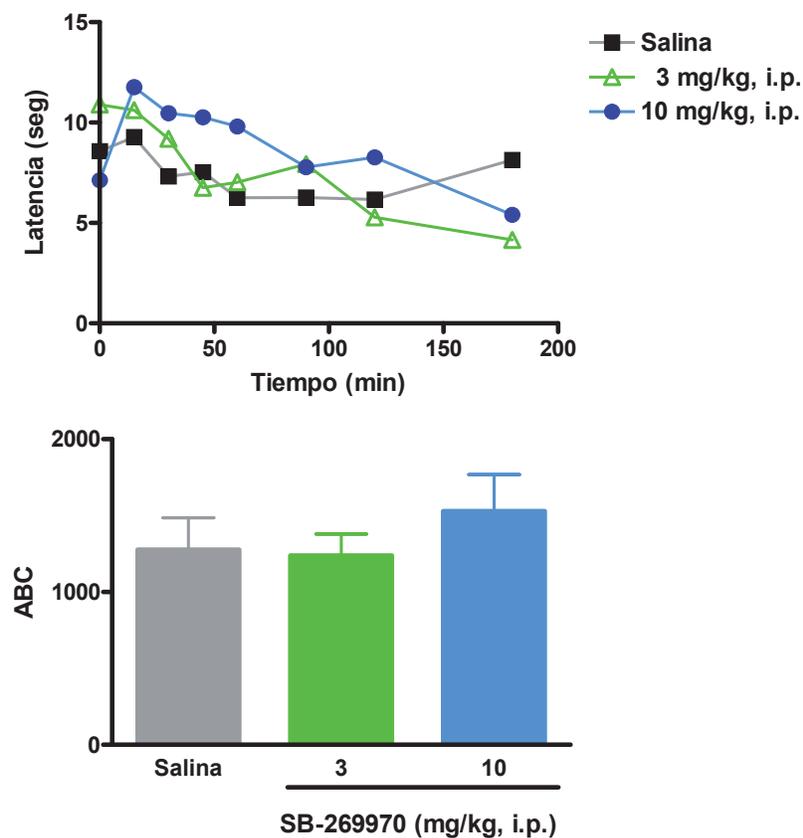
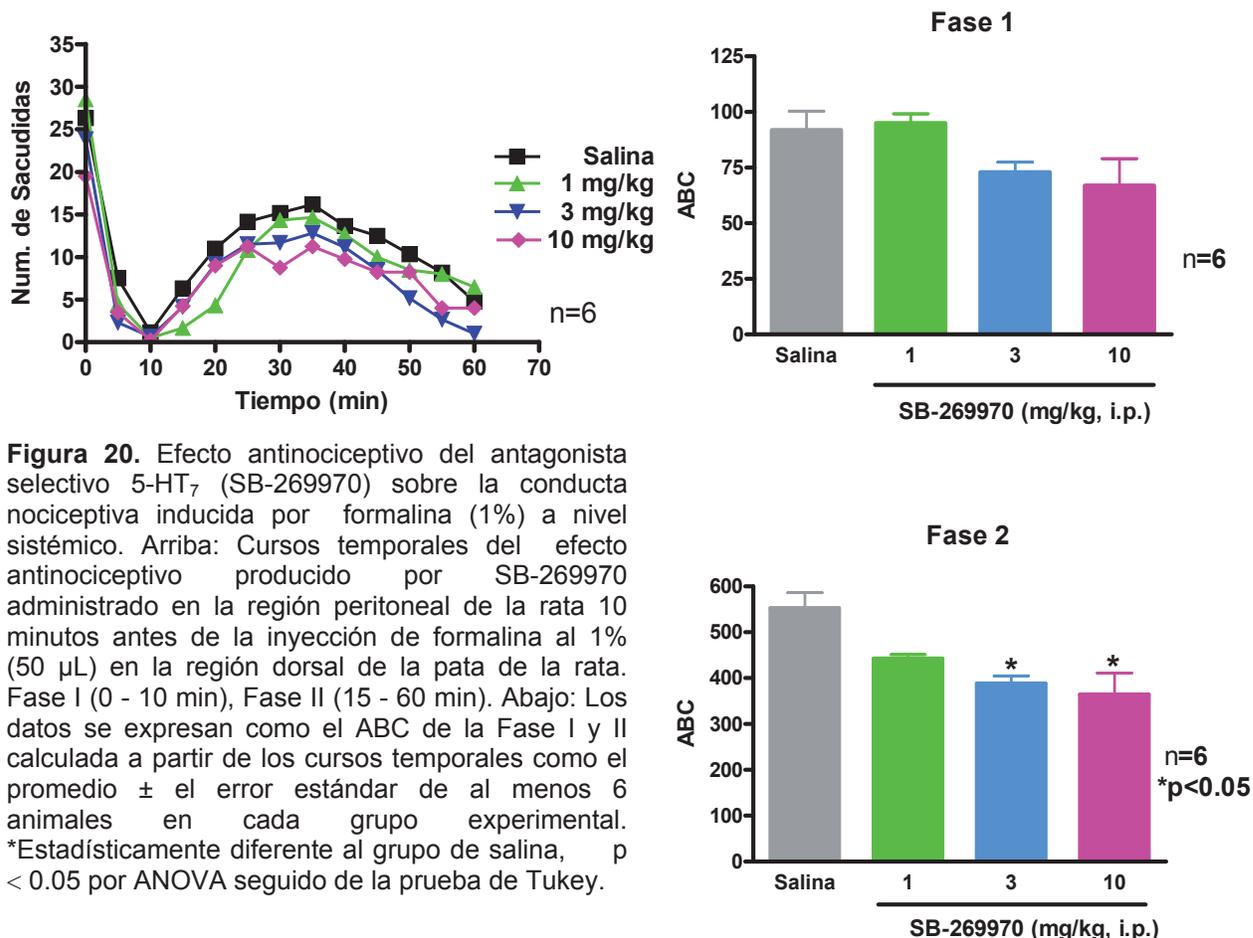


Figura 19. Falta de efecto antinociceptivo del antagonista selectivo 5-HT₇ (SB-269970) sobre la conducta nociceptiva inducida por el modelo de plancha caliente a nivel sistémico. Arriba: Cursos temporales del antagonista selectivo 5-HT₇ SB-269970 administrado por vía intraperitoneal en la rata 10 minutos antes de someterse al modelo de plancha caliente. Abajo: Los datos se expresan como el ABC calculados a partir de los cursos temporales como el promedio ± el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental.

7.2 EVALUACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT₇ EN EL MODELO DE LA FORMALINA

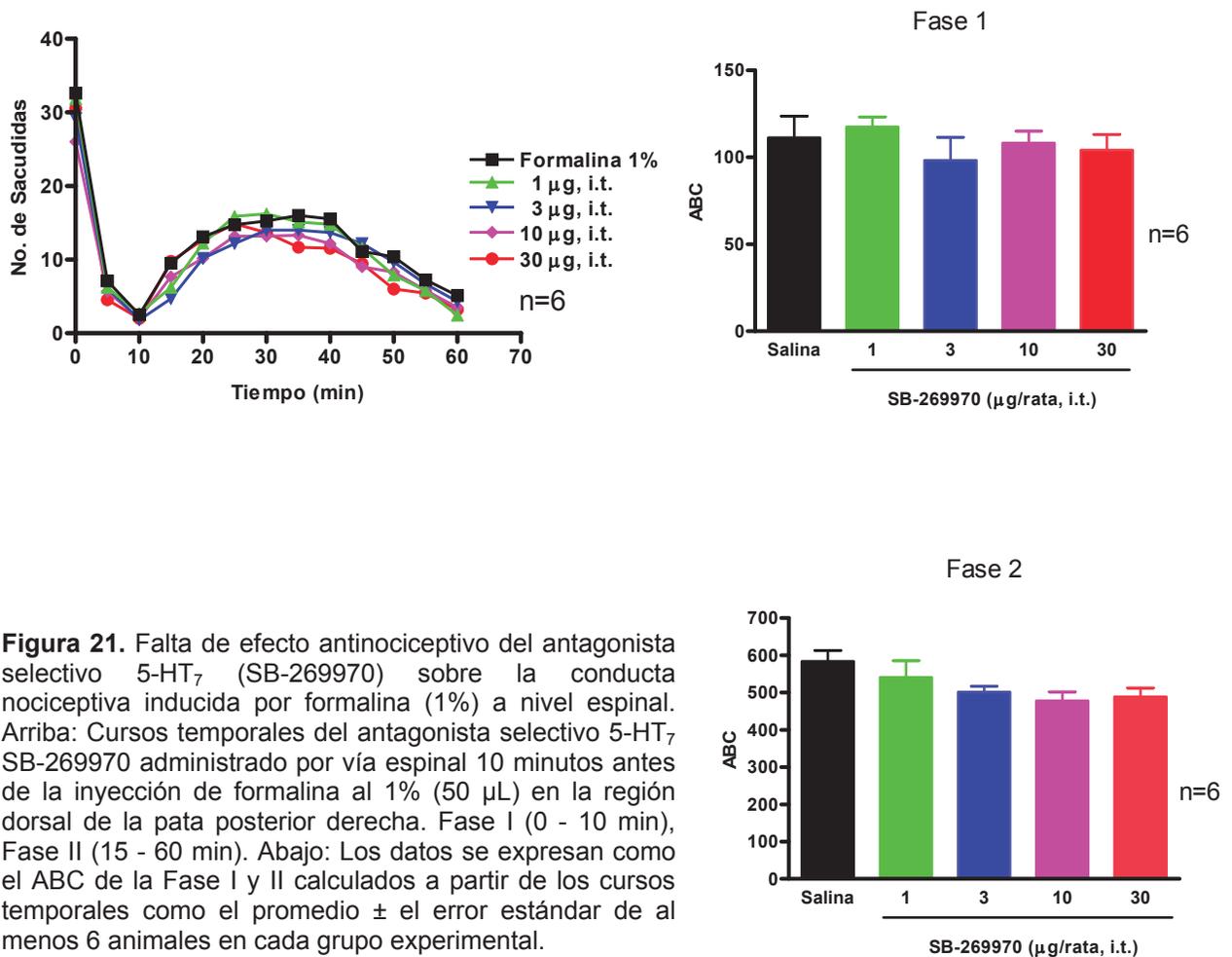
7.2.1 Efecto del antagonista serotoninérgico a nivel sistémico en el modelo de la formalina

La administración sistémica del antagonista del receptor 5-HT₇ SB-269970 disminuyó el número de sacudidas en ambas fases de la prueba de formalina (1%) alcanzando diferencia estadísticamente significativa solo en la fase 2 a partir de la dosis de 3 mg. Lo anterior puede verse en la figura 20. Ahí se observa la eficacia antinociceptiva del fármaco SB-269970 sobre la fase 2, tanto en cursos temporales como en gráfica de barras (ABC).



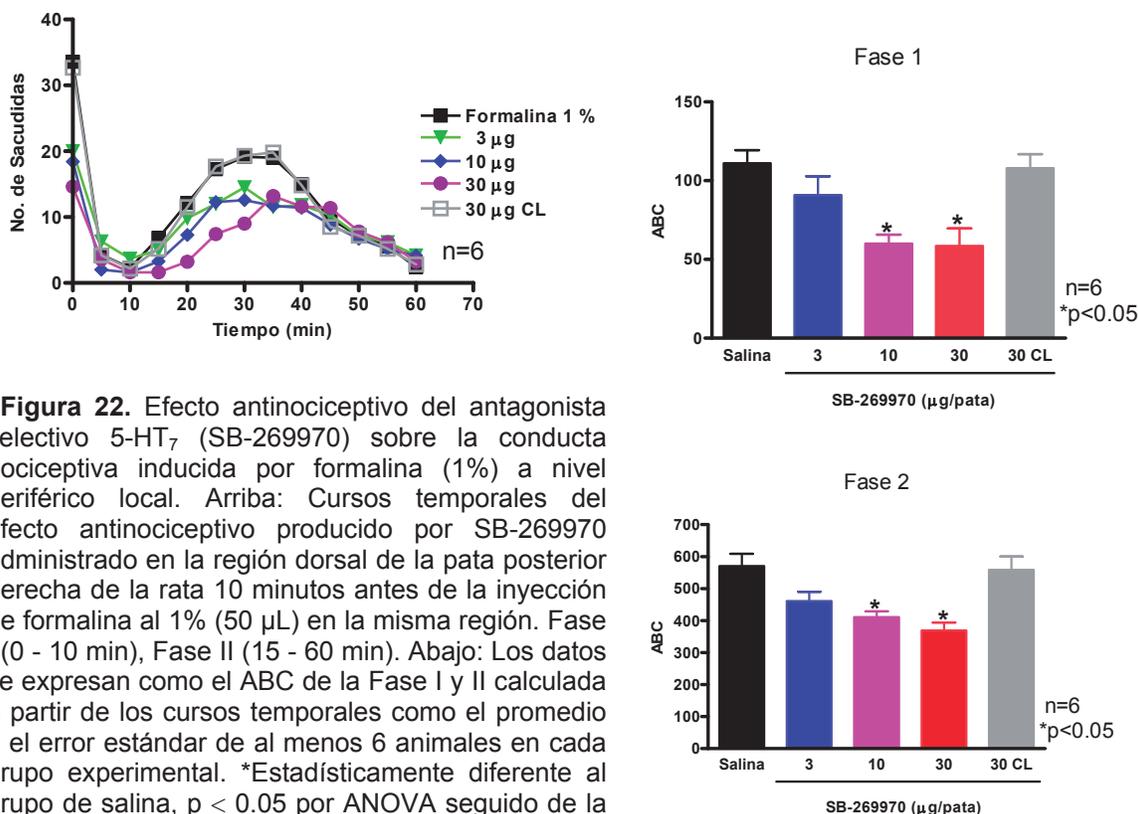
7.2.2 Efecto del antagonista serotoninérgico a nivel espinal en el modelo de la formalina

La administración espinal del antagonista selectivo 5-HT₇ SB-269970 mostró una tendencia a disminuir el número de sacudidas de manera dependiente de la dosis (3-30 µg) en la fase 2 de la prueba de la formalina, pero dicha tendencia no alcanzó diferencia estadística significativa (Figura 21).



