



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Psicología**

**División de Estudios Profesionales**

**Evaluación farmacológica de los receptores  
glutamatérgicos en alodinia secundaria  
producida por formalina**

**TESIS**

**Que para obtener el título de  
Licenciada en Psicología**

**Presenta**

**María Fernanda Ramírez López**

**Director:**

**Dr. René Raúl Drucker Colín**

**Revisora:**

**Dra. Carolina Escobar Briones**



**México, D.F.**

**Septiembre, 2014**



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.

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM que aceptó mi participación en su casa.

Al Dr. René Drucker Colín por su apoyo y porque me haya permitido trabajar en su laboratorio.

A Mónica Ambriz Tututi por su guía y su asesoría, sin la cual esta tesis no se hubiera podido realizar.

A Diana Millán Aldaco por sus enseñanzas, su apoyo técnico y sus regaños.

A Marcela Palomero Rivero por su tolerancia, su paciencia y su asistencia.

A Olga Rojas Ramos porque sus clases reafirmaron mi gusto por la psicofisiología.

A Rubén, Beto, Lupita, Khalil y Fer que presenciaron el arduo trabajo que requirió el término de mi tesis y me ayudaron a integrarme al ritmo del laboratorio.

A las amazonas, Alexa, Ana Equihua, Valeria, Vida, Daniel, Ana Padilla, Angie, Tania; que me acompañaron durante la carrera y que con esas largas pláticas con (muchos) cafés y cigarros en la explanada, hicieron mi estancia en la facultad más feliz.

A mi papá, que sin su insistencia de fijarme metas a largo plazo no estaría donde estoy.

A mi hermano, a quien amo con locura y que siempre ha creído en mí.

A mis amigos de toda la vida (bueno, no toda) Frida, Agni, Manu, Javi, Ro y Alma que han soportado mis ataques de locura y ansiedad y que sin su amistad no hubiera reconocido que mis pies estaban en la tierra.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>4</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICAS.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>1.CAPÍTULO I .....</b>	<b>9</b>
1.1. Definición de Dolor.....	9
1.2. Sistema nociceptivo.....	10
1.2.1. <i>Fibras C y A<math>\delta</math></i> .....	11
1.2.3. <i>Fibras A<math>\beta</math></i> .....	12
1.3. Clasificación del dolor .....	12
1.4. Alodinia e hiperalgesia.....	14
1.5. Mecanismos del dolor patológico .....	18
1.5.1. <i>Sensibilización periférica</i> .....	18
1.5.2. <i>Sensibilización central</i> .....	20
1.5.3. <i>Facilitación descendente</i> .....	22
<b>2.CAPÍTULO II .....</b>	<b>24</b>
2.1. Modelos de dolor en animales .....	24
2.2. Alodinia e hiperalgesia producida por formalina .....	25
<b>3.CAPÍTULO III .....</b>	<b>27</b>
3.1. Receptores glutamatergicos y su papel en nocicepción.....	27
3.1.1. <i>Receptores NMDA</i> .....	28
3.1.2. <i>Receptores AMPA/KAINATO</i> .....	29
3.1.3. <i>Receptores glutamatérgicos metabotrópicos</i> .....	30
<b>4.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>32</b>
<b>5.HIPÓTESIS .....</b>	<b>32</b>
<b>6.OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>32</b>
<b>7.OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>33</b>
<b>8.MÉTODO .....</b>	<b>33</b>
8.1. Sujetos.....	33
8.2. Canulación intratecal .....	33
8.3. Canulación en el Núcleo Dorsal Reticular .....	34
8.4. Inducción de alodinia secundaria.....	34
8.5. Evaluación de la alodinia secundaria.....	34
8.6. Protocolo experimental .....	36

8.6.1. PRE-TRATAMIENTO.....	36
8.6.2. POST-TRATAMIENTO.....	37
8.7. Fármacos.....	37
8.8. Administración de los fármacos.....	37
8.9. Inmunohistoquímica.....	38
8.10. Cuantificación de células positivas a c-Fos .....	39
8.11. Análisis estadístico.....	39
<b>9.RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
9.1. Post- tratamiento periférico de los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5.....	40
9.2. Pre-tratamiento periférico de los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5.....	43
9.3. Post- tratamiento espinal de los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5.....	44
9.4. Pre-tratamiento espinal con los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5.....	47
9.5. Post- tratamiento en el nDr de los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5.....	48
9.6. Pre-tratamiento en el nDr de los antagonistas de los receptores AMPA/ka, NMDA y mGluR1/5.....	51
9.6.1. Efecto de la administración en el nDr de los antagonistas glutamatérgicos en la conducta nociceptiva inducida por formalina.....	51
9.6.2. Efecto de la administración en el nDr de los antagonistas glutamatérgicos en la expresión de c-Fos en la médula espinal seis días después de la inyección de formalina.....	52
<b>10.DISCUSIÓN .....</b>	<b>57</b>
10.1. Post- tratamiento y pre-tratamiento periférico de los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5.....	57
10.1.1. Receptores periféricos AMPA .....	58
10.1.2. Receptores periféricos NMDA .....	58
10.1.3. Receptores periféricos mGlu1/5.....	59
10.2. Post- tratamiento y pre-tratamiento espinal de los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5.....	60
10.2.1. Receptores espinales AMPA/Ka .....	61
10.2.2. Receptores espinales NMDA .....	62
10.2.3. Receptores espinales mGlu1/5.....	63
10.3. Post- tratamiento y pre-tratamiento en el nDr de los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5.....	64
Efecto de la administración en el nDr de los antagonistas glutamatérgicos en la expresión de c-Fos en la médula espinal seis días después de la inyección de formalina.....	66
<b>11.CONCLUSIONES .....</b>	<b>69</b>
<b>12.REFERENCIAS.....</b>	<b>70</b>

