

Papel del Sistema Colinérgico Muscarínico en la Modulación del Dolor Crónico en la
Corteza Anterior del Cíngulo

Tesis

Que para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Juan Manuel Ortega Legaspi

Director de tesis:

Dr. Francisco Pellicer Graham



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis ha dado lugar a las siguientes comunicaciones a congresos:

1. Ortega-Legaspi JM, Lopez-Avila A, Coffeen U, Castillo-Tovar A, Lamothe-Molina P, Jaimes O, Pellicer F. The Role of Cholinergic M1, M2, M3 and M4 Receptors in the Anterior Cingulate Cortex Regarding Nociceptive Related Memory in the Rat. PM 034. 12th World Congress on Pain. Glasgow, Escocia, Reino Unido, 2008.
2. Ortega-Legaspi JM, Leon-Olea M, Melo A, Lamothe-Molina P, Simon-Arceo K, Lopez-Avila A, Coffeen U, Jaimes O, Pellicer F. Cholinergic M2, but not M1, receptor immunoreactivity expression diminishes in the anterior cingulate cortex in a neuropathic model of nociception. Pain in Europe VI, 6th Congress of the European Federation of IASP Chapters (EFIC). Lisboa, Portugal, 2009.

Artículos publicados derivados de la tesis:

1. Ortega-Legaspi JM. The nightmare of a painful phantom. *Salud Mental* Vol: 30 (6): 49 - 52 , Nov- Dic, 2007.
2. Ortega-Legaspi JM, León-Olea M, de Gortari P, Amaya MI, Coffeen U, Pellicer F. Expression of muscarinic M1 and M2 receptors in the anterior cingulate cortex associated with neuropathic pain. *Eur J Pain*. doi:10.1016/j.ejpain.2010.02.007

AGRADECIMIENTOS

A los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Francisco Pellicer Graham

Dr. Oscar Próspero García

Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza

A las Dras. Martha León Olea y Patricia de Gortari

Beca CONACyT 212563

A los miembros del jurado de examen de grado

DEDICATORIA

A mis papás, Ale y Héctor.

Fam. Pellicer León.

Abuelos Juan, Ricardo, Quitita y Lili.

Andrés, Margarita, Inge. Guzmán, Lili Hope

Mi compadre Horacio.

Miembros del laboratorio de Neurofisiología Integrativa:

Ulises

Karina

Fam. Agudelo Hernández

ÍNDICE

RESUMEN -----	8
SUMMARY -----	9
I. INTRODUCCIÓN -----	10
Memoria y miembro fantasma -----	13
II. SISTEMA COLINÉRGICO MUSCARÍNICO -----	15
Receptores muscarínicos -----	16
Relación del sistema muscarínico con la memoria y el dolor-----	21
Bloqueo muscarínico en la CAC y dolor neuropático -----	23
III. JUSTIFICACIÓN -----	27
IV. OBJETIVOS-----	27
V. HIPÓTESIS-----	28
VI. MATERIAL Y MÉTODOS -----	29
BLOQUEO COLINÉRGICO MUSCARÍNICO EN LA CAC Y DOLOR INFLAMATORIO Y AGUDO -----	29
Colocación de cánula para microinyección de escopolamina en la CAC-----	29
Inducción de proceso inflamatorio -----	30
Prueba de termonocicepción -----	30
Grupos experimentales -----	31
Análisis estadístico -----	31
EXPRESIÓN DE RECEPTORES M1 Y M2 EN LA CAC Y DOLOR NEUROPÁTICO -----	32
Microinyección de escopolamina en la CAC -----	32

Modelo de dolor neuropático -----	32
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) -----	34
Procedimiento de inmunofluorescencia -----	38
Doble marcaje para neuronas y el receptor M2 -----	40
Análisis de imágenes histológicas-----	42
Grupos experimentales -----	42
Análisis estadístico -----	43
VII. RESULTADOS -----	44
Bloqueo muscarínico en la CAC	
y dolor inflamatorio y agudo -----	44
Expresión de receptores M1 y M2 en la CAC	
y dolor neuropático-----	48
Cambios en el RNAm de los receptores	
M1 y M2-----	48
Cambios del área inmunoreactiva	
a los receptores M1 y M2 -----	52
VIII. DISCUSIÓN -----	60
Antialgesia producida por el	
bloqueo muscarínico en la CAC -----	61
Dinámica de receptores muscarínicos	
y dolor neuropático-----	63
Núcleos corticales y subcorticales relacionados	
con la integración del dolor de larga duración -----	66
Traslación del modelo animal de denervación	
para la explicación del dolor neuropático -----	67

IX. CONCLUSIONES	68
REFERENCIAS	70
ANEXOS	81

RESUMEN

La corteza anterior del cíngulo (CAC) y el sistema colinérgico muscarínico participan en el procesamiento del componente afectivo del dolor y de memoria. La CAC tiene receptores muscarínicos y recibe proyecciones colinérgicas. El bloqueo muscarínico en la CAC disminuye la nocicepción neuropática inducida por denervación. El objetivo de este trabajo fue analizar el papel del sistema muscarínico y sus receptores en la CAC con el dolor de larga duración. Se indujo hiperalgesia medida con el reflejo de flexión después de un proceso inflamatorio, y se vio que el bloqueo farmacológico de los receptores muscarínicos en la corteza anterior del cíngulo, previo a la inflamación, disminuyó dicha hiperalgesia. Después se analizó la expresión de receptores M1 y M2 en la CAC en una condición de nocicepción neuropática por denervación y con bloqueo muscarínico en la CAC previo. Se vio que el RNAm de ambos receptores en la región cg1 aumentó dependiendo del grado de nocicepción. El bloqueo con escopolamina previo a la nocicepción provocó un aumento en el RNAm para ambos receptores sin importar el grado de nocicepción. En ambas condiciones el cambio fue mayor para M2. En cg2, el RNAm de M1 disminuyó discretamente en todas las situaciones y el del M2 aumentó de acuerdo a la nocicepción mientras que con escopolamina el RNAm aumentó. La proteína del receptor M2 disminuyó en cg1 en la situación de nocicepción neuropática y aumentó con el bloqueo muscarínico. El bloqueo muscarínico en la CAC previene la adquisición de memoria relacionada a la nocicepción y disminuye la hiperalgesia inducida por inflamación. Existe una expresión diferencial de los receptores muscarínicos M1 y M2 asociada al dolor inducido por denervación, en dos regiones de la corteza anterior del cíngulo, cg1 y cg2.

SUMMARY

The anterior cingulate cortex (ACC) and the cholinergic muscarinic system are involved in the integration of the affective component of pain and memory. The ACC has muscarinic receptors and receives cholinergic projections. Muscarinic blockade in the ACC decreases neuropathic nociception induced by denervation. The purpose of this study was to determine the role of the muscarinic system and its receptors in the ACC in relation to long lasting pain. Hyperalgesia was induced and measured as the flexion reflex after an inflammatory process. Pharmacological blockade of muscarinic receptors in the ACC, previous to inflammation, decreased hyperalgesia. The expression of M1 and M2 receptors in the ACC was analysed in a neuropathic nociception condition and with a previous muscarinic blockade in the ACC. mRNA levels of both receptors in cg1 increased depending on the degree of nociception. The blockade with scopolamine previous to nociception caused an increase in mRNA for both receptors regardless of the degree of nociception. In both conditions the changes were greater for M2. In cg2, mRNA levels of M1 decreased discretely in all situations whilst M2 increased according to nociception and only increased when treated with scopolamine. M2 protein levels receptor decreased in cg1 in the neuropathic nociception situation and increased with muscarinic blockade. Muscarinic blockade in the ACC prevents nociceptive-related memory acquisition and decreases hyperalgesia induced by inflammation. We observed a differential expression of muscarinic receptors M1 and M2 associated to pain induced by denervation in two regions of the ACC, cg1 and cg2.

I. INTRODUCCIÓN

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP por sus siglas en inglés) lo define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a daño tisular real o potencial, o descrita en términos de dicho daño (Merskey et al, 1994).

La definición de dolor conlleva los elementos fisiológicos de memoria y aprendizaje con los cuales se preserva la integridad física de la especie. Los fenómenos que se relacionan con la percepción del dolor y con la memoria tienen una base fisiológica en común. Ambos procesos involucran mecanismos de integración como la potenciación post-tetánica (Lloyd, 1949), la potenciación a largo plazo (Bliss & Lomo, 1973; Sandkuhler, 2000; Zhuo, 2007) y los reflejos flexores antialgésicos (Perl et al., 1962).

Estos mecanismos están presentes tanto en organismos menos complejos como en respuestas espinales básicas en humanos (Klein et al., 2004). El control de la información dolorosa en el sistema nervioso central empieza en la médula espinal. En esta estructura se han descrito fenómenos que tradicionalmente se han relacionado con la memoria pero que también juegan un papel importante en la transmisión y modulación del dolor en la médula espinal (Dickenson et al., 1997). La médula espinal es la que se encarga de generar las respuestas ante estímulos nocivos agudos (Laird & Cervero, 1991). El control y las respuestas adecuadas a la estimulación dolorosa se integran a distintos niveles del neuroeje. La información dolorosa converge en las neuronas de las láminas I y V de la médula espinal, las cuales proyectan por medio del tracto espino talámico lateral al sistema lateral del tálamo, a los núcleos ventral

posterior lateral (VPL) y central lateral (CL), principalmente. Es en estos núcleos donde se integra la topografía aferente, esto es, estos núcleos son en parte los encargados de discriminar el sitio de origen de la señal dolorosa y su extensión; además de integrar los parámetros cualitativos de la sensación dolorosa. Es también el tálamo, por medio de los núcleos intralaminares, el que informa a estructuras del sistema límbico de estos procesos, dando como resultado lo que se ha denominado el matiz afectivo de la sensación dolorosa. Del tálamo la información se releva hacia la corteza cerebral de asociación, específicamente a las primeras capas corticales de la I a la IV, para posteriormente viajar a la corteza motora donde se genera un patrón motor antialgésico complejo, es decir, una sucesión de órdenes motoras conscientes dirigidas a disminuir o evitar mayor daño. Es a partir de este nivel que opera el sistema difuso inhibitorio descendente. Este sistema lo forman la sustancia gris periacueductal y los núcleos del rafe; sitios en los que se ha demostrado la presencia de péptidos opioides, serotonina y ácido γ -amino butírico, entre los principales, que constituyen la parte final o de largo plazo de los procesos antialgésicos (Pellicer & León-Olea, 1998).

Dentro de la definición de dolor se encuentra el término “experiencia desagradable”, ciertamente un término subjetivo pero que en el caso del humano se asocia a estados emocionales comunes y bien identificados cuando percibimos dolor. La evidencia de que el cíngulo está relacionado con el procesamiento de las emociones fue establecida por Papez en 1937. Desde entonces, varios estudios han vinculado a esta estructura, por medio del haz del cíngulo, con áreas límbicas que se constituyen en un circuito que se proyecta del hipocampo, a los cuerpos mamilares, los núcleos talámicos anteriores, la corteza del cíngulo y que regresa al hipocampo y más precisamente con

procesos cognitivos y afectivos asociados al dolor (Vogt et al., 1992; Devinsky et al., 1995; Vogt et al., 1996; Pellicer & León-Olea, 1998).

La convergencia del procesamiento de la memoria y el dolor en la corteza anterior del cíngulo (CAC) se documentó primero en pacientes con dolor intratable farmacológicamente por medio de lesiones neuroquirúrgicas causadas con radiofrecuencia. Estos pacientes presentaron una disociación cognitivo-afectiva en el postoperatorio (Foltz & White, 1962). Estudios más recientes, que se realizaron con técnicas de imágenes funcionales también han demostrado el papel de la CAC en el componente afectivo y de desagrado del dolor (Craig et al., 1996; Devinsky et al., 1995; Rainville et al., 1997; Vogt et al., 1996; Vogt et al., 1992). Esta convergencia también se ha estudiado utilizando aproximaciones experimentales en animales con los cuales se ha podido determinar la fisiología de los mecanismos de dolor de manera análoga a la encontrada en el humano (Johansen et al., 2001; Pellicer et al., 2006; Tuor et al., 2000; Vaccarino & Melzack, 1989, Graff-Guerrero et al, 2009). Estos hechos señalan el importante papel que juegan estructuras prefrontales, como la corteza del cíngulo en el matiz afectivo de procesos relacionados con dolor persistente. Se ha relacionado a la corteza del cíngulo, así como a la formación reticular, y a algunas estructuras límbicas con la actividad de una red neuronal denominada "neuromatriz"; esta idea incluso se ha extendido a estructuras subcorticales relacionadas tradicionalmente con el control motor, como los ganglios basales. La relevancia del concepto de "neuromatriz" se ha centrado en un posible mecanismo de génesis para el miembro fantasma doloroso y el dolor central entre otros. Esta hipótesis implica la existencia de una red neuronal, distribuida en varias áreas del cerebro que procesaría información paralela a la entrada

somatosensorial y que sería susceptible de ser modificada por la entrada sensorial (Melzack, 1990).

Miembro fantasma y memoria

El miembro fantasma es un fenómeno que está relacionado con la deaferentación nerviosa en humanos, la cual confiere la sensación persistente de un miembro después que este ha sido amputado. Un hecho importante que condiciona a los estados de percepción somatosensorial dolorosa, es la actividad sensorial previa a la deaferentación periférica. Al respecto se tiene evidencia clínica de que el dolor referido posterior a la amputación (miembro fantasma doloroso), presenta características sensoriales y topológicas similares al dolor experimentado previamente a la amputación. La temporalidad, localización y tipo de dolor previo a la amputación parecen jugar un papel importante en el desarrollo del miembro fantasma doloroso (Katz & Melzack, 1990). Una de las evidencias de la existencia de procesos de memoria asociados al dolor es la presencia de un miembro fantasma doloroso.

El término de memoria al dolor fue acuñado por Ronald Melzack y colaboradores quienes utilizaron observaciones clínicas en pacientes con dolor de miembro fantasma. En esta serie, los pacientes presentaron dolor fantasma muy similar al que sintieron antes de la amputación (Katz & Melzack, 1990, para mayor información sobre miembro fantasma referirse al anexo 2).

En este contexto, se ha descrito que la neurectomía (Wall et al., 1979) o ligadura parcial del nervio ciático (Bennet & Xie, 1988) en animales de experimentación

produce una conducta que se manifiesta como autotomía o autoagresión y que es cuantificable (Coderre et al, 1986; Albe-Fessard et al., 1990). Este procedimiento experimental se ha constituido en un modelo animal para el estudio de miembro fantasma (Kauppila & Pertovaara, 1991). Un hecho importante que justifica a este modelo para estudiar al miembro fantasma doloroso es que el bloqueo con anestesia local previo a la denervación abole la conducta de autotomía en la rata (Kauppila & Pertovaara, 1991). Por el contrario, la estimulación dolorosa previa a la denervación incrementa y acelera dicha conducta (Coderre & Melzack, 1986), de manera análoga a lo que sucede en pacientes con amputaciones traumáticas (Katz & Melzack, 1990). Esto pone de manifiesto que el estado funcional que precede a la sección de un nervio, condiciona las respuestas resultante de dicha lesión.

Más aún, en experimentos similares realizados en el sistema nervioso central, Melzack y colaboradores reportaron que la infiltración de anestesia local en el haz del cíngulo disminuye y retarda la aparición de la conducta de autotomía en la rata así como la fase nociceptiva tónica, producida por la inyección intraplantar de formalina (Vaccarino & Melzack, 1989; Vaccarino & Melzack, 1992). Estos hallazgos ponen de manifiesto el papel de las proyecciones prefrontales y de núcleos mesolímbicos relacionados con la corteza del cíngulo en la génesis y el mantenimiento del dolor neuropático. También se ha demostrado que la ventana temporal en que se aplica un estímulo nociceptivo previo a la deafferentación determina el desarrollo de las conductas antes descritas asociadas a dolor inflamatorio y denervación (López-Avila et al, 1999).

La manipulación quirúrgica que involucra el haz del cíngulo o la corteza anterior del cíngulo (CAC) se ha utilizado para el manejo de pacientes cuyo dolor ya no

responde a medios farmacológicos (Foltz & White, 1962; Hurt & Ballantine, 1974; Hassenbusch et al., 1990). Asimismo, existe evidencia obtenida mediante estudios de imágenes funcionales que ha mostrado la relación de la CAC con el componente afectivo del dolor, el cual está relacionado con el desagrado de este (Jones et al., 1991; Coghill et al., 1994; Hsieh et al., 1995; Rainville et al., 1997). Más aún, en experimentos con resonancia magnética funcional en ratas se demostró que estructuras pertenecientes a la matriz del dolor -que son las estructuras cerebrales que sistemáticamente se activan ante estímulos dolorosos- (incluyendo a la CAC; Peyron et al., 2000.) se activan con diversos estímulos nocivos de manera análoga a como sucede en humanos (Tuor et al., 2000; Hess et al., 2007; Graff-Guerrero et al., 2009; Westlund et al., 2009).

II. SISTEMA COLINÉRGICO MUSCARÍNICO

El sistema colinérgico muscarínico ha sido relacionado de forma importante en los procesos de aprendizaje y memoria (Hasselmo, 2006) así como de procesos de algesia y analgesia (Eisenach, 1999). Como se muestra en la figura 1, la estructura anatómico-funcional que tiene proyecciones colinérgicas directas a la CAC es la banda diagonal de Broca (Gaykema et al., 1990), donde además se ha demostrado la presencia de receptores muscarínicos (Levey et al., 1991; Tohyama M, 1998).

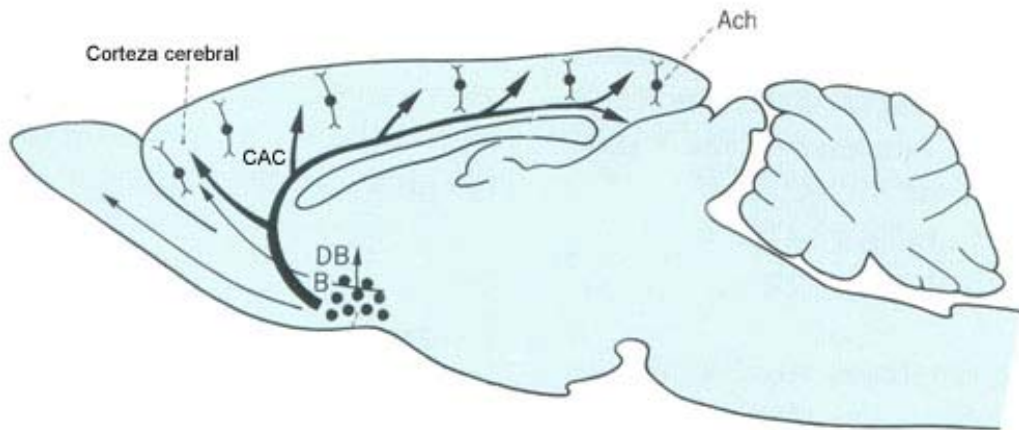


Figura 1. Diagrama con la representación de un corte sagital de cerebro de rata en la que se muestra la innervación colinérgica hacia la corteza cerebral. Nótese la proyección directa del núcleo basal de Meynert (B) y de la banda diagonal de Broca (DB) hacia las regiones frontales, incluyendo la corteza anterior del cíngulo (CAC).

Receptores muscarínicos

A la fecha se ha demostrado la existencia de cinco subtipos de receptores muscarínicos que se han agrupado en dos familias. Mediante el uso de pirenzepina (antagonista muscarínico) se distinguió la existencia de una familia de receptores denominada M1, que presenta una alta afinidad a este antagonista. El otro grupo de receptores, denominado M2, presenta afinidad intermedia o baja para la pirenzepina (Hammer et al. 1980).

Los receptores muscarínicos pertenecen a los denominados metabotrópicos, es decir, su activación genera una cascada intracelular relacionada con la activación de proteínas G inhibitoras o excitadoras; se han caracterizado cinco genes de estos receptores (M1 a M5). El receptor es una glicoproteína única con siete dominios transmembranales, un extremo extracelular N-terminal con los sitios de glicosilación, un

extremo intracelular C-terminal y un dominio citoplásmico largo entre los segmentos transmembranales cinco y seis (Figura 2A; Lucas-Meunier et al., 2003; Taylor & Heller, 2006).

La familia de los receptores M1 comprende a los receptores M1, M3 y M5; mientras que la familia de los receptores M2 se forma por los receptores M2 y M4. Los receptores de la familia M1 estimulan, por medio de una proteína G insensible a la toxina pertusis ($G_{q/11}$), a la vía del fosfoinositol. Este puede cerrar canales de K^+ provocando así despolarización de la célula. Los receptores de la familia M2 inhiben a la adenilato ciclasa por medio de la proteína G sensible a la toxina pertusis (G_i) lo que provoca inhibición de canales de Ca^{++} voltaje dependientes (Caulfield & Birdsall, 1998; Figura 2B).

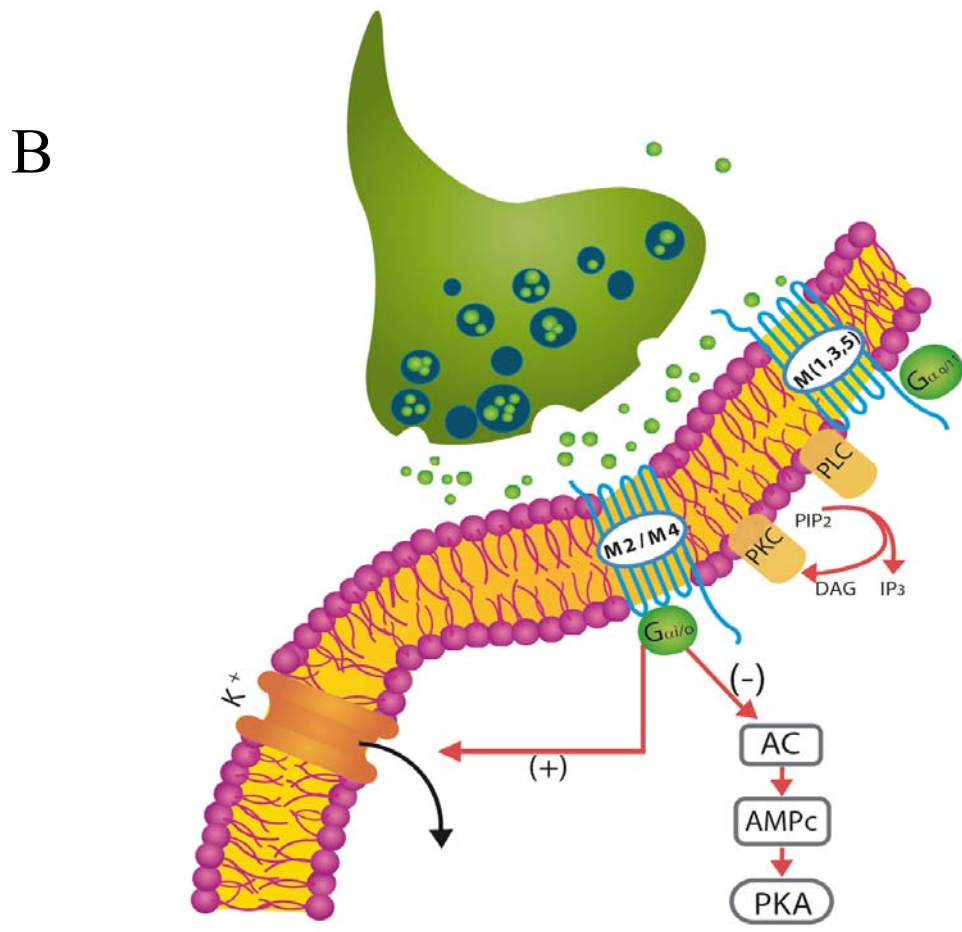
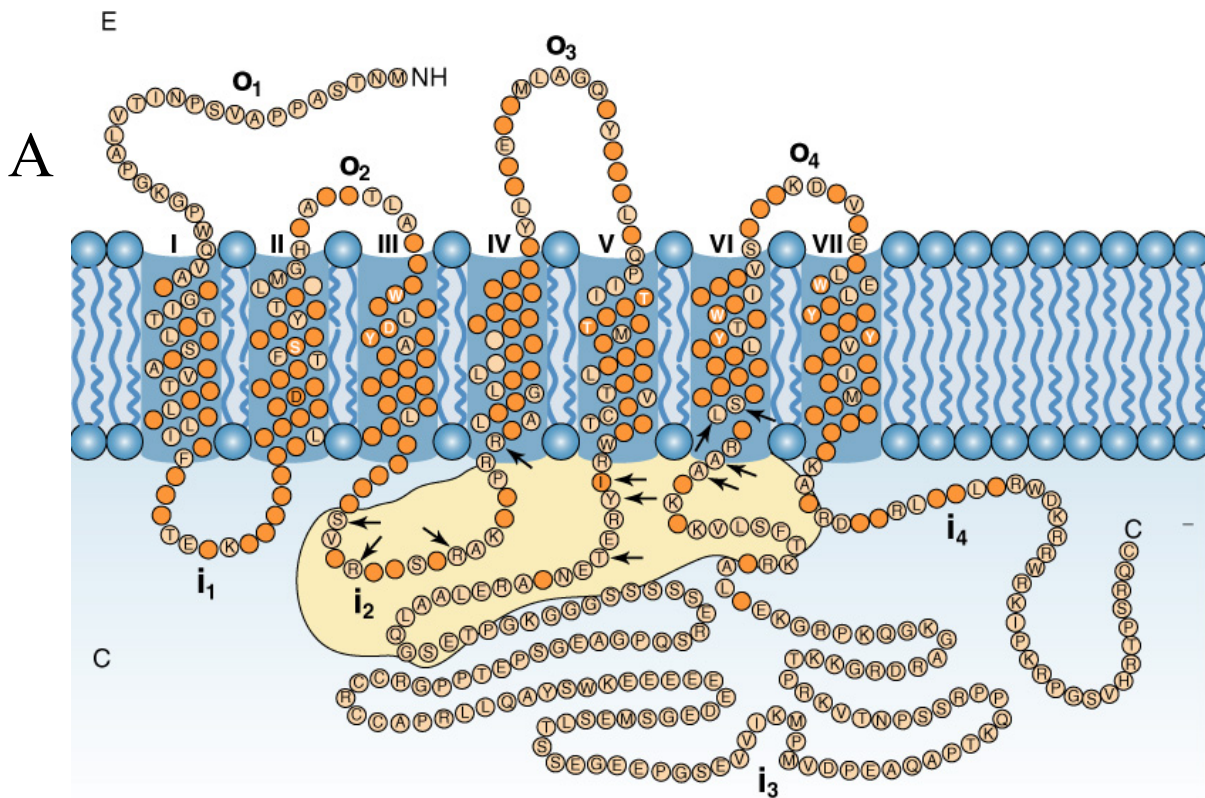


Figura 2

(A) Secuencia de amino ácidos y estructura transmembranal del receptor M1. Los amino ácidos que son idénticos entre los receptores M1, M2, M3 y M4 se muestran en anaranjado oscuro. La parte sombreada representa la región aproximada que determina el sitio de unión de la proteína G. Las flechas denotan los amino ácidos importantes para el acoplamiento de la proteína G. Los amino ácidos que se predice están involucrados en la unión de agonistas o antagonistas se muestran con letras blancas. i, asas intracelulares; o, asas extracelulares; c, citosol; e, espacio extracelular (Taylor & Heller, 2006).

(B) Representación del mecanismo de acción de los 5 subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos, la parte superior representa una neurona presináptica liberando acetilcolina (círculos verdes) mientras que la parte inferior representa la membrana postsináptica. Los receptores M1, M3 y M5 activan a una proteína G_q , las subunidades $G_{\alpha q}$ y α_{11} activan a la fosfolipasa C (PLC) lo que genera la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) con lo que se obtienen diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). El DAG aumenta la actividad del Ca^{++} intracelular y de la proteína-quinasa C (PKC). El IP_3 moviliza Ca^{++} del retículo endoplásmico elevando así los niveles de Ca^{++} citosólico libre. Las respuestas subsecuentes se desencadenan por medio de los efectos del Ca^{++} en proteínas reguladas por Ca^{++} y por la fosforilación mediada a través de cinasas dependientes de Ca^{++} /calmodulina y PKC. Los receptores M2 y M4 interactúan con la subunidad α de la proteína G_i , con esta interacción la subunidad $G_{\alpha i}$ se disocia de la subunidad $\beta\gamma$, lo que inhibe a la adenilatociclasa (AC), disminuyendo así los niveles de AMPc y de la proteína-quinasa dependiente de AMPc (PKA). Además, los receptores M2 y M4 regulan canales de K^+ rectificadores hacia adentro (G-protein coupled inwardly rectifying K^+ channels, GIRKs) mediante la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G_i .

La presencia de los receptores muscarínicos en el sistema nervioso central ha sido demostrada en estructuras como el núcleo olfatorio anterior, tubérculo olfatorio, hipocampo, núcleo supraóptico hipotalámico, núcleo accumbens y la corteza cerebral (Rotter et al., 1979). Los receptores que se analizaron en este trabajo fueron los M1 y M2 dado estos son los receptores muscarínicos más abundantes en la CAC (Figura 3; Tabla 1; Levey et al., 1991) y cada uno representa a una de las familias de receptores muscarínicos.

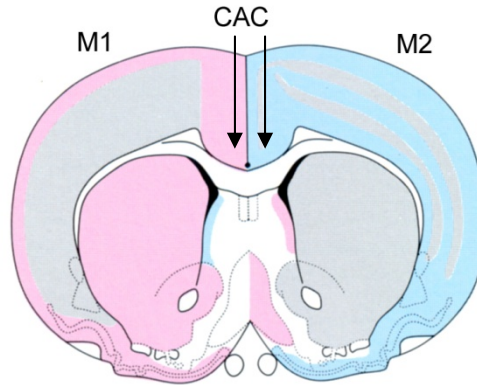


Figura 3. Imagen representativa de un corte coronal de cerebro de rata donde se muestran la distribución de receptores M1 y M2. En rojo se muestran los sitios de unión del receptor M1 y en azul del M2. Nótese la presencia de ambos receptores en la corteza anterior del cíngulo (CAC; tomado de Tohyama M, 1998).