7.2.3 Efecto del antagonista serotoninérgico a nivel periférico local en el modelo de la formalina

La administración periférica local del antagonista 5-HT₇ SB-269970 disminuyó el número de sacudidas de manera dependiente de la dosis (3-30 µg) en ambas fases de la prueba de formalina (1%) alcanzando diferencia estadísticamente significativa a partir de la dosis de 10 µg. Lo anterior puede verse en la figura 22. Ahí se observa la eficacia antinociceptiva del fármaco SB-269970 sobre la fase 1 y la fase 2, tanto en cursos temporales como en gráfica de barras. Asimismo, la administración contralateral de SB-269970 y de formalina en la pata ipsilateral (30 µg) no produjo un efecto estadísticamente diferente del grupo control, lo que sugiere un efecto antinociceptivo local y no sistémico.



7.2.4 Efecto de la coadministración del agonista serotoninérgico con el antagonista selectivo 5-HT₇ a nivel periférico local en el modelo de la formalina

La administración periférica local de SB-269970 (30 µg) revirtió el efecto pronociceptivo de 5-CT (1 µg) de manera estadísticamente significativa cuando ambos fármacos se coadministraron en un volumen de 50 µL (Figura 23) 10 minutos antes de la inyección de la formalina (0.5%).

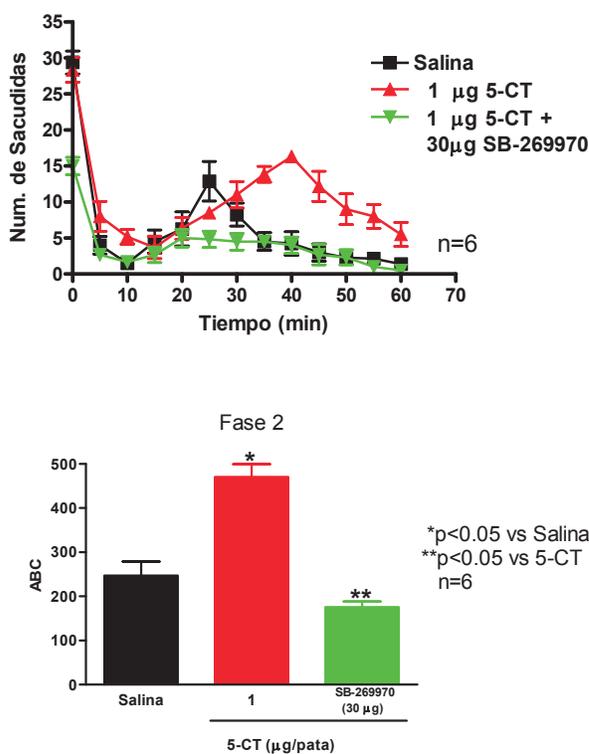


Figura 23. Efecto de la administración del antagonista selectivo 5-HT₇ (SB-269970) sobre la conducta pronociceptiva inducida por el agonista 5-carboxamidotriptamina (5-CT) en el modelo de formalina (0.5%). Arriba: Cursos temporales del efecto pronociceptivo producido por 5-CT y de los efectos resultantes de la coadministración de 5-CT con SB-269970 administrados en la región dorsal de la pata posterior derecha. Fase I (0 - 10 min), Fase II (15 - 60 min). Abajo: Los datos se expresan como el ABC de la Fase 2 calculados a partir de los cursos temporales y representan el promedio ± el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. *Estadísticamente diferente al grupo de salina, **Estadísticamente diferente al grupo de 5-CT (1 µg), p < 0.05 por ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

7.3 EVALUACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT₇ EN EL MODELO DE NEUROPATÍA

7.3.1 Efecto del antagonista serotoninérgico a nivel sistémico en el modelo de neuropatía (Kim y Chung)

La administración sistémica (intraperitoneal) del SB-269970 mostró efecto antialodínico dependiente de la dosis (1-10 mg) en el modelo de neuropatía (Kim y Chung), alcanzando diferencia estadística significativa a partir de 3 mg/kg (Figura 24).

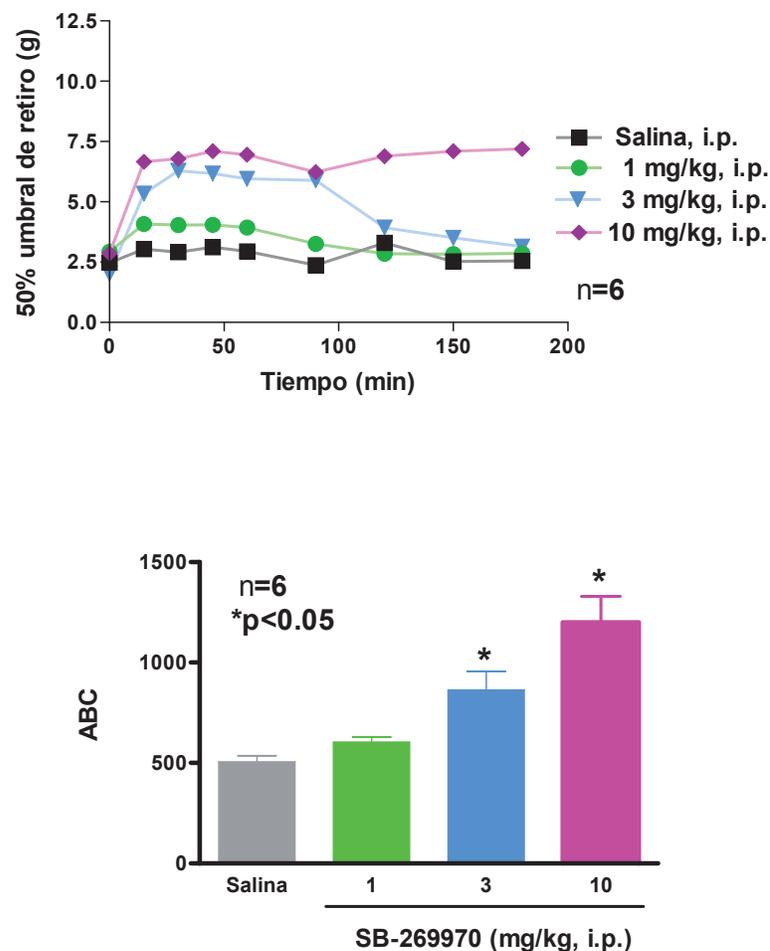


Figura 24. Efecto antinociceptivo del antagonista selectivo 5-HT₇ (SB-269970) sobre la conducta nociceptiva inducida por el modelo de neuropatía a nivel sistémico. Arriba: Cursos temporales del antagonista selectivo 5-HT₇ SB-269970 administrado por vía intraperitoneal 15 minutos antes de someter a la rata a la prueba de umbral de retiro. Abajo: Los datos se expresan como el ABC calculados a partir de los cursos temporales como el promedio ± el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. *Diferencia significativa con respecto al grupo de salina, p<0.05 por ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

7.3.2 Efecto del antagonista serotoninérgico a nivel espinal en el modelo de neuropatía (Kim y Chung)

La administración espinal del antagonista 5-HT₇ SB-269970 mostró efecto antialodínico dependiente de la dosis (12.5-50 µg) en el modelo de neuropatía (Kim y Chung), alcanzando diferencia estadística significativa a partir de 37.5 µg (Figura 25).

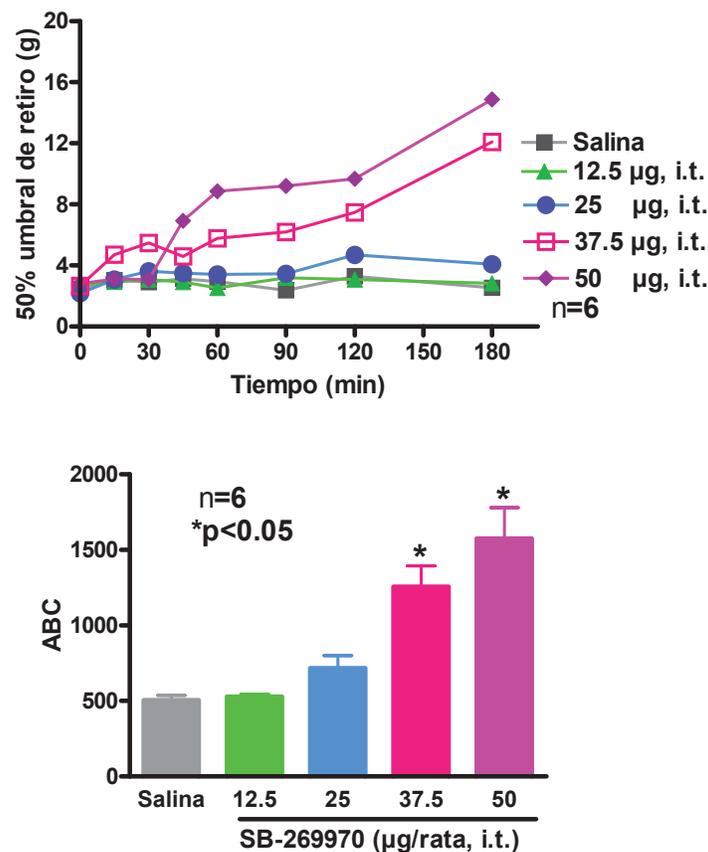


Figura 25. Efecto antinociceptivo del antagonista selectivo 5-HT₇ (SB-269970) sobre la conducta nociceptiva inducida por el modelo de neuropatía a nivel espinal. Arriba: Cursos temporales del antagonista selectivo 5-HT₇ SB-269970 administrado por vía espinal 15 minutos antes de someter a la rata a la prueba de umbral de retiro. Abajo: Los datos se expresan como el ABC calculados a partir de los cursos temporales como el promedio ± el error estándar de al menos 6 animales en cada grupo experimental. *Diferencia significativa con respecto al grupo de salina, p<0.05 por ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

8. DISCUSIÓN

8.1 PRUEBA DE PLANCHA CALIENTE

Esta prueba consiste en la introducción de la rata en un espacio cilíndrico con el extremo superior abierto y una superficie consistente en una placa metálica que es calentada (Woolfe y Mac-Donald, 1944; Eddy y Leimbach, 1953; O'Callaghan y Holzman, 1975). Este modelo produce dos tipos de comportamiento que pueden ser medidos en términos de sus tiempos de reacción, siendo el lamido de la pata o el salto al borde del cilindro. Ambos comportamientos son considerados como respuestas integradas supraespinalmente. En cuanto a su sensibilidad a sustancias analgésicas, el comportamiento de lamido de pata es afectado solo por opioides. Por otro lado, el tiempo de reacción de salto al borde del cilindro es incrementado proporcionalmente por analgésicos menos poderosos, tales como el ácido acetilsalicílico o paracetamol, especialmente cuando la temperatura de la plancha es de 50°C o menos (Ankier, 1974), o si la temperatura se incrementa de modo progresivo y lineal, ejemplo, de 43 a 52°C a 2.5°C/min (Hunskaar et al., 1985). La especificidad y sensibilidad de la prueba puede aumentar si se mide el tiempo de reacción del primer comportamiento evocado ya sea lamido de pata o salto (Carter, 1991). El comportamiento es relativamente estereotipado en el ratón pero es más complejo en la rata, pudiendo ser chillidos, lamido de patas anteriores, lamido de patas traseras, enderezamiento, inicio y termino de autolimpieza, entre otras cosas. Estos comportamientos han sido llamados como “movimientos defensivos caóticos” (Knoll y cols., 1955). Espejo y Mir (1993) identificaron y describieron 12 comportamientos diferentes. Debido a que muchos de estos comportamientos se presentan, la observación de ellos se dificulta. Además, esta prueba es muy susceptible al fenómeno de aprendizaje, el cual resulta en un acortamiento progresivo del tiempo de reacción al saltar y acompañarse de la desaparición del comportamiento de lamido (Knoll y cols., 1955). Así, el animal puede lamerse las patas y saltar durante la primera prueba pero puede saltar casi inmediatamente – acortando el tiempo de reacción- durante las pruebas subsecuentes (Takagi y Iwamoto, 1952; Jacob, 1963; Kayan y cols.,

1969; Van Ree y Leys, 1985; Espejo y Mir, 1993). Similarmente, aún colocando los animales sobre una plancha no caliente una vez que observaron la prueba lleva a que en pruebas subsecuentes disminuya el tiempo de reacción en condiciones estándar con una temperatura nociva constante (Bardo y Hughes, 1979; Hunskaar y cols., 1986). En general, las mediciones son variables, aún dentro del mismo laboratorio (Miller, 1948; Tjølsen y Hole, 1997). Todos estos factores hacen que esta prueba sea muy delicada de usar. En el análisis final se debe de hacer notar que esta prueba consiste en la estimulación de cuatro extremidades y aún la cola del animal simultáneamente (Knoll y cols., 1955). Tal estimulación heterotrópica involucra grandes áreas corporales que indudablemente disparan controles inhibitorios difusos que probablemente alteren las respuestas observadas.

En el modelo de plancha caliente se induce la función de alerta reflejada por la activación fásica de nociceptores ante un potencial estímulo peligroso que excede el rango fisiológico. Este propósito de aviso del dolor es más evidente en la piel, la cual está más expuesta a daños externos. El dolor agudo, cutáneo evoca así, una respuesta de retiro o de escape, respuestas restrictivas que tienen como finalidad el discontinuar la exposición a el estímulo nocivo y, así, terminar con el dolor. El estímulo agudo térmico provocado por la plancha caliente es de una duración de pocos segundos activando solo nociceptores transitorios (Millan, 1999).