<b>13.ANEXOS.....</b>	<b>80</b>
13.1 Grupos experimentales.....	80
13.2 Papel de los receptores glutamatèrgicos en la alodinia secundaria.....	81
13.2.1. Tabla 1. Administración periférica de antagonistas/agonistas glutamatèrgicos.....	81
13.2.2. Tabla 2. Administración sistémica de antagonistas/agonistas glutamatèrgicos.....	83
13.2.3. Tabla 3. Administración intratecal de antagonistas/agonistas glutamatèrgicos.....	85
13.2.4. Tabla 4. Administración supraespinal de antagonistas/agonistas glutamatèrgicos.....	87
13.2.5. Tabla 5. Papel de los receptores glutamatèrgicos en el modelo de formalina.....	89
13.3 Artículo publicado: <i>Role of glutamate receptors in the dorsal reticular nucleus in formalin-induced secondary allodynia</i> .....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización laminar de la sustancia gris de la médula espinal. Imagen obtenida de Todd, 2010.....	11
Figura 2. Los distintos tipos de dolor: Nociceptivo, inflamatorio y neuropático. Imagen modificada de: Woolf, 2004.....	14
Figura 3. Las zonas primaria y secundaria en la hiperalgesia y la alodinia.....	15
Figura 4. Los diferentes mecanismos del dolor.....	17
Figura 5. Sensibilización periférica. Imagen modificada de: Costigan et al, 2009. ....	19
Figura 5. Sensibilización central. Imagen modificada de : Latremoliere & Woolf, 2009 .....	21
Figura 7. Vía espino-bulbo-espinal y cerebral del nDr (DRt) y su implicación en los circuitos moduladores del dolor. Imagen modificada de: Almeida et. Al., 2006. ....	23
Figura 8. Clasificación de los receptores glutamatèrgicos y sus antagonistas.....	27
Figura 9. Los receptores NMDA compuestos por sus subunidades y sus sitios de unión.....	29
Figura 10. Los receptores AMPA y sus subunidades.....	30
Figura 11. Estructura de los receptores metabotrópicos Imagen modificada de: Spooren & Gasparini, 2004 .....	31

Figura 12. Sitio coronal de canulación en el núcleo dorsal reticular.....	34
Figuras 13. y 14. Ratas en caja de acrílico sobre malla metálica.....	35
Figura 15. Gráfica que representa el 50% umbral de retiro.....	35
Figura 16. Protocolos experimentales.....	37
Figura 17. Inmunohistoquímica representativa de la expresión de c-Fos en el asta dorsal espinal en respuesta a la formalina al 1%.....	52
Figura 18. Inmunohistoquímica representativa de la expresión de c-Fos en el asta dorsal espinal en respuesta al pre-tratamiento con los antagonistas glutamatérgicos.....	54

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Efecto de la inyección de formalina al 1% (F 1% día 6) y en ratas intactas (C) en el umbral de retiro de las patas ipsilateral (IL) y contralateral (CL) evaluado el sexto día.....	40
Gráfica 2. Efecto del post-tratamiento periférico (s.c) con el antagonista CNQX 0.4, 4 y 40nM.....	41
Gráfica 3. Efecto del post-tratamiento periférico (s.c.) del antagonista MK801 3, 10 y 30nM .....	41
Gráfica 4. Efecto del post-tratamiento periférico (s.c.) del antagonista A841720 10, 40 y 100nM). .....	42
Gráfica 5. Efecto del pre-tratamiento periférico (s.c.) con los antagonistas CNQX (40nM), MK801 (30nM) y A841720 (40nM).....	43
Gráfica 6. Efecto de la inyección de formalina al 1% (F 1% día 6) y en ratas operadas (C) en el umbral de retiro de la pata ipsilateral (IL) o contralateral (CL) evaluado el sexto día.....	44
Gráfica 7. Efecto del post-tratamiento intratecal (i.t) con el antagonista CNQX.0.1, 1 y 10nM.....	45
Gráfica 8. Efecto del post-tratamiento intratecal (i.t.) del antagonista MK801 0.3, 3 y 30nM .....	45
Gráfica 9. Efecto del post-tratamiento intratecal (i.t.) del antagonista A841720 10, 40 y 100nM .	46
Gráfica 10. Efecto del pre-tratamiento intratecal (i.t.) con los antagonistas CNQX (1nM), MK801 (3nM) y A841720 (40nM).....	47
Gráfica 11. Efecto de la inyección de formalina al 1% (F 1% día 6) y en ratas operadas (C) en el umbral de retiro de las patas ipsilateral (IL) o contralateral (CL) evaluado el sexto día.....	48
Gráfica 12. Efecto del post-tratamiento en el núcleo dorsal reticular (nDr) del antagonista CNQX 4 nM.....	49