Región	Receptores totales (fmol/ensayo)	Inmunoprecipitados (fmol/pellet)				
		M1	M2	M3	M4	M5
Corteza	47.4 ± 2.4	20.4 ± 2.3 (40)	18.7 ± 3.1 (37)	1.6 ± 0.2 (0)	8.6 ± 1.6 (15)	1.4 ± 0.3 (0)
Estriado	48.8 ± 2.0	16.6 ± 2.6 (31)	15.2 ± 1.8 (29)	1.4 ± 0.2 (0)	15.4 ± 4.0 (29)	1.4 ± 0.2 (0)
Tálamo	41.8 ± 1.3	3.4 ± 0.3 (6)	21.5 ± 2.3 (49)	1.3 ± 0.2 (0)	7.5 ± 1.7 (15)	1.3 ± 0.3 (0)
Tallo cerebral	20.6 ± 2.4	1.3 ± 0.3 (2)	18.2 ± 1.8 (84)	1.0 ± 0.2 (0)	1.2 ± 0.2 (1)	1.1 ± 0.2 (1)

Tabla 1. Cantidad de receptores muscarínicos en diferentes estructuras del cerebro de rata. Nótese que hay un mayor número de receptores M1 y M2 en la corteza cerebral (recuadro rojo), los valores en paréntesis son el valor en porcentaje en función del total de receptores muscarínicos en el área respectiva (tomado de Levey et al., 1991).

Desde el punto de vista farmacológico, la muscarina (alcaloide que se extrae del hongo *Amanita muscaria*) es el agonista natural de este sistema. Hasta la fecha, no existen agonistas farmacológicos específicos para cada subtipo (Caulfield & Birdsall, 1998). Se ha demostrado la existencia de antagonistas no selectivos dentro de los que se encuentran la atropina y la escopolamina, así como algunos con selectividad parcial para algunos de los subtipos. En este sentido, sustancias como la pirenzepina a bajas concentraciones funcionan como antagonistas de la familia de los receptores M1 (Hammer et al., 1980) y la metoctramina y el AFDX – 116 son más selectivos para la familia de los M2 (Mochida & Kobayashi, 1988). Existen otros compuestos con diferentes selectividades para los diferentes receptores muscarínicos, sin embargo las constantes de afinidad son similares para algunos subtipos (Waelbroeck et al., 1990). La falta de agonistas selectivos, así como los pocos antagonistas selectivos es uno de los mayores problemas para la caracterización de los diferentes subtipos de receptores (Lucas-Meunier et al., 2003).

Relación del sistema muscarínico con la memoria y el dolor

Algunas estructuras pertenecientes al sistema límbico como el hipocampo, el lóbulo temporal, la amígdala, el núcleo accumbens y la CAC están involucradas de manera importante en procesos de aprendizaje y memoria (Schacter et al., 1989; Jarrard, 1993; Devinsky et al., 1995; Chapman, 1996; Wiig & Burwell, 1998; Wan et al., 1999; Setlow et al., 2000). Reportes recientes muestran que la CAC juega un papel en el procesamiento de la memoria post-entrenamiento y el aprendizaje asociado a la predicción y la evitación de estímulos nociceptivos (Devinsky et al., 1995). Más aún, en

ratas que aprendieron el camino correcto en un laberinto en T después de un estímulo eléctrico nociceptivo, el bloqueo colinérgico muscarínico en la CAC con escopolamina disminuye la resolución del mismo de manera correcta. Por lo tanto, la CAC por medio del sistema colinérgico muscarínico juega un papel en la memoria a estímulos nociceptivos (Farr et al., 2000).

Se ha documentado que existe analgesia mediada por el sistema colinérgico en la médula espinal (Jones & Dunlop, 2007), la cual se produce al activar este sistema con agonistas (Eisenach et al., 1996). La inyección de carbacol (agonista colinérgico) en la sustancia gris periacueductal redujo la nocicepción aguda evocada por calor (Guimaraes & Prado, 1994; Guimaraes et al., 2000). En ratones con deficiencia o “knock-out” para los receptores muscarínicos M2 y M4 se observó que la analgesia mediada por el sistema colinérgico está interrumpida (Duttaroy et al., 2002). Se obtuvieron resultados similares por medio de la desactivación supraespinal del receptor M1 por medio del uso de oligonucleótidos antisentido. Esta evidencia mostró, en animales a los que se les aplicó estimulación térmica nociceptiva, la interrupción de la antinocicepción que normalmente se da al activar al sistema colinérgico con un agonista muscarínico (oxotremorina; Galeotti et al., 2003; 2005). Además, un agonista colinérgico en el núcleo intralaminar parafascicular del tálamo disminuye la conducta nociceptiva; esta respuesta se bloquea con un antagonista muscarínico (Harte et al., 2004).

La CAC, específicamente la región más rostral (*cingulum 1* ó *cg1*), juega un papel clave en el componente afectivo del dolor (Devinsky et al., 1995; Paxinos & Watson, 1998; Johansen et al., 2001). El sistema colinérgico muscarínico proyecta a

esta estructura (Gaykema et al., 1990) donde la presencia de receptores muscarínicos se ha demostrado (Figura 1; Levey et al., 1991; Tohyama M, 1998).

Bloqueo muscarínico en la CAC y dolor neuropático

En un trabajo previo de nuestro grupo, nos dimos a la tarea de evaluar el efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos en el dolor neuropático, mediante la microinyección de escopolamina (antagonista muscarínico no selectivo) en la CAC utilizando el modelo de denervación propuesto por Wall en 1979 con la aplicación de un estímulo termonociceptivo previo a esta con el fin de aumentar la autotomía y disminuir el tiempo de inicio de la misma (Coderre et al., 1986). Este modelo experimental desencadena una conducta cuantificable conocida como conducta de autotomía que se relaciona con el grado de nocicepción (Coderre et al., 1986). Se cuantificó la respuesta conductual al dolor neuropático con el bloqueo colinérgico a diferentes tiempos en relación al estímulo nociceptivo y la denervación.

La aproximación experimental consistió en microinyectar escopolamina en la CAC antes del estímulo termonociceptivo en un grupo, entre este estímulo y la denervación en otro y después de la denervación en otro más.

Los resultados mostraron una disminución en el puntaje así como en el inicio de la conducta de autotomía, que dependió del momento en que se aplicó la microinyección de escopolamina en la CAC. Cuando la escopolamina se administró en la CAC antes de cualquier estimulación nociceptiva hubo una disminución en la conducta de autotomía y no así cuando se microinyectó después de ambos estímulos. Cuando este fármaco se microinyectó en la CAC entre el estímulo termonociceptivo y la

denervación hubo una tendencia a la disminución de la conducta de autotomía que no fue tan evidente como cuando la administración se dio antes (Figura 4 y tabla 2).

Este trabajo puso de manifiesto que existe un papel del sistema colinérgico muscarínico en el dolor neuropático inducido por denervación y en la adquisición de la memoria relacionada a la nocicepción. Es importante mencionar que en este trabajo se utilizó un bloqueo de los receptores muscarínicos en la CAC, de manera similar al bloqueo con el que en otros trabajos se modificaron tareas de memoria en roedores (Farr et al., 2000). Si bien a nivel espinal, talámico y gris periacueductal la analgesia mediada por el sistema muscarínico se da aparentemente por la activación del mismo (Guimaraes & Prado, 1994; Guimaraes et al., 2000; Duttaroy et al., 2002; Harte et al., 2004), pareciera que en estructuras como la CAC –en donde converge la integración de procesos tanto de memoria como del componente afectivo del dolor- se logra un efecto de disminución de la nocicepción crónica con el bloqueo de estos receptores (para mayor detalle en este trabajo ver el anexo 1).

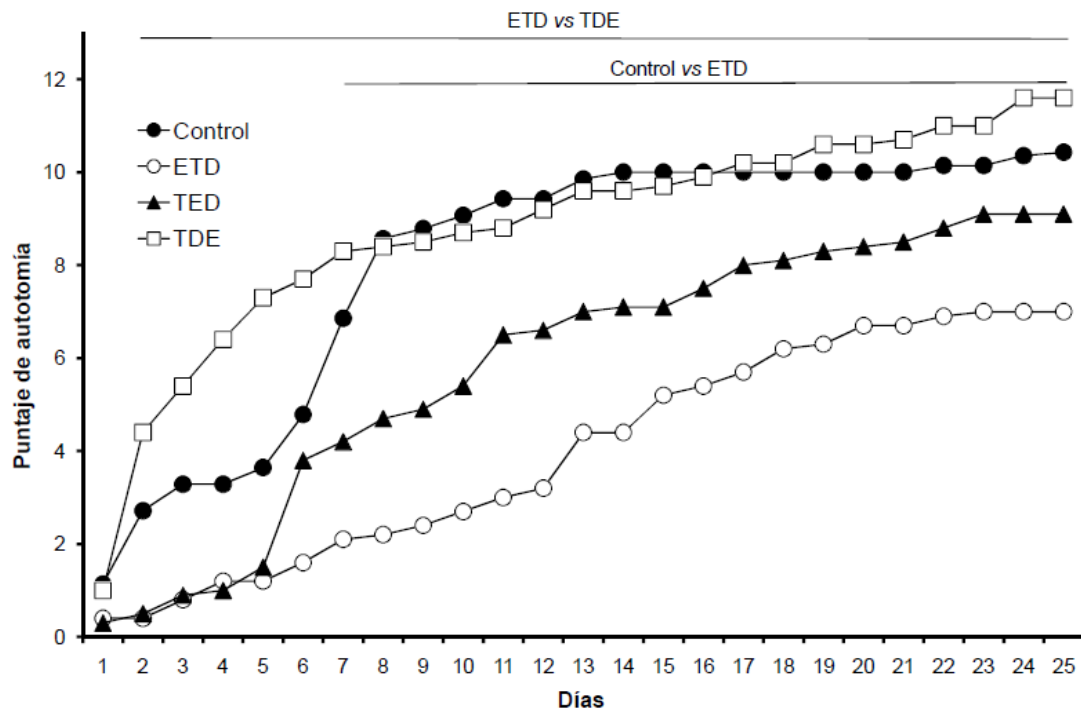


Figura 4. Promedio de la conducta de autotomía que se midió por 25 días en ratas tratadas con escopolamina en la corteza anterior del cíngulo (CAC) en un modelo de dolor neuropático por denervación. A todos los grupos se les realizó la denervación ciática derecha 30 min después del estímulo termonociceptivo. Al grupo control se le microinyectó solución salina al 0.9% en la CAC antes de la termonocicepción (inmersión de la pata derecha en agua a 55 °C por 20 s). A los grupos experimentales se les microinyectó escopolamina (10 µg en 250 nl) en la CAC ya sea antes de la termonocicepción (ETD), entre la termonocicepción y la denervación (TED) o después de ambas maniobras (TDE). El grupo ETD mostró un puntaje de autotomía disminuido al compararlo contra el control y el grupo TDE. La significancia estadística entre grupo se muestra por medio de las barras horizontales ($p < 0.05$). Tomada de Ortega-Legaspi et al., 2003; anexo 1.

Conducta de autotomía en los diferentes esquemas experimentales.			
Grupo	Incidencia	Inicio de autotomía (días ± error estándar).	Máximo puntaje de autotomía al día 25.
Control	14/14 (100%)	3.35 ± 0.78	10.4
ETD	10/10 (100%)	9.6 ± 1.8*	7
TED	9/10 (90%)	7.6 ± 2.12	9.1
TDE	10/10 (100%)	2.1 ± 0.45* **	11.6

Tabla 2. Incidencia, inicio y puntaje máximo de la conducta de autotomía que se midió por 25 días en ratas con bloqueo muscarínico en la corteza anterior del cíngulo (CAC) en un modelo de dolor neuropático por denervación. La incidencia se calculó para cada grupo como el porcentaje del número de animales que presentaron autotomía, dividido entre el total de animales por grupo. No hubo diferencias en la incidencia entre los diferentes grupos. El inicio de la autotomía se calculó como el día promedio en que la autotomía inició en cada grupo. Las diferencias entre grupos para este parámetro se establecieron con una ANOVA de una vía: termonocicepción-escopolamina-denervación (TED) vs termonocicepción-denervación-escopolamina (TDE) *, escopolamina-termonocicepción-denervación (ETD) vs TDE **, y ETD vs control* (nivel de significancia Tukey: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$). El puntaje de autotomía se obtuvo con la escala de Wall (1979). Tomada de Ortega-Legaspi et al., 2003; anexo 1.

III. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que el sistema colinérgico muscarínico juega un papel en la modulación del dolor en la CAC y esta estructura tiene proyecciones colinérgicas y receptores muscarínicos. La CAC también se ha involucrado en la modulación de procesos relacionados con la memoria. Con base en esto, el propósito de esta tesis es analizar el papel del sistema colinérgico muscarínico y la dinámica de sus receptores involucrados en procesos de dolor de larga duración en la CAC.

IV. OBJETIVOS

Dado que el bloqueo colinérgico muscarínico disminuye el dolor crónico neuropático inducido por denervación el objetivo fue evaluar el efecto del bloqueo los receptores muscarínicos en el dolor inflamatorio, por medio de la microinyección de escopolamina (antagonista muscarínico no selectivo) en la CAC utilizando el modelo de dolor inflamatorio inducido con carragenina (Hargreaves et al., 1988). Este modelo sirve para medir hiperalgesia cutánea utilizando una fuente de calor después de la inyección intraplantar de carragenina, la cual es genera un proceso inflamatorio aséptico.

Considerando el papel del sistema colinérgico muscarínico en la CAC en la modulación del dolor crónico y la presencia de receptores muscarínicos M1 y M2 principalmente en la CAC, otro objetivo de este estudio fue investigar los posibles cambios en la expresión de los receptores M1 y M2, tanto a nivel del RNA mensajero (RNAm) así como de la proteína, bajo una condición neuropática. También se evaluó si

estos cambios podrían ser revertidos con escopolamina en el mismo modelo de dolor neuropático.

V. HIPÓTESIS

Dado que se ha demostrado el papel del bloqueo colinérgico muscarínico en la CAC en el dolor neuropático crónico por denervación, este mismo bloqueo disminuirá la respuesta nociceptiva inducida por otro proceso de larga duración, la inflamación; no así la respuesta termonociceptiva aguda.

Dado que la conducta algésica de autotomía se revierte parcialmente por el bloqueo de los receptores muscarínicos con escopolamina, hipotetizamos que los receptores M2 (acoplados a proteína G inhibidora) se irían a la baja en animales con dolor neuropático, permitiendo así asegurar la entrada de información que favorece la memoria y el aprendizaje.

El tratamiento con escopolamina dentro de la CAC aumentaría la expresión de receptores M2 en ratas con dolor neuropático.

En lo que respecta al receptor M1 (acoplado a una proteína Gq), hipotetizamos que no variaría o aumentaría ligeramente su expresión en ambas situaciones.

Sumado a esto, esperamos mayor cambio de receptores en el área denominada cg1, que corresponde con el sitio responsable de integrar el componente afectivo del dolor en la rata.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos fueron realizados de acuerdo al comité de ética del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente” (INPRF) y a la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (Zimmermann, 1983).

Para todos los experimentos se utilizaron ratas Wistar macho (250-350 g) que fueron criadas en el bioterio del INPRF y mantenidas en cajas individuales de acrílico transparente, bajo un ciclo de luz/oscuridad constante (12 x 12 h), a 23 °C, 52% de humedad y alimentación e hidratación *ad libitum*.

BLOQUEO MUSCARÍNICO EN LA CAC Y DOLOR INFLAMATORIO Y AGUDO.

Con esta serie experimental se evaluó la respuesta antialgésica termonociceptiva (reflejo de flexión) seguida de la microinyección de 10 µg en 250 nl de escopolamina en la CAC 30 min y 24h después de la inducción de un proceso inflamatorio.

Colocación de cánula para microinyección de escopolamina en la CAC

Siete días previos a la inducción del proceso inflamatorio, bajo anestesia general con halotano al 2%, se colocó por medio de un aparato estereotáxico una cánula a nivel de las meninges (A, 1 mm desde Bregma; L, 0.6 mm). La cánula se fijó con metilmetacrilato. El día de la microinyección de 10 µg de escopolamina disueltos en 250 nl

de solución salina, se introdujo una aguja en la cánula, la cual sobrepasaba la misma por 2 mm, quedando así en la CAC.

Inducción del proceso inflamatorio

El proceso inflamatorio se indujo mediante la infiltración intraplantar derecha de carragenina lambda (CAR 50µl al 1% en solución salina. Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA).

Prueba de termonocicepción

Con el fin de disminuir el estrés de los animales en experimentación, se sometieron a un periodo de habituación tanto al equipo como al personal a lo largo de 7 días consistentes en sesiones diarias de 10 min en las cajas de experimentación. El séptimo día los animales fueron pesados y marcados. La respuesta conductual nociceptiva se midió por medio de un aparato de termonocicepción plantar (Ugo Basile mod. 7370). Las ratas permanecieron en cajas de acrílico (17 x 22x 13cm), con piso de vidrio. Después del periodo de aclimatación, la fuente de calor radiante se posicionó debajo de la región plantar derecha trasera. La latencia al reflejo de nocicepción (LRN) se determinó con una exactitud de 0.1 s mediante el dispositivo electrónico de tiempo que está integrado al aparato de termonocicepción plantar. Todos los grupos se probaron 30 min y 24 h después de la inyección intraplantar.

Grupos experimentales

- Grupo control (n = 15): microinyectado en la CAC con 250 nl de solución salina (NaCl 9%) más la inyección intraplantar de 50 µl de solución salina. Prueba de termonocicepción.

- Grupo control-CAR (n=15): microinyectado en la CAC con solución salina 250 nl. más inducción del proceso inflamatorio y prueba de termonocicepción.

- Grupo Escopol CAC - Plantar test (n = 15): microinyectado en la CAC con escopolamina más la prueba de termonocicepción.

- Grupo Escopol CAC – CAR - Plantar test, (n=15): microinyectado en la CAC con escopolamina más la inducción del proceso inflamatorio y prueba de termonocicepción.

- Grupo CAR - Escopol CAC - Plantar test (n=15): inducción del proceso inflamatorio seguido de la microinyección de escopolamina en la CAC seguido de la prueba de termonocicepción.

Análisis estadístico

Para determinar las diferencias entre el reflejo de flexión antialgésico por prueba (1 y 24 h) entre grupos se aplicó una análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de

Tukey como *pos hoc*. Esta prueba da un valor de F y se consideró significativo con un valor de $p < 0.05$.

EXPRESIÓN DE RECEPTORES M1 Y M2 EN LA CAC Y DOLOR NEUROPÁTICO.

Microinyección de escopolamina en la CAC:

Bajo anestesia general (isoflurano al 2% mezclado con O₂ al 98%), utilizando una bomba para microjeringas (WPI, Sarasota, FL, USA) se colocó estereotáxicamente una jeringa de 10 µl (0.20 mm OD, World Precision Instruments, WPI) en la CAC izquierda (A, 1 mm desde Bregma; L, 0.6 mm; H, 2 mm desde las meninges). Después, se microinyectó escopolamina (10 µg diluidos en 250 nl de solución salina) a una velocidad de 0.5 µl/min durante 30 s. Esta dosis fue escogida basándonos en reportes previos (Farr et al., 2000; Ortega-Legaspi et al., 2003). La jeringa se quedó en la misma posición por otros 30 s antes de sacarla para disminuir la posibilidad de reflujo. La piel del cráneo se cerró con sutura de seda 3-0. Estos parámetros de microinyección han demostrado no inducir daño tisular (Peterson, 1998).

Modelo de dolor neuropático

Utilizamos el modelo de denervación propuesto por Wall en 1979. Esta aproximación experimental desencadena una conducta cuantificable conocida como conducta de autotomía, la cual se relaciona con el grado de nocicepción puesto que cuando se hacen manipulaciones previas a la denervación que se sabe producen dolor la

conducta aumente y, de manera opuesta cuando se disminuye el dolor con anestésicos locales antes de cortar el nervio la conducta se presenta en mucho menor magnitud (Coderre et al., 1986). Con el fin de aumentar la autotomía y disminuir el tiempo de inicio de la misma, se aplicó termocicepción antes de la denervación (Coderre & Melzack, 1986). Brevemente, se indujo un proceso nociceptivo por medio de la inmersión de la pata derecha de la rata en agua caliente a 55 °C por 20 s. Treinta minutos más tarde, se expuso el nervio ciático derecho por microdissección. El nervio se cortó y se ligó con sutura de seda 3-0. Se removieron cinco milímetros de la porción distal con el fin de evitar la reinervación. Se cerró la piel con hilo de nylon 3-0. Durante todos estos procedimientos los animales estuvieron bajo anestesia general con isoflurano al 2%, mezclado con O₂ al 98%. Durante los días posteriores al procedimiento quirúrgico, se revisaron las heridas para buscar posibles signos de infección con el fin de sacar del estudio a los animales que los presentaran, no se encontraron estos datos en ningún animal. También, se comparó la conducta de los animales con la de los controles donde no hubo diferencias aparentes.

Medición de la conducta de autotomía: Los puntajes de autotomía (PA) se tomaron diariamente utilizando la escala de Wall et al. (1979). Esta escala da los siguientes puntajes: un punto por la remoción de una o más uñas; un punto adicional por cada mitad digital distal atacada y otro punto más por cada mitad digital proximal. Si se notaba daño en la porción distal o proximal de la pata, se añadió un punto más por cada una. Los PA's fueron capturados por ocho días, que es el tiempo que ha demostrado ser el promedio en que el PA alcanza su media en animales control de estudios previos (Ortega-Legaspi et al., 2003; Lopez-Avila et al., 2004; Coffeen et al., 2008). Después, estos grupos fueron divididos en bajo, medio y alto PA. Esta categorización se hizo

considerando los puntajes más bajos (PA de 0 a 1) y los más altos (PA de 11 a 13). Aquellos animales cuyos PA's cayeron en la mitad fueron categorizados como medio PA. Separamos a los animales de acuerdo a su PA con el fin de evaluar los cambios relacionados con el menor y el mayor dolor, así como los que caen en la media. Este modelo ha demostrado ser una herramienta útil para estudiar mecanismos centrales de dolor neuropático (Coderre et al., 1986). Más aún, la conducta asociada a la autotomía se ha estudiado en un nivel genético en el que se han producido fenotipos de alta y baja conducta (Mogil et al., 1999; Devor et al., 2005). En este trabajo, utilizamos una selección aleatoria de animales y los categorizamos de acuerdo a su PA. Dado que la autotomía se relaciona con la intensidad de la nocicepción, quisimos saber si la expresión del RNAm de los receptores M1 y M2 en la CAC correlaciona con el PA y también saber si el número de receptores en aquellos animales con un PA que cayera en la media cambia bajo las condiciones estudiadas.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Extracción de tejido: en el día ocho después de la cirugía, todos los animales se sacrificaron por decapitación y el cerebro se extrajo y congeló en hielo seco (-70 °C) inmediatamente. Para hacer la extracción de la CAC izquierda (contralateral a la pata denervada), se cortó una rebanada parasagital de 1 mm a partir de la línea media. Después, se obtuvieron dos muestras por sacabocado en *cingulum* 1 (cg1, rostral) y *cingulum* 2 (cg2, caudal) con un horador de 1 mm de diámetro (Figura 5) (Paxinos & Watson, 1998).

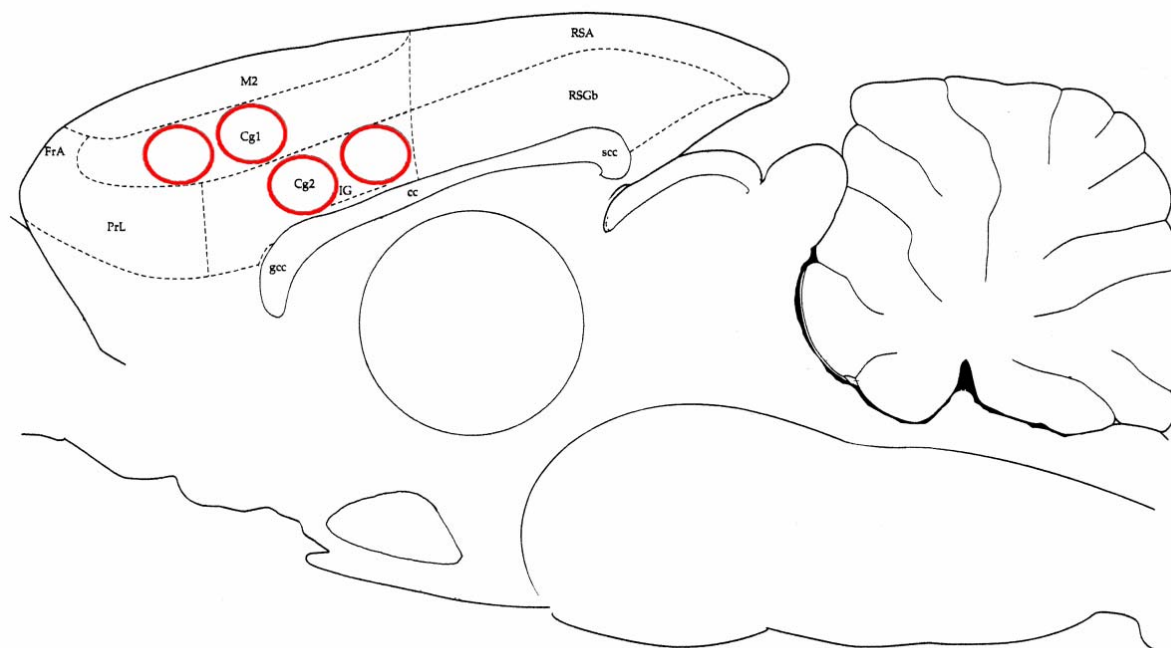


Figura 5. Imagen representativa de un corte parasagital de cerebro de rata donde se aprecian las dos áreas que conforman a la corteza anterior del cíngulo (CAC), *cingulum* 1 (cg1) y *cingulum* 2 (cg2). Los círculos en rojo representan los lugares donde se extrajo tejido para la PCR y también donde se tomaron las fotomicrografías en las rebanadas de tejido para inmunofluorescencia. Nótese que cg1 corresponde a la parte rostral de la CAC y cg2 a la caudal. Modificado de Paxinos y Watson, 1998.

Semi-cuantificación de RNAm por medio del procedimiento de PCR: Se homogenizaron muestras congeladas de cg1 y cg2 en tiocianato de guanidina 4M (ICN, Aurora, Ohio, USA) y el RNA total fue extraído por el método previamente descrito por Chomczynski and Sacchi, 1987. La calidad de las muestras de RNA se verificó por A) el cociente de las absorbencias de O.D. a 260/280 nm y 260/230 nm; un valor >1.8 se consideró apropiado; y B) por electroforesis cuantificando el cociente 28S/18S de la densidad de ambas bandas. La muestra era desechada si el valor era menor a 1.8 o, cuando había evidencia de degradación determinada por aumento de la tinción al final del gel. Los niveles del RNAm de los receptores M1 y M2 de las regiones cg1 y cg2 se semi-

cuantificaron por medio de la reacción en cadena de la polimerasa utilizando algliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) como el transcrito control para ambos receptores y también a la actina para el receptor M2. El protocolo que se utilizó es el que se describe en Jaimes-Hoy et al., 2008. Brevemente, 1.5 µg de RNA se usaron para obtener cDNA (M-MLV reverse transcriptase, Carlsbad, CA, USA) y el oligo-dT (Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. Instituto de Biotecnología), seguido por la PCR. El número de ciclos para cada sonda se optimizó para cada región con el fin de asegurar condiciones lineales (Figura 6), utilizando 1 µl y 25 pmol de sondas para los receptores M1 y M2 (secuencia sentido M1: GCT GGA AAT TCC CTC CTT TC; antisentido GCT TTG GGA CTT GGT GTG TT. M2 sentido: TGC CTC CGT TAT GAA TCT CC; antisentido TCC ACA GTC CTC ACC CCT AC); 1 µl y 50 pmol para G3PDH (secuencia sentido: TGA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG GC; antisentido CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC); 1 µl y 25 pmol para la actina (secuencia sentido: GAC GAT GCT CCC CGG GCT GTA TTC; antisentido TCT CTT GCT CTG GGC CTC GTC ACC) y 0.5 µl Taq DNA polimerasa (5U/µl) (Biotecnologías Universitarias, UNAM, DF, México). Los oligonucleótidos fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología, UNAM tomando como referencia los números de Genbank NM 080773 para el receptor M1 y NM 031016 para el M2. La secuencia blanco de los primers fue 2019 a 2213 para el receptor M1 y 775 a 966 para el M2, con una longitud de 195 y 192 pares de bases respectivamente. Las condiciones finales fueron: 28 ciclos para el receptor M1, 32 para el M2, 21 para G3PDH y 22 para actina. Para todos los oligonucleótidos, cada ciclo consistió en 94 °C por 1 min seguido por: 1 min a 64 °C, seguido por 1 min 15 s a 72 °C. Todos los cDNA's tuvieron una extensión final de 10 min a 72 °C. Varios cDNA's fueron semi-cuantificados por la misma reacción de transcriptasa reversa.

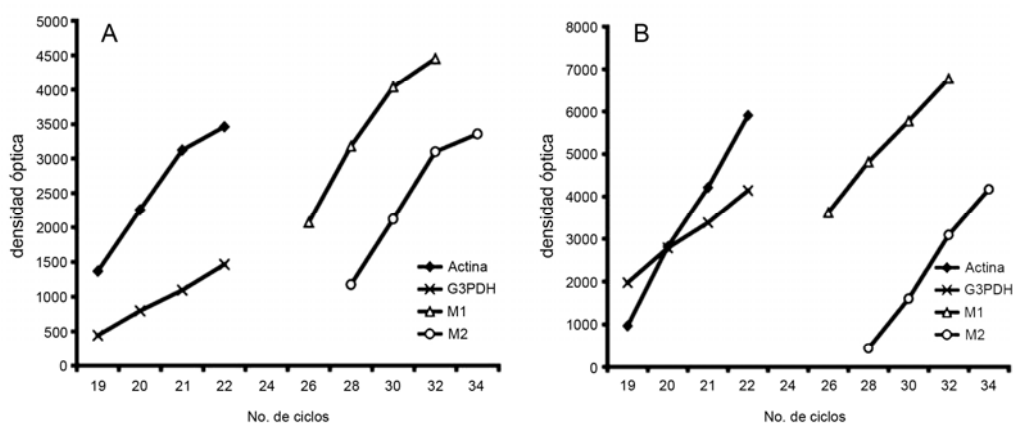


Figura 6. Experimentos piloto de donde se obtuvieron los ciclos para toda la serie experimental en donde se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa. Esta optimización metodológica para las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa se hace en relación al número de ciclos por sonda. Los datos se representan como las densidades ópticas de la señal de los productos de la PCR a diferentes ciclos para cg1 (A) y cg2 (B) después de electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

Los productos finales de la PCR (8 μ l para cada cDNA de los receptores M1 y M2, y 4 μ l de G3PDH y actina) se separaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Ultra-pure Bio-Rad, Hercules CA, USA), teñido con bromuro de etidio (a mg/l). La densidad se midió con el software Advanced American Biotech Imaging (American-Applied Biotechnology, Fullerton, CA, USA). La cantidad relativa de los cDNA's estudiados se calculó como el cociente de la densidad del cDNA del receptor M1 sobre la de G3PDH; y el receptor M2 sobre G3PDH y actina. Se tuvo cuidado de incluir muestras de los grupos control y experimentales en el mismo gel.