El propósito del presente estudio fue investigar la participación relativa del receptor 5-HT₇ en el dolor de tipo agudo térmico. Nuestros resultados confirman que la serotonina no tiene un efecto pronociceptivo en este modelo de dolor agudo a nivel central (Yaksh y Wilson, 1979; Solomon y Gebhart, 1988; Crisp y cols. 1991; Bardin y cols. 1997a). La administración sistémica del antagonista del receptor 5-HT₇ SB-269970 en el modelo de plancha caliente mostró una tendencia de aumento de latencia, pero sin alcanzar diferencia estadística significativa. La función instantánea de los nociceptores en la señalización después de la exposición a estímulos agudos nocivos corresponde a la función de alerta del dolor y parece presentarse con poca intervención de mecanismos moduladores periféricos o centrales (Handwerker y Kobal, 1993). El modelo de

plancha caliente está diseñado para estimular sólo receptores del dolor a la superficie plantar de las ratas y evitando un daño tisular, al no presentarse este no hay un proceso inflamatorio suficiente donde la serotonina pudiera estar actuando. Una gran mayoría de los modelos de comportamiento en ratas usados para acceder a la participación de la serotonina emplean pruebas térmicas. Hay sin embargo, evidencia que los resultados obtenidos usando estas pruebas térmicas pueden ser seriamente mal interpretadas si la temperatura de la piel de la rata no es monitoreada apropiadamente (Hole y cols., 1990), ya que los efectos vasculares de la serotonina pueden modificar esta temperatura (Eide y Tjolsen, 1988). Otras cuestiones es que la serotonina endógena espinal está involucrada no sólo en la nocicepción sino también en funciones no nociceptivas tales como el control motor lo cual de hecho pueden afectar la respuesta en las pruebas nociceptivas. Sacudidas espontáneas de la cola pueden ser inducidas por la administración del agonista no selectivo del receptor 5-HT₇ 8-OH-DPAT en ratas (Millan y cols., 1991). Hay que tomar en cuenta también el hecho de que resultados opuestos han sido obtenidos usando los mismos modelos de dolor y que los subtipos de receptores del serotonina exhiben afinidades diferenciales por serotonina, la variedad de efectos descritos anteriormente podrían ser debido a acciones sobre diferentes sitios serotoninérgicos o no serotoninérgicos dependiendo de las dosis usadas (Crisp y cols., 1991; Cesselin y cols., 1994; Millan, 1994). El objetivo de utilizar el presente modelo de dolor agudo térmico fue para evaluar la participación del receptor de serotonina 5-HT₇ a nivel central o periférico en el dolor inducido por el modelo de plancha caliente al administrar el antagonista selectivo para este receptor y probar su capacidad de bloquear la antinocicepción inducida por serotonina endógena en caso de que ésta estuviera presente. Los resultados están de acuerdo con los estudios previos donde la administración de agonistas del receptor 5-HT_{1A} (los cuales ya se ha mencionado antes que también tienen afinidad por el receptor 5-HT₇) no modifica las reacciones dolorosas (Solomon y Gebhart, 1988; Mjellem y cols., 1992; Millan, 1994).

8.2 PRUEBA DE LA FORMALINA

La inyección subcutánea de un volumen pequeño (50 μ L) de formalina diluida (0.5 y 1 %) en la región dorsal de la pata posterior derecha de ratas hembra produjo una conducta de sacudidas (conducta nociceptiva) bifásica dependiente de la concentración de formalina y del fármaco administrado como pretratamiento. La primera fase (fase I) fue de inicio rápido, gran intensidad y corta duración (aproximadamente 5 min). La fase I fue seguida de un corto período durante el cual la rata no mostró la conducta sugestiva de nocicepción. Finalmente, la segunda fase (fase II) inició entre los 10 y 20 minutos después de la inyección de formalina y aumentó de manera gradual alcanzando un máximo entre los 25 y 40 minutos dependiendo del pretratamiento y una duración de alrededor de 40 minutos con ambas concentraciones de formalina. Los cursos temporales descritos anteriormente concuerdan con lo publicado en la literatura por diferentes autores (Dubuisson y Dennis, 1977; Tjolsen y cols., 1992). En este sentido, Puig y Sorkin (1996) correlacionan mediante registros electrofisiológicos las fuertes sacudidas observadas en la fase 1 (0 - 10 minutos) con una actividad exagerada de las fibras aferentes sensoriales, pero dichos registros no logran explicar completamente el comportamiento nociceptivo observado durante la fase 2, en donde se muestra una actividad aferente discreta. Esta aparente discrepancia es resuelta por Dickenson y Sullivan (1987), los cuales demuestran que durante el período en el cual se observa una actividad aferente primaria discreta, las neuronas del asta dorsal de la médula espinal muestran un aumento en su excitabilidad con un perfil temporal bifásico similar a la conducta nociceptiva, es decir, existe un proceso de sensibilización central. Asimismo, se ha demostrado que la actividad de diversos componentes inflamatorios y la liberación de sustancias mediadoras del dolor (Hunnskaar y Hole, 1987; Tjolsen y cols., 1992) juegan un papel muy importante en el comportamiento nociceptivo de la fase II. En resumen, se puede argumentar que la conducta nociceptiva manifestada durante la fase I es consecuencia de la acción directa de la formalina sobre los nociceptores localizados principalmente sobre las fibras C mientras que la fase 2

se debe a la liberación de diversos componentes inflamatorios tanto en la periferia como a nivel espinal y a un proceso de sensibilización central (Hunskaar y Hole, 1987; Tjolsen y cols., 1992; Yashpal y cols., 1998).

La prueba de formalina describe diferentes comportamientos, entre los que se encuentran el morder, lamer, levantar y sacudir la pata inyectada, por lo que la conducta nociceptiva se puede evaluar registrando el tiempo en que la rata se muerde y mantiene levantada la pata o la frecuencia del número de sacudidas (Wheeler-Aceto y Cowan, 1991; Coderre y cols., 1993; Abbott y cols., 1995). En el presente trabajo se cuantificó la conducta de sacudidas debido a que es el parámetro más utilizado para cuantificar el grado de dolor (Dubuisson y Dennis, 1977) y que ha demostrado ser un parámetro útil para cuantificar la actividad antinociceptiva de fármacos de acción periférica y central (Wheeler-Aceto y Cowan, 1991; Lee y Jeong, 2002). Aunque algunos autores sugieren que la suma del tiempo de lamida más el tiempo de levantamiento de la pata es mejor índice del dolor inducido por formalina (Abbot y cols., 1995). La conducta de sacudidas es más rítmica y constante durante el periodo de observación lo cual es una ventaja sobre las otras que son más esporádicas. Asimismo, se asume que la espontaneidad de la conducta de mordida/lamida representa ataques episódicos de dolor fásico y la de sacudidas dolor crónico o subagudo, por lo que es posible considerar que la conducta de sacudidas es mejor índice de la conducta nociceptiva cuando se desea evaluar el dolor tónico de origen inflamatorio.

Asimismo, en la prueba de la formalina la intensidad del estímulo es un factor importante de determinar ya que se ha sugerido que la utilización de altas concentraciones de formalina (5 %) induce otras reacciones conductuales que pueden interferir con la conducta nociceptiva de sacudidas (Clavelou y cols., 1995) mientras que la utilización de concentraciones muy bajas incrementa el riesgo de aumentar la variabilidad o la incidencia de “no respondedores” (Wilson y Mogil, 2001) por lo que en el diseño experimental se decidió utilizar formalina al 1 % para ver un posible efecto antinociceptivo y formalina al 0.5 % para observar con mayor claridad un posible efecto pronociceptivo como lo reporta previamente Doak y Sawynok en 1997.

Otros factores pueden impactar o alterar la conducta nociceptiva o la eficacia antinociceptiva de algunos fármacos (Damaj, 2001). En especial la prueba de la formalina se ve afectada por factores de estrés como son los sonidos, los olores, luz intensa, elevada presión atmosférica o la intensa actividad humana en el cuarto durante el período en que se está llevando a cabo la prueba (Tjølsen y cols., 1992), por lo que las ratas fueron evaluadas a temperatura controlada (25 – 27 °C) en un cuarto aislado y exclusivo para la realización de esta prueba tratando de esta manera de disminuir los factores que podrían alterar los resultados de la prueba. Dentro de estos factores debemos considerar uno muy importante, el género debido a que en nuestro estudio se utilizaron ratas hembra y algunos autores han reportado que el ciclo estral puede influenciar la conducta nociceptiva en algunos modelos de dolor (Vincler y cols., 2001; Craft y cols., 2004). Datos obtenidos en el laboratorio muestran que la conducta nociceptiva inducida por la inyección s.c. de formalina al 1% es similar tanto en machos como en hembras (datos no mostrados). De manera similar, Yaksh y cols. (2001) en su modelo automatizado de formalina no observaron diferencia entre hembras y machos en la conducta nociceptiva de sacudidas. También, se ha descrito que el ciclo estral no altera la conducta nociceptiva de ambas fases de la prueba de la formalina (Vincler y cols., 2001). Lo anterior apoya a nuestras observaciones. Sin embargo, Aloisi y colaboradores reportaron que la conducta de sacudidas y lamidas de la pata inyectada fue mayor en hembras comparadas con machos administrando formalina al 10% (Aloisi y cols., 1994), pero no con formalina al 0.1 % (Aloisi y cols., 1995a; 1995b) o al 5 % (Yaksh y cols., 2001). Por lo que resulta evidente que altas concentraciones de formalina parecen afectar la conducta nociceptiva entre machos y hembras.

En nuestros resultados observamos que los fármacos utilizados en el presente trabajo tuvieron su efecto pronociceptivo o antinociceptivo sobretudo en la fase II de la prueba de la formalina. Esto nos sugiere que el receptor 5-HT₇ podría jugar un papel principal en el dolor de tipo inflamatorio. Este argumento es sustentado por el trabajo publicado por Meuser y colaboradores (2002) en donde la administración intrarticular de 8-OH-DPAT y 5-HT incrementa los niveles de c-

fos en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal a los 60 y 90 minutos de la administración del fármaco. Además, dicho incremento se previene por la administración intrarticular de metiotepina lo que sugiere la participación del receptor 5-HT₇. Asimismo, el grupo de Yun-Qing Li (Wu y cols., 2001) sugiere también la participación del receptor 5-HT₇ en el dolor de tipo inflamatorio debido a que la administración subcutánea de adyuvante completo de Freund en la pata posterior de la rata incrementa los niveles de mRNA para el receptor 5-HT₇ en el ganglio de la raíz dorsal cuatro días después de la administración del adyuvante. En este estudio se evaluó la posible participación de los receptores 5-HT₇ a nivel periférico en el comportamiento nociceptivo inducido por formalina. Como previamente se reportó (Doak y Sawynok, 1997), nosotros utilizamos una concentración baja de formalina (0.5%) para detectar acciones pronociceptivas del agonista del receptor de 5-HT, la 5-carboxamidotriptamina, mientras que una concentración mayor de formalina (1%) se utilizó para detectar acciones antinociceptivas del antagonista selectivo del receptor 5-HT₇. Bajo estas condiciones nosotros fuimos capaces de observar un efecto antinociceptivo periférico local con el antagonista selectivo del receptor 5-HT₇, el SB-269970, en la prueba de la formalina. El efecto antinociceptivo local de SB-269970 no fue debido a una acción sistémica ya que la administración en la pata contralateral no mostró efecto alguno. Como SB-269970 inhibe preferentemente a los receptores 5-HT₇ (Hoyer y cols., 2002; Roberts y cols., 2001; Thomas y cols., 2000, 2002), nuestros resultados sugieren una participación relevante de los receptores 5-HT₇ periféricos locales en el proceso nociceptivo inducido por formalina. La función pronociceptiva de los receptores 5-HT₇ periféricos locales en la prueba de la formalina fue confirmada cuando la administración del agonista del receptor 5-HT_{7/1A} 5-CT produjo nocicepción durante la fase 2 de la prueba de la formalina y su efecto fue significativamente revertido por el antagonista del receptor 5-HT₇ SB-269970. Notablemente, nuestros datos farmacológicos están correlacionados con datos previos anatómicos (Rocha y cols., 2005) que sugieren un efecto directo de los agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₇ sobre nociceptores de la piel donde una subpoblación de estas fibras expresa receptores 5-HT₇ y datos

electrofisiológicos indican que la activación de receptores 5-HT₇ incrementa el AMP cíclico y la excitabilidad neuronal (Cardenas y cols., 1999). Esta evidencia está en línea con el hecho que la inyección local de tanto 5-HT o análogos del AMP cíclico produce hiperalgesia (Taiwo y Levine, 1991, 1992; Taiwo y cols., 1989). Basados en su mecanismo transduccional, se podría esperar que la activación periférica de los receptores 5-HT₇ (positivamente acoplados a la adenilato ciclasa) produzca nocicepción. Evidencia conductual ha sido proporcionada en este sentido donde los receptores 5-HT₇ (Rocha y cols., 2005) tienen una participación significativa en la hiperalgesia inducida por 5-HT. La coadministración a nivel periférico local de SB-269970 revirtió el efecto pronociceptivo de la 5-CT de manera estadísticamente significativa cuando ambos fármacos se coadministraron en un volumen de 50 µL 10 minutos antes de la inyección de la formalina. La 5-CT es un agonista serotoninérgico con alta afinidad por los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{5A} y 5-HT₇ (Wijngaarden y cols., 1990; Hoyer y cols., 1994). En este sentido, debemos señalar que hasta la fecha no existen agonistas selectivos 5-HT₇, pues la mayoría de los compuestos sintetizados también despliegan alta afinidad por los receptores 5-HT_{1A} (Leopoldo, 2004; Leopoldo y cols., 2004). Aunque, recientemente se ha sintetizado un derivado de las tiopiridinas que parece prometedor ya que su afinidad por el receptor 5-HT₇ es relativamente alta comparada con el receptor 5-HT_{1A} (Thomson y cols., 2004).