Gráfica 13. Efecto del post-tratamiento en el núcleo dorsal reticular (nDr) del antagonista MK801 3 nM .....	49
Gráfica 14. Efecto del post-tratamiento en el núcleo dorsal reticular (nDr) del antagonista A841720 4 nM .....	50
Gráfica 15. Efecto del pre-tratamiento en el núcleo dorsal reticular (nDr) con los antagonistas CNQX (4nM), MK801 (3nM) y A841720 (4nM) .....	51
Gráfica 16. Expresión de c-Fos en ratas intactas o 6 días después de la administración de solución salina (S.S.) o formalina al 1% (F1%), en las láminas I-V en el asta dorsal de la médula espinal ipsilateral (IL) y contralateral (CL) a la inyección.....	53
Gráfica 17. Efecto del pre-tratamiento (-10 min.) con el antagonista CNQX (4 nM) en el núcleo dorsal reticular (nDr) en la expresión de c-Fos en las láminas I-V en el asta dorsal de la médula espinal. ....	55
Gráfica 18. Efecto del pre-tratamiento (-10 min.) con el antagonista MK 801(3 nM) en el núcleo dorsal reticular (nDr) en la expresión de c-Fos en las láminas I-V en el asta dorsal de la médula espinal. ....	56
Gráfica 19. Efecto del pre-tratamiento (-10 min.) con el antagonista A841720 (4 nM) en el núcleo dorsal reticular (nDr) en la expresión de c-Fos en las láminas I-V en el asta dorsal de la médula espinal. ....	56



## RESUMEN

El dolor inflamatorio crónico induce cambios en la señalización nociceptiva desde las fibras aferentes primarias hasta centros moduladores en el sistema nervioso central. Sin embargo, no es clara la participación de los receptores glutamatérgicos a nivel periférico, espinal y supraespinal en este fenómeno. Para analizar de la influencia de estos receptores a esos niveles, en este estudio se administraron antagonistas para los receptores NMDA, AMPA/Ka y metabotrópicos del grupo 1 en un modelo de dolor inflamatorio inducido por formalina, un irritante, y se evaluó la conducta nociceptiva, retiro de la extremidad estimulada en ratas. Asimismo, un centro modulador del dolor supraespinal poco estudiado, el núcleo dorsal reticular, que se halla conectado intrínsecamente con las neuronas del asta dorsal espinal, parece cambiar su modulación en el dolor inflamatorio. Adicional a la evaluación de la conducta nociceptiva, se realizó un estudio de la expresión de c-Fos, un marcador de la activación neuronal, para analizar los efectos de la estimulación inocua en segmentos lumbares del asta dorsal de la médula espinal y el pre-tratamiento de los diferentes antagonistas administrados en el núcleo dorsal reticular. Nuestros resultados demuestran que hay una participación diferencial de los receptores glutamatérgicos según el nivel de administración de los antagonistas, así como el tiempo de administración, ya sea como pre-tratamiento o post-tratamiento.

# INTRODUCCIÓN

El dolor constituye una alarma que tiene el papel de salvaguardar la integridad del organismo. Sin embargo, cuando el dolor se vuelve crónico pierde la función protectora y es en sí mismo una enfermedad. El dolor crónico persiste por un tiempo prolongado después de la lesión inicial, incluso en ausencia de una lesión periférica. Dentro del dolor crónico, hay respuestas alteradas como la alodinia (dolor en respuesta a un estímulo normalmente inocuo) o la hiperalgesia (intensificación del dolor en respuesta a un estímulo nocivo) hacia estímulos mecánicos o térmicos. La transición del dolor hacia una fase crónica involucra cambios en la modulación de las señales nociceptivas desde donde se inician -la neurona sensorial primaria-, así como cambios en la médula espinal y el cerebro. Evidencia farmacológica, electrofisiológica y conductual apoya la intervención de los receptores glutamatérgicos en las vías del dolor y su modulación puede tener potencial terapéutico.

Se ha sugerido que la hiperalgesia y la alodinia dependen, al menos en parte, del incremento de la eficacia sináptica de la señalización glutamatérgica a largo plazo. Asimismo, cambios inducidos en la modulación descendente del sistema nociceptivo durante el dolor crónico también se relaciona con la modulación glutamatérgica. Sin embargo, esta modulación nunca ha sido descrita en un componente facilitatorio clave, el núcleo dorsal reticular (nDR). La caracterización neuroquímica de la vía núcleo dorsal reticular-espinal demostró que los receptores glutamatérgicos NMDA, AMPA/Ka y mGluR1 y 5 están posicionados para modular indirectamente la actividad de las neuronas que proyectan al asta dorsal de la médula espinal. El presente estudio demuestra la participación de los receptores glutamatérgicos no sólo a nivel periférico y espinal, sino también supraespinal, en el nDr, y que éstos son capaces de controlar la facilitación descendente de la transmisión del dolor.

# CAPÍTULO I

## Definición de Dolor

En 1840, Johannes Miller y colaboradores publicaron la teoría de las modalidades sensoriales específicas y sentaron las bases para una teoría detallada de las terminaciones específicas de órganos, las fibras nerviosas periféricas y los tractos nerviosos, la cual ayudó a la discriminación de las diferentes sensaciones incluyendo el dolor (Merskey, 1980).

El dolor es una experiencia multidimensional, intrínsecamente desagradable y dañina (Woolf, 2004). Resulta de naturaleza subjetiva con un componente emocional y otro cognitivo, ya que implica una abstracción y una experiencia previa (Julius & Basbaum, 2001; Woolf, 2004).

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés; 1994) define el dolor como “una sensación desagradable y una experiencia emocional asociada con un daño al tejido real o potencial que está descrita en términos de dicho daño”. En este contexto, el dolor constituye una alarma que tiene el papel de protección del organismo (Le Bars, Gozariu, & Cadden, 2001; Millan, 1999). El umbral para provocar dolor tiene que ser lo suficientemente alto para no interferir en las actividades normales pero lo suficientemente bajo para evitar daño al tejido. No obstante, si el tejido se daña, la protección hacia estímulos nocivos cambia para promoverla recuperación del tejido lesionado (Scholz & Woolf, 2002). Cuando el dolor se vuelve crónico pierde la función protectora y es en sí mismo una enfermedad. El dolor crónico persiste por un tiempo prolongado después de la lesión inicial, incluso en ausencia de una lesión periférica (Woolf, 2004). Dentro del dolor crónico, hay respuestas alteradas como la alodinia (dolor en respuesta a un estímulo normalmente inocuo) o la hiperalgesia (intensificación del dolor en respuesta a un estímulo nocivo) hacia estímulos mecánicos o térmicos. Estas respuestas se pueden desarrollar en el área de daño (respuestas primarias) así como en áreas lejanas al daño (respuestas secundarias) (Sandküler, 2009).