Procedimiento de inmunofluorescencia.

En el día ocho después de la cirugía, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (63 mg/kg) y se perfundieron de manera intracardiaca con 200 ml de solución salina al 0.9% seguido de 350 ml de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 10 mM (pH 7.4, PBS). Los cerebros se removieron y se pusieron en post-fijación por 2 h a 4 °C para ser bloqueados y crioprotectados en sucrosa al 30%. Se cortaron en un micrótopo de congelación (Leitz, Grand Rapids, MI) rebanadas parasagitales izquierdas (contralateral a la pata denervada, 30 µm, 0.3 mm a 1 mm de la línea media). Después, las rebanadas se guardaron en PBS. Estas secciones se procesaron para inmunofluorescencia en libre flotación.

Incubación con anticuerpos primarios: Las secciones (18 para cada rata) se procesaron de manera alternada para inmunofluorescencia para los receptores M1 y M2. Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron: mAChR M1 (C-20 sc-7470; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), que es un anticuerpo policlonal hecho en cabra de afinidad purificada contra el péptido en el extremo C-terminal del mAChR M1 de origen humano; mAChR M2 (C-18 sc-7472; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), que es un anticuerpo policlonal hecho en cabra de afinidad purificada contra el péptido en el extremo C-terminal del mAChR M2 de origen humano. Ambos anticuerpos tienen 100% de identidad con el receptor de la rata (el anticuerpo contra el receptor M1 coincide en 20/20 aminoácidos y el M2 en 18/18; información proporcionada por el fabricante).

Las secciones se pusieron en una solución de bloqueo de PBS con suero normal de burro al 1%, albúmina sérica bovina al 5% (BSA), gelatina de teleostean al 3% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y Triton X-100 al 0.3% por una hora para minimizar el marcaje no específico. Se incubaron las secciones por 72 h a 4 °C en el anticuerpo primario, ya sea el policlonal de cabra anti M1 (1:20), o el policlonal de cabra anti M2 (1:50) en solución de bloqueo. Transcurrido este tiempo, las secciones se lavaron tres veces (10 min cada una) en PBS con Triton X-100 0.3% (buffer de lavado) previo a la incubación con el anticuerpo secundario. Estas condiciones fueron optimizadas en un estudio piloto en donde las diluciones óptimas fueron en el intervalo de 1:20-1:200.

Incubación en el anticuerpo secundario y visualización: Todas las secciones donde se evaluó el receptor M1 se incubaron en un anticuerpo de tipo IgG de burro anti-cabra conjugado a tetrametilrodamina (TRITC) a una dilución de 1:50 en solución de bloqueo por 2 h a 37 °C. Para el receptor M2, se utilizó un anticuerpo secundario similar pero conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una dilución de 1:100 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA no. 711-065-152 y no. 705-095-147 respectivamente). Después de la incubación en el anticuerpo secundario, las secciones se lavaron dos veces en buffer de lavado y una última vez en PBS. Inmediatamente después, las secciones se montaron con medio de montaje anti-desvanecimiento Prolong (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

Las secciones se observaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) con los filtros adecuados para TRITC o FITC según fuera el caso. Después, se identificaron las regiones cg1 y cg2 utilizando las imágenes de un atlas anatómico

(Paxinos and Watson, 1998) como referencia y fotografiadas a una magnificación de 40x con una cámara digital Spot-II (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI). A cada sección se le fotografiaron cuatro campos a 40x, dos para cg1 y dos para cg2. Analizamos tres secciones por rata tomando en cuenta que fueran de la misma lateralidad (Figura 5). Al final se analizaron 12 fotomicrografías por rata.

Los controles de inmunofluorescencia (6 secciones por cada rata) consistieron en muestras de cerebro sin la incubación previa en el anticuerpo primario. Las secciones utilizadas en estos controles metodológicos fueron procesadas de manera simultánea a las secciones experimentales para cada experimento. Estas imágenes fueron utilizadas para corregir en fondo (vea la sección de análisis de imágenes y las figuras 7A y B).

Doble marcaje para neuronas y el receptor M2

Con el fin de verificar si el receptor M2 estaba presente en la membrana neuronal, se realizó un doble marcaje en secciones obtenidas de ratas con medio PA (con y sin la microinyección de escopolamina en la CAC). Se utilizaron los anticuerpos primarios contra el receptor M2 (*vide supra*) y el núcleo neuronal (Anti neuronal nuclei, NeuN, IgG anticuerpo monoclonal en ratón, Millipore). Como anticuerpos secundarios, se utilizaron los IgG conjugados a FITC (*vide supra*) y Alexa Fluor 555 conjugado a IgG burro anti-ratón (Invitrogen). En otra aproximación para el mismo propósito, se marcó al receptor M2 como descrito previamente y el núcleo celular fue teñido utilizando el SelectFX® Nuclear Labeling Kit TO-PRO®-3 iodide (Invitrogen).

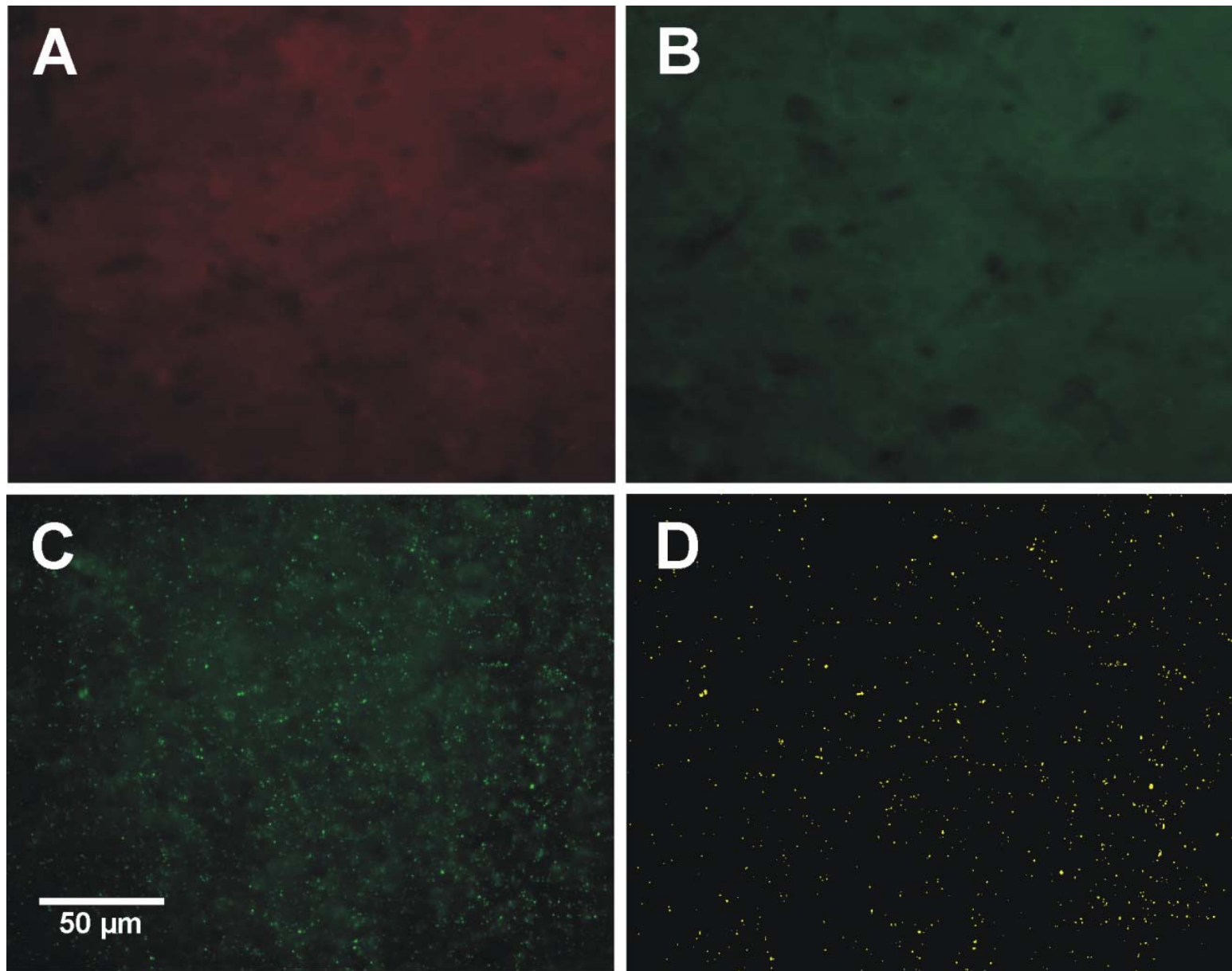


Figura 7. Fotomicrografías de los controles de inmunofluorescencia que se tomaron de rebanadas parasagitales ($30\ \mu\text{m}$) de la corteza anterior del cíngulo (CAC) a una magnificación de $40\times$. Para obtener estos controles, se omitió el anticuerpo primario y sólo se utilizó el anticuerpo secundario acoplado a TRITC (A) o a FITC (B). Las secciones utilizadas para estos controles metodológicos se procesaron simultáneamente con las secciones experimentales de cada experimento. Estas imágenes se usaron para corregir el fondo en el análisis de las imágenes experimentales. (C) Fotomicrografía que se tomó del grupo control que muestra inmunoreactividad positiva para el receptor M2. (D) Se muestra la misma fotomicrografía que en (C) pero procesada para la cuantificación del área inmunoreactiva (AIR). Nótese que el fondo es completamente

negro por lo tanto la cuantificación del AIR (puntos amarillos) es válida y demuestra por lo menos dos desviaciones estándar por arriba del fondo.

Las secciones se observaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) con los filtros adecuados para FITC, Alexa Fluor 555 o TO-PRO y fotografiadas (Spot-II digital camera, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) a una magnificación de 100x. Las imágenes después se fusionaron y se les corrigió en fondo para brillo y contraste.

Análisis de imágenes histológicas.

El área inmunoreactiva (AIR) se determinó por medio del análisis de las fotomicrografías digitales. Utilizando el software ProPlus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), se corrigió el fondo (utilizando las imágenes de los controles de inmunofluorescencia, Figuras 8A y B) y después se aplanaron. Luego, la imagen se convirtió a escala de grises. El intervalo en escala de grises que se utilizó para determinar el AIR fue de 0 a 255. Se seleccionó un umbral que incluyera el área de por lo menos dos desviaciones estándar por arriba del promedio del fondo. El área que se cuantificó sobre este umbral se dividió por el área total (100%), como está previamente descrito (Gillard et al., 2006). Se puede ver un ejemplo de este procedimiento y el área sobre el umbral en las figura 7C y D.

Grupos experimentales

- Control (n=7): animales que se mantuvieron en cajas individuales por ocho días sin intervenciones quirúrgicas. Cuatro de estos fueron utilizados para los experimentos de PCR y 3 para los de inmunofluorescencia.

- Grupo neuropático (n=15): a todos los animales se les aplicó termonocicepción a la pata derecha y 30 min más tarde se llevó a cabo la denervación ciática derecha. Se cuantificaron los PA's por ocho días y después de ese periodo los animales se dividieron en tres diferentes grupos dependiendo su PA: bajo, medio y alto. Para los experimentos de PCR, se utilizaron cuatro animales por cada uno de estos grupos (de Gortari et al., 2009); no se realizaron experimentos de inmunofluorescencia en los grupos con bajo y alto PA. Los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron con 3 animales del grupo de medio PA, dado que este grupo representa la media de todos los PA'a y por lo tanto a la mayoría de los individuos.
- Grupo Escopolamina (escopol, n=15): Los animales se microinyectaron con escopolamina en la CAC; inmediatamente después se aplicó termonocicepción a la pata derecha y 30 minutos más tarde se llevó a cado la denervación ciática derecha. Se capturó el PA por ocho días y después los animales se dividieron en tres diferentes grupos escopol dependiendo su PA.: bajo, medio y alto. De manera similar al grupo neuropático, los experimentos de PCR se realizaron con cuatro animales por grupo y no se hicieron experimentos de inmunofluorescencia en los grupos escopol bajo y alto PA. Los experimentos de inmunofluorescencia se hicieron con 3 animales del grupo escopol medio PA.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 15.0. Los datos se presentan como la media y los errores estándar de la media.

Los datos de PCR se analizaron por medio de una prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida por una prueba Bonferroni como *post hoc*. Esta prueba presenta un valor de F y la significancia se estableció con el valor de $p < 0.05$. Además, se realizó un correlación de Pearson (que da un valor de r) entre los PA's y los niveles de RNAm. El nivel de significancia se consideró con una $p < 0.05$.

Los datos de inmunofluorescencia se analizaron con una prueba t de student (que da un valor de t) considerando significativos aquellos valores con una p menor a 0.05.

VII. RESULTADOS

Bloqueo muscarínico en la CAC y dolor inflamatorio y agudo.

Los grupos en los que no se indujo el proceso inflamatorio con carragenina (Control, 6.8 ± 0.34 s; y Escopol CAC – Plantar test, 6.5 ± 0.28 s) no mostraron diferencias significativas en la latencia al reflejo de nocicepción (LRN) a los 30 min ($p=0.966$, Figura 8). Esto demostró que el bloqueo muscarínico en la CAC no modifica la nocicepción aguda.

La eficacia del proceso inflamatorio en disminuir la LRN se ve con una diferencia significativa a los 30 min de la inducción del proceso inflamatorio entre los grupos Control (6.8 ± 0.34 s) y Control – CAR (5.4 ± 0.35 s; $p=0.010$; Figura 8). Ese resultado demostró que el proceso inflamatorio aséptico generado por la carragenina genera hiperalgesia pues hay una respuesta exagerada a un estímulo nociceptivo.

A los 30 min de la inducción del proceso inflamatorio con carragenina, hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Control – CAR (5.4 ± 0.35 s) y Escopol CAC – CAR – Plantar test (6.9 ± 0.28 s; $F=4.766$, $p=0.005$). El grupo Control – CAR comparado contra el grupo CAR – Escopol CAC – Plantar test no mostró diferencia ($p=0.923$, Figura 8). Estos datos mostraron que el bloqueo muscarínico en la CAC disminuye el efecto de la inflamación en el reflejo de retiro de la pata de la rata, pero sólo cuando este se dio antes del proceso inflamatorio, pues cuando el bloqueo se dio después de dicho proceso no se vio el efecto.

En lo que respecta a las diferencias entre grupos a las 24 h de la microinyección de escopolamina, no hubo diferencias significativas entre ninguno de ellos ($F=1.947$, $p=0.104$; Figura 9). Estos datos mostraron que la carragenina perdió su efecto en el reflejo de retiro de la pata, pues el grupo control – CAR no tuvo este valor disminuido. En relación a los grupos con escopolamina, al no haber efecto de la carragenina el fármaco no tuvo nada que revertir.

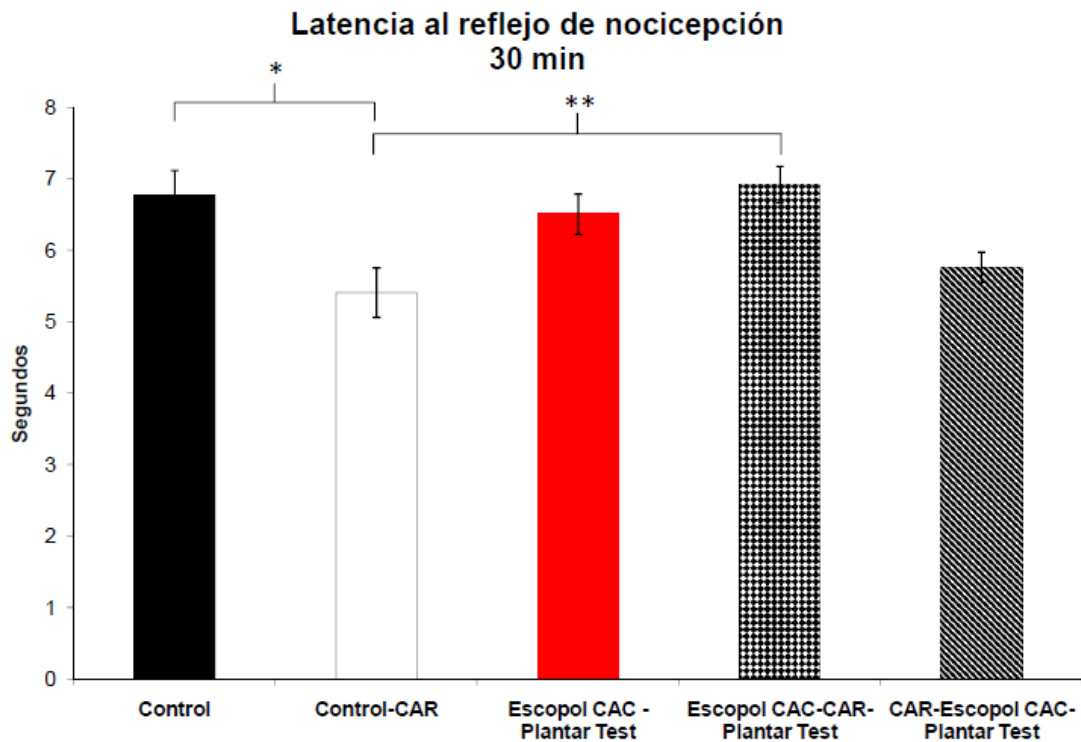


Figura 8. Latencias al reflejo nociceptivo en segundos ante un estímulo térmociceptivo a los 30 min de la inducción de un proceso inflamatorio con carragenina en la pata derecha de la rata. La figura muestra una diferencia significativa entre el grupo control (microinyectado con solución salina en la corteza anterior del cíngulo (CAC) y sin proceso inflamatorio en la pata) y el grupo control – CAR (microinyectado en la CAC con solución salina y con proceso inflamatorio en la pata; * $p = 0.010$). También se ve una diferencia entre el grupo control – CAR y el grupo Escopol CAC – CAR – Plantar test (microinyectado con escopolamina en la CAC antes del proceso inflamatorio; ** $p = 0.005$). La n fue 15 para todos los grupos. Con esto es notorio que la escopolamina microinyectada en la CAC antes de un proceso inflamatorio en la pata puede revertir el efecto hiperalgésico que genera la carragenina en el grupo control.

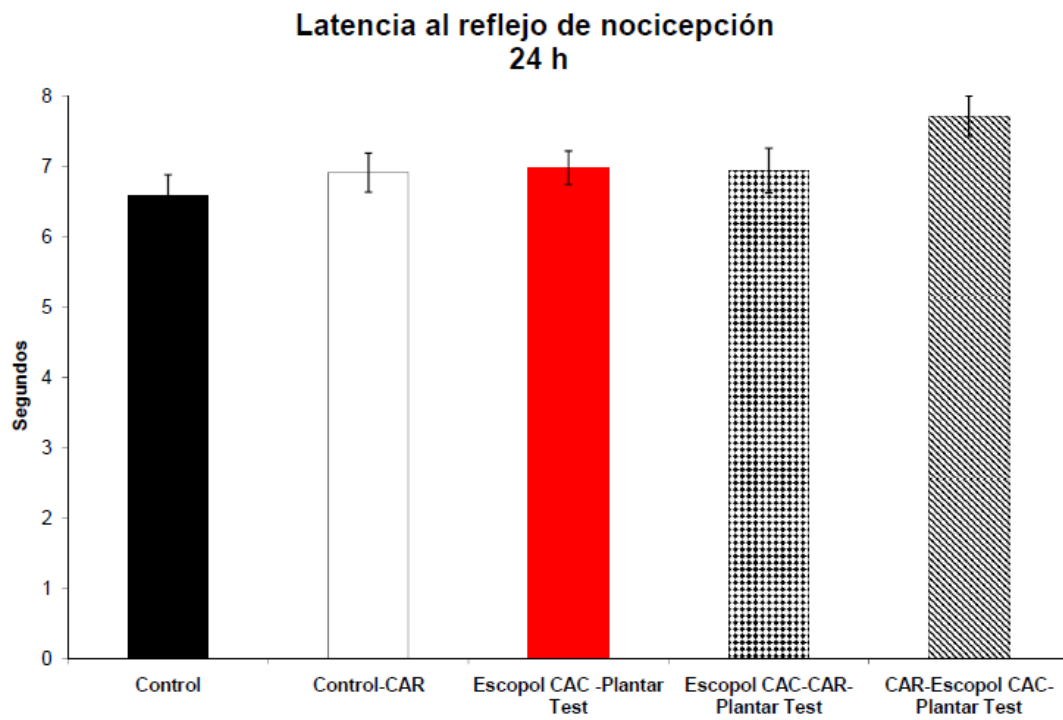


Figura 9. Latencias al reflejo nociceptivo en segundos ante un estímulo termnociceptivo a las 24 h de la inducción de un proceso inflamatorio con carragenina en la pata derecha de la rata. La n fue 15 para todos los grupos. La figura muestra que no hay diferencias en los grupos cuando se mide este parámetro 24 h después de un proceso inflamatorio en la pata.

Como el bloqueo colinérgico disminuye la nocicepción neuropática crónica e inflamatoria es que decidimos ver cuál era el efecto de la nocicepción neuropática crónica sobre los receptores M1 y M2 a nivel de RNAm y de proteína.

Expresión de receptores M1 y M2 en la CAC y dolor neuropático.

Cambios en el RNAm de los receptores M1 y M2

Los resultados mostraron una diferencia en los niveles de RNAm de los receptores M1 y M2 en cg1 que correlacionan con el PA al compararlos con los controles. El grupo de bajo PA disminuyó el porcentaje de RNAm de ambos receptores, mientras que los grupos de medio y alto PA mostraron un incremento gradual al compararlos con los controles. Todos los animales tratados con escopolamina mostraron un incremento en los niveles de RNAm de ambos receptores en cg1, independientemente de su PA. El porcentaje de cambio de los niveles de RNAm de los receptores muscarínicos M1 y M2 fue siguiente: Los receptores M1 mostraron una disminución de 17% (de 100% a $82.7 \pm 1\%$) en el grupo de bajo PA y un incremento de 12% y 53% (100% a $112.4 \pm 1.1\%$ y $153.6 \pm 1.9\%$) en los grupos de medio y alto PA, respectivamente *versus* los controles. Interesantemente, los tres grupos de escopol PA mostraron un incremento de $47.2 \pm 1.4\%$, $87.2 \pm 0.9\%$ y $23.1 \pm 1.9\%$ en los grupos escopol bajo, medio y alto PA, respectivamente ($F=680.6$, $p<0.0001$; Figura 10A) comparados contra el grupo control (100%). El grupo escopol alto PA aumentó su porcentaje de mRNA para este M1 en cg1 al compararlo con el grupo alto PA ($t=11.124$, $p<0.0001$). Se encontró una correlación positiva entre los niveles del RNAm del receptor M1 y el PA en los grupos bajo, medio y alto PA en cg1 ($r=0.965$, $p<0.0001$). No se encontró

correlación entre los niveles de RNAm y los grupos escopol bajo, escopol medio y escopol alto PA ($r=-0.341$, $p=0.278$) en cg1. Los niveles de RNAm del receptor M2 en cg1 mostraron una disminución de 30% (100 a $70.2\pm 0.5\%$) en el grupo de bajo PA y un incremento de 66% y 136% en los grupos de medio y alto PA (100 a $166.1\pm 1.5\%$ y $236.2\pm 4.5\%$, respectivamente) comparado con el grupo control (100%). Los grupos de escopolamina mostraron un aumento de 147, 154 y 138% en los grupos escopol bajo, escopol medio y escopol alto PA, respectivamente (100 a $247\pm 2.2\%$, $254.3\pm 2.1\%$ y $238.5\pm 3.3\%$, respectivamente; $F=925.3$, $p<0.0001$; Figura 10B) relativo a los controles (100%). Al igual que con el receptor M1, se encontró una correlación positiva entre los niveles de RNAm del receptor M2 y el PA en los grupos de bajo, medio y alto en la región cg1 ($r=0.923$, $p<0.0001$). No se encontró correlación entre los niveles de RNAm del receptor M2 y el PA en los grupos escopol bajo, escopol medio y escopol alto ($r=0.406$, $p=0.190$) en cg1. Estos resultados indican que dependiendo del grado de autotomía y por ende de nocicepción hay mayor expresión del mRNA de ambos receptores muscarínicos, pero en mayor medida del receptor M2 lo que muestra que es más importante la producción del receptor inhibitor ante un mayor grado de nocicepción. En todos los grupos para ambos receptores se vio que la escopolamina aumentó los niveles de mRNA de ambos receptores, pero también el efecto es mayor en el del M2.

Los niveles de RNAm del receptor M1 en la región cg2 mostraron una disminución discreta en todos los grupos en comparación con el grupo control. Esta disminución fue gradual e inversa al puntaje de autotomía: 14, 19 y 25% en los grupos de bajo, medio y alto PA (100% a $85.9\pm 0.6\%$, $80.8\pm 0.7\%$ y $75.4\pm 0.2\%$, respectivamente) comparado con los controles (100%). Los grupos tratados con

escopolamina mostraron un patrón similar con una disminución de 18, 26 y 29% en los grupos escopol bajo, escopol medio y escopol alto PA (100% a $81.7\pm 0.7\%$, $74.3\pm 0.6\%$ y $71.5\pm 0.6\%$, respectivamente; $F=211.1$, $p<0.0001$; Figura 10C). Hubo una correlación negativa entre los niveles de RNAm del receptor M1 y el PA en los grupos bajo, medio y alto PA ($r=-0.913$, $p<0.0001$) y también entre los niveles de mRNA del receptor M1 y el PA en los grupos escopol bajo, escopol medio y escopol alto ($r=-0.964$, $p<0.0001$) en cg2. Los niveles de RNAm del receptor M2 en la región cg2 mostraron un incremento gradual que correlacionó con el PA: $116.6\pm 1.8\%$ en el grupo de bajo PA, $200.6\pm 1.4\%$ en medio PA y $224\pm 0.9\%$ en alto PA. Todos los grupos escopol incrementaron sus niveles de RNAm al compararlos contra el grupo control con $129\pm 2.2\%$ en escopol bajo PA, $121.5\pm 1.1\%$ en escopol medio PA y $142.4\pm 1.1\%$ en escopol alto PA ($F=1057.1$, $p<0.0001$; Figura 10D). Se encontró una correlación positiva entre los niveles de RNAm del receptor M2 y el PA en los grupos de bajo, medio y alto PA ($r=0.828$, $p=0.01$) en cg2. No se encontró correlación entre los niveles de RNAm y el PA en los grupos escopol bajo, escopol medio y escopol alto ($r=0.520$, $p=0.083$). El receptor M1 en esta región únicamente disminuyó y de manera muy sutil mientras que sí se ve un efecto que correlaciona con la nocicepción en el mRNA del receptor M2, pero no a la magnitud que se vio en la región cg1 por lo que esto indica que la región cg2 no responde tanto en niveles de mRNA de los receptores M1 y M2 ante información nociceptiva.

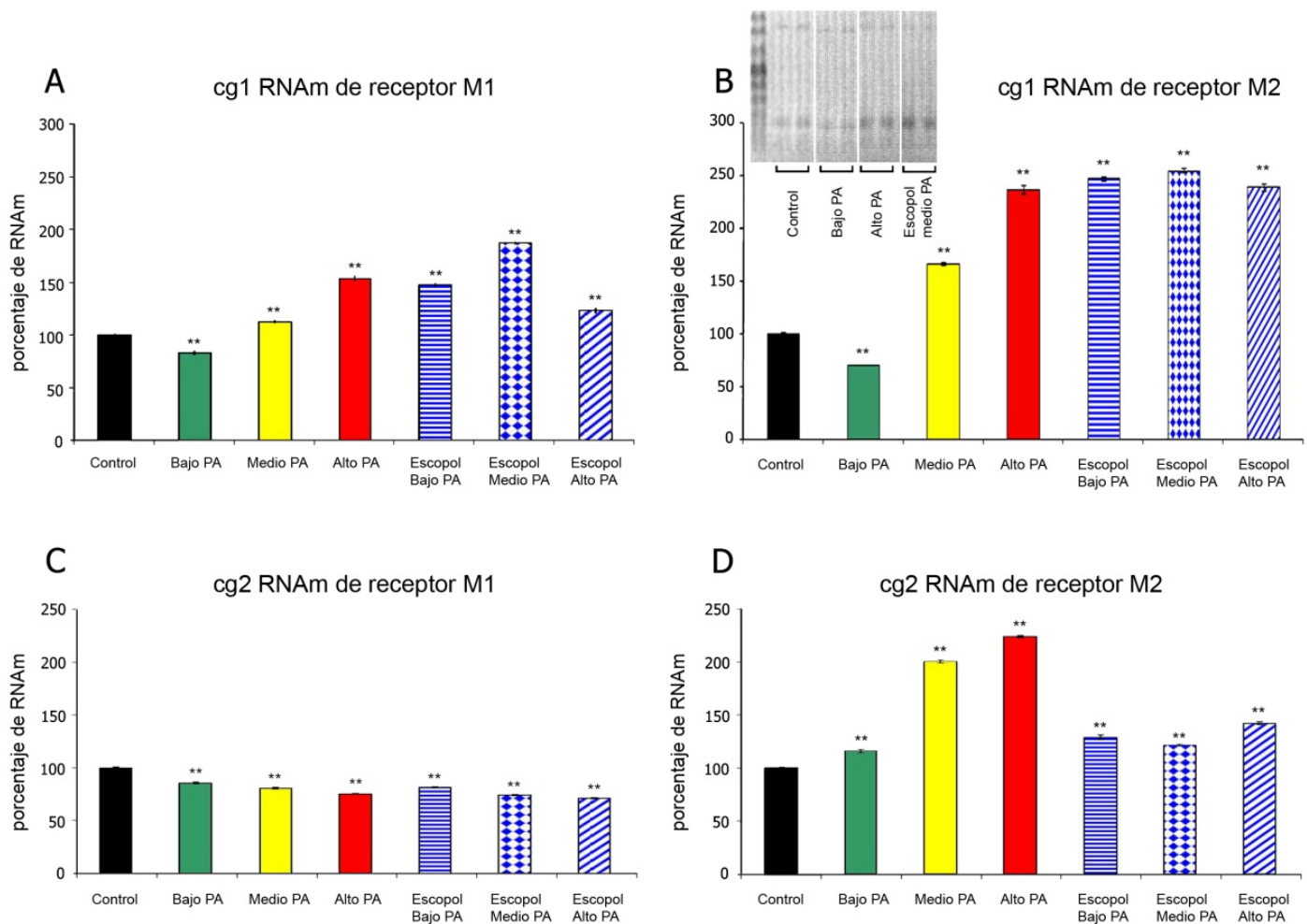


Figura 10. Porcentaje de los niveles de RNAm de los receptores M1 y M2 obtenidos por medio de la PCR en las regiones cg1 y cg2 de la corteza anterior del cíngulo (CAC). (A) En cg1, el receptor M1 muestra una disminución en el grupo de bajo puntaje de autotomía (PA) y un incremento que correlaciona positivamente con el PA (correlación de Pearson, $r=0.965$, $p<0.0001$) en los grupos de medio y alto PA, al compararlos con el control (sin estimulación nociceptiva). Los grupos a los que se les microinyectó escopolamina en la CAC antes de la termonocicepción y la denervación: escopol bajo, medio y alto PA no muestran una correlación entre su porcentaje de RNAm y el PA pero todos incrementaron su PA al compararlos con el control (**ANOVA de una vía $F=680.6$, $p<0.0001$). (B) En cg1, los niveles de RNAm del receptor M2 muestran el mismo patrón que en (A) pero con mayor magnitud en las diferencias (** ANOVA de una vía $F=925.3$, $p<0.0001$). También se encontró una correlación positiva similar a la que se observa para el receptor M1 en cg1 (correlación de Pearson, $r=0.923$, $p<0.0001$). (C) Los niveles de RNAm del receptor M1 en cg2 muestran una disminución en todos los grupos al compararlos con el control (**ANOVA de una vía $F=211.1$, $p<0.0001$). Hay una correlación negativa entre el PA y los grupos con bajo, medio y alto PA ($r=-0.913$, $p<0.0001$) así como entre el PA y todos los grupos escopol (correlación de Pearson $r=-0.964$, $p<0.0001$). (D) En cg2, el receptor M2 muestra un incremento en todos los grupos al compararlos contra el control (**ANOVA de una vía $F=1057.1$,

$p < 0.0001$). Los grupos con bajo, medio y alto PA muestran una correlación positiva con el PA (correlación de Pearson $r=0.520$, $p=0.083$). Todas las diferencias entre grupos se establecieron con una prueba Bonferroni como *post hoc* con un nivel de significancia de $p < 0.05$ ($n = 4$ para cada grupo). En la parte superior izquierda de (B), se muestra un ejemplo del gel de agarosa para electroforesis donde se ve el oligonucleótido control (banda superior) y el cDNA del receptor M2 (banda inferior).