No obstante, la carencia de agonistas selectivos para el receptor 5-HT₇, el antagonista selectivo SB-269970 es al menos dos ordenes de magnitud más afín en relación a los demás receptores serotoninérgicos (Novell y cols., 2000). En base a la propiedad que confieren los antagonistas y de acuerdo a los resultados obtenidos se puede sugerir que el receptor 5-HT₇ aumenta el número de sacudidas en el modelo de la formalina a nivel periférico local en ratas. Esta conclusión concuerda con diferentes estudios electrofisiológicos que relacionan a la activación del receptor 5-HT₇ con la generación de una corriente no selectiva de cationes (I_H) activada por hiperpolarización (Cardenas y cols., 1999; Chapin y Andrade, 2001a,b) que mantiene a la neurona en un potencial de membrana

menos negativo (-20 y -30 mV). También concuerda con lo reportado por algunos autores que relacionan la activación del receptor 5-HT₇ con la apertura de canales de Ca²⁺ tipo T (Baker y cols., 1998; Lenglet y cols., 2002) y posiblemente con la apertura de canales de Na⁺ resistentes a tetrodotoxina (Cardenas y cols., 2001). La despolarización neuronal generada por estos mecanismos produce un incremento en la liberación de neurotransmisores de las fibras aferentes primarias, así como un aumento de la excitabilidad neuronal. En este sentido y con el fin de descartar la participación de los receptores 5-HT₁ y 5-HT_{5A} se debe señalar que los efectos descritos para el receptor 5-HT₇ son contrarios a los descritos para estas familias de receptores serotoninérgicos pues mientras la activación del receptor 5-HT₇ genera corrientes despolarizantes, la activación de los receptores 5-HT₁ y 5-HT₅ tradicionalmente se ha asociado con la generación de corrientes hiperpolarizantes, es decir, con la apertura de canales de K⁺. Aunque debemos señalar que este mecanismo solo se ha demostrado en los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{5A} Millan, 2002; Hoyer y cols., 2002).

Las corrientes despolarizantes producidas por activación del receptor 5-HT₇ descritas en los estudios electrofisiológicos dependen del incremento de AMPc (Baker y cols., 1998; Cardenas y cols., 1999; 2001; Chapin y Andrade, 2001a,b; Lenglet y cols., 2002), el cual es muy importante, pues se ha demostrado que la administración periférica de análogos de AMPc es capaz de generar hiperalgesia (Taiwo y cols., 1989; Taiwo y Levine, 1991; Taiwo y cols., 1992; Cunha y cols., 1999). En este sentido, debemos mencionar que únicamente el receptor 5-HT₇ tiene el mecanismo transduccional capaz de incrementar los niveles de AMPc pues se encuentra acoplado a una proteína G estimuladora (Gs) que activa a la enzima adenilato ciclasa (AC). Esta enzima a su vez cicla la molécula de adenosinmonofosfato (AMP) generando el AMPc (Ruat y cols., 1993b; Lovenberg y cols., 1993; Bard y cols., 1993; Adham y cols., 1998). En cambio, los receptores de la familia 5-HT₁ y 5-HT_{5A} se encuentran acoplados a una proteína G inhibitoria (Gi) que modula negativamente a la enzima adenilato ciclasa (AC). Este tipo de acoplamiento se relaciona tradicionalmente a un efecto neuronal hiperpolarizante (Barnes y Sharp, 1999; Millan, 2002) como lo demuestra el estudio

electrofisiológico llevado a cabo por Todorovic y Anderson (1992) en ganglios de la raíz dorsal. Por ende, se sugiere que el efecto pronociceptivo inducido por 5-CT se debe más bien a la activación de receptores 5-HT₇.

El aporte de serotonina a nivel espinal tiene principalmente un origen supraespinal, sobretodo de los núcleos del rafé y bulbo raquídeo rostroventral, ricos en neuronas serotoninérgicas que proyectan sus axones a través de vías descendentes. A este nivel, el elucidar el papel que ejerce un tipo de receptor se vuelve aún más complejo pues un mismo receptor puede estar ejerciendo tanto efecto pronociceptivo como antinociceptivo dependiendo del tipo de neurona donde se encuentre localizado. De hecho, para la serotonina este fenómeno se ha reportado en varios de sus receptores. Además, el hecho de que serotonina tenga al menos 14 receptores y que sus neuronas se encuentran altamente co-localizadas con neurotransmisores tanto excitatorios como inhibitorios (Millan, 2002) nos habla de lo difícil que podría resultar el determinar el papel que ejerce el receptor 5-HT₇ en la transmisión del dolor a nivel espinal pues su efecto podría verse fácilmente enmascarado (Figura 26).

A nivel espinal la administración intratecal de SB-269970 mostró una tendencia a disminuir el número de sacudidas de manera dependiente de la dosis durante la fase 2 de la prueba de la formalina, pero dicha tendencia no alcanzó diferencia estadística significativa. Hasta la fecha no existen estudios conductuales que confirmen la carencia de efecto del antagonista SB-269970 a nivel espinal. Sin embargo, el hecho de que el antagonista SB-269970 carezca de efecto no significa que este receptor no participe en la transmisión del dolor. Por el contrario, parece ser común que los antagonistas de diversos receptores que participan en el procesamiento del dolor a nivel espinal carezcan de efecto cuando se administran de manera individual en la medula espinal como lo demuestran algunos estudios conductuales y electrofisiológicos llevados a cabo para algunos receptores serotoninérgicos (Gjerstad y cols., 1996; Gjerstad y cols., 1997; Zhang y cols., 2001b). Cabe mencionar que estos antagonistas a pesar de que carecen de efecto cuando son administrados de manera individual, son capaces de revertir el efecto producido por el agonista para el mismo receptor. En nuestro caso, la

administración intratecal del antagonista SB-269970 nos sugiere que el receptor 5-HT₇ no participa en la transmisión del dolor inflamatorio a nivel espinal aunque debemos considerar que su efecto podría estar enmascarado por la participación de otros receptores serotoninérgicos.

Para la administración sistémica del antagonista serotoninérgico en la prueba de la formalina al 1% hubo una disminución en el número de sacudidas en ambas fases de la prueba de formalina alcanzando diferencia estadísticamente significativa solo en la fase 2 a partir de la dosis de 3 mg. El efecto significativo sugiere que es mayormente por su acción a nivel periférico local ya que no se había observado efecto a nivel espinal por estar enmascarado su efecto, pero no se descarta un efecto a nivel supraespinal.

En resumen, el receptor 5-HT₇ parece tener una participación en el dolor de tipo inflamatorio.

8.3 MODELO DE NEUROPATÍA

La alodinia táctil es una propiedad del estado de dolor neuropático que puede desarrollarse después de daño del nervio periférico. En el presente trabajo las ratas se sometieron a la ligadura de los nervios L5 y L6 (Kim y Chung, 1992) y se les indujo alodinia táctil, uno de los síntomas que acompañan al dolor neuropático.

En estudios realizados en pacientes el estado de dolor neuropático está mediado en parte por fibras de axones grandes de conducción rápida (Campbell y cols., 1988). Este síndrome de dolor parece ser resistente a las acciones analgésicas de opioides (Arnér y Meyerson, 1988). En el modelo de la ligadura floja del nervio ciático reportado por Bennett y Xie (1988) se ha observado que los animales muestran signos de comportamiento de dolor espontáneo e hiperalgesia que dura aproximadamente 2 meses. Este modelo no sólo desarrolla hiperalgesia a estímulos nocivos mecánicos y térmicos, sino también alodinia mecánica y alodinia al frío. Más recientemente Seltzer y colaboradores (1990) reportaron un modelo que involucra ligadura apretada de un tercio a la mitad del nervio ciático en la rata. Este procedimiento quirúrgico también produce signos inmediatos de comportamiento de dolor espontáneo, alodinia e hiperalgesia. Una desventaja de

estos dos modelos reportados previamente es que es difícil controlar el número y tipo de fibras dañadas. En el caso del modelo de Bennett y Xie la tensión de las ligaduras alrededor del nervio ciático puede variar y esto podría influenciar el número y tipo de fibras aferentes dañadas. En el modelo de Seltzer y colaboradores el número y tipo de axones del nervio ciático que son ligados también difieren de experimento a experimento debido a la incapacidad de dañar exactamente la misma parte del nervio en cada animal y se ha demostrado que la hiperalgesia térmica se ve disminuida de manera dependiente de la dosis por la administración espinal de opioides (Yamamoto y Yaksh, 1992). En el modelo de neuropatía periférica producida por la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 en la rata el número de nervios espinales ligados en cada animal es el mismo y está más correlacionado con los datos reportados en humanos. La alodinia táctil que produce es resistente al efecto analgésico de opioides administrados espinalmente (Kim y Chung, 1992). Este modelo puede ser útil no sólo en la evaluación de mecanismos que fundamentan la alodinia, sino también como un buen instrumento para el monitoreo preclínico de fármacos que pueden ser terapéuticamente útiles para esta condición. El presente modelo tiene dos características únicas. Primero, el procedimiento quirúrgico es estereotipado. Segundo los niveles de daño y segmentos espinales intactos son aislados, permitiendo manipulaciones experimentales independientes. Una desventaja de este modelo es que la cirugía es considerablemente más extensa y complicada que los demás modelos previamente descritos (Seltzer y cols., 1990; Bennett y Xie, 1988). Las medidas de umbral de retiro con filamentos de von Frey en el paradigma arriba abajo, cuando se combina con el modelo de dolor neuropático, representa una herramienta poderosa para analizar los efectos de las manipulaciones del estado de dolor neuropático (Chaplan y cols., 1994). Al tercer día pudo considerarse alodinia, concordando con los datos reportados por Chaplan y colaboradores (1994). Los valores de umbral de retiro en un grupo de ratas neuropáticas con cierto tamaño de muestra reportan poca variabilidad biológica 20 días post-cirugía (Kim y Chung, 1992). Nuestros grupos de inducción de alodinia son similares a lo reportado por Chaplan y cols. (1994). Más del 90% de nuestras ratas desarrollaron alodinia y las

ratas que no desarrollaron alodinia fueron sacrificadas. El modelo de Chung es un modelo de dolor neuropático que cumple con los criterios establecidos para un buen modelo experimental de dolor (Taber, 1974). El manejo de los datos permite determinar tanto el umbral de retiro por ciertos rangos de tiempo o determinar el ABC del curso temporal del umbral en la conducta de retiro de la pata estimulada.

En este modelo la estimulación en la pata de la rata con los filamentos de “von Frey” produjo la típica conducta dolorosa como es el retiro de la pata evaluada ante estímulos normalmente inocuos (alodinia táctil), observando un patrón similar al reportado por otros autores (Chaplan y cols., 1994). La administración de solución salina espinal y sistémica no modificó el comportamiento del umbral de retiro de la pata estimulada durante el tiempo que duro la evaluación. La ambientación previa de los animales durante 30 min a 1 hora, la temperatura en un rango de 25 a 27°C y el aislamiento en un cuarto con el mínimo de ruido tiene un papel muy importante para encontrar un patrón de umbral de retiro coherente y similar al reportado. En cuanto a la administración intratecal del antagonista SB-269970, encontramos que mostró un efecto antialodínico dependiente de la dosis (12.5-50 µg). Esta diferencia con el dolor inflamatorio puede deberse a que después del daño al nervio se produce una desinhibición, es decir, normalmente el flujo sensorial está controlado por interneuronas que inhiben la percepción del dolor, pero en el dolor neuropático hay una reducción en la síntesis de neurotransmisores inhibitorios GABA y glicina, además de la pérdida de estas interneuronas inhibitorias después del aporte excesivo del aminoácido excitotóxico glutamato, incrementando la excitabilidad neuronal favoreciendo la transmisión del dolor y respondiendo a estímulos normalmente inocuos como el tacto suave (Scholz y Wolf, 2000). La administración intraperitoneal e intratecal del antagonista 5-HT₇ SB-269970 mostró efecto antialodínico dependiente de la dosis en este modelo de neuropatía (Kim y Chung, 1992), no así la administración de vehículo (Salina). Estos datos sugieren que el receptor 5-HT₇ participa en la alodinia táctil inducida por el modelo de ligadura de nervios L5 y L6 (Kim y Chung, 1992). La evidencia previa que apoya nuestros resultados indica la presencia de receptores 5-HT₇ en fibras nerviosas Aβ (Cardenas y cols., 1999) cuya activación