## Sistema nociceptivo

La nocicepción es la percepción del organismo de un estímulo nocivo que involucra una actividad neuronal. Esta percepción sensorial comienza en la periferia, donde las terminales responden a los estímulos y transmiten esta información dentro del asta dorsal de la médula espinal hasta el sistema nervioso central (SNC)(Woolf, 2004). El mecanismo de transducción involucra la activación de canales catiónicos en las terminales nerviosas libres directamente por propiedades biofísicas en el alto umbral del estímulo nocivo e indirectamente por cambios químicos en el micro y macroambiente producido por dicho estímulo (Giordano, 2005; Vanderah, 2007).

El sistema nociceptivo capta cualquier estímulo que pueda causar daño en el tejido a través de los nociceptores, terminaciones nerviosas especializadas, conocidas también como fibras aferentes primarias (D'Mello & Dickenson, 2008; Julius & Basbaum, 2001). Los nociceptores tienen umbrales o sensibilidades que los distinguen de otras fibras nerviosas sensoriales. Las fibras que inervan el cuerpo y la cabeza surgen de cuerpos celulares ubicados en los ganglios de la raíz dorsal y trigeminal, respectivamente, y pueden ser categorizados en tres grupos principales basados en criterios anatómicos y funcionales (Julius & Basbaum, 2001):

- Fibras C: delgadas (0.4 – 1.2  $\mu\text{m}$  de diámetro), desmielinizadas y de conducción lenta (0.2 – 2 m/seg.)

- Fibras A $\delta$ : medianas (2- 6  $\mu\text{m}$  de diámetro), poco mielinizadas y de conducción intermedia (12- 30 m/seg.)

- Fibras A $\beta$ : gruesas (>10  $\mu\text{m}$  de diámetro), mielinizadas y de conducción rápida (30- 100m/seg.)

Las láminas más superficiales de la médula espinal (I y II), junto con las más profundas (V, VI y la X) constituyen las regiones implicadas principalmente en la recepción, procesamiento y transmisión de la información nociceptiva (Fig 1). Las fibras C proyectan principalmente a la lámina IIe y en menor grado hacia las láminas I, V y X. Por otro lado, las fibras A $\delta$  de alto umbral inervan predominantemente la lámina I y en menor grado las láminas IIe y X (Giordano, 2005; Julius & Basbaum, 2001). Las aferencias desmielinizadas viscerales, de articulaciones y de los músculos, proyectan sus axones principalmente hacia las láminas I, V/VI y X. Existe un grado notable de convergencia, ya que las aferencias de diversas regiones del organismo proyectan hacia una sola neurona espinal (Julius & Basbaum, 2001).

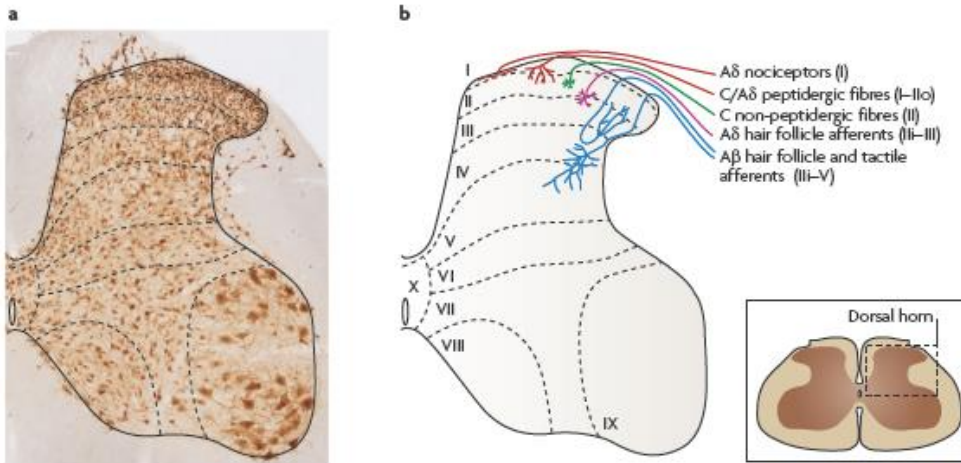


FIGURA 1 ORGANIZACIÓN LAMINAR DE LA SUSTANCIA GRIS DE LA MÉDULA ESPINAL. IMAGEN OBTENIDA DE TODD, 2010.

## Fibras C y A $\delta$

Cada una de estas fibras codifica información sensorial, pero son diferencialmente sensibles a estímulos tanto nocivos como inocuos. El dolor nociceptivo es mediado, bajo circunstancias normales, por las fibras aferentes primarias C o A $\delta$  de alto umbral que proyectan hacia vías nociceptivas del sistema nervioso central (Costigan, Scholz, & Woolf, 2009). Estas neuronas nociceptivas expresan receptores especializados del canal del ion del transductor, principalmente receptores TRP, adaptados para responder estímulos intensos termales o mecánicos así como a mediadores químicos exógenos y endógenos (Dhaka et al. 2006).