Cambios del área inmunoreactiva a los receptores M1 y M2

Se encontraron cambios significativos en inmunoreactividad (IR) del receptor M2 en la región cg1. La proteína del receptor M2 disminuyó en el grupo de medio PA comparado con el control (Figuras 11A; 12A y B) y aumentó en el grupo escopol medio PA comparado contra el grupo de medio PA (Figuras 11B; 12C y D).

En la región cg1, hubo una disminución en el AIR de los receptores M2 de 3.54 veces en el grupo con medio PA al compararlo con grupo control ($0.55 \pm 0.14\%$ en el grupo con medio PA, $1.95 \pm 0.52\%$ en el grupo control; $t=2.58$, $p=0.03$; Figuras 11A; 12A y B). También, hubo un aumento de 2.5 veces en el grupo escopol medio PA al compararlo grupo medio PA ($2.35 \pm 0.63\%$ en el grupo escopol medio PA, $0.92 \pm 0.27\%$ en el grupo medio PA; $t=-2.07$, $p=0.05$; Figuras 11B; 12C y D). En lo que respecta al receptor M1 en la región cg1, el grupo control y el grupo con medio PA no mostraron diferencia alguna ($0.22 \pm 0.03\%$ vs. $0.17 \pm 0.03\%$ de AIR, respectivamente; $t=1.12$, $p=0.27$; Figuras 11C; 13A y B). Similarmente, el grupo medio PA no mostró diferencias al compararlo con el grupo escopol medio PA ($0.28 \pm 0.12\%$ vs. $0.12 \pm 0.03\%$ de AIR, respectivamente; $t=1.25$, $p=0.23$; Figuras 11D; 13C y D).

Estos resultados indican que la nocicepción neuropática genera una disminución en la expresión del receptor inhibitor M2 mientras que la manipulación farmacológica

que se sabe disminuye la conducta de autotomía (bloqueo con escopolamina) aumenta la expresión de este mismo receptor, dando así un posible mecanismo por el que la escopolamina disminuye la nocicepción neuropática. También se ve que no hay un papel en el receptor M1 en esta región de la CAC.

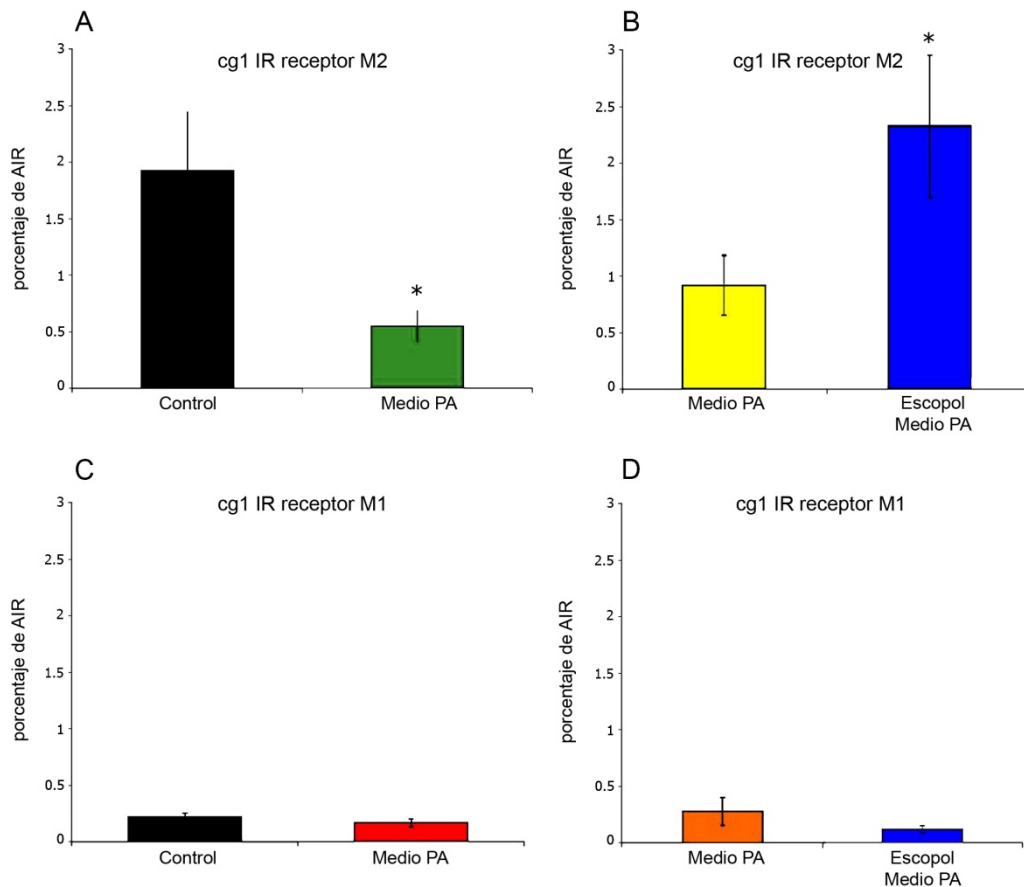


Figura 11. Inmunoreactividad (IR) de los receptores M1 y M2 (expresada como el porcentaje de área inmunoreactiva, AIR) en cg1. (A) El receptor M2 muestra una disminución en IR en el grupo al que se le aplicó termonocicepción en la pata derecha seguido de neurectomía ciática derecha y que presentó medio puntaje de autotomía (PA) comparado con el control (sin estimulación nociceptiva; *t de student=2.58, p=0.03). (B) El grupo al que se le microinyectó escopolamina en la CAC antes de la termonocicepción y la denervación (escopol medio PA) incrementa su porcentaje de AIR comparado con el grupo de medio PA (*t de student =-2.07, p=0.05). (C) El receptor M1 no presenta diferencias entre los grupos control y de medio PA (t de student =1.12, p=0.27). (D) Los grupos de medio PA y escopol con medio PA tampoco muestran diferencias entre ellos (t de student =1.25, p=0.23).

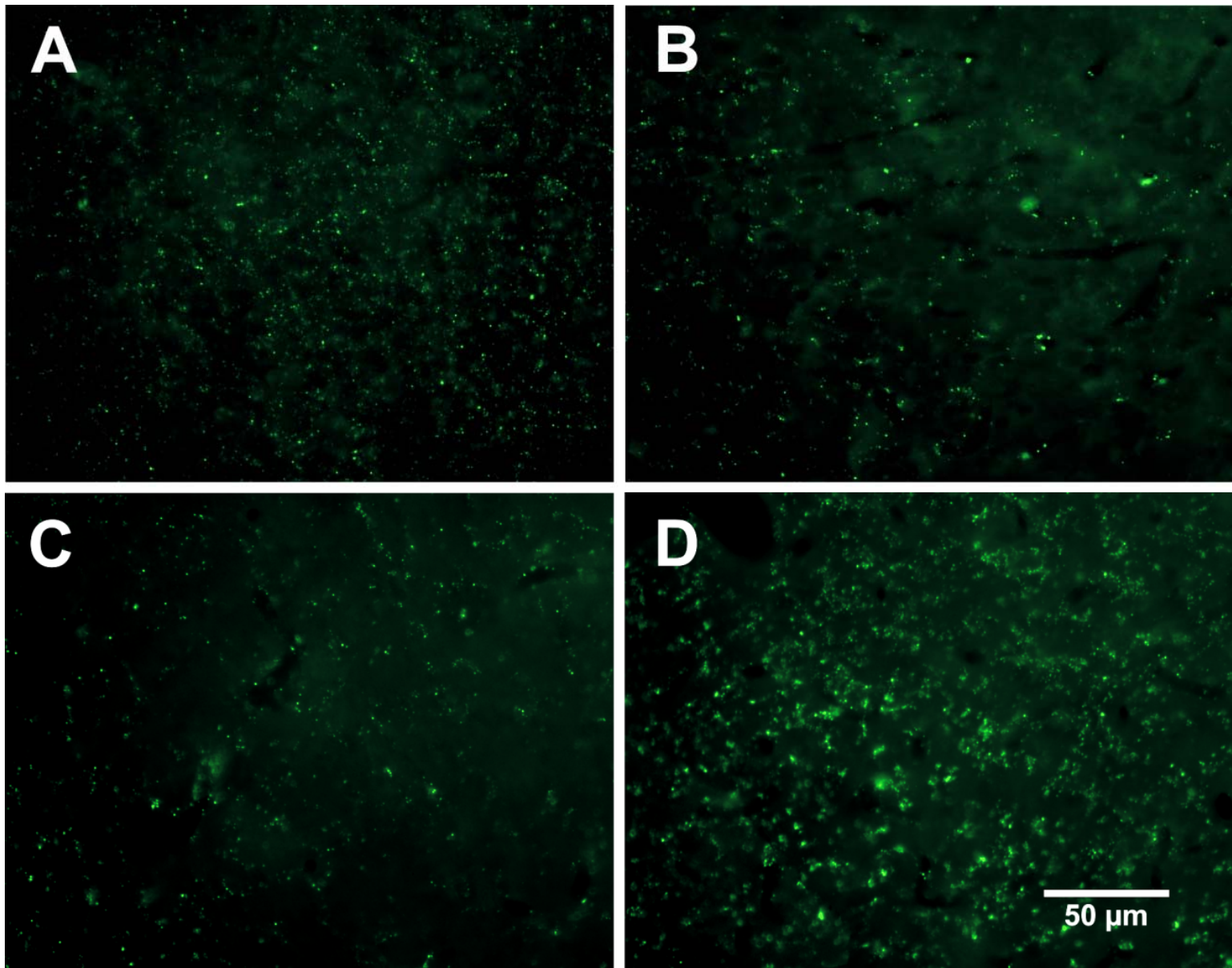


Figura 12. Fotomicrografías representativas de rebanadas parasagitales (30 μm) tomadas de la región cg1 de la corteza anterior del cíngulo (CAC) y procesadas para inmunofluorescencia con anticuerpos primarios contra el receptor M2 y anticuerpos secundarios acoplados a isotiocianato de fluoresceína. Se analizaron 36 fotomicrografías (18 para cg1 y 18 para cg2) para cada grupo experimental ($n=3$). (A) y (B) muestran fotomicrografías de los grupos control (sin estimulación nociceptiva) y de medio puntaje de autotomía (PA; con termonocicepción en la pata derecha seguida de neurectomía ciática derecha) respectivamente; nótese una menor inmunoreactividad en el grupo de medio PA (con dolor neuropático) comparado con el control. (C) y (D) muestran fotomicrografías de los grupos con medio PA y escopol con medio PA (microinyectado con escopolamina en la CAC antes de la termonocicepción y la denervación); nótese la mayor inmunoreactividad en el grupo que recibió el tratamiento con escopolamina al compararlo con el grupo de dolor neuropático.

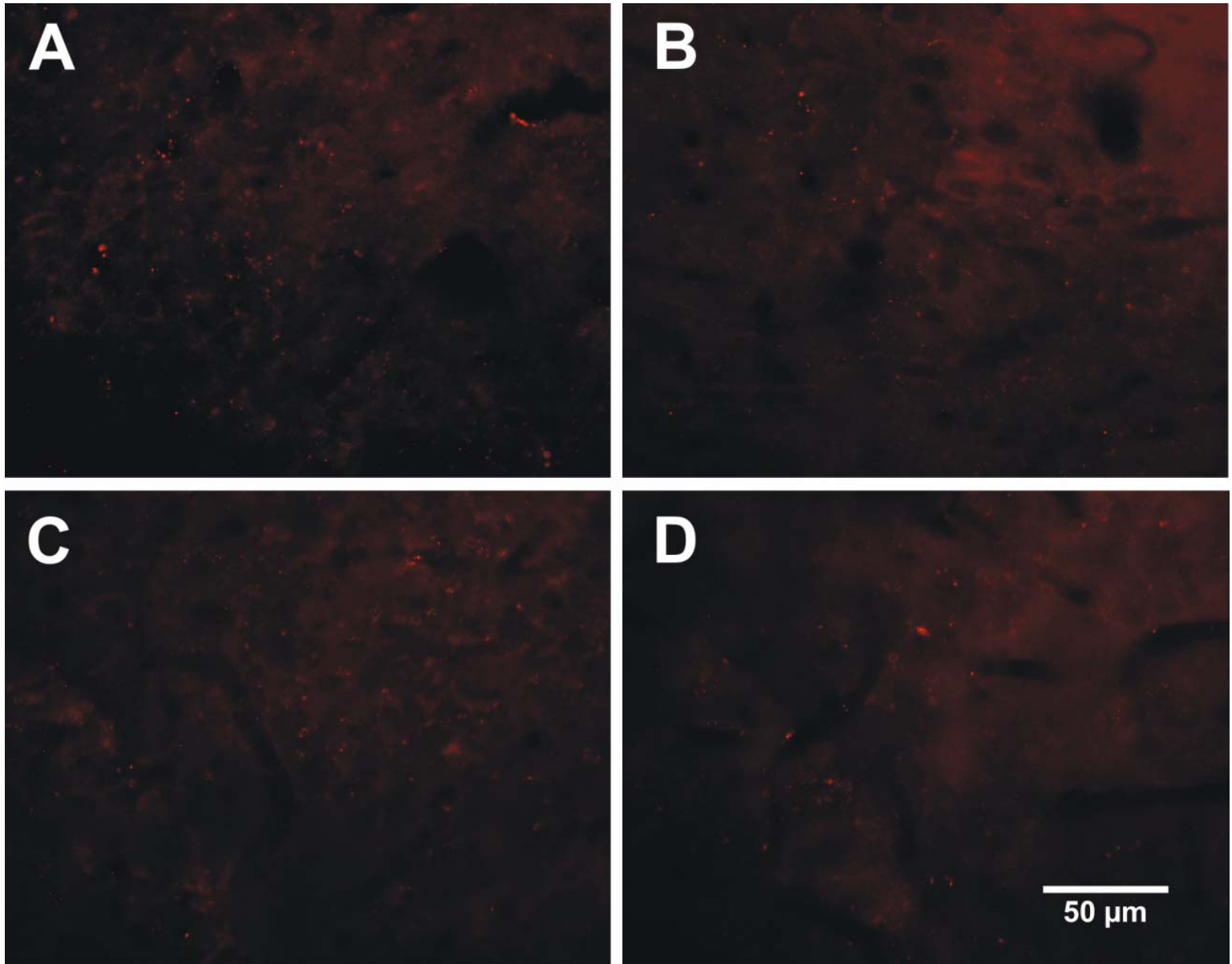


Figura 13. Fotomicrografías representativas de rebanadas parasagitales ($30\ \mu\text{m}$) que se tomaron de la región cg1 de la corteza anterior del cíngulo (CAC) y se procesaron para inmunofluorescencia con anticuerpos primarios contra el receptor M1 y anticuerpos secundarios acoplados a tetrametilrodamina. Se analizaron 36 fotomicrografías (18 para cg1 y 18 para cg2) para cada grupo experimental ($n=3$). (A) y (B) muestran fotomicrografías de los grupos control (sin estimulación nociceptiva) y con medio puntaje de autotomía (PA; con termonocicepción en la pata derecha seguida de neurectomía ciática derecha); nótese que la inmunoreactividad es similar en ambas imágenes. (C) y (D) muestran fotomicrografías de los grupos con medio PA y escopol medio PA (microinyectado con escopolamina en la CAC antes de la termonocicepción y la denervación) respectivamente con inmunoreactividad similar también.

Más aún, no se observaron diferencias en la región cg2 en la IR de ningún receptor. El AIR del receptor M2 en cg2 mostró un valor de $0.96 \pm 0.16\%$ para el grupo control y $0.89 \pm 0.22\%$ para el grupo de medio PA ($t=0.26$, $p=0.8$; Figura 14A). Tampoco hubo diferencias entre el grupo de medio PA y el grupo escopol medio PA ($1.4 \pm 0.52\%$ vs. $1.89 \pm 0.39\%$ de AIR, respectivamente; $t=-0.75$, $p=0.46$; Figura 14B). El grupo control para el receptor M1 mostró un valor de AIR de $0.34 \pm 0.09\%$ comparado con $0.18 \pm 0.04\%$ en el grupo de medio PA ($t=1.59$, $p=0.12$; Figura 14C). El AIR del grupo de medio PA ($0.2 \pm 0.05\%$) no mostró diferencia comparado con el grupo escopol medio PA ($0.15 \pm 0.04\%$; $t=0.79$, $p=0.44$; Figura 14D). Esto pone de manifiesto que la región cg1 no está involucrada en la respuesta a la nocicepción neuropática crónica.

El doble marcaje del receptor M2 y los núcleos neuronales mostró la existencia de receptores M2 en la membrana neuronal y el neuropilo. Este resultado es también un ejemplo de un aumento en el AIR encontrado en el grupo escopol medio PA en contraste con el grupo de medio PA. Cuando se tiñó el núcleo celular, estos resultados fueron corroborados (Figura 15). Estas imágenes confirman que los animales con dolor neuropático tienen al receptor M2 en neuronas de la CAC.

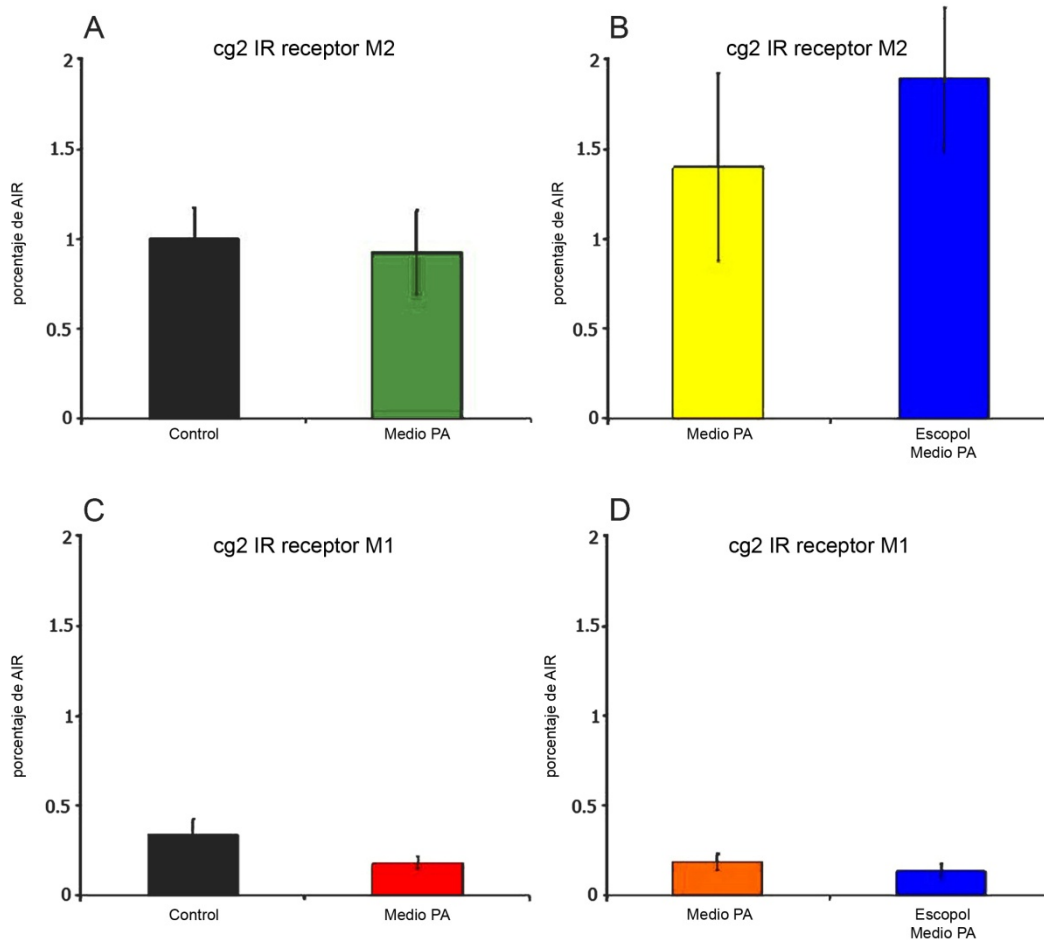


Figura 14. Inmunoreactividad (IR), expresada como el porcentaje de área inmunoreactiva (AIR) de los receptores M2 (A y B), y M1 (C y D) en la región cg2 de la corteza anterior del cíngulo (CAC). Nótese que los grupos control (sin estimulación nociceptiva) no presentan diferencias al compararlos contra los grupos con medio puntaje de autotomía (PA, con termonocicepción en la pata derecha seguida de neurectomía ciática derecha) para ambos receptores (A) y (C). De manera similar, los grupos con medio PA no presentan diferencias al compararlos contra los grupos a los que se les microinyectó escopolamina en la CAC antes de la termonocicepción y la denervación (escopol medio PA), esto también para ambos receptores (B) y (D).

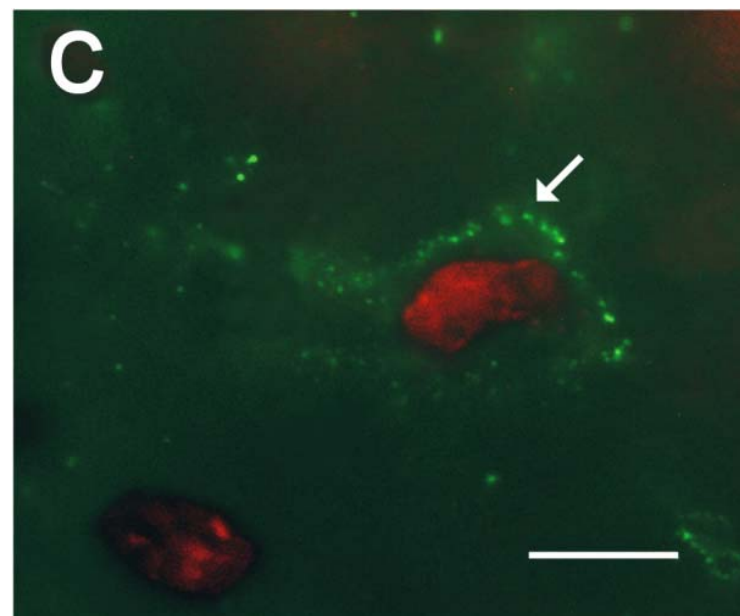
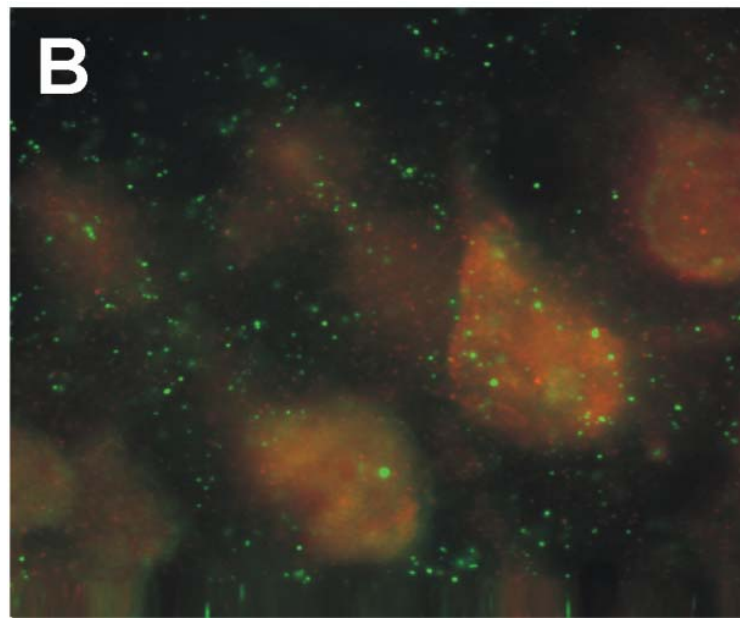
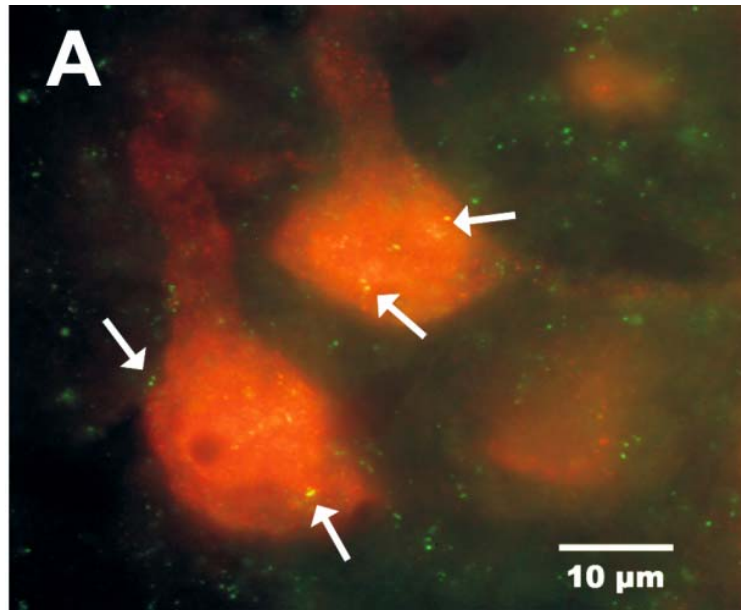


Figura 15 (A) Fotomicrografía de una rebanada parasagital (30 μm) que se tomó de la región cg1 de la corteza anterior del cíngulo (CAC) del grupo con medio puntaje de autotomía (PA) con una magnificación de 100x. Esta muestra se procesó para doble marcaje, para el receptor M2 (FITC) y núcleos neuronales (Alexa Fluor 555). Las flechas blancas señalan los receptores M2 (puntos verdes); la combinación de ambos fluoróforos genera puntos amarillos. (B) Fotomicrografía de una rebanada parasagital (30 μm) de la región cg1 de la CAC correspondiente al grupo escopol medio PA, con el mismo proceso que a la imagen (A). Nótese que hay mayor inmunoreactividad para el receptor M2 en los animales que se le trató con escopolamina. (C) Fotomicrografía de una rebanada parasagital (30 μm) que se tomó de la región cg2 de la CAC y que se procesó para doble marcaje con anticuerpos contra el receptor M2 (FITC) y una tinción para núcleos celulares (TO-PRO). Nótese la presencia de receptores M2 alrededor del citoplasma.

VIII. DISCUSIÓN

Los hallazgos presentados en esta tesis muestran la relación funcional entre la memoria asociada a la nocicepción crónica y la corteza anterior del cíngulo. Esta asociación funcional entre dolor y memoria es susceptible de ser disminuida mediante la manipulación de los sistemas que tradicionalmente se han relacionado con la memoria, los cuales se encuentran localizados en estructuras supraespinales.

En este sentido, en un estudio previo mostramos que el bloqueo de los receptores muscarínicos en la CAC previo a estimulación nociceptiva y la neurectomía del nervio ciático, disminuyó la conducta de autotomía que se asocia al dolor (Ortega-Legaspi et al., 2003).

Posteriormente, se indujo hiperalgesia medida con el reflejo de flexión después de un proceso inflamatorio (en el orden de las horas), el bloqueo farmacológico de los receptores muscarínicos en la CAC, previo a la inflamación, disminuyó dicha hiperalgesia (Figura 8).

Considerando el papel del sistema colinérgico muscarínico en la CAC en la nocicepción de larga duración fue que nos dimos a la tarea de ver los cambios en los receptores involucrados. En este sentido, encontramos también una expresión diferencial de los receptores muscarínicos M1 y M2 asociada al dolor inducido por denervación, en dos regiones de la corteza anterior del cíngulo (cg1 y cg2, Figuras 10 a la 15). Estas regiones si bien son cercanas topográficamente son distintas en términos de su integración funcional. Más aún, el bloqueo muscarínico en la CAC que previamente

había demostrado una disminución en la nocicepción crónica mostró un aumento particularmente del receptor M2 (inhibidor) en la región cg1 (la más involucrada con el procesamiento afectivo del dolor, Johansen et al., 2001; Figuras 10, 11, 12 y 15).