normalmente media las sensaciones de tacto ligero o vibración, pero no de dolor, cuando existe un daño a las fibras aferentes primarias existe un patrón anormal de disparo en el cual se ha visto que participan las fibras nerviosas A β (Koltzenburg, 1995; La Motte y cols., 1991; Simone y cols., 1989b; Torebjörk y cols., 1992; Tallin y cols., 1976). Además, la estimulación táctil no nociva de fibras A β modifica la expresión de genes en neuronas del asta dorsal de la medula espinal bajo condiciones de inflamación (Molander y cols., 1992; Ma y Wolf, 1996a). Esto podría llevar a la percepción de una estimulación inocua como nociva. En el sitio del daño nervioso y en los tejidos que rodean a éste, hay una respuesta inflamatoria local la cual involucra acidosis e infiltración de mastocitos, macrófagos y otras células de la respuesta inmune que liberan mediadores químicos como 5-HT (Perry y cols., 1993; Silver y cols., 1996; Yoder y cols., 1997) que produce la activación de las fibras aferentes primarias dañadas, así como las fibras nerviosas adyacentes intactas. Además, el daño a las fibras aferentes primarias produce una alteración en los niveles de genes de expresión temprana como c-fos, donde se ha sugerido una participación de estos como factores que modulan la expresión de genes efectores que actúan de manera sinérgica con otros elementos regulatorios para controlar el patrón de cambios fenotípicos iniciados por el daño nervioso (Fiallos-Estrada y cols., 1993; Herdegen y cols., 1997; Hughes y Dragunow, 1995) de acuerdo a esto se reportó que los cuerpos celulares o somas de neuronas sensoriales en un modelo de ligadura nerviosa presentaban una mayor despolarización en respuesta a mediadores inflamatorios como la serotonina, mediante el incremento de excitabilidad de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal, que podría contribuir al dolor y alodinia después del daño neural periférico (Xue-Jun y cols., 2003). Los receptores 5-HT₇ se encuentran acoplados positivamente a la adenilato ciclasa que favorece la generación de AMPc intracelular y la subsecuente activación de PKA, la cual ha mostrado que fosforila receptores AMPA en ciertas poblaciones de neuronas (Barria y cols., 1997; Ben-Ari y cols., 1992; Lisman, 1994, 1997). En lo que concierne a eventos de largo plazo, aquellos en los cuales las proteincinasas dependientes de calcio juegan un papel crucial modulando la actividad de factores de transcripción nuclear y genes

de expresión temprana como c-fos (Bito y cols., 1997; Carafoli y cols., 1997; Deisseroth y cols., 1998; Hughes and Dragunow, 1995; Lerea, 1997; Lisman y cols., 1997; Stevens y cols., 1994) desencadenando una plasticidad sináptica. El hecho que el antagonista 5-HT₇ SB-269970 en este modelo de dolor neuropático si disminuya la conducta nociceptiva y no disminuya la conducta nociceptiva inducida por formalina al 1% como modelo de dolor inflamatorio cuando es administrado a nivel espinal puede ser soportado, además de los mecanismos anteriormente descritos (únicos del dolor neuropático), por el hecho que existe evidencia de una reducción en actividad de las neuronas inhibitorias GABAergicas después del daño a las fibras aferentes primarias como en el modelo de neuropatía de Kim y Chung, presentando una reducción funcional en la inhibición GABAergica de terminales de fibras C localizadas en el asta dorsal de la medula espinal (Bhisitkul y cols., 1990). De hecho, las ondas de despolarización lenta producidas en fibras aferentes primarias por neuronas inhibitorias se ven reducidas en las primeras semanas después del daño neural, sugiriendo que la influencia funcional de las neuronas inhibitorias sobre las terminales centrales de las fibras aferentes primarias esta reducida (Laird y Bennett, 1992; Wall y Devor, 1981), el daño a las fibras aferentes primarias produce un transitorio pero masivo aporte de aminoácidos excitatorios proveniente de los receptores NMDA hacia las vulnerables interneuronas inhibitorias. Esto puede llevar a una excesiva acumulación de calcio intracelular y la inducción de oxido nítrico y otros mecanismos que provocan su degeneración excitotóxica (Choi y Rothman, 1990; Gu y cols., 1997; Lerea, 1997; Mao y cols., 1997; Melino y Bernassola, 1997; Minghetti y Levi, 1998; Nishio y Watanabe, 1998). En el mecanismo de dolor inflamatorio en cambio no hay disminución del mecanismo de las interneuronas inhibitorias y si están presentes los mecanismos que enmascaran el efecto sobre los receptores 5-HT₇ en la medula espinal en donde hay antinocicepción y pronocicepción por los diversos subtipos de receptores de 5-HT como el mecanismo antinociceptivo de los receptores 5-HT_{1A} contrario al de los receptores 5-HT₇ los cuales se acoplan negativamente a adenilato ciclasa y su estimulación

aumenta las corrientes de potasio y suprime las corrientes de calcio (Boess y Martin, 1994; Millan, 1995; Yang y cols., 1998).

En el mecanismo de la alodinia táctil se ha sugerido una participación de las neuronas A β que normalmente transmiten la sensación de tacto inocuo (Wolf, 2004). Hay evidencia electrofisiológica que sugiere un papel pronociceptivo de los receptores 5-HT₇ vía la generación de AMPc, el cual genera una corriente de cationes activada por hiperpolarización (I_H), lo que refuerza la liberación de neurotransmisores e incrementa la excitabilidad de fibras (A δ). Interesantemente, este mismo fenómeno se ha observado en terminales centrales de fibras A β lo que sugiere la participación de los receptores 5-HT₇ en la mediación de la alodinia mecánica (Cardenas y cols., 1999, 2001; Chapin y Andrade, 2001 a,b) y que podría explicar la acción antialodínica del SB-269970. En cuanto a la administración sistémica (intraperitoneal) del SB-269970 mostró efecto antialodínico dependiente de la dosis (1-10 mg) en el modelo de neuropatía (Kim y Chung), alcanzando diferencia estadística significativa a 3 mg, efecto que corrobora el posible mecanismo espinal de desinhibición por apoptosis de interneuronas inhibitorias, la habilitación de fibras A β en la percepción de tacto inocuo en una sensación dolorosa y en la modificación del fenotipo neuronal por cambios transcripcionales (Scholz y Wolf, 2000). En resumen podemos suponer que el receptor 5-HT₇ tiene una participación en algunos de los mecanismos involucrados en el procesamiento del dolor neuropático.

8.4 CANULACIÓN INTRATECAL

De acuerdo a nuestros datos, las ratas canuladas presentaron en ambas fases de la prueba de formalina al 1% y el modelo de neuropatía una intensidad y duración similar a las obtenidas en ratas normales o no canuladas. Estos datos concuerdan con lo descrito por Yaksh y Rudy (1976) en donde establecen que la canulación no produce intolerancia en los animales por un período mínimo de cuatro meses. Sin embargo, algunos autores han reportado diferencias conductuales en la prueba de formalina entre ratas canuladas y no canuladas. Almeida y cols. (2000) observaron que la conducta de sacudidas se ve

incrementada en la fase 1 con concentraciones bajas de formalina (0.3 - 1%), mientras que dicha conducta aumenta durante la fase 2 con concentraciones altas (5%). Asimismo, Sawynok y Reid (2003) reportan que la conducta de sacudidas se intensifica con formalina al 5% mientras que otras conductas como la de mordida y lamida se ven inhibidas en el rango de concentraciones entre 1.5 y 5%. Estos reportes nos sugieren que la presencia de la cánula en el espacio intratecal puede desencadenar un proceso inflamatorio que produce sensibilización central a nivel del asta dorsal de la médula espinal afectando el comportamiento conductual de los animales en esta prueba. Sin embargo, debemos resaltar que la concentración empleada de formalina en nuestro estudio (1%) no altera la conducta de sacudidas en la fase 2 de la prueba de formalina pues de acuerdo con Almeida y colaboradores (2000), concentraciones bajas de formalina solo afectan la fase 1 de la prueba, fase en la cual los fármacos empleados a nivel espinal en el presente trabajo no tuvieron efecto significativo respecto al grupo control.

9. CONCLUSIONES

9.1 CONCLUSIONES PARTICULARES

La administración intratecal de SB-269970 en el modelo de plancha caliente no modificó el tiempo de latencia sugiriendo que el receptor 5-HT₇ no participa en el dolor agudo térmico inducido por la plancha caliente.

La administración periférica local de 5-carboximidotriptamina produce un efecto pronociceptivo lo que sugiere la participación periférica del receptor 5-HT₇ en la conducta dolorosa inducida por formalina.

La administración periférica local y sistémica de SB-269970 reduce el número de sacudidas en la prueba de formalina sugiriendo un papel periférico pronociceptivo del receptor 5-HT₇.

El SB-269970 revierte el efecto pronociceptivo inducido por 5-CT sugiriendo la participación del receptor 5-HT₇ en el dolor inducido por formalina.

El SB-269970 no modifica el efecto producido por formalina cuando es administrado de manera individual a nivel espinal.

La administración espinal y sistémica de SB-269970 en el modelo de neuropatía produjo un efecto antialodínico lo que sugiere una participación espinal y sistémica de los receptores 5-HT₇ en este tipo de dolor.

9.2 CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados sugieren que el receptor 5-HT₇ tiene un papel pronociceptivo en el procesamiento del dolor inflamatorio y neuropático, pero no agudo, a nivel periférico local, espinal y sistémico.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 📁 Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF. 1995. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*. 60:91-102.
- 📁 Abbott FV, Hong Y, Blier P. 1996. Activation of 5-HT_{2A} receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. *Neuropharmacology*. 35:99-110.
- 📁 Adham N, Zgombick JM, Bard J, Branchek TA. 1998. Functional characterization of the recombinant human 5-hydroxytryptamine 7(a) receptor isoform coupled to adenylate cyclase stimulation. *J Pharmacol Exp Ther*. 287:508-514.
- 📁 Akil H, Mayer DJ, Liebeskind JC. 1976. Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science*. 191:961-967.
- 📁 Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. 2005. Guide to receptors and channels. *British Journal of Pharmacology*. 144S:1-128.
- 📁 Alhaider AA, Wilcox GL. 1993. Differential roles of 5-hydroxytryptamine_{1A} and 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor subtypes in modulating spinal nociceptive transmission in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 265:378-385.
- 📁 Ali Z, Wu G, Kozlov A, Barasi S. 1994. The actions of 5-HT₁ agonists and antagonists on nociceptive processing in the rat spinal cord: results from behavioural and electrophysiological studies. *Brain Res*. 661:83-90.
- 📁 Aloisi AM, Albonetti ME, Carril G. 1994. Sex differences in the behavioural response to persistent pain in rats. *Neurosci Lett*. 179:79-82.
- 📁 Aloisi AM, Albonetti ME, Carril G. 1995a. Behavioural effects of different intensities of formalin pain in rats. *Physiol Behav*. 58:603-610.
- 📁 Aloisi AM, Sacerdote P, Albonetti ME, Carli G. 1995b. Sex-related effects on behaviour and beta-endorphin of different intensities of formalin pain in rats. *Brain Res*. 699:242-249.
- 📁 Almeida A, Tjolsen A, Lima D, Coimbra A, Hole K. 1996. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates acute nociception in the rat. *Brain Res Bull*. 39:7-15.
- 📁 Almeida A, Storkson R, Lima D, Hole K, Tjolsen A. 1999. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates pain behaviour induced by formalin in the rat. *Eur J Neurosci*. 11:110-122.

- 📁 Almeida FR, Schivo IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH. 2000. Chronic intrathecal cannulation enhances nociceptive responses in rats. *Braz J Med Biol Res.* 33:949-956.
- 📁 Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. 2004. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res.* 1000:40-56.
- 📁 Anker SI. 1974. New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. *Eur J Pharmacol.* 27:1-4.
- 📁 Apfel SC. 2000. Neurotrophic factors and pain. *Clin J Pain Suppl.* 2:07-11.
- 📁 Arner S, Meyerson BA. 1988. Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain. *Pain.* 33(1):11-23.
- 📁 Baker LP, Nielsen MD, Impey S, Metcalf MA, Poser SW, Chan G, Obrietan K, Hamblin MW, Storm DR. 1998. Stimulation of type 1 and type 8 Ca²⁺/calmodulin-sensitive adenylyl cyclases by the Gs-coupled 5-hydroxytryptamine subtype 5-HT_{7A} receptor. *J Biol Chem.* 273:17469-17476.
- 📁 Bard JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA, Weinshank RL. 1993. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem.* 268:23422-23426.
- 📁 Bardin L, Bardin M, Lavarenne J, Eschalier A. 1997. Effect of intrathecal serotonin on nociception in rats: influence of the pain test used. *Exp Brain Res.* 113:81-87.
- 📁 Bardin L, Lavarenne J, Eschalier A. 2000a. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain.* 86:11-18.
- 📁 Bardin L, Schmidt J, Alloui A, Eschalier A. 2000b. Effect of intrathecal administration of serotonin in chronic pain models in rats. *Eur J Pharmacol.* 409:37-43.
- 📁 Bardin L, Colpaert FC. 2004. Role of spinal 5-HT(1A) receptors in morphine analgesia and tolerance in rats. *Eur J Pain.* 8:253-261.
- 📁 Bardo MT, Hughes RA. 1979. Exposure to a nonfunctional hot plate as a factor in the assessment of morphine-induced analgesia and analgesic tolerance in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 10:481-485.
- 📁 Barnes NM, Sharp T. 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* 38:1083-1152.