La excitación sináptica evocada a través de las fibras A $\delta$  y C, activa la expresión de varias proteínas codificadas de genes de tempranos- inmediatos (GTI) tales como c-JUN, JUN B, JUN D, KROX-24, c-FOS y FOS B, en neuronas supraespinales y espinales (Herdegen, Tölle, Bravo, Zieglgänsberger, & Zimmermann, 1991). El aumento de la expresión del mensajero de c-Fos y la proteína FOS se observa en la médula espinal lumbar en las láminas superficiales (I- III) y profundas (VII,VIII y X) (Hoffman & Miller, 2010; Pinto, Lima, & Tavares, 2007; Menétrey, Gannon, Levine, & Basbaum, 1989).

## Fibras A $\beta$

Por otro lado, las fibras A $\beta$  tienen umbrales de activación bajo y en condiciones normales responden únicamente al tacto (D'Mello & Dickenson, 2008). Después de una lesión en el nervio, estas fibras comienzan a producir dolor (Khan, Chen, & Pan, 2002). Se ha reportado que el bloqueo selectivo farmacológico de las fibras A $\beta$  suprime la alodinia táctil en modelos de lesión del nervio (Yamamoto, Sugiura, Nakazato-Imasato, & Kita, 2008). Asimismo, la entrada polisináptica y monosináptica de las fibras A $\beta$  incrementa en la lámina más superficial del asta dorsal, un área que normalmente sólo recibe entradas de las fibras A $\delta$  y C (Costigan et al., 2009). Una serie de cambios neuronales pueden promover el dolor mediado por las fibras A $\beta$ : la sensibilización central, la desinhibición y la ramificación de las terminales aferentes centrales. Todos estos mecanismos contribuyen a que la entrada de bajo umbral desde fibras mielinizadas sea transferido de circuitos no nociceptivos a circuitos nociceptivos en la médula espinal.

Un tercer tipo de neurona, denominadas de rango amplio dinámico (WDRs) reciben entradas de los tres tipos de fibras sensoriales. Responden a un rango completo de estímulos, tanto cutáneos, musculares y viscerales como a la estimulación térmica, mecánica y química (D'Mello & Dickenson, 2008).

## Clasificación del dolor

El dolor no es una entidad homogénea sensorial ya que existen varios tipos: el dolor agudo, inflamatorio y neuropático (Fig.2). **El dolor agudo** es activado por un estímulo nocivo mediado por el sistema nociceptivo (Woolf, 2004). Sin embargo, si el tejido llegara a dañarse a pesar de la defensa del sistema nociceptivo, el organismo cambia de una protección hacia estímulos nocivos a una promoción de recuperación del tejido lesionado. **El dolor inflamatorio** es utilizado para cumplir esta meta. Para auxiliar la reparación del tejido dañado, la sensibilidad aumenta de tal manera, que al estimular el área afectada causa dolor y hay una respuesta exagerada y prolongada, minimizando un daño mayor (Costigan et al., 2009). El aumento de la sensibilidad ocurre dentro del área inflamada y en áreas no inflamadas contiguas como un resultado de la plasticidad de los nociceptores y de vías centrales nociceptivas (Hucho & Levine, 2007). Las terminales periféricas de las fibras aferentes primarias al ser expuestas a señales inflamatorias y al

factor de crecimiento nervioso (NGF) inducen a que las neuronas del ganglio de la raíz dorsal comiencen a expresar Sustancia P y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)(D'Mello & Dickenson, 2008). Consecuentemente, las fibras mielinizadas son activadas por estímulos inocuos de baja intensidad y liberan estos neuropéptidos en la médula espinal, generando la sensibilización central (Latremoliere & Woolf, 2009). El **dolor neuropático** es un tipo de dolor considerado patológico que involucra un cambio profundo tal en la sensibilidad que una entrada de baja intensidad genera dolor, interrumpiendo el patrón normal de la especificidad del dolor. Esta hipersensibilidad ocurre también en áreas fuera del campo de los nervios dañados. El dolor neuropático está típicamente asociado con la pérdida de terminales periféricas de las fibras C (Costigan et al., 2009). Las fibras C y A dañadas y no dañadas, después de un daño en los nervios periféricos, comienzan a generar potenciales de acción espontáneos. Asimismo, las neuronas sensoriales lesionadas, y en menor grado las no lesionadas en los ganglios de la raíz dorsal exhiben un cambio profundo en la transcripción que altera las propiedades de la membrana, factores de crecimiento y la función de los transmisores. Por lo tanto, la estimulación de fibras no nociceptivas ahora libera factores que conllevan a la sensibilización central (Latremoliere & Woolf, 2009). Entonces existe dolor en ausencia de un estímulo identificable, una característica importante del dolor neuropático. (Costigan et al., 2009).

El dolor espontáneo surge como resultado de la generación de un potencial de acción ectópico dentro de las vías nociceptivas debido a la sensibilización central y la conectividad alterada en la médula espinal. No obstante no se origina en las terminales periféricas en respuesta a un estímulo (Costigan et al., 2009). Asimismo, las interacciones entre los axones sensoriales, los axones de nervios autonómicos y las células ganglionares resultan en una excitación que se propaga entre las diferentes fibras nerviosas (D'Mello & Dickenson, 2008). Esta actividad espontánea es generada en sitios múltiples, incluyendo el neuroma (el sitio del daño con un crecimiento acortado del axón), en el cuerpo celular de neuronas dañadas en los ganglios de la raíz dorsal (GRD), y en las aferentes intactas vecinas (Costigan et al., 2009).