Antialgesia producida por el bloqueo muscarínico en la CAC

La actividad nociceptiva sensorial, previa a la deaferentación periférica condiciona estados somatosensoriales, particularmente dolorosos. La evidencia clínica muestra que el dolor referido después de una amputación exhibe características topológicas y sensoriales similares a las del dolor que se percibe antes de la amputación. Estas experiencias han sido acotadas por varios autores como memoria dolorosa (Melzack, 1980; Katz & Melzack, 1990; Hill et al., 1996). En relación a esto, la CAC se ha asociado también al procesamiento de la memoria, puesto que se ha documentado que las lesiones del haz del cíngulo y de la CAC interfieren con la memoria espacial (Dunnett et al., 1990; Aggleton et al., 1995). Asimismo, la lesión de la CAC retarda la adquisición del aprendizaje de evitación discriminativo (Gabriel et al., 1989, 1991). De manera similar, la cingulotomía bilateral afecta la adquisición y mantenimiento de respuestas de evitación y genera una disociación cognitivo-afectiva de la percepción dolorosa (Devinsky et al., 1995). La relación que existe entre la CAC y la manipulación del sistema colinérgico en tareas relacionadas con la memoria espacial por medio de entrenamiento a base de estímulos nocivos (resolución de un laberinto en T) se documentó al demostrar que la microinyección de un agonista colinérgico (arecolina) en la CAC aumentó el desempeño en la prueba de retención mientras que el uso de un antagonista (escopolamina) disminuyó la retención en la misma prueba (Farr et al. 2000).

La corteza del cíngulo es un sitio de convergencia donde se integra, entre otras cosas, el componente desagradable de la entrada dolorosa (Jones et al., 1991; Coghill et al., 1994; Hsieh et al., 1995; Rainville et al., 1997), así como diferentes funciones relacionadas con memoria espacial y de corto plazo (Dunnett et al., 1990; Aggleton et al., 1995; Ragozzino & Raymond, 1998; Gaffan, 2002). Esta convergencia anatómica y funcional nos permite incidir a niveles corticales y subcorticales del sistema de integración nociceptiva, en particular, con eventos significativos que desencadenan un proceso de memoria.

En este sentido, nuestros resultados muestran que la microinyección de escopolamina en la CAC antes de la aplicación del estímulo nociceptivo previene la adquisición de memoria nociceptiva tanto en los experimentos de dolor neuropático inducido por denervación (Ortega-Legaspi et al., 2003, anexo 1), así como en los que el dolor se indujo mediante un proceso inflamatorio (Figura 8). Los datos que se obtuvieron en los grupos en los que la escopolamina se administró después de la estimulación nociceptiva, sustentan la idea de que esta estimulación es determinante para producir o activar un proceso de memoria asociada a la nocicepción. Esto podría deberse a que estos estímulos alcanzan estructuras centrales sin haber sido bloqueados previamente por la acción de la escopolamina sobre los receptores muscarínicos. Cuando el este bloqueo se realiza antes de la entrada de los estímulos, la respuesta al dolor no agudo (conducta de autotomía, latencia de retiro nociceptiva después de inflamación) se encuentra disminuida.

Dinámica de receptores muscarínicos y dolor neuropático

La dinámica molecular de los receptores muscarínicos relacionada con el dolor neuropático, particularmente en estructuras y vías supraespinales, no ha sido cabalmente estudiada. Este estudio muestra los cambios en la cantidad de receptores M1 y M2 como proteína, así como en sus niveles de RNAm, en dos regiones de la CAC (cg1 y cg2) que ocurre en paralelo a una conducta nociceptiva inducida por denervación.

Los niveles de RNAm del receptor M2 en las regiones cg1 y cg2 mostraron un incremento que correlacionó de manera positiva con el grado de conducta de autotomía (en los grupos sin escopolamina), conducta que es un indicador de la severidad de la nocicepción neuropática. Estos cambios en los niveles de RNAm del receptor M2 los atribuimos a la activación constante de fibras dolorosas consecuencia de la denervación lo que le confiere la característica de dolor neuropático. El M2 pertenece a la familia de receptores con siete dominios transmembranales acoplados a un proteína G inhibidora (Lucas-Meunier et al., 2003). El incremento del RNAm de un receptor inhibitor nos permite inferir que la CAC prepara la maquinaria para desencadenar respuestas inhibitorias que se dan en mayor magnitud dependiendo del grado de nocicepción. Esto se sustenta por el hecho de que la escopolamina aumentó el número de receptores M2 (sin correlación con el grado de nocicepción), evidenciado por el incremento tanto en su RNAm como de la proteína; hecho que explicaría por qué la escopolamina en la CAC fue capaz de disminuir la conducta de autotomía desencadenada por nocicepción neuropática a lo largo de 25 días.

En la región cg1 de la CAC el receptor M2 disminuyó su expresión –demostrado mediante los experimentos de inmunofluorescencia- en el grupo que presentó los puntajes de autotomía media. La activación tónica del sistema colinérgico, así como la estimulación de receptores muscarínicos con agonistas, producen una regulación a la baja de estos receptores (van Koppen and Kaiser, 2003). Esto implicaría que el dolor neuropático crónico desencadena la activación tónica del sistema colinérgico que proyecta a la CAC y por lo tanto reduce la expresión de estos receptores. Este efecto únicamente se observó en la región cg1 y no en la cg2. Esto concuerda con evidencia previa en la que se mostró que la parte rostral de la CAC es la responsable de la integración del componente afectivo del dolor y de procesos de memoria relacionados a la estimulación nociceptiva (Farr et al., 2000; Johansen et al., 2001). De manera interesante, el papel que juegan los cambios en la expresión del receptor M2 en el dolor neuropático se resalta por la evidencia anatómica dada con el doble marcaje de los receptores M2 y los núcleos neuronales. Esto mostró que el receptor M2 está presente en las membranas neuronales y en el neuropilo de la región cg1. Este resultado también muestra un incremento en el área inmunoreactiva del receptor inhibitor (M2) en animales tratados previamente con escopolamina (Figura 15).

Los niveles de RNAm del receptor M1 en la región cg1 mostraron cambios discretos que correlacionaron positivamente con la autotomía (en los grupos sin escopolamina). Los niveles de RNAm del receptor M1 en la región cg2 disminuyeron en todos los grupos y mostraron una correlación con la autotomía en los grupos con y sin escopolamina. Aunque sí hubo una correlación, esta fue negativa y los cambios en el porcentaje de RNAm de este receptor en cg2 fueron discretos. Al medir la inmunoreactividad no hubo cambios en este receptor en ninguna situación o región de la

CAC. En este sentido, pareciera que el receptor M1 no juega un papel relevante en la integración del dolor crónico en la CAC.

La microinyección de escopolamina en la CAC antes de la entrada nociceptiva detiene la adquisición de memoria relacionada a la nocicepción (Ortega-Legaspi et al., 2003). En dicho trabajo, así como en este, la administración única de escopolamina disminuyó la autotomía por largos periodos de tiempo. Este efecto no se puede atribuir a un efecto farmacológico prolongado, dado que dicho efecto va más allá de la vida media de la escopolamina (20 min; Lyeth et al., 1992). El hecho de que la dosis única de escopolamina fuera capaz de modificar la conducta de autotomía se puede explicar por la inhibición que evita que se desencadenen los mecanismos centrales de dolor crónico.

La regulación a la alta del receptor M2 que se vio en la región cg1, en los animales tratados con escopolamina, implica un aumento de la inhibición mediada por el receptor M2 que a largo plazo se hace evidente por la disminución en la conducta de autotomía. Se ha reportado que la administración crónica de escopolamina induce una regulación a la alta de receptores muscarínicos en el hipocampo y en el estriado (Russell et al., 1986); nuestros resultados confirman esta observación. Nuestros resultados mostraron que los niveles de RNAm del receptor M2 en los animales tratados con escopolamina fueron mayores en cg1 que en cg2. También, la inmunoreactividad para el receptor M2 aumentó únicamente en cg1. El aumento en la expresión de receptores acoplados a un sistema de segundos mensajeros inhibidores aumenta la inhibición que se presenta en una estructura responsable de la integración de las conductas que responden a nocicepción crónica y memoria al dolor. Los procesos intracelulares que controlan la expresión de receptores muscarínicos varían entre el M1 y M2 (van Koppen

and Kaiser, 2003). Esto explicaría el mayor incremento en el RNAm de M2, que en el observado para M1.

Núcleos corticales y subcorticales relacionados con la integración del dolor de larga duración

La evidencia clínica de la década de 1960 proveniente de estudios neuroquirúrgicos muestra que la CAC es un sitio clave cuya lesión provoca la disociación cognitivo-afectiva del dolor (Foltz & White, 1962). También, la lesión del núcleo mediodorsal del tálamo, que proyecta directamente a la CAC, deteriora la memoria en humanos y en primates (Gaffan & Parker, 2000; Gaffan, 2002); mientras que la estimulación eléctrica del mismo núcleo talámico aumenta la conducta asociada al dolor en un modelo de dolor inflamatorio en la rata (Torres-López et al., 2000). Más aún, la lesión de la corteza insular, que es otra estructura importante relacionada con la percepción del dolor, produce un síndrome conocido como la asimbolia del dolor (Berthier et al., 1988) y también se ha relacionado con procesos relacionados con la memoria al dolor (Lenz et al., 1997). Todas estas estructuras forman parte del sistema límbico y están relacionadas con los sistemas de memoria y de dolor. La lesión y la disfunción de estas estructuras resaltan la asociación entre la memoria y el dolor. Esta relación se ve reforzada por observaciones hechas en pacientes que han tenido convulsiones y que tienen amnesia súbita con alivio del dolor como resultado (Choi et al., 2007; Klein et al., 2007).

El estudio de estos sitios anatómicos corticales y subcorticales, así como los mecanismos relacionados con el dolor resultante de la denervación o la amputación

cobra relevancia dado que el dolor deja de ser una alarma y se convierte en un problema médico. El dolor crónico representa el mayor costo en términos de pérdida de días laborales en los Estados Unidos. Probablemente el ejemplo más dramático sea la presencia de dolor en una parte del cuerpo que no está presente, esto es, el miembro fantasma doloroso. El fenómeno de miembro fantasma doloroso se presenta en 50 a 80% de los casos de miembro fantasma, sin importar la naturaleza de la amputación (Flor, 2002). El costo social y económico de este tipo de patologías es enorme en toda la población y es más importante aún si se toma en cuenta que la mayoría de las amputaciones traumáticas ocurren en pacientes de edades productivas (Jensen y Nikolajsen, 1999). Por estas razones es que es importante el estudio de los mecanismos por medio de los cuales se integra el dolor crónico, el miembro fantasma doloroso y la memoria asociada al dolor; todos fenómenos íntimamente relacionados. En la actualidad, el tratamiento del dolor crónico se ha constituido en uno de los mayores retos en medicina. La aproximación farmacológica en este tipo de dolor ha presentado numerosas fallas terapéuticas, dada la complejidad de los diferentes sistemas algésicos y antialgésicos involucrados.

Traslación del modelo animal de denervación para la explicación del dolor neuropático

La pertinencia de los modelos animales que se usan para estudiar el dolor con el fin de trasladar o traducir los resultados a ensayos clínicos en humanos se ha cuestionado dado que hay un potencial sesgo en sus aproximaciones experimentales (Rice et al., 2008). Otra característica importante acerca de los modelos animales es que los pacientes con dolor neuropático tienen un síntoma predominante que no se evoca,

sino que es espontáneo. En este trabajo hemos explorado una conducta que se expresa a lo largo del tiempo y no se evoca por un estímulo como puede ser el retiro de un miembro ante un estímulo sensorial. Este modelo correlaciona razonablemente con reportes clínicos en los que los pacientes que presentan un foco doloroso antes de la amputación de un miembro tienen una alta incidencia de miembro fantasma doloroso (Katz & Melzack, 1990).

IX. CONCLUSIONES

Los hallazgos encontrados en esta tesis muestran, en primera instancia, que existe un papel relevante del sistema colinérgico muscarínico en la corteza anterior del cíngulo en la integración del dolor neuropático e inflamatorio.

Otro hallazgo relevante es la correlación entre la expresión de receptores muscarínicos en la CAC y la conducta de autotomía después de la lesión del nervio. Los mecanismos de la expresión celular del receptor M2 en una condición de nocicepción neuropática son de alguna forma inhibidos, como se ve en la disminución del receptor como proteína y en un aumento en su RNAm. Esto nos permite inferir que un receptor inhibitor está siendo producido a nivel de RNAm dependiendo de la manifestación de nocicepción neuropática crónica, la cual de alguna manera genera la degradación de este receptor a nivel de proteína. Este estudio también muestra la selectividad de la porción rostral de la CAC en relación a la modulación de la nocicepción neuropática. Además, la escopolamina, que demostró reducir la memoria relacionada con la nocicepción, produce un aumento sostenido tanto del RNAm como de la inmunoreactividad del receptor M2. Esto implica que la escopolamina desencadena un mecanismo que

incrementa la posible expresión de un receptor acoplado a un sistema de segundos mensajeros inhibidores, lo que explica la reducción en el dolor neuropático.

Es importante recalcar que el modelo experimental utilizado en esta tesis no interfiere con los sistemas de transducción y transmisión del estímulo nociceptivo, incluyendo estructuras subcorticales y corticales no frontales. Esto sugiere que la manipulación del sistema colinérgico en la CAC tiene una relación directa con el proceso de adquisición de la memoria relacionada a la nocicepción.

REFERENCIAS

- Aggleton JP, Neave N, Nagle S, Sahgal A. A comparison of the effects of medial prefrontal, cingulate cortex, and cingulum bundle lesions on tests of spatial memory: evidence of a double dissociation between frontal and cingulum bundle contributions. *J Neurosci* 1995;15:7270–81.
- Albe-Fessard D, Giamberardino MA, Rampin O. Comparison of different animal models of chronic pain. In: Press R, editor. *Advances in pain research and therapy*. New York: S. Lipton et al.; 1990. p. 11–27.
- Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33:87-107.
- Berthier M, Starkstein S, Leiguarda R. Asymbolia for pain: a sensory-limbic disconnection syndrome. *Ann Neurol* 1988;24:41-49.
- Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973;232:331-356.
- Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 1998;50:279-290.
- Chapman CR. Limbic processes and the affective dimension of pain. *Prog Brain Res* 1996;110:63–81.
- Choi DS, Choi DY, Whittington RA, Nedeljkovic SS. Sudden amnesia resulting in pain relief: the relationship between memory and pain. *Pain* 2007;132:206-210.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.

- Coderre TJ, Grimes RW, Melzack R. Deafferentation and chronic pain in animals: an evaluation of evidence suggesting autotomy is related to pain. *Pain* 1986;26:61-84.
- Coderre TJ, Melzack R. Procedures which increase acute pain sensitivity also increase autotomy. *Experimental Neurology* 1986;92:713-722.
- Coffeen U, Lopez-Avila A, Ortega-Legaspi JM, del Angel R, Lopez-Munoz FJ, Pellicer F. Dopamine receptors in the anterior insular cortex modulate long-term nociception in the rat. *Eur J Pain* 2008;12:535-543.
- Coghill RC, Talbot JD, Evans AC, et al. Distributed processing of pain and vibration by the human brain. *J Neurosci: Off J Soc Neurosci* 1994;14:4095-108.
- Craig AD, Reiman EM, Evans A, Bushnell MC. Functional imaging of an illusion of pain. *Nature* 1996;384:258-260.
- de Gortari P, Mancera K, Cote-Velez A, Amaya MI, Martinez A, Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P. Involvement of CRH-R2 receptor in eating behavior and in the response of the HPT axis in rats subjected to dehydration-induced anorexia. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34:259-272.
- Devinsky O, Morrell MJ, Vogt BA. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain* 1995;118:279-306.
- Devor M, del Canho S, Raber P. Heritability of symptoms in the neuroma model of neuropathic pain: replication and complementation analysis. *Pain* 2005;116:294-301.
- Dickenson AH, Chapman V, Green GM. The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. *Gen Pharmacol* 1997;28:633-8.
- Dunnett SB, Wareham AT, Torres EM. Cholinergic blockade in prefrontal cortex and hippocampus disrupts short-term memory in rats. *NeuroReport* 1990;1:61-4.

- Duttaroy A, Gomeza J, Gan JW, Siddiqui N, Basile AS, Harman WD, Smith PL, Felder CC, Levey AI, Wess J. Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 2002;62:1084-1093.
- Eisenach JC. Muscarinic-mediated analgesia. *Life Sci* 1999;64:549-54.
- Eisenach JC, Detweiler DJ, Tong C, D'Angelo R, Hood DD. Cerebrospinal fluid norepinephrine and acetylcholine concentrations during acute pain. *Anesth Analg* 1996;82:621-626.
- Farr SA, Uezu K, Creonte TA, Flood JF, Morley JE. Modulation of memory processing in the cingulate cortex of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;65:363-368.
- Flor H: Phantom-limb pain: characteristics, causes, and treatment. *Lancet Neurol* 2002; 3:182-9.
- Foltz EL, White LE, Jr. Pain "relief" by frontal cingulotomy. *J Neurosurg* 1962;19:89-100.
- Gabriel M, Kubota Y, Sparenborg S, Straube K, Vogt BA. Effects of cingulate cortical lesions on avoidance learning and training-induced unit activity in rabbits. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation Cerebrale* 1991;86:585-600.
- Gabriel M, Sparenborg S, Kubota Y. Anterior and medial thalamic lesions, discriminative avoidance learning, and cingulate cortical neuronal activity in rabbits. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation Cerebrale* 1989;76:441-57.
- Gaffan D, Parker A. Mediodorsal thalamic function in scene memory in rhesus monkeys. *Brain* 2000;123 (Pt 4):816-827.

- Gaffan D. Against memory systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002;357:1111-1121.
- Galeotti N, Bartolini A, Ghelardini C. Ryanodine receptors are involved in muscarinic antinociception in mice. *Behav Brain Res* 2005;164:165-171.
- Galeotti N, Bartolini A, Ghelardini C. The phospholipase C-IP3 pathway is involved in muscarinic antinociception. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:888-897.
- Gaykema RP, Luiten PG, Nyakas C, Traber J. Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J Comp Neurol* 1990;293:103-124.
- Gillard ER, León-Olea M, Mucio-Ramírez S, Coburn CG, Sánchez-Islas E, de Leon A, Mussenden H, Bauce LG, Pittman QJ, Currás-Collazo MC. A novel role for endogenous pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide in the magnocellular neuroendocrine system. *Endocrinology* 2006;147:791-803.
- Graff-Guerrero A, Ortega-Legaspi JM, de la Fuente-Sandoval C, Pellicer F, López D, Moreno A, Martín R, Solís S, Hidalgo S, Rodríguez AO. Opposite parietal and midbrain BOLD patterns during inflammatory pain in the rat: A high-field fMRI study. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine Congress*. Honolulu, Hawaii, USA. 2009.
- Guimaraes AP, Guimaraes FS, Prado WA. Modulation of carbachol-induced antinociception from the rat periaqueductal gray. *Brain Res Bull* 2000;51:471-478.
- Guimaraes AP, Prado WA. Antinociceptive effects of carbachol microinjected into different portions of the mesencephalic periaqueductal gray matter of the rat. *Brain Res* 1994;647:220-230.
- Hammer R, Berrie CP, Birdsall NJ, Burgen AS, Hulme EC. Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* 1980;283:90-92.

- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988;32:77-88.
- Harte SE, Hoot MR, Borszcz GS. Involvement of the intralaminar parafascicular nucleus in muscarinic-induced antinociception in rats. *Brain Res* 2004;1019:152-161.
- Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 2006;16:710-715.
- Hassenbusch SJ, Pillay PK, Barnett GH. Radiofrequency cingulotomy for intractable cancer pain using stereotaxis guided by magnetic resonance imaging. *Neurosurgery* 1990;27:220-3.
- Hess A, Sergejeva M, Budinsky L, Zeilhofer HU, Brune K. Imaging of hyperalgesia in rats by functional MRI. *Eur J Pain* 2007;11:109-119.
- Hill A, Niven CA, Knussen C. Pain memories in phantom limbs: a case study. *Pain* 1996;66:381-4.
- Hsieh JC, Belfrage M, Stone-Elander S, Hansson P, Ingvar M. Central representation of chronic ongoing neuropathic pain studied by positron emission tomography. *Pain* 1995;63:225-36.
- Hurt RW, Ballantine Jr HT. Stereotactic anterior cingulate lesions for persistent pain: a report on 68 cases. *Clin Neurosurg* 1974;21:334-51.
- Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P, de Gortari P. Differential response of TRHergic neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) in female animals submitted to food-restriction or dehydration-induced anorexia and cold exposure. *Horm Behav* 2008;53:366-377.
- Jarrard LE. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* 1993;60:9-26.

- Jensen TS, Nikolajsen L: Phantom pain and other phenomena after amputation. In: Wall PD, Melzack RA (eds). Textbook of Pain. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1999.
- Johansen JP, Fields HL, Manning BH. The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:8077-8082.
- Jones AKBW, Friston KJ, Qi LY, Frackowiak RS. Cortical and subcortical localization of response to pain in man using positron emission tomography. Proc R Soc Lond B 1991;244:39-44.
- Jones PG, Dunlop J. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. Neuropharmacology 2007;53:197-206.
- Katz J, Melzack R. Pain 'memories' in phantom limbs: review and clinical observations. Pain 1990;43:319-336.
- Kauppila T, Pertovaara A. Effects of different sensory and behavioral manipulations on autotomy caused by a sciatic lesion in rats. Exp Neurol. 1991; 111:128-30.
- Klein T, Magerl W, Treede RD. Forget about your chronic pain. Pain 2007;132:16-17.
- Laird JM, Cervero F. Signalling of a step-like intensity change of noxious mechanical stimuli by dorsal horn neurones in the rat spinal cord. J Physiol 1991;434:561-75.
- Lenz FA, Gracely RH, Zirh AT, Romanoski AJ, Dougherty PM. The sensory-limbic of pain memory. Connections from thalamus to the limbic system mediated the learned component of the affective dimension of pain. Pain Forum 1997;6:22-31.
- Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. J Neurosci 1991;11:3218-3226.

- Lloyd DP. Post-tetanic potentiation of response in monosynaptic reflex pathways of the spinal cord. *J Gen Physiol* 1949;33:147-170.
- Lopez-Avila A, Coffeen U, Ortega-Legaspi JM, del Angel R, Pellicer F. Dopamine and NMDA systems modulate long-term nociception in the rat anterior cingulate cortex. *Pain* 2004;111:136-143.
- López-Avila A, Sotres-Bayon F, del Angel R, Pellicer F. Time span between nociceptive stimulus and denervation modifies autotomy behavior in rat. *Analgesia* 1999;4:475–8.
- Lucas-Meunier E, Fossier P, Baux G, Amar M. Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflugers Arch* 2003;446:17-29.
- Lyeth BG, Ray M, Hamm RJ, Schnabel J, Saady JJ, Poklis A, Jenkins LW, Gudeman SK, Hayes RL. Postinjury scopolamine administration in experimental traumatic brain injury. *Brain Res* 1992;569:281-286.
- Melzack R. Psychologic aspects of pain. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 1980;58:143–54.
- Melzack R. Phantom limbs and the concept of a neuromatrix. *Trends Neurosci* 1990 13:88-92.
- Merskey H, Lindblom U, Mumford JM, Natha PW, Sunderland S. Pain Terms A Current List with Definitions and Notes on Usage. In: Merskey H, Bogduk N, editors. *Classification of Chronic Pain Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms*. Seattle: IASP Press; 1994. p. 207-213.
- Mochida S, Kobayashi H. A novel muscarinic receptor antagonist AF-DX 116 differentially blocks slow inhibitory and slow excitatory postsynaptic potentials in the rabbit sympathetic ganglia. *Life Sci* 1988;42:2195-2201.

- Mogil JS, Wilson SG, Bon K, Lee SE, Chung K, Raber P, Pieper JO, Hain HS, Belknap JK, Hubert L, Elmer GI, Chung JM, Devor M. Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain* 1999;80:67-82.
- Ortega-Legaspi JM, Lopez-Avila A, Coffeen U, del Angel R, Pellicer F. Scopolamine into the anterior cingulate cortex diminishes nociception in a neuropathic pain model in the rat: an interruption of 'nociception-related memory acquisition'? *Eur J Pain* 2003;7:425-429.
- Papez JW. A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol Psychiatr* 1937;38:725-743.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th ed. Academic Press, 1998 London.
- Pellicer F, León-Olea M. Dolor y antialgesia. En: Escobar B MI, Pimienta J HJ, editores. *Sistema Nervioso, neuroanatomía funcional, neurohistología, neurotransmisores, receptores y clínica*. Editorial Universidad del Valle, Cali, Colombia 1998. P. 321-332.
- Pellicer F, Torres-López E, Sotres-Bayón F, López-Avila A, Coffeen U, Ortega-Legaspi JM, del Angel R, 2006. The affective and Cognitive Dimension of Nociception in an Animal Model: The Role of the Anterior Cingulate Cortex. In: Lucas A, editor. *Frontiers in Pain Research*. New York: Nova Science Publishers; 2006. p. 133-156.
- Perl ER, Whitlock DG, Gentry JR. Cutaneous projection to second-order neurons of the dorsal column system. *J Neurophysiol* 1962;25:337-358.
- Peterson S. *Drug microinjection in discrete brain regions* Tujunga, CA: David Kopf Instruments 1998;1-6.

- Peyron R, Laurent B, García-Larrea L. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis (2000). *Neurophysiol Clin* 2000; 30:26388.
- Ragozzino ME, Raymond PK. The effects of muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat anterior cingulate and prelimbic/infralimbic cortices on spatial working memory. *Neurobiol Learn Mem* 1998;69:241–57.
- Rainville P, Duncan GH, Price DD, Carrier B, Bushnell MC. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science* 1997;277:968-971.
- Rice AS, Cimino-Brown D, Eisenach JC, Kontinen VK, Lacroix-Fralish ML, Machin I, Mogil JS, Stohr T. Animal models and the prediction of efficacy in clinical trials of analgesic drugs: a critical appraisal and call for uniform reporting standards. *Pain* 2008;139:243-247.
- Rotter A, Birdsall NJ, Burgen AS, Field PM, Hulme EC, Raisman G. Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. I. Technique for autoradiographic localization of the binding of [3H]propylbenzilylcholine mustard and its distribution in the forebrain. *Brain Res* 1979;180:141-165.
- Russell RW, Ehlert FJ, Hwa JJ. Relation between behaviorally augmented tolerance and upregulation of muscarinic receptors in the CNS: effects of chronic administration. *Psychopharmacology (Berl)* 1986;88:33-39.
- Sandkuhler J. Learning and memory in pain pathways. *Pain* 2000;88:113-118.
- Schacter GB, Yang CR, Innis NK, Mogenson GJ. The role of the hippocampal-nucleus accumbens pathway in radial-arm maze performance. *Brain Res* 1989;494:339–49.

- Setlow B, Roozendaal B, McGaugh JL. Involvement of a basolateral amygdala complex-nucleus accumbens pathway in glucocorticoid-induced modulation of memory consolidation. *Euro J Neurosci* 2000;12:367–75.
- Taylor P, Heller Brown J. Acetylcholine. In: Siegel GJ, Brady ST, Albers RW, Price DL, editors. *Basic Neurochemistry Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2006. P. 185-209.
- Tohyama M. The acetylcholinergic system. In: Tohyama M, Takatsuji K, editors. *Atlas of Neuroactive Substances and Their Receptors in the Rat*. New York: Oxford University Press; 1998. p. 66-95.
- Torres-López E, del Angel R, Pellicer F. Thalamic anteriomedial and mediodorsal nuclei stimulation enhances the self-injury behaviour induced by an inflammatory process in the rat. *Analgesia* 2000;5:67-73.
- Tuor UI, Malisza K, Foniok T, Papadimitropoulos R, Jarmasz M, Somorjai R, Kozłowski P. Functional magnetic resonance imaging in rats subjected to intense electrical and noxious chemical stimulation of the forepaw. *Pain* 2000;87:315-324.
- Vaccarino AL, Melzack R. Analgesia produced by injection of lidocaine into the anterior cingulum bundle of the rat. *Pain* 1989;39:213-219.
- Vaccarino AL, Melzack R. Temporal processes of formalin pain: differential role of the cingulum bundle, fornix pathway and medial bulboreticular formation. *Pain*. 1992;49:257-71.
- van Koppen CJ, Kaiser B. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther* 2003;98:197-220.

- Vogt BA, Derbyshire S, Jones AK. Pain processing in four regions of human cingulate cortex localized with co-registered PET and MR imaging. *Eur J Neurosci* 1996;8:1461-1473.
- Vogt BA, Finch DM, Olson CR. Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions. *Cereb Cortex* 1992;2:435-443.
- Waelbroeck M, Tastenoy M, Camus J, Christophe J. Binding of selective antagonists to four muscarinic receptors (M1 to M4) in rat forebrain. *Mol Pharmacol* 1990;38:267-273.
- Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 1979;7:103-111.
- Wan H, Aggleton JP, Brown MW. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J Neurosci: Off J Soc Neurosci* 1999;19:1142-8.
- Westlund KN, Vera-Portocarrero LP, Zhang L, Wei J, Quast MJ, Cleeland CS. fMRI of supraspinal areas after morphine and one week pancreatic inflammation in rats. *Neuroimage* 2009;44:23-34.
- Wiig KA, Burwell RD. Memory impairment on a delayed nonmatching-to-position task after lesions of the perirhinal cortex in the rat. *Behav Neurosci* 1998;112:827-38.
- Zhuo M. A synaptic model for pain: long-term potentiation in the anterior cingulate cortex. *Mol Cells* 2007;23:259-271.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-110.

Scopolamine into the anterior cingulate cortex diminishes nociception in a neuropathic pain model in the rat: an interruption of ‘nociception-related memory acquisition’?

J. Manuel Ortega-Legaspi^a, Alberto López-Avila^b, Ulises Coffeen^b, Rosendo del Angel^b, Francisco Pellicer^{b,*}

^a *Facultad de Medicina, Núcleos de Calidad Educativa, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.*

^b *Subdirección de Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría, Ramón de la Fuente, Camino a Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, México*

Received 25 July 2002; accepted 16 December 2002

Abstract

The cingulate cortex plays a key role in the affective component related to pain perception. This structure receives cholinergic projections and also plays a role in memory processing. Therefore, we propose that the cholinergic system in the anterior cingulate cortex is involved in the nociceptive memory process. We used scopolamine (10 µg in 0.25 µl/saline) microinjected into the anterior cingulate cortex, either before thermonociception followed by a sciatic denervation, between thermonociception and denervation or after both procedures ($n = 10$ each). The vehicle group (saline solution 0.9%, $n = 14$) was microinjected before thermonociception. Chronic nociception was measured by the autotomy score, which onset and incidence were also determined. Group scopolamine–thermonociception–denervation (STD) presented the lowest autotomy score as compared to vehicle and group thermonociception–denervation–scopolamine (TDS) (vehicle vs. STD, $p = 0.002$, STD vs. TDS, $p = 0.001$). Group thermonociception–scopolamine–denervation (TSD) showed a diminished autotomy score when compared to TDS ($p = 0.053$). STD group showed a delay in the onset of AB as compared to the rest of the groups. Group TSD presented a significant delay ($p = 0.048$) in AB onset when compared to group TDS. There were no differences in the incidence between groups. The results show that nociception-related memory processed in the anterior cingulate cortex is susceptible of being modified by the cholinergic transmission blockade. When scopolamine is microinjected prior to the nociceptive stimuli, nociception-related memory acquisition is prevented. The evidence obtained in this study shows the role of the anterior cingulate cortex in the acquisition of nociception-related memory.