- ✎ Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR. 1997. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science*. 276: 2042-2045.
- ✎ Ben-Ari Y, Anikszteijn L, Bregestovski P. 1992. Protein kinase C modulation of NMDA currents: an important link for LTP induction. *Trends Neurosci*. 15: 333-339.
- ✎ Bennett GJ, Xie YK. 1988. A peripheral mononeuropathy in the rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 33:87-107.
- ✎ Besson P, Perl E. 1969. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J. Neurophysiol*. 32:1025.
- ✎ Bester H, Matsumoto N, Besson JM, Bernard JF. 1997. Further evidence for the involvement of the spinoparabrachial pathway in nociceptive processes: a c-Fos study in the rat, *J Comp Neurol*. 383:439-458.
- ✎ Bhisitkul RB, Kocsis JD, Gordon TR, Waxman SG. 1990. Trophic influence of the distal nerve segment on GABA_A receptor expression in axotomized adult sensory neurons. *Exp Neurol*. 109:273-278.
- ✎ Binder W, Carmody J, Walker J. 2000. Effect of gender on anti-inflammatory and analgesic actions of two kappa-opioids. *J Pharmacol Exp Ther*. 292:303-309.
- ✎ Bitó H, Deisseroth K, Tsien RW. 1997. Ca²⁺-dependent regulation in neuronal gene expression. *Curr Opin Neurobiol*. 7:419-429.
- ✎ Boess FG, Martin IL. 1994. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology*. 33:275-317.
- ✎ Bonica J, Yaksh T, Liebeskind JC, Pechnick RN, Depantis A. 1990. Biochemistry and modulation of nociception and pain. En: John Bonica, *The management of pain*. 2nd ed. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. 96-120.
- ✎ Bouhassira D, Villanueva L, Bing Z, Le Bars D. 1992. Involvement of the subnucleus reticularis dorsalis in diffuse noxious inhibitory controls in the rat. *Brain Res*. 595:353-357.
- ✎ Bowman WC, Rand MJ. 1984. *Farmacología. Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones clínicas*. 2^{da} ed. Ed. Interamericana. 1-36.
- ✎ Bradley PB, Engel G, Feniuk W, Fozard JR, Humphrey PP, Middlemiss DN, Mylecharane EJ, Richardson BP, Saxena PR. 1986. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology*. 25(6):563-576.

- 📁 Brodie BB, Shore PA. 1957. A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. *Ann NY Acad Sci.* 66:631-642.
- 📁 Burstein R, Falkowsky O, Borsook D, Strassman A. 1996. Distinct lateral and medial projections of the spinothalamic tract of the rat, *J Comp Neurol.* 373:549-574.
- 📁 Calejesan AA, Kim SJ, Zhou M. 2000. Descending facilitatory modulation of a behavioral nociceptive response by stimulation in the adult rat anterior cingulate cortex. *Eur J Pain.* 4:83-96.
- 📁 Campbell JN, Raja SN, Meyer RA, Mackinnon SE. 1988. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain.* 32(1):89-94.
- 📁 Carafoli E, Nicotera P, Santella L. 1997. Calcium signalling in the cell nucleus. *Cell Calcium.* 22:313-319.
- 📁 Cardenas CG, Del Mar LP, Vysokanov AV, Arnold PB, Cardenas LM, Surmeier DJ, Scroggs RS, 1999. Serotonergic modulation of hyperpolarization-activated current in acutely isolated rat dorsal root ganglia neurons. *J Physiol.* 518:507–523.
- 📁 Cardenas LM, Cardenas CG, Scroggs RS, 2001. 5-HT increases excitability of nociceptor-like rat dorsal root ganglion neurons via cAMP-coupled TTX-resistant Na⁺ channels. *J Neurophysiol.* 86:241–248.
- 📁 Carter RB. 1991. Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: effect of behavioral endpoint. *Pain.* 47:211–220.
- 📁 Caterina MJ, Julius D. 2001. The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. *Ann Rev Neurosci.* 24:487-517.
- 📁 Cerveró F, Laird JMA. 1995. Fisiología del Dolor. En: Tratamiento del Dolor: Teoría y Práctica Aliaga L. Baños JE, Barutell C, et.al. MCR. Barcelona. 9-25.
- 📁 Cesselin F, Laporte AM, Miquel MC, Bourgoin S, Hamon M. 1994. Serotonergic mechanisms of pain control. In: Gebhart GF, Hammond DL, Jensen TS, editors. *Progress in pain research and management, vol 2, proceedings of the VIIth World Congress on Pain, Seattle, WA: IASP.* 669-695.
- 📁 Chapin EM, Andrade R. 2001a. A 5-HT₇ receptor-mediated depolarization in the anterodorsal thalamus. I Pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther.* 297:395–402.

- 📁 Chapin EM, Andrade R, 2001b. A 5-HT₇ receptor-mediated depolarization in the anterodorsal thalamus. Part II. Involvement of the hyperpolarization-activated current I_H. *J Pharmacol Exp Ther.* 297:403–409.
- 📁 Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Meth*; 53:55-63.
- 📁 Choi DW, Rothman SM. 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *A Rev Neurosci.* 13:171-182.
- 📁 Cicero TJ, Nock B, Meyer ER. 1996. Gender-related differences in the antinociceptive properties of morphine. *J Pharmacol Exp Ther.* 279:767-773.
- 📁 Clavelou P, Dallel R, Orliaguet T, Woda A, Raboisson P. 1995. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. *Pain.* 62:295-301.
- 📁 Coderre TJ, Fundytus ME, McKenna JE, Dalal S, Melzack R. 1993. The formalin test: a validation of the weighted-scores method of behavioral pain rating. *Pain.* 54:43-50.
- 📁 Costigan M, Woolf CJ. 2000. Pain: Molecular Mechanisms. *The Journal of Pain.* 1(3):35-44.
- 📁 Craft RM, Mogil JS, Aloisi AM. 2004. Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. *Eur J Pain.* 8(5):397:411.
- 📁 Crisp T, Stafinsky JL, Spanos LJ, Uram M, Perni V, Donepudi HB. 1991. Analgesic effects of serotonin and receptor selective serotonin agonists in the rat spinal cord. *Gen Pharmacol.* 22:247-251.
- 📁 Cunha FQ, Teixeira MM, Ferreira SH. 1999. Pharmacological modulation of secondary mediator systems-cyclic AMP and cyclic GMP-on inflammatory hiperalgesia. *Br J Pharmacol.* 127:671-678.
- 📁 Damaj MI. 2001. Influence of gender and sex hormones on nicotine acute pharmacological effects in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 296:132-140.
- 📁 Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW. 1998. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature.* 392:198-202.
- 📁 Dickenson AH, Sullivan AF. 1987. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurons in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain.* 30:349-360.

- 📁 Dixon WJ. 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 20:441-462.
- 📁 Doak GJ, Sawynok J. 1997. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience.* 80:939-949.
- 📁 Doly S, Fisher J, Brisorgueil MJ, Vergé D, Conrath M. 2005. Pre- and postsynaptic localization of the 5-HT₇ receptor in rat dorsal spinal cord: Immunocytochemical evidence. *The Journal of comparative neurology.* 490:256-269.
- 📁 Downie JW, Ferrington DG, Sorkin LS, Willis WD Jr. 1988. The primate spinocervicothalamic pathway: responses of cells of the lateral cervical nucleus and spinocervical tract to innocuous and noxious stimuli, *J. Neurophysiol.* 59:861-885.
- 📁 Dray A. 1995. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth.* 75(2):125-131.
- 📁 Dubner R, Bennett GJ. 1983. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Ann Rev Neurosci.* 6:381-418.
- 📁 Dubuisson D, Dennis SG. 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain.* 4:161-174.
- 📁 Eddy NB y Leimbach D. 1953. Synthetic analgesics: II. Dithienylbutenyl and dithienyl-butylamines. *J Pharmacol Exp Ther.* 107:385–393.
- 📁 Eide PK, Tjolsen A. 1988. Effects of serotonin receptor antagonists and agonists on the tail-flick responses in mice involve altered tail skin temperature. *Neuropharmacology.* 27:889-893.
- 📁 Eison AS, Wright RN, Freeman R. 1992. Peripheral 5-carboxamidotryptamine induces hindlimb scratching by stimulating 5-HT_{1A} receptors in rats. *Life Sci.* 51:PL95-99.
- 📁 Erspamer V, Asero B. 1952. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature.* 169:800-801.
- 📁 Espejo EF y Mir D. 1993. Structure of the rat's behaviour in the hot plate test. *Behav Brain Res.* 56:171–176.
- 📁 Fajardo GL, Linares MM, Olaya GH. 2001. Inflamación y dolor: cambios en el sistema nervioso periférico y central. *Medunab.* 4:1-14.

- 📁 Fasmer OB, Berge OG, Post C, Hole K. 1986. Effects of the putative 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-2-(di-n-propylamino)tetralin on nociceptive sensitivity in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 25:883-888.
- 📁 Feldman SR, Meyer JS, Quenzer LF. 1997. Serotonin. In: *Principles of Neuropsychopharmacology*. Ed. Sinahuer Associates. USA. 9:345-389.
- 📁 Fiallos-Estrada CE, Kummer W, Mayer B, Bravo R, Zimmerman M, Hergegen T. 1993. Long-lasting increase of nitric oxide synthase immunoreactivity, NADPH-diaphorase reaction and cJUN co-expression in dorsal root ganglion neurones following sciatic nerve transection. *Neurosci Lett.* 150:169-173.
- 📁 Fields HL, Basbaum AI. 1994. Central nervous system mechanisms of pain modulation. En: Wall PD, Melzack R. *Textbook of Pain*. 3rd ed. Ed. Churchill Livingston. Edinburgh. 243–257.
- 📁 Fields HL, Martín JB. 1994. Dolor: Fisiopatología y Tratamiento. En: Harrison. *Principios de Medicina Intena*. 13^{va} ed. Ed. Mc Graw Hill-Interamericana. España. Cap. 11:57-63.
- 📁 Gaddum JH, Picarelli ZP. 1957. Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemotther.* 12:323-328.
- 📁 García-Añoveros J, Samad TA, Zuvela-Jelaska L, Woolf CJ, Corey DP. 2001. *The Journal of Neuroscience.* 21:2678-2686.
- 📁 García JAL, Herrero JF. 1998. Somestesia: Mecanorrecepción, Termorrecepción y Nocicepción. En: *Manual de Neurociencia*. Jose Ma. Delgado, Alberto Ferrús, Francisco Mora y J. Rubio. Ed.Síntesis. España. 18:457-481.
- 📁 Gauriau C, Bernard JF. 2002. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol.* 87:251-258.
- 📁 Gjerstad J, Tjolsen A, Hole K. 1996. The effect of 5-HT_{1A} receptor stimulation on nociceptive dorsal horn neurones in rats. *Eur J Pharmacol.* 318:315-321.
- 📁 Gjerstad J, Tjolsen A, Hole K. 1997. A dual effect of 5-HT_{1B} receptor stimulation on nociceptive dorsal horn neurones in rats. *Eur J Pharmacol.* 335:127-132.
- 📁 Gold MS. 1999. Tetrodotoxin-resistant Na⁺ currents and inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:7645-7649.
- 📁 Gray TS, Magnuson DJ. 1992. Peptide immunoreactive neurons in the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis project to the midbrain central gray in the rat. *Peptides.* 13:451-460.

- ✎ Gustafson EL, Durkin MM, Bard JA, Zgombick J, Branchek TA. 1996. A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-HT₇ receptor in rat brain. *Br J Pharmacol.* 117:657-666.
- ✎ Gu ZZ, Pan YC, Cui JK, Klebuc MJ, Shenq S, Liu PK. 1997. Gene expression and apoptosis in the spinal cord neurons after sciatic nerve injury. *Neurochem. Int.* 30:417-426.
- ✎ Guyton AC, Hall JE. Dolor, cefalea y sensaciones de temperatura. En: *Tratado de Fisiología Médica.* Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill. 1996:661-674.
- ✎ Handwerker HO, Kobal G. 1993. Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiol Rev.* 73:639-671.
- ✎ Heidmann DE, Metcalf MA, Kohen R, Hamblin MW. 1997. Four 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *J Neurochem.* 68:1372-1381.
- ✎ Heidmann DE, Szot P, Kohen R, Hamblin MW. 1998. Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms produced by alternative splicing. *Neuropharmacology.* 37:1621-1632.
- ✎ Herdegen T, Skene P, Bähr M. 1997. The c-jun transcription factor-bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci.* 20:227-231.
- ✎ Hirshberg RM, Al-Chaer ED, Lawand NB, Westlund KN, Willis WD. 1996. Is there a pathway in the posterior funiculus that signals visceral pain?. *Pain.* 67:291-305.
- ✎ Hole K, Berge OG, Eide PK, Fasmer OB, Hunskaar S, Lund A, Rostand JH, Tjolsen A. 1990. Modifications in nociceptive reactivity following various serotonergic treatments: methodological difficulties. In: Besson JM, editor. *Serotonin and pain, Amsterdam: Elsevier.* 137-152.
- ✎ Hong Y, Abbott FV. 1994. Behavioural effects of intraplantar injection of inflammatory mediators in the rat. *Neuroscience.* 63:827-836.
- ✎ Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev.* 46(2):157-203.

- 📁 Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 71(4):533-54.
- 📁 Hughes P, Dragunow M. 1995. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmac Rev.* 47:133-178.
- 📁 Humphrey PP, Hartig P, Hoyer D. 1993. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 14(6):233-6.
- 📁 Hunskar HS, Berge OG, Hole K. 1986. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behav Brain Res.* 21:101–108.
- 📁 Hunskar HS, Fasmer OB, Hole K. 1985. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods.* 14:69–76.
- 📁 Hunskar S, Hole K. 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.* 30:103–114.
- 📁 Hyman SE, Cassem NH. Dolor. En: *Neurología.* Ed. Científica Médica Latinoamericana. 1995:1-20
- 📁 IASP. 1986. Pain terms: a current list with definitions and notes on usage. *Pain. Suplemento 3:*S215-S221.
- 📁 Jacob J. 1963. Some effects of morphine on adaptative and learning behaviour, in *Psychopharmacological Methods* (Votava Z, Harvath J, Vinar M eds). pp 70–79. MacMillan, New York.
- 📁 Katter JT, Burstein R, Giesler GJ Jr. 1991. The cells of origin of the spinothalamic tract in cats. *J Comp Neurol.* 303:101-112.
- 📁 Katter JT, Dado RJ, Kostarczyk E Jr, Giesler GJ. 1996. Spinothalamic and spinothalamic tract neurons in the sacral spinal cord of rats: II. Responses to cutaneous and visceral stimuli. *J Neurophysiol.* 75:2606-2628.
- 📁 Kayan S, Woods LA, Mitchell CL. 1969. Experience as a factor in the development of tolerance to the analgesic effect of morphine. *Eur J Pharmacol.* 6:333–339.
- 📁 Khasabov SG, Rogers SD, Ghilardi JR, Peters CM, Mantyh PW, Simone DA. 2002. Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. *J Neurosci.* 22:9086-9098.