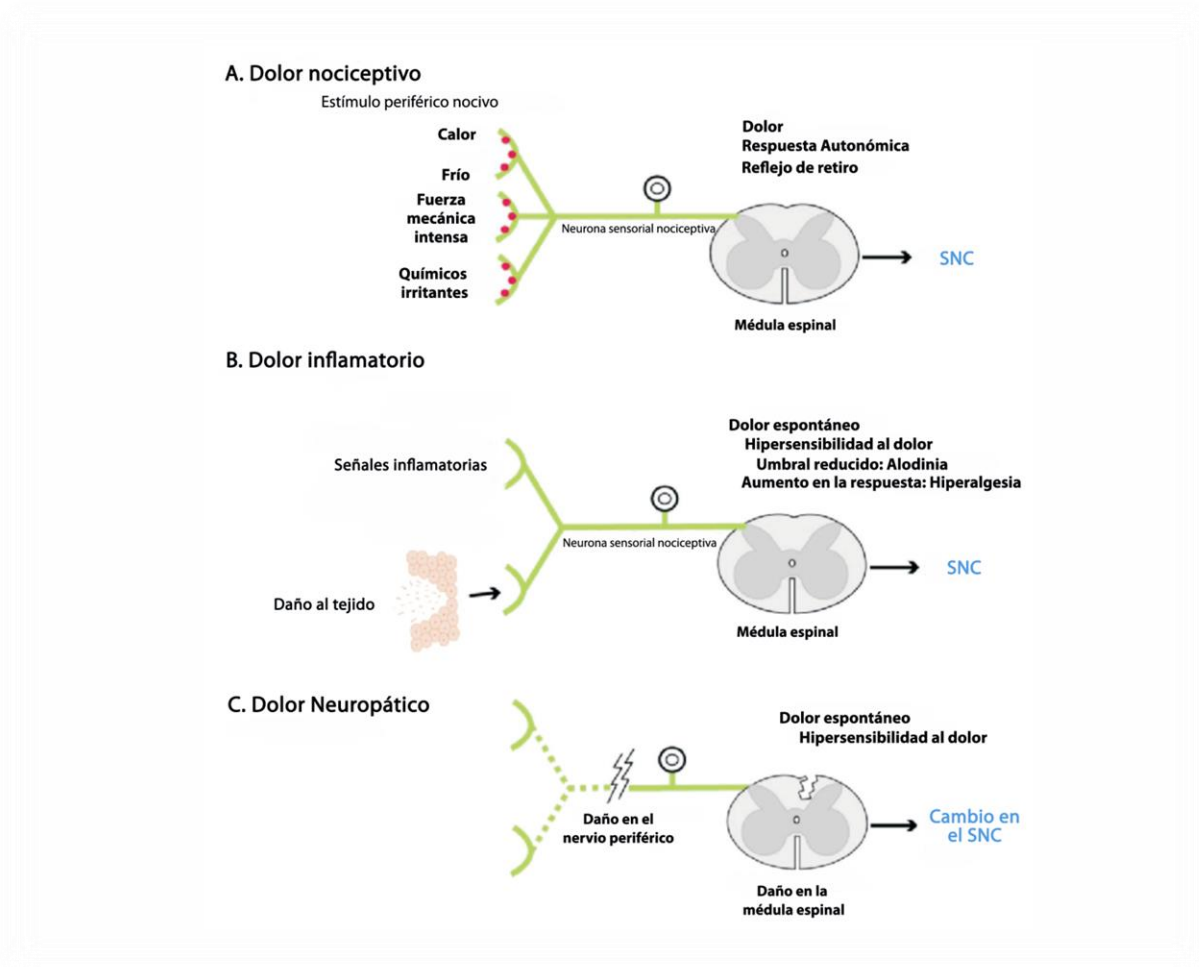


FIGURA 2 LOS DISTINTOS TIPOS DE DOLOR: NOCICEPTIVO, INFLAMATORIO Y NEUROPÁTICO. IMAGEN MODIFICADA DE: WOOLF, 2004

## Alodinia e hiperalgesia

Ante el daño provocado en un tejido por agentes irritantes, calor, estimulación eléctrica o mecánica se producen dos zonas principales de dolor (Fig. 3), la zona de hiperalgesia o alodinia primaria, que comprende la región del tejido dañado y que se caracteriza por dolor espontáneo y aumento de la sensibilidad a los estímulos nocivos y la zona de hiperalgesia o alodinia secundaria, la cual se despliega en un sitio alejado de la zona de daño (Julius & Basbaum, 2001). La alodinia se refiere a un dolor asociado con estímulos que normalmente no son nociceptivos como un estímulo táctil (Fig. 4). La hiperalgesia, por su parte, se define como una respuesta dolorosa exagerada de mayor duración e intensidad. Las condiciones vistas en pacientes con lesiones en el sistema



nervioso donde se les tocaba con una ligera presión o con una temperatura moderadamente fría o caliente evocaba dolor cuando se le aplicaba en la piel aparentemente normal. Es importante

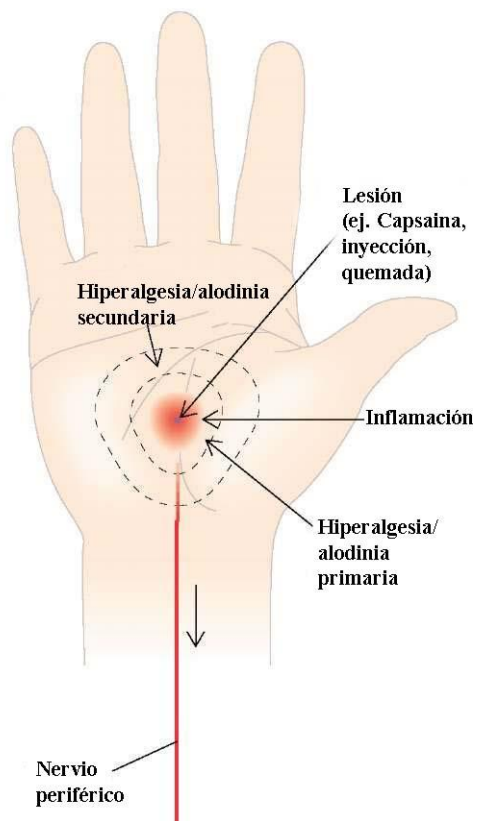


FIGURA 3 LAS ZONAS PRIMARIA Y SECUNDARIA EN LA HIPERALGESIA Y LA ALODINIA.