© 2002 European Federation of Chapters of the International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Memory; Anterior cingulate cortex; Acetylcholine; Denervation; Rat and pain

1. Introduction

Some authors have associated limbic structures with cognitive and affective pain processing (Papez, 1937; Delgado, 1955; Abott and Melzack, 1978). Surgical manipulations that involve the cingulum bundle or the anterior cingulate cortex (ACC) have been used for the treatment of patients with central or intractable pain

(Foltz and White, 1962; Hurt and Ballantine, 1974; Hassenbusch et al., 1990). Moreover, recent evidence from functional imaging studies have shown that the anterior cingulate cortex is particularly related to the affective component of pain (Jones et al., 1991; Coghill et al., 1994; Hsieh et al., 1995; Rainville et al., 1997). In a recent communication (Tuor et al., 2000), using functional magnetic resonance imaging in rats, it was shown, that the anterior cingulate cortex, among other structures, is activated by a nociceptive electrical or chemical and analogous way to humans stimulation.

* Corresponding author. Fax: +525-655-99-80.

E-mail address: pellicer@imp.edu.mx (F. Pellicer).

The cingulate cortex receives cholinergic projections mainly from the medial septum–diagonal band complex (Gaykema et al., 1990). Moreover, a high density of cholinergic receptors in this brain area has also been demonstrated (Tohyama and Takatsuji, 1998). Structures traditionally associated with the limbic system like the hippocampus, temporal lobe, amygdala, accumbens nuclei and ACC are importantly involved in learning and memory processes (Schacter et al., 1989; Jarrard, 1993; Devinsky et al., 1995; Chapman, 1996; Wiig and Burwell, 1998; Wan et al., 1999; Setlow et al., 2000). Recent reports show that the cingulate cortex plays a role in postraining memory processing (Farr et al., 2000). Moreover, Devinsky et al. (1995) suggest that the ACC might be related to learning associated with prediction and avoidance of noxious stimuli.

The aim of this study was to investigate whether the cholinergic system is involved in nociceptive-related memory processing at the level of the ACC.

Scopolamine, a cholinergic antagonist, was microinjected into the ACC to test its capability of interfering with memory and learning processes related to chronic nociception. The neuropathic pain model was induced by denervation, this procedure triggers a sensitisation state, in peripheral and central nervous systems, that has been related to autotomy behaviour (AB) in animals (Wall et al., 1979; Levitt, 1985; Coderre et al., 1986; Albe-Fessard et al., 1990). Autotomy behaviour is considered as an expression of neuropathic pain (Wall et al., 1979). The nociceptive process was increased by a painful stimulation applied prior to denervation in order to enhance AB (Coderre et al., 1986; López-Avila et al., 2000).

2. Materials and methods

The experiments were conducted in agreement with the ethics committee regulations of the International Association for the Study of Pain (Zimmermann, 1983) and with the project's commission approval of the Instituto Nacional de Psiquiatría (INP). Male Wistar rats (250–350 g) were raised, housed and maintained in the INP. During the observation period the animals were maintained in transparent acrylic individual cages with light–dark cycles of 12 × 12 h, and with ad libitum feeding and hydration. For all surgical procedures, the rats were anaesthetised with halothane 2% mixed with 98% O₂.

2.1. Groups

Vehicle (saline solution 0.9%, $n = 14$) was microinjected into the ACC followed by a thermonociceptive stimulus (hind paw immersed in hot water at 55 °C during 20 s) and 30 min later a complete sciatic de-

nervation was carried out; group scopolamine–thermonociception–denervation (STD, $n = 10$): the same procedure with the vehicle group was conducted except that scopolamine was microinjected instead of saline; group thermonociception–scopolamine–denervation (TSD, $n = 10$): scopolamine was microinjected immediately after thermonociception and before the denervation procedure; group thermonociception–denervation–scopolamine (TDS, $n = 10$): the thermonociceptive stimulus was given first, 30 min later the denervation procedure was held and immediately after scopolamine was microinjected into the ACC.

2.2. Microinjection procedure

A unilateral cannula (28 gauge, Small Parts, USA) for the microinjection was stereotaxically positioned into the left ACC. The cannula tip was placed 2 mm underneath the meningeal tissue (A: 1 mm from Bregma; L: –0.6 mm from mid line). The cannula was connected by polyethylene tubing (PE-10, 20 cm length) to a 10 µl syringe (Hamilton, Reno, NV), filled with scopolamine hydrobromide (Sigma Chemicals, St. Louis, MO; 10 µg/0.25 µl saline) or vehicle at the same volume for the control group. For all animals the solutions were injected by means of a syringe pump at a rate of 0.5 µl/min (Harvard Apparatus, MA, USA). These microinjection parameters have been reported not to induce any tissular damage (Peterson, 1998). The cannula was left in place for additional 60 s to reduce the chance of reflux.

2.3. Denervation procedure

Under general anaesthesia (*vide supra*), the right hind limb sciatic nerve was exposed and dissected free. The nerve was transected, its proximal end ligated with 3-0 silk and 5 mm of distal end were removed to prevent reinnervation. Skin was closed with 3-0 silk.

Daily autotomy scores were computed for 25 days, using a scale devised by Wall et al. (1979) which gives a score of 1 for the removal of one or more nails; an additional score of 1 was added for each distal half digit attacked and a further score of 1 was added for each proximal half digit attacked. If the distal or proximal half of the paw was attacked an additional score of 1 was added for each one. We also recorded the AB onset as the mean day, within each group, in which autotomy initiated. The number of animals that presented AB per group was measured (incidence). On day 25, animals were sacrificed by an overdose of pentobarbital.

2.4. Statistical analysis

The following variables were calculated from the raw data obtained from daily registration of the autotomy

scores: incidence of the behaviour (calculated as the number of rats that showed the behaviour in relation to the total number of animals in that group), the onset of the behaviour (calculated as the mean day of onset of the behaviour for every group) and its maximum score (calculated as the sum of the autotomy scores for every group considering the autotomy 13 score categorisation (Wall et al., 1979).

In order to analyse the evolution of autotomy index, a repeated measures ANOVA was run. Differences between treatments per day were assessed by means of a post hoc Tukey test. AB onset data were analysed by means of a one-way ANOVA. A post hoc Tukey test was used to contrast mean day of AB onset between treatments. Differences in the percentage of subjects showing AB per treatment (incidence) were assessed by means of a Fisher exact probability test. The significance for all statistical analyses was established at $p < 0.05$.

3. Results

The results show a decrease in the score and onset of autotomy behaviour, which depended on the scheme of scopolamine microinjection into ACC. (repeated measures ANOVA, $F = 310.22$, $p = 0.000$).

Group STD exhibited the lowest autotomy score when compared to vehicle and TDS (vehicle vs. STD, $p = 0.002$, STD vs. TDS, $p = 0.001$). TSD showed an almost statistically significant autotomy score difference as compared to TDS ($p = 0.053$) (Fig. 1). Significant statistical differences on the autotomy score per day were established by a post hoc Tukey test ($p < 0.05$), when vehicle vs. STD from day 7 to 25, vehicle vs. TSD from day 8 to 10 and STD vs. TDS from day 2 to 25 were compared.

STD group showed a delay in AB onset as compared to the rest of the groups. Group TSD presented a significant delay ($p = 0.048$) in AB onset as compared to group TDS. There were no differences in the incidence between groups. (Table 1).

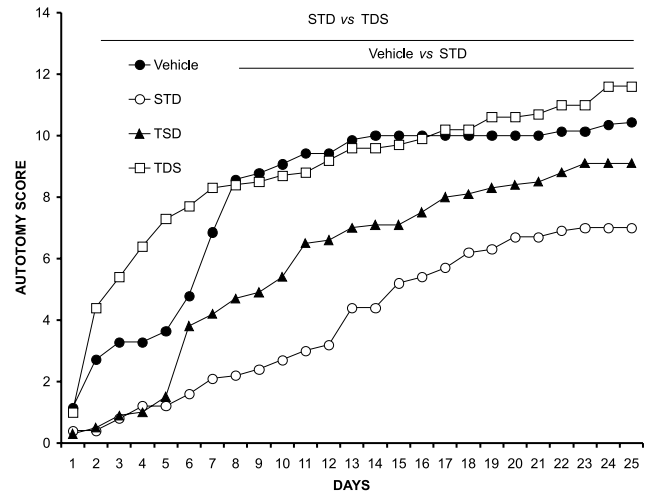


Fig. 1. Behavioural nociceptive response measured as autotomy score along 25 days. All groups were denervated 30 min after thermonociception. Vehicle was microinjected with saline 0.9% into ACC before thermonociception. Experimental groups were injected with scopolamine (10 µg in 0.25 µl) into ACC either before thermonociception (STD), between thermonociception and denervation (TSD) or after both manoeuvres (TDS). STD group shows a decreased autotomy score as compared to vehicle and TDS (repeated measured ANOVA, $p < 0.05$). The significant between groups per day were established by a Tukey test as a post hoc ($p < 0.05$) (horizontal bars).

4. Discussion

Our results show a functional relationship between nociception-related memory and ACC in a chronic nociceptive model, which is susceptible of being modified by a blockade of cholinergic transmission.

Sensory nociceptive activity, previous to peripheral deafferentation conditions somatosensory states, particularly painful ones. Clinical evidence shows that the referred pain after amputation (i.e., phantom limb pain), exhibits topological and sensory characteristics similar to the pain experienced previous to amputation, such experiences have been appointed by several authors (Melzack, 1980; Katz and Melzack, 1990; Hill et al., 1996; López-Avila et al., 2000) as ‘pain memory’.

In this context, the ACC has been related to memory processing. Thus, lesions of the cingulum bundle

Table 1
Autotomy behaviour in the different experimental schemes

Group	Incidence	Onset (days ± SEM)	Maximum score (day 25)
Vehicle	14/14 (100%)	3.35 ± 0.78	10.4
STD	10/10 (100%)	9.6 ± 1.8	7
TSD	9/10 (90%)	7.6 ± 2.12	9.1
TDS	10/10 (100%)	2.1 ± 0.45	11.6

Characteristics of AB in the different experimental groups. The incidence was calculated for each group as the percentage of the number of animals that displayed AB, divided by the total number of animals in the group. The onset was calculated as the mean day, with in each group, in which autotomy initiated. A one-way ANOVA test was used to determine statistically significant differences in the onset of AB between groups; TDS vs. TSD*, TDS vs. STD**, and STD vs. vehicle* (Tukey significant level: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$). Autotomy score was determined using the scale devised by Wall et al. (1979).

and cingulate cortex impair spatial memory (Dunnett et al., 1990; Aggleton et al., 1995), and lesion of ACC retarded acquisition of discriminative avoidance learning (Gabriel et al., 1989, 1991). Bilateral cingulectomy impairs acquisition and maintenance of avoidance responses (Devinsky et al., 1995). Besides, Farr et al. (2000) demonstrated that functional manipulations with the microinjection of a cholinergic agonist (arecoline) into the ACC had a significant increasing effect on retention test performance while that of an antagonist (scopolamine) diminished the retention in the same test.

The cingulate cortex is a convergence locus where the unpleasant component of nociceptive input is integrated (Jones et al., 1991; Coghill et al., 1994; Hsieh et al., 1995; Rainville et al., 1997; Tuor et al., 2000), as well as the integration of several tasks related to short term and spatial memories (Dunnett et al., 1990; Aggleton et al., 1995; Ragozzino and Raymond, 1998; Gaffan, 2002.). This anatomic and functional convergence allows us to incide in cortical and subcortical levels of the nociceptive integration system, on the regard of highly significant events that trigger a memory process.

With this framework our results show that microinjection of scopolamine into ACC, prior to the application of the nociceptive stimulus prevents the acquisition of nociceptive memory. However, scopolamine does not modify retention, as shown in groups TSD and TDS. We refer the term retention as the conservation of chronic nociception measured by the autotomy score.

The data obtained by TDS group supported the idea that the thermonociceptive stimuli and denervation, previous to the scopolamine microinjection, are determinant to produce or activate a nociceptive-related memory process. This is due to the fact that these stimuli reach the central systems without being blocked by scopolamine. This can be assumed by comparing this results to the ones obtained with group STD in which scopolamine induces a blockade in muscarinic receptors of the ACC, what is followed by a reduction in the nociceptive-related memory that is measured as a diminished AB. It is important to note that our experimental approach leaves free the nociceptive stimuli transduction and transmission systems, including subcortical and non-frontal cortical structures. This suggests that scopolamine microinjection into the ACC has a direct relationship with the process of acquisition of nociceptive-related memory.

Not only does the scopolamine effect in the ACC modify autotomy score, but it also delays the onset of AB in a scheme dependent manner.

The present results suggest that nociceptive-related memory processing within the ACC is similar to those traditionally proposed for other processes in which memory is involved.

Acknowledgements

This research was partially supported by CONACyT FP-28696M; INP 3230; Scholarship CONACyT-DGEP UNAM for A.L.-A.

References

- Abott FV, Melzack R. Analgesia produced by stimulation of limbic structures and its relation to epileptiform discharges. *Exp Neurol* 1978;62:720–34.
- Aggleton JP, Neave N, Nagle S, Sahgal A. A comparison of the effects of medial prefrontal, cingulate cortex, and cingulum bundle lesions on tests of spatial memory: evidence of a double dissociation between frontal and cingulum bundle contributions. *J Neurosci: Off J Soc Neurosci* 1995;15:7270–81.
- Albe-Fessard D, Giamberardino MA, Rampin O. Comparison of different animal models of chronic pain. In: Press R, editor. *Advances in pain research and therapy*. New York: S. Lipton et al.; 1990. p. 11–27.
- Chapman CR. Limbic processes and the affective dimension of pain. *Prog Brain Res* 1996;110:63–81.
- Coderre TJ, Grimes RW, Melzack R. Deafferentation and chronic pain in animals: an evaluation of evidence suggesting autotomy is related to pain. *Pain* 1986;26:61–84.
- Coghill RC, Talbot JD, Evans AC, et al. Distributed processing of pain and vibration by the human brain. *J Neurosci: Off J Soc Neurosci* 1994;14:4095–108.
- Delgado JMR. Cerebral structures involved in transmission and elaboration of noxious stimulation. *J Neurosurg* 1955;18:261–75.
- Devinsky O, Morrell MJ, Vogt BA. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain* 1995;118(Pt 1):279–306.
- Dunnett SB, Wareham AT, Torres EM. Cholinergic blockade in prefrontal cortex and hippocampus disrupts short-term memory in rats. *NeuroReport* 1990;1:61–4.
- Farr SA, Uezu K, Creonte TA, Flood JF, Morley JE. Modulation of memory processing in the cingulate cortex of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;65:363–8.
- Foltz EL, White LE. Pain “relief” by frontal cingulotomy. *J Neurosurg* 1962;19:98–100.
- Gabriel M, Kubota Y, Sparenborg S, Straube K, Vogt BA. Effects of cingulate cortical lesions on avoidance learning and training-induced unit activity in rabbits. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation Cerebrale* 1991;86:585–600.
- Gabriel M, Sparenborg S, Kubota Y. Anterior and medial thalamic lesions, discriminative avoidance learning, and cingulate cortical neuronal activity in rabbits. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation Cerebrale* 1989;76:441–57.
- Gaffan D. Against memory systems. *Philos Trans R Soc Lond* 2002;357:1111–21.
- Gaykema RP, Luiten PG, Nyakas C, Traber J. Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J Comparative Neurol* 1990;293:103–24.
- Hassenbusch SJ, Pillay PK, Barnett GH. Radiofrequency cingulotomy for intractable cancer pain using stereotaxis guided by magnetic resonance imaging. *Neurosurgery* 1990;27:220–3.
- Hill A, Niven CA, Knussen C. Pain memories in phantom limbs: a case study. *Pain* 1996;66:381–4.
- Hsieh JC, Belfrage M, Stone-Elander S, Hansson P, Ingvar M. Central representation of chronic ongoing neuropathic pain studied by positron emission tomography. *Pain* 1995;63:225–36.

- Hurt RW, Ballantine Jr HT. Stereotactic anterior cingulate lesions for persistent pain: a report on 68 cases. *Clin Neurosurg* 1974;21:334–51.
- Jarrard LE. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* 1993;60:9–26.
- Jones AKBW, Friston KJ, Qi LY, Frackowiak RS. Cortical and subcortical localization of response to pain in man using positron emission tomography. *Proc R Soc Lond B* 1991;244:39–44.
- Katz J, Melzack R. Pain 'memories' in phantom limbs: review and clinical observations. *Pain* 1990;43:319–36.
- Levitt M. Dysesthesias and self-mutilation in humans and subhumans: a review of clinical and experimental studies. *Brain Res* 1985;357:247–90.
- López-Avila A, Sotres-Bayon F, DelAngel R, Pellicer F. Time span between nociceptive stimulus and denervation modifies autotomy behavior in rat. *Analgesia* 2000;4:475–8.
- Melzack R. Psychologic aspects of pain. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 1980;58:143–54.
- Papez JW. A proposed mechanisms of emotion. *Arch Neurol Psychiat* 1937;38:725–43.
- Peterson S. In: *Drug microinjection in discrete brain regions*. Tujunga, CA: David Kopf Instruments; 1998. p. 1–6.
- Ragozzino ME, Raymond PK. The effects of muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat anterior cingulate and prelimbic/infralimbic cortices on spatial working memory. *Neurobiol Learn Mem* 1998;69:241–57.
- Rainville P, Duncan GH, Price DD, Carrier B, Bushnell MC. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science* 1997;277:968–71.
- Schacter GB, Yang CR, Innis NK, Mogenson GJ. The role of the hippocampal-nucleus accumbens pathway in radial-arm maze performance. *Brain Res* 1989;494:339–49.
- Setlow B, Roozendaal B, McGaugh JL. Involvement of a basolateral amygdala complex-nucleus accumbens pathway in glucocorticoid-induced modulation of memory consolidation. *Euro J Neurosci* 2000;12:367–75.
- Tohyama M, Takatsuji K, editors. *The acetylcholinergic system Atlas of neuroactive substances and their receptors in the rat*. USA: Oxford University Press; 1998. p. 66–95.
- Tuor UI, Malisza K, Foniok T, et al. Functional magnetic resonance imaging in rats subjected to intense electrical and noxious chemical stimulation of the forepaw. *Pain* 2000;87:315–24.
- Wall PD, Devor M, Inbal R, et al. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 1979;7:103–11.
- Wan H, Aggleton JP, Brown MW. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J Neurosci: Off J Soc Neurosci* 1999;19:1142–8.
- Wijg KA, Burwell RD. Memory impairment on a delayed non-matching-to-position task after lesions of the perirhinal cortex in the rat. *Behav Neurosci* 1998;112:827–38.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109–10.

THE NIGHTMARE OF A PAINFUL PHANTOM

J. Manuel Ortega-Legaspi*

*“After the amputation,
he doubted that any operation
had been performed because
the arm and hand seemed to be
still a part of his body and
the seat of great pain.”*
William K. Livingston

SUMMARY

Pain has a representation in the central nervous system within some of the most ancient structures developed over the phylogenetical history. Also, it is the most important symptom for which patients seek medical attention. However, there are pathologies in which pain stops being the alarm and becomes a medical issue, perhaps the most dramatic example of this would be the presence of pain in a part of the body that is no longer present, this is known as ‘phantom limb pain’.

Over history, much attention has been given to pain understanding by well-known personalities and phantom limb itself was described first by Ambroise Paré in the 16th Century and later described by Silas Weir Mitchell in the 19th Century and thoroughly addressed by Livingston in the first half of the 20th Century.

The non-painful phantom limb phenomena are reported by almost all amputees and there is pain in 50 to 80%, no matter the nature of the amputation. We face a puzzling public health problem. The major cause of limb amputations comes from vascular and neuropathic complications provoked by diabetes, followed in frequency by trauma, all astonishingly prevalent in the general working population in productive ages. A worrying cause of trauma and the phantom limb in some developing countries is caused by anti-personnel mines leading people, a majority of civilians with a considerable amount of children, to a living hell accompanied by a painful phantom.

Phantom limb pain represents a challenge that involves a huge scope of study related to both public health and neuroscience. It is an entity that involves peripheral, central and psychological factors. Neuroscientific research has studied the system from the amputated peripheral nerve, where a neuroma develops, to the cerebral cortex in which there are changes in the somatosensory cortex after limb amputations, related to a decreased activation of the area that would represent the missing limb. Besides, this problem has caused the development of theories such as the ‘neuromatrix’ that is activated in the absence of peripheral sensory information. In this sense, the anterior cingulate cortex has been

proposed as a key structure in the development of phantom nociception in animals.

After a huge amount of research, only 30% of patients benefits for a good number of interventions.

Phantom limb pain is a clear example that consciousness can indeed become ill and that the clinical frequency, importance and transcendence make research on the neuroscience of consciousness of vital importance.

The painful phantom represents a tool and challenge in the neuroscientific field, opens the door for the study on consciousness, supports the need for improved healthcare and allows us to think about war and its consequences in the development of society.

Key words: Phantom limb, pain, neuroscience, consciousness.

RESUMEN

El dolor es representado en el Sistema Nervioso Central en algunas de las estructuras más antiguas desarrolladas a lo largo de la historia filogenética. Además, es el síntoma más importante por el que los pacientes buscan atención médica. Sin embargo, existen patologías en las que el dolor deja de ser la alarma y se convierte en un problema médico; probablemente el ejemplo más dramático sea la presencia de dolor en una parte del cuerpo que no está presente, esto se conoce como “miembro fantasma doloroso”.

A lo largo de la historia, se ha prestado mucha atención en el entendimiento del dolor por renombradas personalidades. El miembro fantasma fue descrito por primera vez por Ambroise Paré en el siglo XVI; en el siglo XIX hizo lo mismo Silas Weir Mitchell, y posteriormente fue revisado con mayor profundidad por Livingston a inicios del siglo XX.

El fenómeno del miembro fantasma no doloroso es reportado prácticamente por todas las personas amputadas, y el doloroso en 50 a 80% de los casos, sin importar la naturaleza de la amputación. Nos encontramos frente un importante problema de salud

*Laboratorio de Neurofisiología Integrativa. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente. Calzada México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, 14370, México, D.F. Fax: (525) 655 99 80.
E mail: jmortegal@yahoo.com

Recibido: 31 de julio de 2007. Aceptado: 9 de agosto de 2007.

pública. La principal causa de amputación de miembros viene de las complicaciones vasculares y neuropáticas de la diabetes, seguida en frecuencia por causas traumáticas, extremadamente frecuentes en la población económicamente activa. Una causa preocupante de trauma y del fantasma en algunos países en desarrollo son las minas anti-persona. Estas, llevan a los afectados, la mayoría civiles con un número considerable de niños, a un infierno viviente acompañado de un fantasma doloroso.

El dolor por miembro fantasma representa un desafío que involucra un enorme campo de estudio relacionado con la salud pública y las neurociencias. Es una entidad que involucra factores periféricos, centrales y psicológicos. La investigación neurocientífica ha estudiado el Sistema desde el nervio periférico amputado donde se forma un neuroma, hasta la corteza cerebral en donde hay una activación disminuida del área que representa al miembro amputado en la corteza somatosensorial después de una amputación. Además, esto ha provocado el desarrollo de teorías como la "neuromatriz". En este sentido, la corteza anterior del cíngulo ha sido propuesta como una estructura clave en el desarrollo de la nocicepción fantasma en animales.

Después de una gran cantidad de investigación, sólo 30% de los pacientes se ve beneficiado, gracias a un buen número de intervenciones.

El dolor por miembro fantasma es un ejemplo claro de que la conciencia se puede enfermar y la frecuencia clínica, la importancia y la trascendencia de este problema hacen que la investigación en la neurofisiología de la conciencia sea de vital importancia.

El fantasma doloroso representa una herramienta y un desafío en el campo neurocientífico; abre la puerta para el estudio de la conciencia, apoya la necesidad de mejorar los servicios de salud y nos permite meditar acerca de la guerra y las consecuencias que tiene para el desarrollo de las sociedades.

Palabras clave: Miembro fantasma, dolor, neurociencias, conciencia.

Pain is an experience that represents an essential alarm to actual or potential tissue damage (9), however, the problem is when the alarm becomes the illness.

Pain has a representation in the Central Nervous System within some of the most ancient structures developed over the phylogenetical history of animals, such as the peripheral nerves and the spinal cord. Should pain not have developed over the history of life, perhaps life itself would have not succeeded until our days. Furthermore, pain is the most important symptom for which patients seek medical attention and, in many cases, they would not care about their disease were it not for the presence of pain. However, there are pathologies in which pain stops being the alarm and becomes a medical issue, perhaps the most dramatic example of this would be the presence of pain in a part of the body that is no longer present, this is known as "phantom limb pain" (3, 4, 8).

Over the centuries, much attention has been given to pain understanding. Aristotle thought that the heart was the seat for feelings and argued that pain was an

emotion. In contrast, Galen recognized the brain as the organ of feeling and placed pain into the sphere of sensation. Avicenna noted that, in disease, pain can dissociate from touch or temperature recognition, and proposed pain to be an independent sensation. Further progress in its thinking awaited the development of scientific tools and several old concepts were substituted by proposals such as that of Newton and Hartley, that neuronal messages were vibrations of substance in nerves (11).

Regarding phantom pain, its first description was given by Ambroise Paré, in the 16th Century who postulated that peripheral factors, as well as a central pain memory, might be causing it (4). In more modern times, the acknowledgement of phantom limb pain was not formally described until 1866, when Silas Weir Mitchell chose to publish his findings in the newspaper *The Atlantic Monthly*, under a pseudonym, due to fear of being considered as a charlatan. Public response did not wait, since many of the soldiers wounded during the American Civil War stood for the new ideas, allowing then a proper publication in a scientific journal in 1872 (4, 8). This phenomenon was more thoroughly revised in the beginning of the 20th century by Livingston (6), exemplified by the story of Nick, a personal friend and patient. He made clear how catastrophically this entity is suffered and how it can become a chronic and incapacitating disease.

After these events, although knowledge has grown in a considerable fashion to the massive extent that we have today, patients still suffer from treatment resistant pain syndromes and the knowledge about the neural mechanisms of phantom limb pain has not lead neither to a complete cure nor an effective way of preventing it. In addition, the non-painful phantom phenomena are reported by almost all amputees and there is pain in 50 to 80% of them, no matter the nature of the amputation. We face a puzzling public health problem. The genetic background in Latin America puts its population at a higher risk of diabetes, and the lack of efficient health resources leads many people to poor disease control, ending in vascular complications and neuropathies, which ultimately represent the major cause of limb amputations. Trauma follows diabetic foot as leading cause of limb amputations, being very important, since the highest incidence happens in working population at productive ages (5).

Another issue related to traumatic amputations cannot be left unmentioned, the constant presence of war in many developing countries has left, among other ethically highly questionable things, anti-personnel mines. These devices accounted for 7328 casualties worldwide only in the year 2005, taking those affected with traumatic amputations to being handicapped and

with phantom limb pain. The mentioned number has to be added to thousands more that were not recorded. The International Campaign to Ban Landmines estimates 15 to 20 thousand new landmine casualties every year. This problem is spread through 58 countries in four continents, with Afghanistan, Cambodia, and Colombia being the most affected nations. Furthermore, the expanding number of conflicts around the world has led to an increasing number of cases related to anti-personnel mines; there are countries that still produce and use these weapons, which condemn civilians to a living hell. Therefore, the problem has to be dealt with in those places where the conflicts are over and in those with arising ones. Amongst all the affected ones in 2005, just to give an example, the vast majority (81%) were civilians, with a considerable amount of children (15).

Phantom limb pain represents a challenge that involves a huge scope of study related to both public health and scientific knowledge, giving neuroscience a very important role. Considering the high prevalence and the transcendence of the problem, a considerable amount of research has been endeavoured in order to understand and effectively treat these patients. The issue is more than complex, it is an entity that involves peripheral, central and psychological factors (4).

From the times of Ramón y Cajal, the changes in the peripheral nerves after denervation were observed and described as a neuroma. More recently, several authors such as Devor (1), Wall (13) and Woolf (14), have suggested the mechanisms within the neuroma that play an important role in the genesis of the phantom. Besides, the role of other structures in the Nervous System has taken the researchers to look up to the roof and try to understand the phantom from the systems above the spinal cord. In this context, at the beginning of the nineties, Ronald Melzack proposed a theory in which a neuronal network distributed throughout several structures of the Central Nervous System processes parallel information to the sensory input. This signature was consigned as a 'neuromatrix' that codifies what has been described as the 'genetic body of the brain' which is, in other words, a reference of the body itself, determined genetically. The phantom would then appear when the neuromatrix is activated in the absence of peripheral sensory information (7). In addition, there is a cortical sensory map which was described by Penfield and colleagues as an *homunculus*. More recent evidence, provided by Herta Flor and her group, using functional magnetic resonance imaging, has demonstrated changes in this region after limb amputations, related to a decreased activation of the area that would represent the missing limb (2). The idea that there are new connections in the somatosensory cortex between the

portion that represents the phantom and the adjacent area has been proposed by Ramachandran, as a possible etiology (12). Curiously, in an opposite manner to common research strategies, the above mentioned findings were first obtained from clinical studies that later lead to animal research in order to find the specific mechanisms involved. In this sense, Pellicer and colleagues have proposed that the anterior cingulate cortex is a key structure in the development of phantom nociception in animals. All this basic knowledge provides the fundamental physiological background in order to obtain a rational therapy focused in this difficult clinical entity (10).

Even after a huge amount of modern research and effort, treatment only benefits 30% of the patients after interventions such as local anaesthesia, sympathectomy, dorsal-root entry-zone lesions, cordotomy, rhizotomy and pharmacological treatments with anticonvulsants, barbiturates, antidepressants, neuroleptics and muscle relaxants (4).