- 📁 Kidd BL, Urban LA. 2001. Mechanisms of inflammatory of pain. *Br J Anaesth.* 87:3-11.
- 📁 Kim SH, Chung JM. 1992. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain.* 50:355-363.
- 📁 Knoll J, Kelemen K, Knoll B. 1955. Experimental studies on the higher nervous activity of animals. I. A method for the elaboration of a non-extinguishable conditioned reflex in the rat. *Acta Physiol Hung.* 8:327-344.
- 📁 Koltzenburg M. 1995. Stability and plasticity of nociceptor function and their relationship to provoked and ongoing pain. *Semin Neurosci.* 7:199-210.
- 📁 Laird JMA, Bennett GJ. 1992. Dorsal root potentials and afferent input to the spinal cord in rats with an experimental peripheral neuropathy. *Brain Res.* 584:181-190.
- 📁 LaMotte RH, Shain CN, Simone DA, Tsai EF. 1991. Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. *J Neurophysiol.* 66: 190-211.
- 📁 Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. 2001. Animal Models of Nociception. *Pharmacol Rev.* 53:597-652.
- 📁 Lee IO, Jeong YS. 2002. Effects of different concentration of formalin on paw edema and pain behaviors in rats. *J Korean Med Sci.* 17:81-85.
- 📁 Lenglet S, Louiset E, Delarue C, Vaudry H, Contesse V. 2002. Involvement of T-type calcium channels in the mechanism of action of 5-HT in rat glomerulosa cells: a novel signaling pathway for the 5-HT₇ receptor. *Endocr Res.* 28:651-655.
- 📁 Leopoldo M. 2004. Serotonin (7) receptors (5-HT (7) RS) and their ligands. *Curr Med Chem.* 11:629-661.
- 📁 Leopoldo M, Berardi F, Colabufo NA, Contino M, Lascivita E, Perrone R, Tortorella. 2004. Studies on 1-arylpiperazine derivatives with affinity for rat 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptors. *J Pharm Pharmacol.* 56:247-255.
- 📁 Lerea LS. 1997. Glutamate receptors and gene induction: signaling from receptor to nucleus. *Cell Signalling.* 9:219-226.
- 📁 Lerea L, Carlson NG, Simonato M, Morrow JD, Roberts JL, McNamara JO. 1997. Prostaglandin F_{2α} is required for NMDA receptor-mediated induction of c-fos mRNA in dentate gyrus neurons. *J Neurosci.* 17:117-124.

- 📁 Leslie T, Emson PC, Dowd PM, Woolf CJ. 1995. Nerve growth factor contributes to the up-regulation of growth-associated protein 43 and preprotachykinin A messenger RNAs in primary sensory neurons following peripheral inflammation. *Neuroscience*. 67:753-761.
- 📁 Li JL, Kaneko T, Shigemoto R, Mizuno N. 1997. Distribution of trigeminohypothalamic and spinohypothalamic tract neurons displaying substance P receptor-like immunoreactivity in the rat. *J Comp Neurol*. 378:508-521.
- 📁 Lisman J. 1994. The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci*. 17:406-413.
- 📁 Lisman JE. 1997. Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci*. 20:38-43.
- 📁 Lisman JE, Malenka RC, Nicoll RA, Malinow R. 1997. Learning mechanisms: the case for CaM-KII. *Science*. 276:2001-2002.
- 📁 Loeser JD, Melzack R. 1999. Pain: an overview. *Pain*. 353:1607-1609.
- 📁 Lovenberg TW, Baron BM, Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA, Foye PE, Racke M, Slore AL, Siegel BW, Danielson PE, Sutcliffe JG, Erlander MG. 1993. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron*. 11:449-458.
- 📁 Ma QP, Woolf CJ. 1996a. Basal and touch-evoked fos-like immunoreactivity during experimental inflammation in the rat. *Pain*. 67:307-316.
- 📁 Malmberg AB, Yaksh TL. 1993. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. *Pain*. 54:291-300.
- 📁 Mannion RJ, Costigan M, Decosterd I, Amaya F, Ma QP, Holstege JC, Ji RR, Acheson A, Lindsay RM, Wilkinson GA, Woolf CJ. 1999. Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:9385-9390.
- 📁 Mao J, Price DD, Zhu J, Lu J, Mayer DJ. 1997. The inhibition of nitric oxide-activated poly (ADP-ribose) synthetase attenuates transynaptic alteration of spinal cord dorsal horn neurons and neuropathic pain in the rat. *Pain*. 72: 355-366.
- 📁 Melino G, Bernassola F. 1997. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature*. 388:432-433.

- 📁 Melzack R, Wall PD. 1965. Pain mechanism: A new theory. *Science*. 150:971-979.
- 📁 Menetrey D, Chaouch A, Besson JM. 1980. Location and properties of dorsal horn neurons at origin of spinoreticular tract in lumbar enlargement of the rat. *J Neurophysiol*. 44:862-877.
- 📁 Merskey H. 1979. Pain terms: A list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain*. 6:249.
- 📁 Meuser T, Pietruck C, Gabriel A, Xie GX, Lim KJ, Pierce Palmer P. 2002. 5-HT₇ receptors are involved in mediating 5-HT-induced activation of rat primary afferent neurons. *Life Sci*. 71:2279-2289.
- 📁 Michael GJ, Averill S, Nitkunan A, Rattray M, Bennett DL, Yan Q, Priestley JV. 1997. Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. *J Neurosci*. 17:8476-8490.
- 📁 Millan MJ. 1994. Serotonin and pain: evidence that activation of 5HT_{1A} receptors does not elicit antinociception against noxious thermal, mechanical and chemical stimuli in mice. *Pain*. 58:45-61.
- 📁 Millan MJ. 1995. Serotonin (5-HT) and pain: a reappraisal of its role in the light of receptor multiplicity. *Semin Neurosci*. 7:409-419.
- 📁 Millan MJ. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*. 57:1-164.
- 📁 Millan MJ, Bervoets K, Colpaert F. 1991. 5HT_{1A} receptors and the tail-flick response. 8-OH-DPAT-induced spontaneous tail-flicks in the rat as an in vivo model of 5HT_{1A} receptor-mediated activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 256:973-982.
- 📁 Millan MJ. 2002. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*. 66:355-474.
- 📁 Miller LC. 1948. A critique of analgesic testing methods. *Ann N Y Acad Sci*. 51:34-50.
- 📁 Miller MW. 1987. The origin of corticospinal projection neurons in rat. *Exp Brain Res*. 67:339-356.
- 📁 Minghetti L, Levi G. 1998. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Progr Neurobiol*. 54:99-125.

- ✎ Mjellem N, Lund A, Eide PK, Storkson R, Tjolsen A. 1992. The role of 5HT_{1A} and 5HT_{1B} receptors in spinal nociceptive transmission and in the modulation of NMDA-induced behaviour. *NeuroReport*. 3:1061-1064.
- ✎ Molander C, Hongpaisan J, Grant G. 1992. Changing pattern of c-fos expression in spinal cord neurons after electrical stimulation of chronically injured sciatic nerve in the rat. *Neuroscience*. 50:223-236.
- ✎ Morgan MM, Sohn JH, Lohof AM, Ben-Eliyahu S, Liebeskind JC. 1989. Characterization of stimulation-produced analgesia from the nucleus tractus solitarius in the rat. *Brain Res*. 486:175-180.
- ✎ Mtui EP, Anwar M, Gomez R, Reis DJ, Ruggiero DA. 1993. Projections from the nucleus tractus solitarius to the spinal cord. *J Comp Neurol*. 337:231-252.
- ✎ Murphy AZ, Rizvi TA, Ennis M, Shipley MT. 1999. The organization of preoptic-medullary circuits in the male rat: evidence for interconnectivity of neural structures involved in reproductive behavior antinociception and cardiovascular regulation. *Neuroscience*. 91:1103-1116.
- ✎ Nayebi AR, Ahmadiani A. 1999. Involvement of the spinal serotonergic system in analgesia produced by castration. *Pharmacol Biochem Behav*. 64:467-471.
- ✎ Nayebi AR, Hassanpour M, Rezazadeh H. 2001. Effect of chronic and acute administration of fluoxetine and its additive effect with morphine on the behavioural response in the formalin test in rats. *J Pharm Pharmacol*. 53:219-225.
- ✎ Nishio E, Watanabe Y. 1998. NO induced apoptosis accompanying the change of oncoprotein expression and the activation of CPP32 protease. *Life Sci*. 62:239-245.
- ✎ O'Callaghan JP, Holzman SG. 1975. Quantification of the analgesic activity of narcotic antagonists by a modified hot plate procedure. *J Pharmacol Exp Ther*. 192:497-505.
- ✎ O'Neil MJ, Smith A, Heckelman P. 2001. *The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ. 13th ed. pp.1517-1518.
- ✎ Odeh F, Antal M. 2001. The projections of the midbrain periaqueductal grey to the pons and medulla oblongata in rats. *Eur J Neurosci*. 14:1275-1286.

- 📁 Oyama T, Ueda M, Kuraishi Y, Akaike A, Satoh M. 1996. Dual effect of serotonin on formalin-induced nociception in the rat spinal cord. *Neurosci Res.* 25:129-135.
- 📁 Page IH. 1976. The discovery of serotonin. *Biol Med.* 20:1-8.
- 📁 Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V. 2003. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci.* 4(7):529-39.
- 📁 Peroutka SJ, Snyder SH. 1979. Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H]5-hydroxytryptamine, [3H]lysergic acid diethylamide and [3H]spiroperidol. *Mol Pharmacol.* 16(3):687-99.
- 📁 Perry VH, Brown MC, Andersson PB. 1993. Macrophage response to central and peripheral nerve injury. *Adv Neurol.* 5:309-314.
- 📁 Pierce PA, Xie GX, Levine JD, Peroutka SJ. 1996. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience.* 70:553-559.
- 📁 Puig S y Sorkin LS. 1996. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain.* 64:345-355.
- 📁 Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM. 2001. *Neural Signaling.* In: *Neuroscience.* 2da.ed. Ed. Sinauer Associates. USA. 1:000-000.
- 📁 Rapport MM, Green AA, Page IH. 1948. Serum vasoconstrictor (serotonin). IV. Isolation and characterization. *J Biol Chem.* 176:1243-1251.
- 📁 Rexed B. 1952. Cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol.* 96:415.
- 📁 Rocha-González HI, Meneses A, Carlton SM, Granados-Soto V. 2005. Pronociceptive role of peripheral and spinal 5-HT₇ receptors in the formalin test. *Pain.* 117:182-192.
- 📁 Roberts WA, Eaton SA, Salt TE. 1992. Widely distributed GABA-mediated afferent inhibition processes within the ventrobasal thalamus of rat and their possible relevance to pathological pain states and somatotopic plasticity. *Exp Brain Res.* 89:363-372.

- 📁 Roberts LJ, Morrow JD. 2002. Analgésicos-Antipiréticos y antiinflamatorios, y fármacos antigotosos. En: Goodman and Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Ed. Mc Graw Hill. 10ma.ed. Vol.1:697-742.
- 📁 Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM, Schwartz JC. 1993b. Molecular cloning, characterization and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. Proc Natl Acad Sci USA. 90:8547-8551.
- 📁 Ruda MA, Bennett GJ, Dubner R. 1986. Neurochemistry and neurocircuitry in the dorsal horn. Progr Brain Res. 66:219.
- 📁 Sanders-Bush E, Mayer SE. 2002. Agonistas y Antagonistas de los Receptores de 5-Hidroxitriptamina. En: Goodman and Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Ed. Mc Graw Hill. 10ma.ed. Vol.1:277-298.
- 📁 Sasaki M, Ishizaki K, Obata H, Goto F. 2001. Effects of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin test. Eur J Pharmacol. 424:45-52.
- 📁 Sawynok J, Liu XJ. 2003. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. Progress in Neurobiology. 69:313-340.
- 📁 Sawynok J, Reid A. 2003. Chronic intrathecal cannulas inhibit some and potentiate other behaviors elicited by formalin injection. Pain. 103:7-9.
- 📁 Scholz J, Woolf CJ. 2002. Can we conquer pain?. Nat Neurosci. Suppl:1062-1067.
- 📁 Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. 1990. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. Pain; 43:205-218.
- 📁 Silver R, Silverman AJ, Vitkovic L, Lederhendler II. 1996. Mast cells in the brain: evidence and functional significance. Trends Neurosci. 19:25-31.
- 📁 Simone DA, Baumann TK, LaMotte RH. 1989b. Dose-dependant pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin. Pain. 38:99-107.
- 📁 Skirboll L, Hökfelt T, Dockray G, Rehfeld J, Brownstein M, Cuello AC. 1983. Evidence for periaqueductal cholecystokinin-substance P neurons projecting to the spinal cord. Neuroscience. 3:1151-1158.