reconocer que la alodinia involucra un cambio en la calidad de la sensación, ya sea táctil, térmico o de cualquier otro tipo. La hiperalgesia y la alodinia son frecuentes síntomas de enfermedades y pueden ser útiles en adaptaciones para proteger tejidos vulnerables. Sin embargo, en ambos casos, también emergen como enfermedades en sí mismas (Sandkühler, 2009).

Cambios en la médula espinal que subyacen a estos fenómenos incluyen una reducción de la neurotransmisión inhibitoria GABAérgica y/o glicinérgica, el desarrollo de una potenciación a largo plazo (LTP), la plasticidad intrínseca de las neuronas del asta dorsal y las alteraciones en las propiedades de las aferentes mecanoreceptivas de bajo umbral  $A\beta$  (Todd, 2010). No obstante, los mecanismos subyacentes a la hiperalgesia y la alodinia no son completamente iguales.

Aunque la hiperalgesia primaria es inducida por la sensibilización de los nociceptores y la hiperalgesia secundaria resulta por la sensibilización espinal o supraespinal, esta sensibilización de las neuronas del asta dorsal es generada predominantemente por una entrada a través de las fibras C. Por otro lado, en la alodinia, la entrada de las fibras  $A\beta$  que normalmente proyectan al sistema táctil puede obtener una conexión patológica con el sistema nociceptivo (Lanz, Seifert, & Maihöfner, 2011).

A nivel experimental, el daño provocado por la inflamación por la aplicación subcutánea de capsaicina o irritantes como la formalina, activa las fibras C (y posiblemente  $A\delta$ ). Esto produce un estado de excitabilidad exagerada en el asta dorsal de la médula espinal en particular en láminas profundas. Esta excitabilidad aumentada provoca hiperalgesia. Asimismo, se reduce el umbral de disparo y existe un aumento y aparición de respuestas en las fibras  $A\beta$  (Julius & Basbaum, 2001).

El funcionamiento anormal de las fibras A $\beta$  contribuyen en la alodinia táctil en estados inflamatorios y neuropáticos cuando éstas obtienen acceso hacia vías que normalmente son específicamente nociceptivas (Todd, 2010).

La alodinia mecánica no puede ser explicada sin tomar en cuenta mecanismos centrales (Millan, 1999). Se sugiere que la hiperalgesia y la alodinia son dependientes, al menos en parte, del incremento de la eficacia sináptica de la señalización glutamatérgica a largo plazo (Bleakman, Alt & Nisenbaum, 2006).

Los aminoácidos excitatorios se encuentran en la mayoría de las fibras sensoriales de diámetro delgado y grueso, y están co-localizadas con péptidos como la Sustancia P. Particularmente, los receptores glutamatérgicos han sido implicados en eventos espinales fundamentales en el “*wind up*”, donde las respuestas de las neuronas del asta dorsal incrementan significativamente después de una estimulación repetitiva de las fibras C (Julius & Basbaum, 2001). La activación de esta clase de receptores brinda un aumento marcado en la transmisión sináptica en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Bleakman, Alt & Nisenbaum, 2006).