The problem of phantom limb pain certainly represents a pathological state of human consciousness itself. An individual makes conscious a part of the body that is not there and just to make it worse, it has a good chance of making inexistent pain evident. This is a clear example that consciousness can indeed become ill and that the clinical frequency, importance and transcendence make research on the neuroscience of consciousness of vital importance. Consciousness represents a huge question mark which has been tackled by several disciplines. The holistic understanding of consciousness would lead to an unprecedented amount of knowledge from the philosophical, humanistic and scientific points of view regarding the understanding of life itself.

Considering the outstanding success for human nature that this would represent and giving its clinical relevance for millions that suffer from pathologies related to its malfunction, like those with painful phantoms, research in this field becomes an epistemic priority.

Phantom pain represents a powerful tool and a true challenge in several fields. The most obvious of them is the neuroscientific one, which with further time and effort should eventually elucidate the mechanisms involved. Also, the phantom opens a window for the understanding of consciousness. Above all, it provides us with two mainstreams in the social field; on the one hand, it supports the need for improved healthcare in developing societies in order to diminish the catastrophic consequences of not preventing properly chronic controllable diseases. On the other hand, it allows us to think about war and the weapons used in it, which cause severe consequences in the development of individuals and society.

Acknowledgements

Doctor Francisco Pellicer for all his support and valuable suggestions. Ana Barrera Vargas and Irene Treviño Frenk for language revision and valuable comments.

REFERENCES

1. DEVOR M, GOVRIN-LIPPMAN R, ANGELIDES K: Na⁺ channels immunolocalization in peripheral mammalian axons and changes following nerve injury and neuroma formation. *J Neurosci*, 13:1976-92, 1993.
2. FLOR H, ELBERT T, KNECHT S, WINBRUCH C et al.: Phantom-limb pain as a perceptual correlate of cortical reorganization following arm amputation. *Nature*, 375:482-484, 1995.
3. FLOR H, NIKOLAJSEN L, STAEHELIN JENSEN T: Phantom limb pain: a case of maladaptive CNS plasticity? *Nat Rev Neurosci*, 7:873-81, 2006.
4. FLOR H: Phantom-limb pain: characteristics, causes, and treatment. *Lancet Neurol*, 3:182-9, 2002.
5. JENSEN TS, NIKOLAJSEN L: Phantom pain and other phenomena after amputation. In: Wall PD, Melzack RA (eds). *Textbook of Pain*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1999.
6. LIVINGSOTON WK: Phantom limb pain. In: Livingsotn WK (ed). *Pain and Suffering*. IASP Press, Seattle, 1998.
7. MELZACK R: Phantom limbs and the concept of a neuromatrix. *TINS*, 13:88-92, 1990.
8. MELZACK R: Phantom limbs. *Sci Am*, 266:120-6, 1992.
9. MERSKEY H, BOGDUK N: *Classification of Chronic Pain, IASP Task Force on Taxonomy*. IASP Press, Seattle, 1994.
10. PELLICER F, TORRES-LOPEZ E, SOTRES-BAYON F, LOPEZ-AVILA A et al.: The affective and cognitive dimension of nociception in an animal model: The role of the anterior cingulate cortex. In: Lucas A (ed). *Frontiers in Pain Research*. Nova Science Publishers, New York, 2006.
11. PERL ER: Ideas about pain, a historical view. *Nat Rev Neurosci*, 8:71-80, 2007.
12. RAMACHANDRAN V, BLAKESLEE S: *Phantoms in the Brain*. Fourth State, London, 1999.
13. WALL PD, GUTNICK M: Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma. *Exp Neurol*, 43:580-93, 1974.
14. WOLF CJ, SHORTLAND P, COGGESHALL RE: Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*, 355: 75-78, 1992.
15. www.icbl.org



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pain

journal homepage: www.EuropeanJournalPain.com

Expression of muscarinic M1 and M2 receptors in the anterior cingulate cortex associated with neuropathic pain

J. Manuel Ortega-Legaspi^a, Martha León-Olea^b, Patricia de Gortari^c, María Isabel Amaya^c, Ulises Coffeen^a, Karina Simón-Arceo^a, Francisco Pellicer^{a,*}

^aLaboratorio de Neurofisiología Integrativa, Dirección de Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, Mexico

^bLaboratorio de Histología y Microscopía Electrónica, Dirección de Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, Mexico

^cLaboratorio de Neurofisiología Molecular, Dirección de Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 October 2009

Received in revised form 2 February 2010

Accepted 17 February 2010

Available online xxx

Keywords:

Neuropathic pain

Acetylcholine

Muscarinic receptors

Anterior cingulate cortex

Nociception

ABSTRACT

The anterior cingulate cortex (ACC) and muscarinic receptors modulate pain. This study investigates changes in the expression of muscarinic-1 and -2 receptors (M1R, M2R) in rats' ACC (cg1-rostral- and cg2-caudal) using a model of neuropathic pain by denervation, measured as autotomy score (AS) for 8 days. Changes were analysed with painful stimuli and with scopolamine into the ACC prior to this scheme. We used reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunofluorescence to determine M1R and M2R's mRNA and protein levels, respectively. Animals were divided in low, medium and high AS groups. Cg1 showed decreased mRNA levels for both M1R and M2R in the low AS group, as opposed to an increased expression in the medium and high AS groups. Both receptors correlated positively with AS in these groups. In the scopolamine-treated animals there was an increase in mRNA levels for both receptors in cg1, whereas in cg2, mRNA levels of M1R decreased in all the AS and scopolamine groups. The increased M2R mRNA in cg2 correlated with AS in the low, medium and high AS groups whereas all the scopolamine groups showed an increase. Immunoreactivity of the M2R in cg1 decreased in the medium AS group in comparison to controls but scopolamine treatment produced an increase in the medium scopolamine AS group compared to the medium AS group. The M1R in cg1 and both receptors in cg2 showed no immunoreactivity changes. These results highlight the role of the M2R in cg1 related to the degree of autotomy.

© 2010 Published by Elsevier Ltd. on behalf of European Federation of International Association for the Study of Pain Chapters.

1. Introduction

Muscarinic mediated analgesia has been documented in the spinal cord (Jones and Dunlop, 2007), by the activation of the cholinergic system with agonists (Eisenach et al., 1996). Injection of a cholinergic agonist (carbachol) into the dorsal periaqueductal grey reduces acute nociception (Guimaraes and Prado, 1994; Guimaraes et al., 2000). Cholinergic mediated analgesia can be prevented in knock-out mice for muscarinic receptors (MR), M2 and M4 (Duttaray et al., 2002). Similar results were obtained with the supraspinal deactivation of the M1R which prevents the antinociception evoked by the activation of the muscarinic cholinergic system (Galeotti et al., 2003, 2005). Furthermore, the use of a cholinergic agonist in the intralaminar parafascicular nucleus of the thalamus

diminishes a nociceptive behaviour; this response is blocked by a muscarinic antagonist (Harte et al., 2004).

The anterior cingulate cortex (ACC) plays a key role in the affective component of pain, specifically the more rostral part, *cingulum* 1 (cg1) (Devinsky et al., 1995; Paxinos and Watson, 1998; Johansen et al., 2001). The muscarinic cholinergic system projects to this structure (Gaykema et al., 1990) where the presence of muscarinic receptors has been shown (Levey et al., 1991; Tohyama, 1998). Moreover, the pharmacological blockade of muscarinic receptors in this structure impairs chronic neuropathic pain. This result obtained in a structure related to the cognitive sphere (ACC) impaired nociceptive related memory acquisition, rather than muscarinic analgesia *per se* (Ortega-Legaspi et al., 2003), as seen with agonists in other structures.

There are two families of muscarinic receptors. One is coupled to an excitatory G protein (M1R and M5R) and the other to an inhibitory one (M2R, M3R and M4R) (Lucas-Meunier et al., 2003). In this study, we analysed the changes of a representative member of each family (M1R and M2R), both which have been documented

* Corresponding author. Address: Calzada México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, CP 14370, Tlalpan, México, DF, Mexico. Tel.: +52 55 56553232.

E-mail address: pellicer@imp.edu.mx (F. Pellicer).

to be the most abundant muscarinic receptor subtypes expressed in the rat ACC (Levey et al., 1991).

The aim of this study was to investigate possible changes in the expression of M1R and M2R mRNA as well as its protein levels in the ACC under a neuropathic condition; we also evaluated if these changes could be reverted with scopolamine (a muscarinic antagonist) in the same neuropathic model.

2. Material and methods

The experiments were conducted in agreement with the ethics committee regulations of the International Association for the Study of Pain (Zimmermann, 1983) and with the project's commission approval of the Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente (INPRF). Male Wistar rats (250–350 g) were raised, housed and maintained in the INPRF's animal house. During the observation period the animals were maintained in transparent acrylic individual cages with light–dark cycles of 12 × 12 h, at 23 °C and 52% humidity, and with *ad libitum* feeding and hydration.

2.1. Experimental procedures

Microinjection: Under general anaesthesia (isoflurane 2% mixed with O₂ 98%), a 10 µl syringe (0.20 mm OD, World Precision Instruments, WPI) was stereotaxically positioned into the left ACC, leaving the tip into the ACC (A, 1 mm from Bregma; L, 0.6 mm; H, 2 mm from meninges), using a microsyringe pump (WPI, Sarasota, FL, USA). Scopolamine (10 µg diluted in 250 nl of saline solution) was microinjected at a rate of 0.5 µl/min during 30 s. This dose was chosen based on two previous reports (Farr et al., 2000; Ortega-Legaspi et al., 2003). The syringe was left in place for an additional 30 s lapse to reduce the chance of reflux before being removed. The skull skin was closed with 3–0 silk suture. These microinjection parameters have been reported not to induce tissular damage (Peterson, 1998).

Neuropathic pain model (performed immediately after microinjection): We used the neuropathic pain model induced by denervation (Wall et al., 1979). This experimental approach triggers a quantifiable behaviour known as autotomy behaviour that is related to the degree of neuropathic pain-like behaviour (Coderre et al., 1986). In order to enhance autotomy and shorten its onset, thermonociception was applied prior to denervation (Coderre and Melzack, 1986). Briefly, a nociceptive process was induced by immersing the rat's right hind paw in hot water at 55 °C for 20 s, 30 min prior to denervation. The right sciatic nerve was exposed by microdissection. The nerve was cut and ligated with silk 3–0 suture. Five millimetres of the distal end were removed in order to avoid reinnervation. Skin was closed with silk 3–0 suture. The animals were anaesthetised with 2% isoflurane all throughout these procedures. The wounds were checked every day for possible signs of infection and the rat's behaviour was compared with that of the controls for the remainder of the experiments with no noticeable differences.

Autotomy behaviour measurement: Daily autotomy scores (AS) were computed using a modified scale devised by Wall et al. (1979). This scale gives the following scores: 1 point for the removal of one or more nails; 1 additional point for each distal half digit attacked and a further point for each proximal half digit attacked. If the distal or proximal half of the paw was attacked an additional point of 1 is added for each one. AS was recorded for eight days which has proven to be the average day in which AS reaches its media in control rats from previous studies, (Ortega-Legaspi et al., 2003; Lopez-Avila et al., 2004; Coffeen et al., 2008). Then, these groups were divided in low, medium and high AS groups. This categorisation was done considering the lowest (AS from 0 to 1) and the highest (AS from 11 to 13) autotomy scores.

Those animals whose AS's fell in the middle were categorised as medium AS. We separated the animals according to AS in order to evaluate the changes related to those animals according to the lesser and greatest pain as well as those with medium AS values. This model has proven to be an useful tool to study central mechanisms of neuropathic pain (Coderre et al., 1986) and was used in our previous study (Ortega-Legaspi et al., 2003), the results of which led us to further investigate the dynamics of muscarinic receptors expression. Moreover, the behaviour associated with autotomy has been studied to a genetic level in which high and low pain phenotype strains have been produced (Mogil et al., 1999; Devor et al., 2005). In this work, we used a random selection of animals and categorised them according to their autotomy score. Since autotomy is related to the intensity of neuropathic pain-like behaviour, we wanted to know if M1R and M2R mRNA expression in the ACC is correlated with AS and also if the number of receptors in those animals with an autotomy score that fall in the media change under the conditions studied.

2.2. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) procedure

Tissue extraction: On day eight, all animals were sacrificed by decapitation and the brain was extracted and frozen in dry ice (–70 °C). In order to extract the left ACC (contralateral to denervated hind paw), a parasagittal brain slice was obtained by cutting the frozen brain longitudinally at 1 mm to the left from the midline. Then, two punches with a 1 mm diameter sample corer were done in cg1 and in cg2 (Figure S1) (Paxinos and Watson, 1998).

mRNA semi-quantification, by RT-PCR procedure: Frozen cg1 and cg2 samples were homogenized in 4 M guanidine thiocyanate (ICN, Aurora, Ohio, USA) and total RNA extracted as has previously been described (Chomczynski and Sacchi, 1987). RNA quality of samples was verified by (A) the ratio of OD absorbencies at 260/280 nm and 260/230 nm; a value >1.8 was considered appropriate and (B) electrophoresis, quantifying 28S/18S ratio of the density of both bands; the sample was discarded if the value was lower than 1.8 or, when there was evidence of degradation as determined by increased staining at the end of the gel. mRNA levels of M1R and M2R from cg1 and cg2 were semi-quantified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G₃PDH) as control transcript for both receptors and also actin for M2R. The protocol used was essentially that described by Jaimes-Hoy et al., 2008. Briefly: 1.5 µg of RNA was used to obtain cDNA (M-MLV reverse transcriptase, Carlsbad, CA, USA) and oligo-dT (Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. Biotechnology Institute's facilities), followed by the RT-PCR reaction. The number of cycles for each probe was optimized for each region to assure linear conditions (Figure S2), using 1 µl and 25 pmol of M1R and M2R probes (M1R sense sequence: GCT GGA AAT TCC CTC CTT TC; antisense: GCT TTG GGA CTT GGT GTG TT. M2R sense sequence: TGC CTC CGT TAT GAA TCT CC; antisense: TCC ACA GTC CTC ACC CCT AC); 1 µl and 50 pmol G₃PDH (sense sequence: TGA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG GC; antisense: CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC); 1 µl and 25 pmol actin (sense sequence: GAC GAT GCT CCC CGG GCT GTA TTC; antisense: TCT CTT GCT CTG GGC CTC GTC ACC) and 0.5 µl Taq DNA polymerase (5U/µl) (Biotecnologías Universitarias, UNAM, DF, México). Oligonucleotides were synthesized at the Instituto de Biotecnología, UNAM, with the Genbank number NM 080773 for the M1R and NM 031016 for the M2R. The sequence targeted by the primers was 2019–2213 for the M1R and 775 to 966 for the M2R with a length of 195 and 192 base pairs respectively. Final conditions for cg1 and cg2 were: 28 cycles for M1R, 32 for M2R, 21 for G₃PDH and 22 for actin. For all oligonucleotides, each cycle consisted of 94 °C for 1 min followed by: 1 min at 64 °C followed by

1 min 15 s at 72 °C. All cDNAs had a final extension of 10 min at 72 °C. Several cDNAs were semi-quantified from the same RT reaction.

RT-PCR products (8 µl of each M1R and M2R cDNA, and 4 µl of G₃PDH and actin) were separated by 2% of agarose (Ultra-pure Bio-Rad, Hercules CA, USA) gel electrophoresis, stained with ethidium bromide (1 mg/L) and the density measured with the Advanced American Biotech Imaging software (American-Applied Biotechnology, Fullerton, CA, USA). The relative amount of the studied cDNAs was calculated as the ratio of cDNA M1R over G₃PDH densities and M2R over G₃PDH and actin. Care was taken to include samples of controls and experimental groups in the same gel.

2.3. Immunofluorescence procedure

On day eight post surgery, the rats were deeply anaesthetised with sodium pentobarbital (63 mg/kg) and perfused intracardially with 200 ml of 0.9% saline followed by 350 ml of 4% paraformaldehyde in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4, PBS). Brains were removed and postfixed for 2 h at 4 °C, after which they were blocked and cryoprotected in 30% sucrose. Left (contralateral to denervated hind paw) parasagittal slices (30 µm, 0.3 mm to 1 mm from midline) were cut on a freezing microtome (Leitz, Grand Rapids, MI) and collected in PBS. Free-floating sections were processed for immunofluorescence.

Incubation with primary antibodies: The sections (18 for each rat) were processed in an alternate manner for either M1R or M2R immunofluorescence. The primary antibodies used were: mAChR M1 (C-20 sc-7470; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), which is an affinity purified goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping at the C-terminus of mAChR M1 of human origin and mAChR M2 (C-18 sc-7472; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) an affinity purified goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping at the C-terminus of mAChR M2 of human origin. Both antibodies have 100% identity with the rat receptors (M1R antibody matches 20/20 amino acids and the M2R antibody matches 18/18 amino acids, information provided by the manufacturer).

The sections were placed in a blocking solution of PBS containing 1% normal donkey serum, 5% bovine serum albumin (BSA), 3% teleostean gelatin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and 0.3% Triton X-100 for 1 h to minimize nonspecific staining. Sections were then incubated for 72 h at 4 °C in primary antibody, either polyclonal goat anti M1R (1:20), or polyclonal goat anti M2R (1:50) in blocking solution. Sections were washed three times (10 min each) in PBS with 0.3% Triton X-100 (wash buffer) before incubation with the secondary antibody. The immunostaining conditions were optimized in a pilot study in which the optimal dilutions were in the 1:20–1:200 range.

Secondary antibody incubation and visualization: All tissue sections where M1R was being evaluated were incubated with a donkey antigoat IgG conjugated to tetramethylrhodamine (TRITC) at a 1:50 dilution in blocking solution for 2 h at 37 °C. For M2R a similar antibody but fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated at a 1:100 dilution (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA No. 711-065-152 and No. 705-095-147, respectively), was used. After incubation with the secondary antibody, sections were washed two times in wash buffer followed by a final wash in PBS. Immediately afterwards, the sections were mounted with Prolong antifade mounting medium (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

Sections were observed on a fluorescence microscope (Olympus BX51) with the proper filter for either TRITC or FITC as required. Then cg1 and cg2 were identified using the images contained in an atlas (Paxinos and Watson, 1998) as reference and photographed at 40× magnification with a Spot-II digital camera (Diag-

nostic Instruments, Sterling Heights, MI). Each section had four 40× fields photomicrographed, two for cg1 and two for cg2. We analysed three sections per rat taking care that they had the same laterality (Figure S1). Ultimately, 12 photomicrographs were analysed per rat.

Immunofluorescence controls (six sections for each rat) consisted of brain samples without the primary antibody. Sections used for these methodological controls were processed simultaneously with the experimental sections for each experiment. These images were used to correct background (see the image analysis section and Fig. 1A and B).

Neuronal and M2R double immunostaining in cg1: In order to verify if M2R was present in the neuronal membrane, a double immunostaining was performed in cg1 sections obtained from rats with medium AS (with and without the microinjection of scopolamine in the ACC). M2R (*vide supra*) and neuronal nuclei (Anti neuronal nuclei, NeuN, IgG mouse monoclonal antibody, Millipore) were used as primary antibodies. As secondary antibodies, FITC coupled IgG (*vide supra*) and Alexa Fluor 555 coupled donkey antimouse IgG (Invitrogen) were used. In another approach for the same purpose, the M2R was labelled as previously described and the cellular nuclei were stained using the SelectFX[®] Nuclear Labelling Kit TO-PRO[®]-3 iodide (Invitrogen).

Sections were observed on a fluorescence microscope (Olympus BX51) with the proper filter for either FITC, Alexa Fluor 555 or TO-PRO as required and photographed (Spot-II digital camera, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) at a 100× magnification. Images were merged and background was corrected for brightness and contrast.

Histological image analysis: The immunoreactive area was determined by analysis of the digital photomicrographs. Using Image ProPlus 4.5 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), background was corrected (using immunofluorescence control images, Fig. 1A and B) and flattened. Then, the image was converted to grey scale. Grey-scale ranges from 0 to 255 were used for determining the immunoreactive area (IRA). A threshold was selected to include the area of at least two standard deviations above mean background. The area that was quantified above this threshold was divided by the total area (100%), as previously described (Gillard et al., 2006). An example of the IRA above the threshold is shown in Fig. 1C and D.

Experimental groups:

- **Control (n = 7):** Animals that were maintained in individual cages for 8 days with no surgical interventions. Four of the animals were used for the RT-PCR experiments and three for the immunofluorescence ones.
- **Neuropathic group (n = 15):** All the animals had thermonociception applied to the right hind paw and 30 min later a right sciatic denervation was carried out. AS was recorded for 8 days and after that period, the animals were divided in three different AS groups: low, medium, and high. To perform RT-PCR experiments, four animals per group were used (de Gortari et al., 2009); no immunofluorescence experiments were performed with the low and high AS animal groups. Immunofluorescence experiments were only performed with three animals from the medium AS group, since this group represents the media of all AS's and therefore, the majority of the individuals.
- **Scopolamine (scopol) group (n = 15):** The animals were microinjected into the ACC with scopolamine, immediately afterwards thermonociception was applied to the right hind paw and 30 min later a right sciatic denervation was carried out. AS was recorded for 8 days and after that period, the animals were divided in three different scopol AS groups: low, medium, and high. Similarly to the neuropathic group, RT-PCR experiments

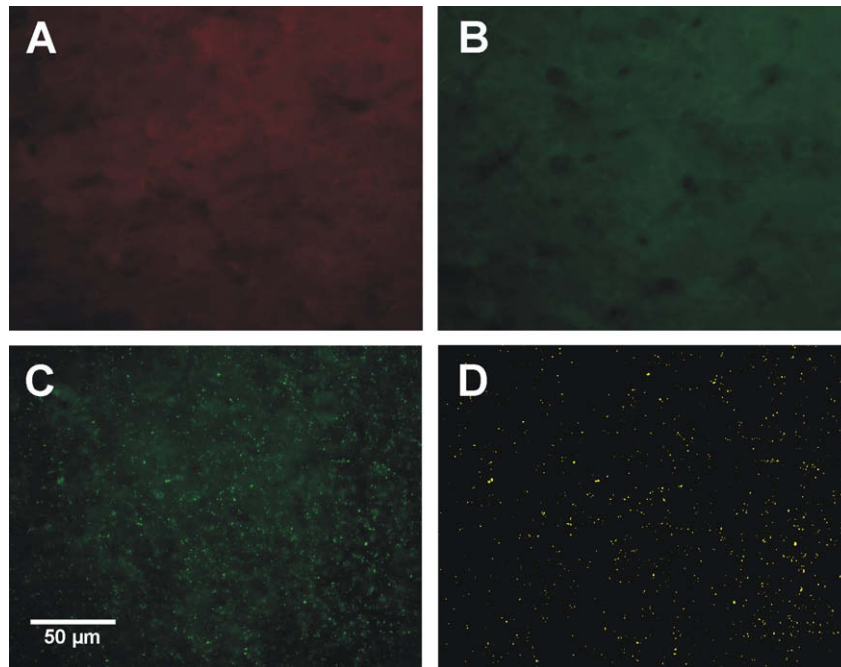


Fig. 1. Photomicrographs of immunofluorescence controls taken from parasagittal slices (30 µm) of the ACC at 40× magnification. In order to obtain these controls the primary antibody was omitted and only the secondary antibody coupled to either TRITC (A) or FITC (B) was applied. Sections used for these methodological controls were processed simultaneously with the experimental sections for each experiment. These images were used in order to correct background for image analysis. (C) Photomicrograph taken from the control group that shows positive immunoreactivity for the M2R. (D) The same photomicrograph as in (C) but processed for IRA quantification, notice that the background is completely black therefore IRA quantitation (yellow spots) is valid and demonstrates at least two standard deviations above the background. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

were performed with four animals per group; no immunofluorescence experiments were performed with the scopol low and high AS animal groups. Immunofluorescence experiments were only performed with three animals from the scopol medium AS group.

2.4. Statistical analysis

The statistical analysis was performed with the SPSS 15.0 software. Data is presented as the mean and standard errors of the mean.

The RT-PCR data was analysed by a one way analysis of variance (ANOVA) test followed by a *post hoc* Bonferroni comparison. Also, a Pearson correlation was performed between AS and mRNA levels. Significance was considered when $p < 0.05$.

The immunofluorescence data was analysed by a student's *t* test considering significance with a p value < 0.05 .

3. Results

3.1. M1R and M2R mRNA changes

The results showed a difference in mRNA levels for M1 and M2 receptors in cg1 that correlates with the autotomy score when compared to controls. The low AS group decreased its percentage of mRNA for both receptors, while the medium and high AS groups showed a gradual increase when compared to the controls. All scopolamine-treated animals showed an increase in mRNA levels for both receptors in cg1, independently of their AS. The percentage of change for MR's mRNA levels in cg1 was as follows: M1R's showed a 17% decrease (from 100% to $82.7 \pm 1\%$) in the low AS group and a 12% and 53% increase (100% to $112.4 \pm 1.1\%$ and $153.6 \pm 1.9\%$) in the medium and high AS group, respectively ver-

sus controls. Interestingly, the three scopol AS groups showed a $47.2 \pm 1.4\%$, $87.2 \pm 0.9\%$ and $23.1 \pm 1.9\%$ increase in scopol low, medium and high AS, respectively ($F = 680.6$, $p = 000$; Fig. 2A) compared to controls (100%). A positive correlation between M1R mRNA levels and AS in low, medium and high AS groups was found in cg1 ($r = 0.965$, $p = 000$). No correlation was found between M1R mRNA levels and scopol low, scopol medium and scopol high groups ($r = -0.341$, $p = 0.278$) in cg1.

M2R mRNA levels in cg1 showed a 30% decrease (100% to $70.2 \pm 0.5\%$) in the low AS group and a 66% and 136% increase in medium and high AS groups (100% to $166.1 \pm 1.5\%$ and $236.2 \pm 4.5\%$, respectively) compared to controls (100%). The scopolamine groups showed a 147%, 154% and 138% increase in scopol low, scopol medium and scopol high AS groups respectively (100% to $247 \pm 2.2\%$, $254.3 \pm 2.1\%$ and $238.5 \pm 3.3\%$, respectively; $F = 925.3$, $p = 000$; Fig. 2B) versus controls (100%). As with the M1R, a positive correlation between M2R mRNA levels and AS in groups low, medium and high in the cg1 region, was found ($r = 0.923$, $p = 000$). No correlation was found between M2R mRNA levels and AS in groups scopol low, scopol medium and scopol high ($r = -0.406$, $p = 0.190$) in cg1.

M1R mRNA levels in cg2 showed a decrease in all groups compared to controls. This decrease was gradual and inverse to autotomy score: 14%, 19% and 15% in low, medium and high AS (100% to $85.9 \pm 0.6\%$, $80.8 \pm 0.7\%$ and $75.4 \pm 0.2\%$, respectively) compared to controls (100%). The scopolamine-treated groups showed a similar pattern with a 18%, 26% and 29% decrease in scopol low, scopol medium and scopol high AS groups (100% to $81.7 \pm 0.7\%$, $74.3 \pm 0.6\%$ and $71.5 \pm 0.6\%$, respectively; $F = 211.1$, $p = 000$; Fig. 2C). There was a negative correlation between M1R mRNA levels and AS in groups low, medium and high ($r = -0.913$, $p = 000$) and also between M1R mRNA levels and groups scopol low, scopol medium and scopol high ($r = -0.964$, $p = 000$) in cg2. mRNA levels of the M2R in cg2 showed a gradual increase that correlated with

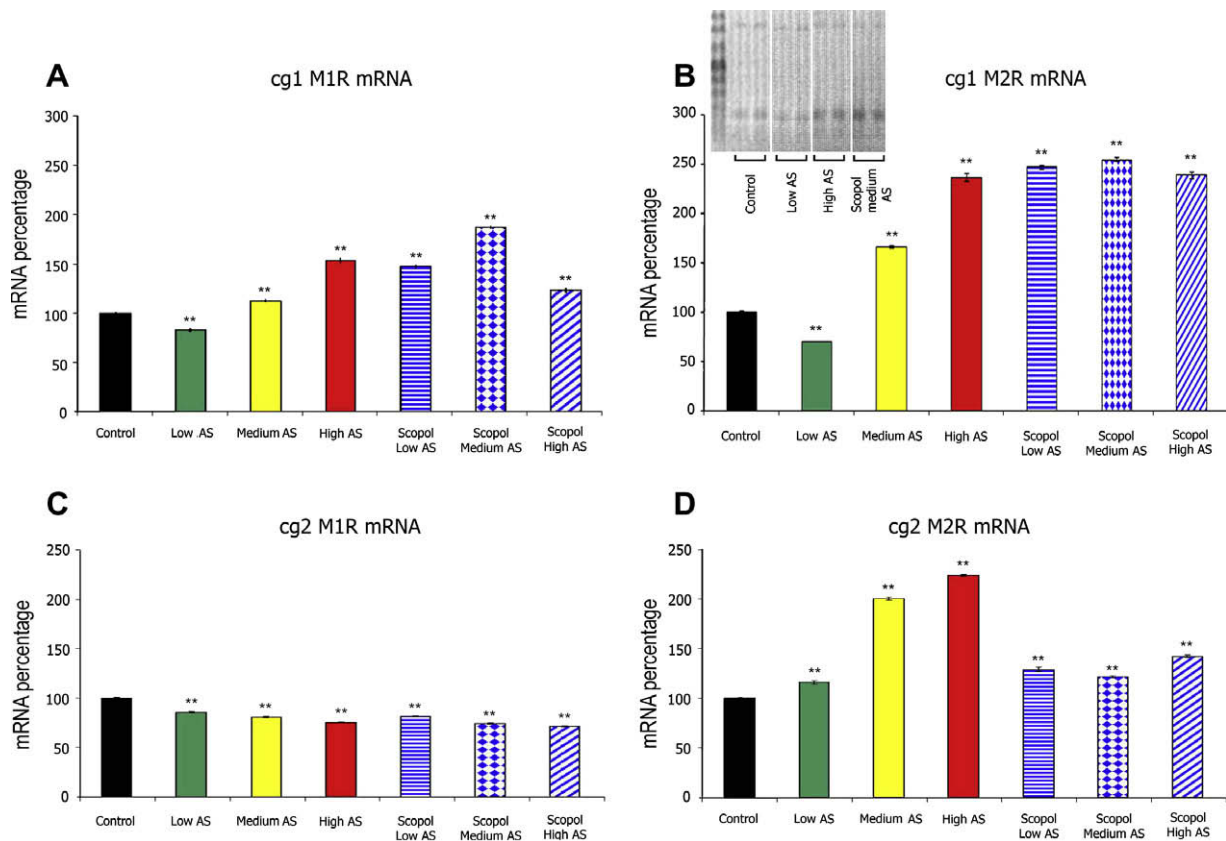


Fig. 2. The graphs depict the percentage of mRNA levels of M1R and M2R vs. controls (100%), obtained by RT-PCR in cg1 and cg2 ACC regions. (A) In cg1, M1R shows a decrease in the low AS group and an increase that correlates positively with AS ($r = 0.965$, $p = 0.000$) in groups medium and high AS, when compared to the control. The groups scopol low AS, medium and high do not show a correlation between their mRNA percentage and AS but all increased their AS compared to the controls ($**F = 680.6$, $p = 0.000$). (B) In cg1, mRNA levels for M2R's show the same pattern as in (A) but with a higher magnitude in the differences ($**F = 925.3$, $p = 0.000$). A similar positive correlation was found ($r = 0.923$, $p = 0.000$). (C) mRNA levels for M1R in cg2 shows a decrease in all groups compared to the control ($**F = 211.1$, $p = 0.000$). There is a negative correlation between AS and groups low AS, medium and high ($r = -0.913$, $p = 0.000$) as well as between AS and the scopol AS groups ($r = -0.964$, $p = 0.000$). (D) In cg2, the M2R shows an increase in all groups compared to the control ($**F = 1057.1$, $p = 0.000$). The groups low AS, medium and high show a positive correlation with AS ($r = 0.520$, $p = 0.083$). All the differences between groups were established with a Bonferroni test as a *post hoc* with significance at $p < 0.05$ ($n = 4$ for each group). At the top left of frame (B), there is an example of the electrophoresis agarose gel showing the band of a control oligonucleotide cDNA (upper band) and the cDNA of the M2R (lower band).