- 📁 Snider WD, McMahon SB. 1998. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 20:629-632.
- 📁 Solomon RE, Gebhart GF. 1988. Mechanisms of effects of intrathecal serotonin on nociception and blood pressure in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 245:905-912.
- 📁 Song XJ, Zhang JM, Hu SJ, LaMotte RH. 2003. Somata of nerve-injured sensory neurons exhibit enhanced responses to inflammatory mediators. *Pain.* 104:701-709.
- 📁 Sorkin LS. 1997. Farmacología y fisiología básicas del proceso del dolor agudo. En: *Clínicas de Anestesiología de Norteamérica.* Wallace MS, Dunn JS, Yaksh TL. Ed. Mc Graw Hill. 2:245-259.
- 📁 Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y. 1994. The role of calcium-calmodulin kinase II in three forms of synaptic plasticity. *Curr Biol.* 4:687-693.
- 📁 Szolcanyi J. 1988. Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. *Agents Actions.* 23:4-11.
- 📁 Taiwo YO, Bjerknes LK, Goetzl EJ, Levine JD. 1989. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience.* 32:577-580.
- 📁 Taiwo YO, Levine JD. 1991. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience.* 44:131-5.
- 📁 Taiwo YO, Levine JD. 1992. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. *Neuroscience.* 48:485-490.
- 📁 Takagi K, Iwamoto S. 1952. Test method for analgesic activity. *Yakugaku Zasshi.* 72:787-791.
- 📁 Tallarida RJ, Murray RB. 1981. *Manual of pharmacologic calculations with computer programs.* Springer-Verlag. New York. Heidelberg, Berlin.
- 📁 Tallarida RJ. 2000. Dose-Response Analysis. In: *Drug Synergism and Dose-Effect, Data analysis.* Ed. Chapman and Hall. USA. 00:000
- 📁 Thomas DR, Atkinson PJ, Ho M, Bromidge SM, Lovell PJ, Villani AJ, Hagan JJ, Middlemiss DN, Price GW. 2000. [³H]-SB-269970-A selective antagonist radioligand for 5-HT₇ receptors. *Br J Pharmacol.* 130:409-17.

- ☞ Thomson CG, Beer MS, Curtis NR, Diggle HJ, Handford E, Kulagowski JJ. 2004. Thiazoles and thiopyridines: novel series of high affinity h5HT (7) ligands. *Bioorg Med Chem Lett.* 14:677-680.
- ☞ Tjölse A, Hole K. 1997. Animal models of analgesia, in *Pharmacology of Pain* (Dickenson AH and Besson JM eds) pp 1–20, Springer Verlag, Berlin.
- ☞ Tjölse A, Berge O-G, Hunskaar S, Rosland JH y Hole K. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* 51: 5-17.
- ☞ Todorovic S, Anderson EG. 1992. Serotonin preferentially hyperpolarizes capsaicin-sensitive C type sensory neurons by activating 5-HT_{1A} receptors. *Brain Res.* 585:212–218.
- ☞ Torebjörk HE, Lundberg LER, LaMotte RH. 1992. Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. *J Physiol.* 448:765-780.
- ☞ Treede RD, Kenshalo DR, Gracely RH. 1999. The cortical representation of pain. *Pain.* 79:105-111.
- ☞ Tsou AP, Kosaka A, Bach C, Zuppan P, Yee C, Tom L, Alvarez R, Ramsey S, Bonhaus DW, Stefanich E, Jakeman L, Eglen RM, Chan HW. 1994. Cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine 7 receptor positively coupled to adenylyl cyclase. *J Neurochem.* 63:456-464.
- ☞ Turk DC, Okifuji A. 1999. Assessment of patient's reporting of pain: an integrated perspective. *The Lancet.* 353:1784-1788.
- ☞ Udenfriend S. 1959. Biochemistry of serotonin and other indoleamines. *Vitam Horm.* 17:133-151.
- ☞ Vanhoenacker P, Haegeman G, Leysen JE. 2000. 5-HT₇ receptors: current knowledge and future prospects. *Trends Pharmacol Sci.* 21:70-77.
- ☞ Van Ree JM, Leys A. 1985. Behavioral effects of morphine and phencyclidine in rats: the influence of repeated testing before and after single treatment. *Eur J Pharmacol.* 113:353–362.
- ☞ Vincler M, Maixner W, Vierck CJ, Light AR. 2001. Estrous cycle modulation of nociceptive behaviors elicited by electrical stimulation and formalin. *Pharmacol Biochem Behav.* 69:315-324.
- ☞ Walker JS, Carmody JJ. 1998. Experimental pain in healthy human subjects: gender differences in nociception and in response to ibuprofen. *Anesth Analg.* 86:1257-1262.

- 📁 Wall PD, Devor M. 1981. The effect of peripheral nerve injury on dorsal root potentials and on transmission of afferent signals into the spinal cord. *Brain Res.* 209:95-111.
- 📁 Wall PD, Devor M. 1983. Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. *Pain.* 17:321-339.
- 📁 Wheeler-Aceto H, Cowan A. 1991. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology.* 104:35–44.
- 📁 Wheeler-Aceto H, Porreca F y Cowan A. 1990. The rat formalin test: comparison of noxious agents. *Pain.* 40: 229-238.
- 📁 Wiberg M, Blomqvist A. 1984. The spinomesencephalic tract in the cat: its cells of origin and termination pattern as demonstrated by the intraaxonal transport method. *Brain Res.* 291:1-18.
- 📁 Wiertelak EP, Roemer B, Maier SF, Watkins LR. 1997. Comparison of the effects of nucleus tractus solitarius and ventral medial medulla lesions on illness-induced and subcutaneous formalin-induced hyperalgesia. *Brain Res.* 748:143-150.
- 📁 Wijngaarden I, Tulp MThM, Soudijn W. 1990. The concept of selectivity in 5-HT receptor research. *Eur J Pharmacol.* 188:301–312.
- 📁 Wiklund L, Behzadi G, Kalen P, Headley PM, Nicolopoulos LS, Parsons CG, West DC. 1988. Autoradiographic and electrophysiological evidence for excitatory amino acid transmission in the periaqueductal gray projection to nucleus raphe magnus in the rat. *Neurosci Lett.* 93:158-163.
- 📁 Willis WD, Westlund KN. 1997. Neuroanatomy of the Pain System that modulate pain. *J Clin Neurophysiol.* 14:2-31.
- 📁 Willis WD Jr. 1999. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp Brain Res.* 124:395-421.
- 📁 Willis WD Jr, Zhang X, Honda CN, Giesler GJ Jr. 2001. Projections from the marginal zone and deep dorsal horn to the ventrobasal nuclei of the primate thalamus. *Pain.* 92:267-76.
- 📁 Wilson SG, Mogil JS. 2001. Measuring pain in the (knockout) mouse: big challenges in a small mammal. *Behav Brain Res.* 125:65-73.
- 📁 Woolf CJ. 2004. Pain: Moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med.* 140:441-451.

- 📁 Woolf CJ, Salter MW. 2000. Neuronal plasticity increasing the gain in pain. *Science*. 5472:1765-1769.
- 📁 Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. 1992. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*. 355:75-77.
- 📁 Woolf CJ, Costigan M. 1999. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci*. 96:7723-7730.
- 📁 Woolfe G, MacDonald AL. 1944. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J Pharmacol Exp Ther*. 80:300-307.
- 📁 Wu S-X, Zhu M, Wang W, Wang Y-Y, Li Y-Q, Yew DT. 2001. Changes of the expression of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by complete Freund's adjuvant-induced inflammation. *Neurosci Lett*. 307:183-186.
- 📁 Yaksh TL, Ozaki G, Mc Cumber D, Rathbun M, Svensson C, Malkmus S, Yaksh MC. 2001. An automated flinch detecting system for use in the formalin nociceptive bioassay. *J Appl Physiol*. 90:2386-2402.
- 📁 Yaksh TL, Rudy TA. 1976. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav*. 17:1031-1036.
- 📁 Yaksh TL, Wilson PR. 1979. Spinal serotonin terminal system mediates antinociception. *J Pharmacol Exp Ther*. 208:446-453.
- 📁 Yamamoto T, Yaksh TL. 1992. Studies on the spinal interaction of morphine and the NMDA antagonist MK-801 on the hyperesthesia observed in a rat model of sciatic mononeuropathy. *Neurosci Lett*. 135(1):67-70.
- 📁 Yang SW, Guo YQ, Kang YM, Qiao JT, Laufman LE, Dafny N. 1998. Different GABA-receptor types are involved in the 5-HT-induced antinociception at the spinal level: a behavioral study. *Life Sci*. 62:143-148.
- 📁 Yashpal K, Mason P, McKenna JE, Sharma SK, Henry JL, Coderre TJ. 1998. Comparison of the effects of treatment with intrathecal lidocaine given before and after formalin on both nociception and fos expression in the spinal cord dorsal horn. *Anesthesiology*. 88:157-164.
- 📁 Yeziarski RP. 1990. Effects of midbrain and medullary stimulation on spinomesencephalic tract in the cat. *J Neurophysiol*. 63:240-255.
- 📁 Yeziarski RP, Mendez CM. 1991. Spinal distribution and collateral projections of rats spinomesencephalic tract cells. *Neuroscience*. 44:113-130.

- ✎ Yoder EJ, Tamir H, Ellisman MH. 1997. Serotonin receptors expressed by myelinating Schwann cells in rat sciatic nerve. *Brain Res.* 753:299-308.
- ✎ Yoshida A, Chen K, Moritani M, Yabuta NH, Nagase Y, Takemura M, Shigenaga N. 1997. Organization of the descending projections from the parabrachial nucleus to the trigeminal sensory nuclear complex and spinal dorsal horn in the rat. *J Comp Neurol.* 383:94-111.
- ✎ Zhang YQ, Tang HS, Yuan B, Jia H. 1997. Inhibitory effects of electrically evoked activation of ventrolateral orbital cortex on the tail-flick reflex are mediated by periaqueductal gray in rats. *Pain.* 72:127-135.
- ✎ Zhang Y, Yang Z, Gao X, Wu G. 2001b. The role of 5-hydroxytryptamine 1A and 5-hydroxytryptamine 1B receptors in modulating spinal nociceptive transmission in normal and carrageenan-injected rats. *Pain.* 92(1-2):201-211.
- ✎ Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 16:109-110.
- ✎ Zimmermann M. 1984. Basic concepts of pain and pain therapy. *Arzneimittelforschung*; 34(9A):1053-1059.
- ✎ Zimmermann M. 1991. Central nervous mechanisms modulating pain related information: do they become deficient after lesions of the peripheral or central nervous system? En: Casey KL, (Ed), *Pain and Central Nervous System Disease: The Central Pain Syndromes.* Raven Press, New York; 183-199.

11. ANEXOS

11.1 ABREVIATURAS

5-CT	5-carboxamidotriptamina
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	Serotonina
5-HT ₇	Receptor de serotonina Subtipo 7
8-OH-DPAT	Bromuro de 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralin
ABC	Área bajo la curva
AC	Adenilato ciclasa
AMPA	Ácido DL- α -NH ₂ -2,3-dihidro-5-metil-3-oxo-4-isoxazolepropanoico
AMPc	Adenosin monofosfato ciclico
ASICs	Canales de sodio sensibles a ácido
ATP	Adenosin trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
Ca ²⁺	Calcio
CGRP	Péptido relacionado al gen calcitonina
COX	Ciclooxygenasa
DH	Asta dorsal
DRASIC	Canal iónico sensible a acido presente en la raíz dorsal
DRT	Núcleo reticular dorsal
EXIN	Interneuronas excitatorias
GABA	Ácido gamma-amino-butirico
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glia
GRD	Ganglio de la raíz dorsal
IB ₄	Isolectina B ₄
ICAM	Molécula de adherencia intracelular
I _H	Corriente de cationes activada
IL	Interleucina
ININ	Interneuronas inhibitorias
IPN	Neuronas propioespinales intersegmentales
K ⁺	Potasio
LC	Núcleo central lateral
MAO	Monoaminoxidasa
MAPK	Protein cinasa activada por mitogenos
MDEG	Canal iónico sensible a ácido degerina mamífera
MDvc	Núcleo medial dorsal
Mg ²⁺	Magnesio
Na ⁺	Sodio

NGF	Factor de crecimiento neural
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
N-NOC	Neuronas no nociceptivas
NO	Oxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NRD	Núcleo del rafe dorsalis por hiperpolarización
NRM	Núcleo del rafé magno
NRO	Núcleo del rafe oscuro
NRP	Núcleo del rafe pálido
NTS	Núcleo del tracto solitario
PAF	Fibra aferente primaria
PAG	Sustancia gris periacueductal
PBN	Núcleo parabraquial
PG	Prostaglandina
PKA	Protein cinasa dependiente de AMPc
PKC	Protein cinasa dependiente de Calcio
PN	Neurona de proyección
PO	Núcleo posterior
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
RVM	Bulbo raquídeo rostroventrolateral
SB-269970	Cloruro de (R)-3-(2-(2-(4-metilpiperidin-1-il)etil)pirrolidin-1-sulfonil)fenol
SI	Corteza somatosensorial primaria
SII	Corteza somatosensorial secundaria
SN	Neuronas nociceptivas específicas
SNC	Sistema nervioso central
TREK	Canal de potasio de dos poros
TrkA	Receptor tirosincinasa A
TRPM	Canal a mentol con potencial de receptor transitorio
TRPV	Canal vainilloide con potencial de receptor transitorio
VCAM	Molécula de adherencia de células vasculares
VDCC	Canal de calcio dependiente de voltaje
VmPO	Núcleo ventromedial posterior
VPI	Núcleo ventroposteroinferior
VPL	Núcleo ventroposterolateral
VPM	Núcleo ventroposteromedial
WDR	Neuronas de amplio rango dinámico

11.2 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo fueron presentados en el siguiente congreso:

49th Annual meeting of the Western Pharmacology Society and XXIX Congreso Nacional de Farmacología. 29 de Enero al 2 de Febrero de 2006. Puerto Vallarta, México. "Pronociceptive role of peripheral, spinal and systemic 5-HT₇ receptors in several pain models in the rat".

11.3 JURADO

El jurado designado por el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo aprobó esta tesis el día 01 de Agosto de 2006.

Maestro Héctor Urquiza Marín

Doctor Vinicio Granados Soto

Doctor Francisco Javier Flores Murrieta

Doctor Zurisaddai Hernández Gallegos