AS: $116.6 \pm 1.8\%$ in low AS, $200.6 \pm 1.4\%$ in medium AS and $224 \pm 0.9\%$ in high AS. All scopolamine groups increased mRNA levels when compared to the control group with $129 \pm 2.2\%$ in scopol low AS, $121.5 \pm 1.1\%$ in scopol medium AS and $142.4 \pm 1.1\%$ in scopol high AS ($F = 1057.1$, $p = 0.000$; Fig. 2D). A positive correlation between M2R mRNA levels and AS in groups low, medium and high was found ($r = 0.828$, $p = 0.001$) in cg2. No correlation was found in cg2 between M2R mRNA levels and AS in groups scopol low, scopol medium and scopol high ($r = 0.520$, $p = 0.083$).

3.2. Immunoreactive area changes for the M1R and M2R

Significant changes in immunoreactivity (IR) were found in cg1 for the M2R. M2R IR decreased in the medium AS group compared to the control (Figs. 3A and 4A and B) and increased in the scopol medium AS group compared to the medium AS group (Figs. 3B and 4C and D).

In cg1, there was a decrease to $0.55 \pm 0.14\%$ in M2R's IRA in group medium AS when compared to the $1.95 \pm 0.52\%$ of the control group ($t = 2.58$, $p = 0.03$; Figs. 3A and 4A and B). Also, there was an increase to $2.35 \pm 0.63\%$ in scopol medium AS group when compared to the $0.92 \pm 0.27\%$ of the medium AS group ($t = -2.07$, $p = 0.05$; Figs. 3B and 4C and D). In regard to the M1R in the cg1 region, the control group and the medium AS group showed no difference ($0.22 \pm 0.03\%$ vs. $0.17 \pm 0.03\%$ of IRA, respectively; $t = 1.12$, $p = 0.27$; Figs. 3C and 5A and B). Similarly, the medium AS group

showed no difference when compared to the scopol medium AS group ($0.28 \pm 0.12\%$ vs. $0.12 \pm 0.03\%$ of IRA, respectively; $t = 1.25$, $p = 0.23$; Figs. 3D and 5C and D).

Furthermore, region cg2 showed no differences between groups in either receptor immunoreactivity. IRA for the M2R in cg2 showed a $0.96 \pm 0.16\%$ value for the control and $0.89 \pm 0.22\%$ for the medium AS group ($t = 0.26$, $p = 0.8$; Fig. 6A). There was also no difference between medium AS and scopol medium AS groups ($1.4 \pm 0.52\%$ vs. $1.89 \pm 0.39\%$ of IRA, respectively; $t = -0.75$, $p = 0.46$; Fig. 6B). The control group for the M1R showed a $0.34 \pm 0.09\%$ IRA value as compared to $0.18 \pm 0.04\%$ in the medium AS group ($t = 1.59$, $p = 0.12$; Fig. 6C). In regard to M1R in cg2, the IRA value for the medium AS group ($0.2 \pm 0.05\%$) had no difference when compared to the scopol medium AS group ($0.15 \pm 0.04\%$; $t = 0.79$, $p = 0.44$; Fig. 6D).

The double immunostaining for the M2R and neuronal nuclei showed the existence of M2R's in the neuronal membrane and neuropile. This result is also an example of an increased IRA found on the scopol medium AS group in contrast with the medium AS group (Fig. 7). When the cellular nuclei were stained, the above mentioned result was corroborated (image not shown).

4. Discussion

The molecular dynamics of muscarinic receptors related to neuropathic pain, particularly in supraspinal structures and pathways,

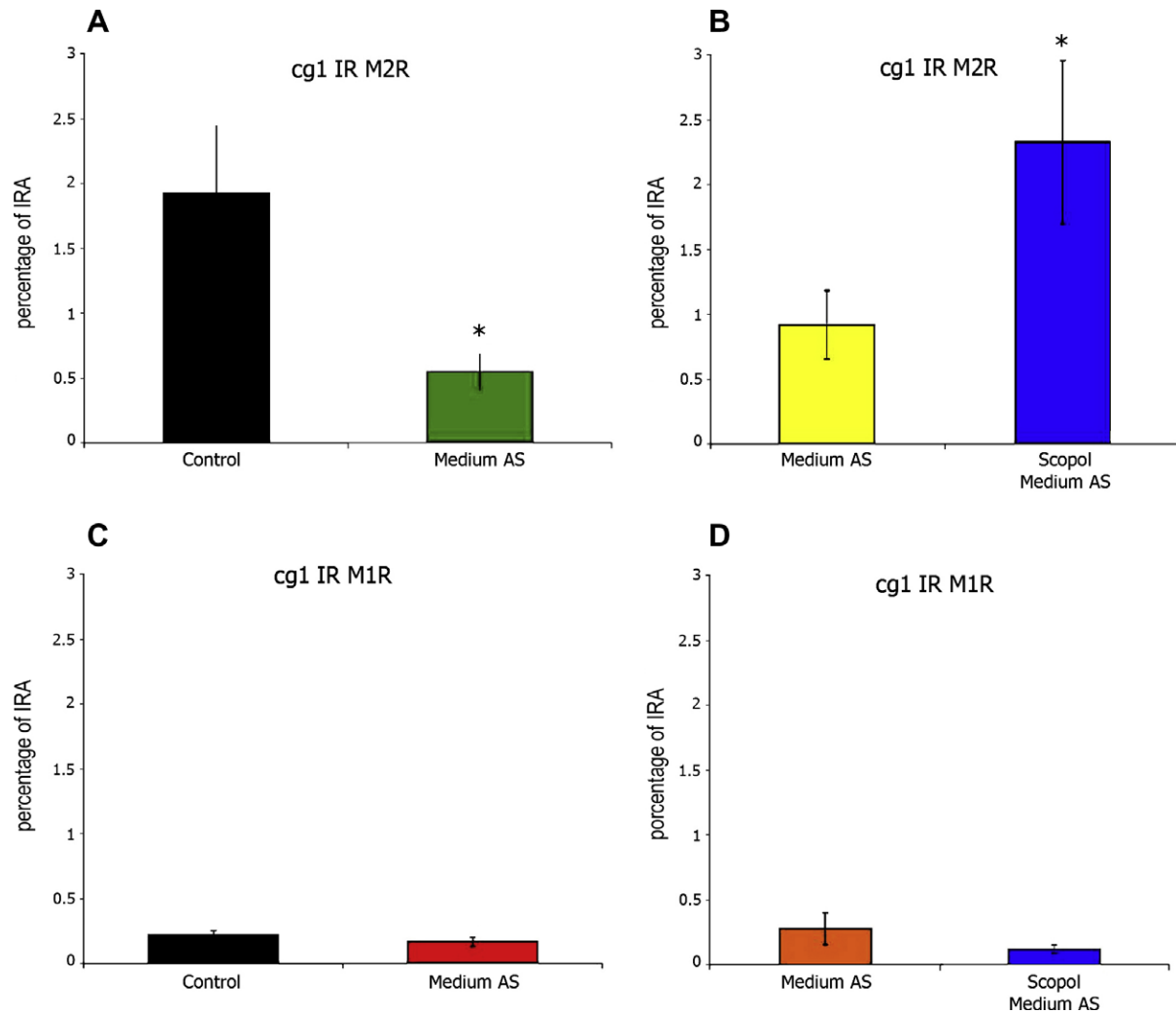


Fig. 3. The graphs show the immunoreactivity (IR) of M1 and M2 receptors (expressed as percentage of IRA) in cg1. (A) The M2R shows a decrease in IR in group medium AS compared to the control ($t = 2.58$, $p = 0.03$). (B) Scopol medium AS group increases its IRA percentage compared to the medium AS group ($t = -2.07$, $p = 0.05$). (C) M1R shows no differences between control and medium AS groups ($t = 1.12$, $p = 0.27$). (D) Medium AS and scopol medium AS groups show no differences ($t = 1.25$, $p = 0.23$).

is poorly understood. This study shows, in whole animals, the changes in the number of receptor protein and mRNA levels of muscarinic M1 and M2 receptors in the anterior cingulate cortex associated with a nociceptive behaviour induced by denervation.

The efficacy of animal models used to study pain in order to translate their results to human randomised clinical trials has been questioned since there is a potential of bias in the experimental approaches (Rice et al., 2008). Another feature of concern about animal models is that patients with neuropathic pain have a predominant symptom which is not evoked pain but spontaneous pain. In this work, we have explored a behaviour that is expressed over time and not evoked by a stimulus such as the simple withdrawal of a limb to sensory stimuli. This model is fairly correlated with clinical reports in patients showing that a painful focus previous to amputation elicits a high incidence of phantom limb pain (Katz and Melzack, 1990).

The mRNA levels for M2R in cg1 and cg2 showed an increase that positively correlated with the degree of autotomy behaviour (in the groups without scopolamine), which is an indicative of the severity of neuropathic pain-like behaviour. Therefore, the changes in mRNA levels for the M2R that we observed could be a consequence of chronic neuropathic input. The M2 receptor belongs to a family of seven trans-membrane domains coupled to

an inhibitory G protein (Lucas-Meunier et al., 2003). The increase of the mRNA of an inhibitory receptor (M2R) allows us to infer that there is a counter regulatory mechanism within the ACC. This assumption is supported by the fact that scopolamine increased both the receptor and the protein and that this compound, scopolamine has also proven effective in reducing AS after 25 days (Ortega-Legaspi et al., 2003).

M2R decreased its expression in cg1, as determined with immunofluorescence, in the medium AS group. The tonic activation of the cholinergic system, as well as the stimulation of muscarinic receptors with agonists, both produce a down regulation of these receptors (van Koppen and Kaiser, 2003). This would imply that chronic neuropathic pain triggers a tonic activation of the cholinergic system that projects to the ACC and therefore reduces the expression of the receptors. This effect was only found in cg1 and not in cg2, that fits well with previous evidence in which the rostral ACC is responsible for the integration of the affective component of pain and memory processes related to nociceptive stimulation (Farr et al., 2000; Johansen et al., 2001). Interestingly enough, the role played by the changes of M2R in neuropathic pain is highlighted by the strong anatomical evidence given by the double immunostaining of the M2R and neuronal nuclei. This shows that the M2R is present in neuronal membranes and neuropile lo-

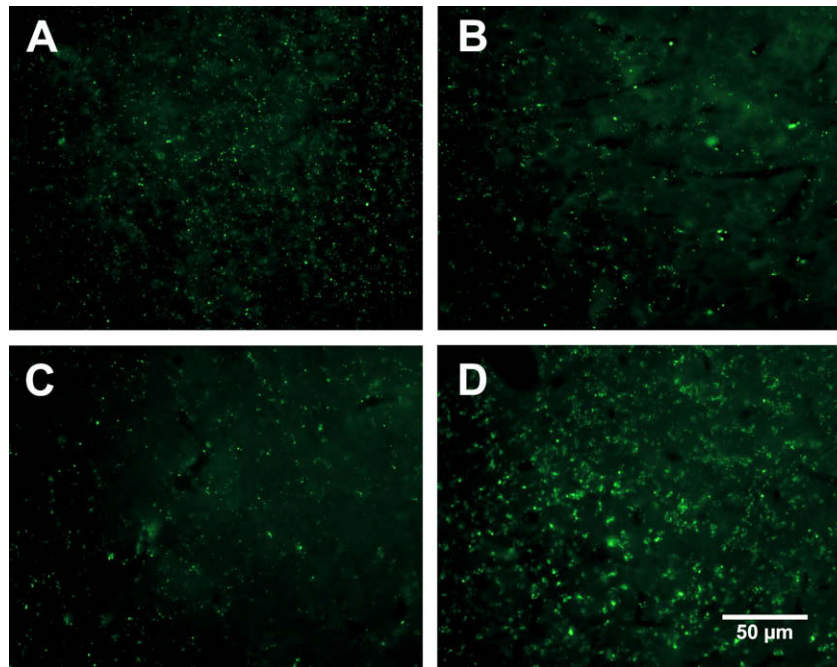


Fig. 4. Photomicrographs of parasagittal slices (30 μm) taken in the ACC's cg1 region processed for immunofluorescence with primary antibodies against the M2R and secondary antibodies coupled to fluorescein isothiocyanate. (A) and (B) show photomicrographs from control and medium AS groups, respectively; notice the diminished immunoreactivity in the medium AS group (with neuropathic pain) compared to the control. (C) and (D) show photomicrographs from medium AS and scopol medium AS groups; notice the increased immunoreactivity in the group treated with scopolamine compared to a group with neuropathic pain.

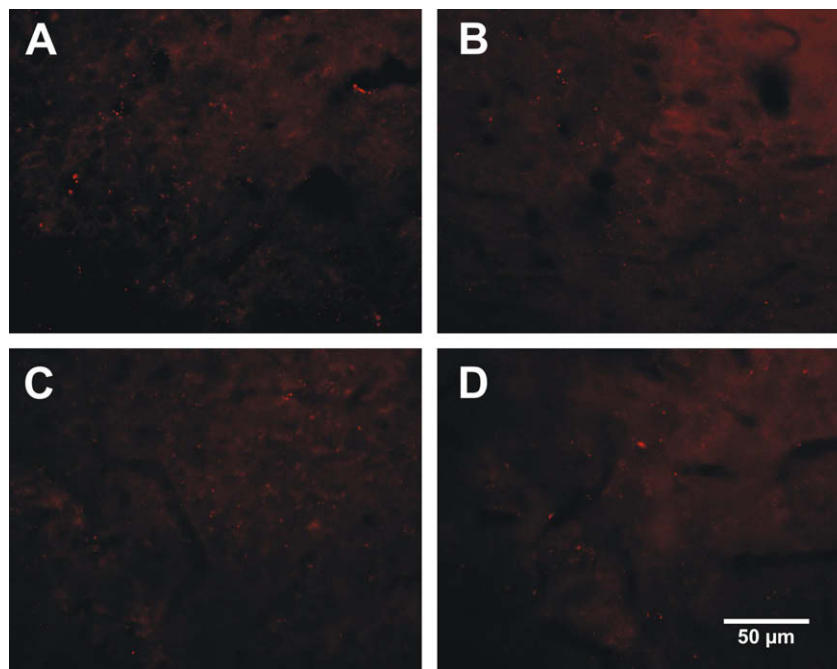


Fig. 5. Photomicrographs of parasagittal slices (30 μm) taken in the ACC's cg1 region processed for immunofluorescence with primary antibodies against the M1R and secondary antibodies coupled to tetramethylrhodamine. (A) and (B) show photomicrographs from control and medium AS groups; notice that the immunoreactivity is similar in both images. (C) and (D) show photomicrographs from medium AS and scopol medium AS groups which show similar immunoreactivity.

cated in cg1. This result also shows an increased IRA of the inhibitory receptor (M2R) in animals treated beforehand with scopolamine (Fig. 7).

The mRNA levels for the M1R in cg1 show discrete changes that positively correlate with autotomy (in the groups without scopolamine). M1R mRNA levels in cg2 decreased in all groups, which showed a correlation between autotomy and AS groups

as well as with scopol AS groups. Although there was a correlation, it is a negative one and the changes in the percentage of mRNA for the M1R in cg2 were discrete. Considering that there were no changes in this receptor in either situation or region of the ACC when measuring the immunoreactivity, it is not likely that M1R plays a role in the integration of chronic pain in the ACC.

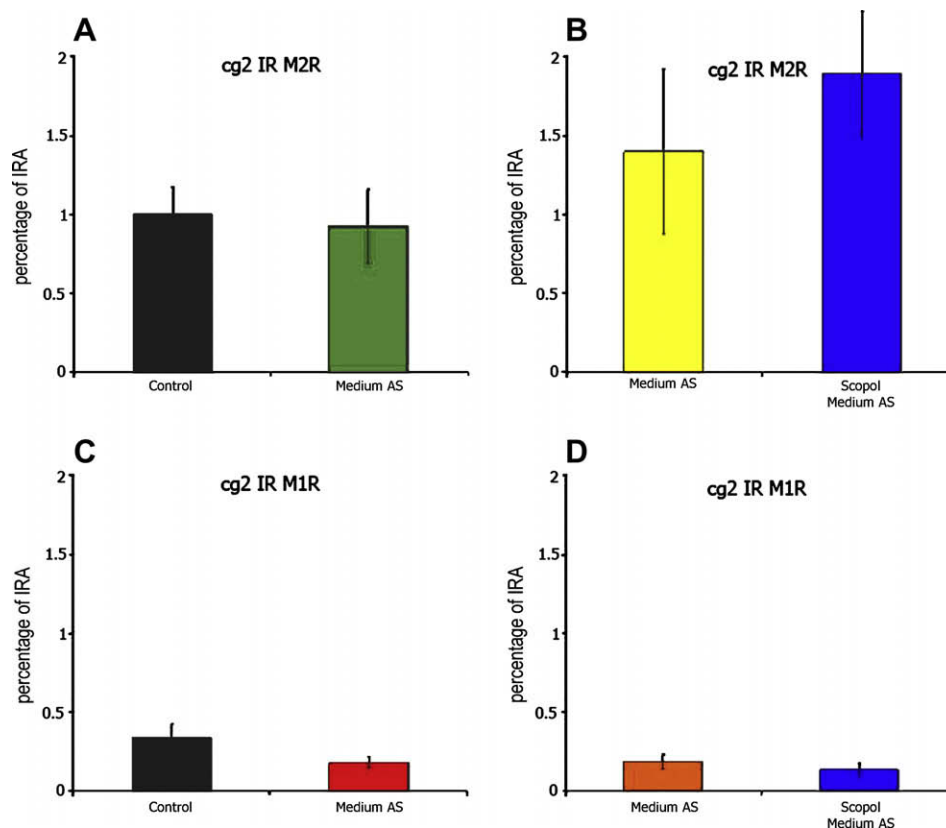


Fig. 6. The graphs show the immunoreactivity, expressed as percentage of IRA, to M2 (A) and (B) and M1 (C) and (D) receptors in cg2; no differences between groups in either receptor were observed.

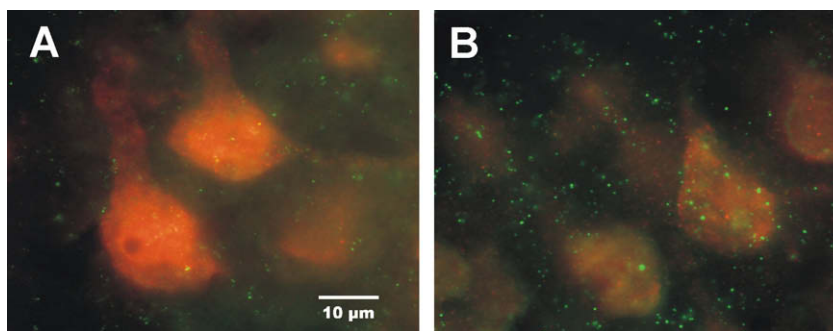


Fig. 7. (A) Photomicrograph of a parasagittal slice (30 μm) taken in the ACC's cg1 region from medium AS group stained for M2R (FITC) and neuronal nuclei (Alexa Fluor 555). The green dots correspond to the M2R. Yellow dots are the result of the combination of both fluorophores. (B) Photomicrograph of a parasagittal slice (30 μm) taken in the ACC's cg1 region from group scopol medium AS, with the same process as (A). Notice that there is an enhanced immunoreactivity to M2R in scopolamine-treated animals. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

In a previous report, we documented that the microinjection of scopolamine into the ACC prior to nociceptive input impairs the acquisition of nociceptive related memory seen as decreased autotomy behaviour (Ortega-Legaspi et al., 2003). Both, in the former as well as in this report, the single administration of scopolamine modified autotomy behaviour for extensive periods of time. This cannot be attributed to a long lasting pharmacologic effect since it goes far beyond scopolamine half-life (plasma half-life 20 min) (Lyeth et al., 1992). The fact that a single dose of scopolamine was capable of modifying the autotomy behaviour can be explained by its inhibition which probably restrains the triggering mechanism.

The up regulation of the M2R seen in cg1 in scopolamine-treated animals implies an increase of M2-mediated inhibition that in

the long term is represented by diminished autotomy behaviour. Scopolamine induces up regulation of muscarinic receptors in the hippocampus and striatum (Russell et al., 1986); our results confirm this observation. M2R's mRNA in scopolamine-treated animals was greater in cg1 than in cg2. Also, the immunoreactivity for M2R increased only in cg1. The intracellular processes that control muscarinic receptor expression vary between the M1R and M2R (van Koppen and Kaiser, 2003). This would explain the greater increase in M2R mRNA than the observed for M1R.

Clinical evidence provided in the 1960s by neurosurgical studies points out the ACC as a key *locus*; its lesion provokes a cognitive-affective dissociation of pain (Foltz and White, 1962). Also, the lesion of the mediodorsal thalamic nucleus, which projects directly to the ACC, impairs memory in humans and monkeys (Gaffan

and Parker, 2000; Gaffan, 2002) whereas the electrical stimulation of the same thalamic nucleus enhances pain-like behaviour in an inflammatory pain model in the rat (Torres-López et al., 2000). Moreover, the lesion of the insular cortex, which is another important limbic structure related to pain perception, produces a syndrome known as asymbolia of pain (Berthier et al., 1988) and has also been related to pain memory related processes in a sensory limbic model (Lenz et al., 1997). All these structures are part of the limbic system and are closely related to memory and pain systems. The lesion and malfunction of these structures highlights the association between memory and pain. This relationship is reinforced by observations made in patients who have had seizures and produce sudden amnesia that result in pain relief (Choi et al., 2007; Klein et al., 2007).

5. Conclusions

The findings in this study show a correlation between the expression of muscarinic receptors in the ACC and autotomy following nerve lesion. The mechanisms of M2 receptor cellular expression in this condition are somehow inhibited as determined by the decrease of M2R as a protein and an increase of its mRNA. This allows us to infer that an inhibitory receptor is ready to being produced in relation to the degree of neuropathic pain-like behaviour when the receptor is less expressed in the membrane due to neuropathic nociceptive input. This study also pin points the selectivity of the rostral portion of the ACC for neuropathic nociceptive modulation. Furthermore, scopolamine, which has shown to reduce nociceptive related memory acquisition, produced a sustained increase in both mRNA and immunoreactivity of the M2 receptor. This implies that scopolamine triggers a mechanism that increases the possible expression of a receptor coupled to an inhibitory second messenger system, which would explain the reduction of neuropathic pain.

Acknowledgements

JMOL is a current PhD student at Doctorado en Ciencia Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México and was supported by a CONACyT scholarship 212563. We thank for excellent technical assistance Arturo Castillo-Tovar and Orlando Jaimes, and Raúl Cardoso and José Luis Calderón for image editing. This project was partially supported by CONACyT Grants 62433 for FP and 61410 for PdG; and INPRF Grant 3230.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ejpain.2010.02.007.

References

- Berthier M, Starkstein S, Leiguarda R. Asymbolia for pain: a sensory-limbic disconnection syndrome. *Ann Neurol* 1988;24:41–9.
- Coderre TJ, Grimes RW, Melzack R. Deafferentation and chronic pain in animals: an evaluation of evidence suggesting autotomy is related to pain. *Pain* 1986;26:61–84.
- Coderre TJ, Melzack R. Procedures which increase acute pain sensitivity also increase autotomy. *Exp Neurol* 1986;92:713–22.
- Coffeen U, Lopez-Avila A, Ortega-Legaspi JM, del Angel R, Lopez-Munoz FJ, Pellicer F. Dopamine receptors in the anterior insular cortex modulate long-term nociception in the rat. *Eur J Pain* 2008;12:535–43.
- Choi DS, Choi DY, Whittington RA, Nedeljkovic SS. Sudden amnesia resulting in pain relief: the relationship between memory and pain. *Pain* 2007;132:206–10.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–9.
- de Gortari P, Mancera K, Cote-Velez A, Amaya MI, Martinez A, Jaimes-Hoy L, et al. Involvement of CRH-R2 receptor in eating behavior and in the response

- of the HPT axis in rats subjected to dehydration-induced anorexia. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34:259–72.
- Devinsky O, Morrell MJ, Vogt BA. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain* 1995;118:279–306.
- Devor M, del Canho S, Raber P. Heritability of symptoms in the neuroma model of neuropathic pain: replication and complementation analysis. *Pain* 2005;116:294–301.
- Duttaroy A, Gomeza J, Gan JW, Siddiqui N, Basile AS, Harman WD, et al. Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 2002;62:1084–93.
- Eisenach JC, Detweiler DJ, Tong C, D'Angelo R, Hood DD. Cerebrospinal fluid norepinephrine and acetylcholine concentrations during acute pain. *Anesth Analg* 1996;82:621–6.
- Farr SA, Uezu K, Creonte TA, Flood JF, Morley JE. Modulation of memory processing in the cingulate cortex of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;65:363–8.
- Foltz EL, White Jr LE. Pain "relief" by frontal cingulotomy. *J Neurosurg* 1962;19:89–100.
- Gaffan D. Against memory systems. *Philos Trans Roy Soc Lond B: Biol Sci* 2002;357:1111–21.
- Gaffan D, Parker A. Mediodorsal thalamic function in scene memory in rhesus monkeys. *Brain* 2000;123(Pt 4):816–27.
- Galeotti N, Bartolini A, Ghelardini C. The phospholipase C-IP3 pathway is involved in muscarinic antinociception. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:888–97.
- Galeotti N, Bartolini A, Ghelardini C. Ryanodine receptors are involved in muscarinic antinociception in mice. *Behav Brain Res* 2005;164:165–71.
- Gaykema RP, Luiten PG, Nyakas C, Traber J. Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J Comp Neurol* 1990;293:103–24.
- Gillard ER, León-Olea M, Mucio-Ramírez S, Coburn CG, Sánchez-Islas E, de Leon A, et al. A novel role for endogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the magnocellular neuroendocrine system. *Endocrinology* 2006;147:791–803.
- Guimaraes AP, Guimaraes FS, Prado WA. Modulation of carbachol-induced antinociception from the rat periaqueductal gray. *Brain Res Bull* 2000;51:471–8.
- Guimaraes AP, Prado WA. Antinociceptive effects of carbachol microinjected into different portions of the mesencephalic periaqueductal gray matter of the rat. *Brain Res* 1994;647:220–30.
- Harte SE, Hoot MR, Borszcz GS. Involvement of the intralaminar parafascicular nucleus in muscarinic-induced antinociception in rats. *Brain Res* 2004;1019:152–61.
- Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P, de Gortari P. Differential response of TRHergic neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) in female animals submitted to food-restriction or dehydration-induced anorexia and cold exposure. *Horm Behav* 2008;53:366–77.
- Johansen JP, Fields HL, Manning BH. The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8077–82.
- Jones PG, Dunlop J. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. *Neuropharmacology* 2007;53:197–206.
- Katz J, Melzack R. Pain 'memories' in phantom limbs: review and clinical observations. *Pain* 1990;43:319–36.
- Klein T, Magerl W, Treede RD. Forget about your chronic pain. *Pain* 2007;132:16–7.
- Lenz FA, Gracely RH, Zirh AT, Romanoski AJ, Dougherty PM. The sensory-limbic of pain memory. Connections from thalamus to the limbic system mediated the learned component of the affective dimension of pain. *Pain Forum* 1997;6:22–31.
- Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 1991;11:3218–26.
- Lopez-Avila A, Coffeen U, Ortega-Legaspi JM, del Angel R, Pellicer F. Dopamine and NMDA systems modulate long-term nociception in the rat anterior cingulate cortex. *Pain* 2004;111:136–43.
- Lucas-Meunier E, Fossier P, Baux G, Amar M. Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflugers Arch* 2003;446:17–29.
- Lyeth BG, Ray M, Hamm RJ, Schnabel J, Saady JJ, Poklis A, et al. Post injury scopolamine administration in experimental traumatic brain injury. *Brain Res* 1992;569:281–6.
- Mogil JS, Wilson SG, Bon K, Lee SE, Chung K, Raber P, et al. Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain* 1999;80:67–82.
- Ortega-Legaspi JM, Lopez-Avila A, Coffeen U, del Angel R, Pellicer F. Scopolamine into the anterior cingulate cortex diminishes nociception in a neuropathic pain model in the rat: an interruption of 'nociception-related memory acquisition'? *Eur J Pain* 2003;7:425–9.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. London: Academic Press; 1998.
- Peterson S. Drug microinjection in discrete brain regions. Tujunga (CA): David Kopf Instruments; 1998. p. 1–6.
- Rice AS, Cimino-Brown D, Eisenach JC, Kontinen VK, Lacroix-Fralish ML, Machin I, et al. Animal models and the prediction of efficacy in clinical trials of analgesic drugs: a critical appraisal and call for uniform reporting standards. *Pain* 2008;139:243–7.
- Russell RW, Ehler FJ, Hwa JJ. Relation between behaviorally augmented tolerance and upregulation of muscarinic receptors in the CNS: effects of chronic administration of scopolamine. *Psychopharmacology (Berl)* 1986;88:33–9.

Tohyama MTK. The acetylcholinergic system atlas of neuroactive substances and their receptors in the rat. USA: Oxford University Press; 1998.

Torres-López E, del Angel R, Pellicer F. Thalamic anteriomedial and mediodorsal nuclei stimulation enhances the self-injury behaviour induce by an inflammatory process in the rat. *Analgesia* 2000;5:67-73.

van Koppen CJ, Kaiser B. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther* 2003;98:197-220.

Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, et al. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 1979;7:103-11.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-10.