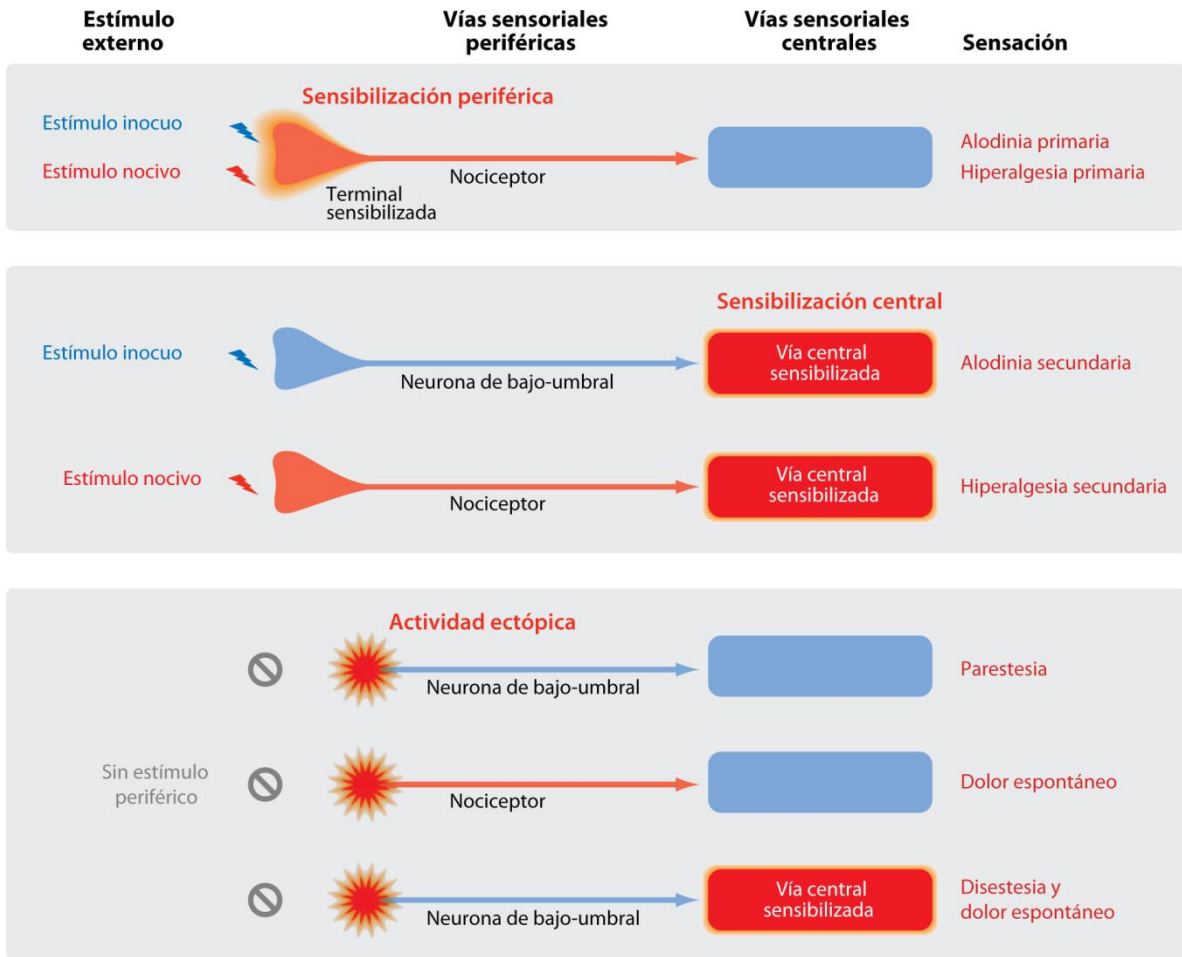


FIGURA 4 LOS DIFERENTES MECANISMOS DEL DOLOR. UNA REPRESENTACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE EL ESTÍMULO EXTERNO NOCIVO E INOCUO Y LAS RESPUESTAS SENSORIALES QUE ÉSTOS EVOCAN, DEPENDIENDO DE LA FIBRA AFERENTE QUE ES ACTIVADA (UN NOCICEPTOR O UNA NEURONA DE UMBRAL BAJO) Y SI LA SENSIBILIDAD, YA SEA DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO O DEL CENTRAL, ES ALTERADA PARA AMPLIFICAR LA RESPUESTA HACIA EL ESTÍMULO (SENSIBILIZACIÓN) Y GENERAR ACTIVIDAD ECTÓPICA. IMAGEN MODIFICADA DE: COSTIGAN ET AL, 2009.

## Mecanismos del dolor patológico

### Sensibilización periférica

Debido a la sensibilización del sistema nociceptivo inducido por la inflamación, éste puede ser activado por entradas de información inofensivas de bajo umbral. Mediadores inflamatorios activan señales intracelulares en las vías de transducción en las terminales de los nociceptores, incitando un aumento en la producción, el transporte y la inserción de canales iónicos y canales dependientes de voltaje (Fig. 5). Además, hay una pérdida de la funcionalidad después de un daño neurológico que ocurre a causa de la interrupción de la conectividad axonal. Estos déficits funcionales persisten, ya que una variedad de factores inhibitorios en la degeneración de mielina y la cicatrización astrogial previenen el crecimiento axonal (Cafferty, McGee, & Strittmatter, 2008).

Las alteraciones en la sensibilización periférica incluyen la generación ectópica de potenciales de acción, facilitación y desinhibición de la transmisión sináptica, pérdida de la conectividad sináptica y formación de nuevos circuitos sinápticos e interacciones neuroinmunes (Costigan et al., 2009).

Tras la transducción de un estímulo de alto umbral, los nervios dañados pueden iniciar una actividad ectópica que continúa junto con la acumulación y la agrupación de canales de sodio ( $\text{Na}^+$ ), específicamente los canales  $\text{Nav}_{1.8}$  y  $\text{Nav}_{1.9}$ , alrededor de los axones dañados (D'Mello & Dickenson, 2008). En condiciones normales, la mayoría de estos canales son sensibles a la tetrodotoxina (TTX), sin embargo, cuando hay daño al nervio e inflamación aumenta la expresión de canales resistentes a la TTX (TTX-R), lo que favorece la conductancia de sodio con bajo umbral (Giordano, 2005). Esta actividad aberrante inicia la propagación rápida hacia los cuerpos celulares en los ganglios del asta dorsal (D'Mello & Dickenson, 2008).

Una entrada de alto umbral puede romper membranas neurales o no neurales para liberar ácidos grasos así como cationes mono y divalentes. Estos ácidos grasos liberados son catalizados por la fosfolipasa-A2 para producir ácido araquidónico. El aumento de este último induce a la isoenzima ciclo-oxigenasa-2 (COX-2) para acelerar la formación de prostaglandinas, con la producción descendente de prostaglandina sintasa se genera la prostaglandina E2. Ésta actúa en los receptores PGE-2 en los nociceptores para incrementar la adenil ciclasa, elevando el adenosín

monofosfato cíclico (AMPC) que posteriormente activa proteínas quinasas específicas (Giordano, 2005). Ambas proteínas cinasa A y C fosforilan receptores de prostanoideos, quininas y aminoácidos, así como canales iónicos, y afectan su sensibilidad respectiva hacia ligandos y concentraciones iónicas (D’Mello & Dickenson, 2008; Hucho & Levine, 2007).

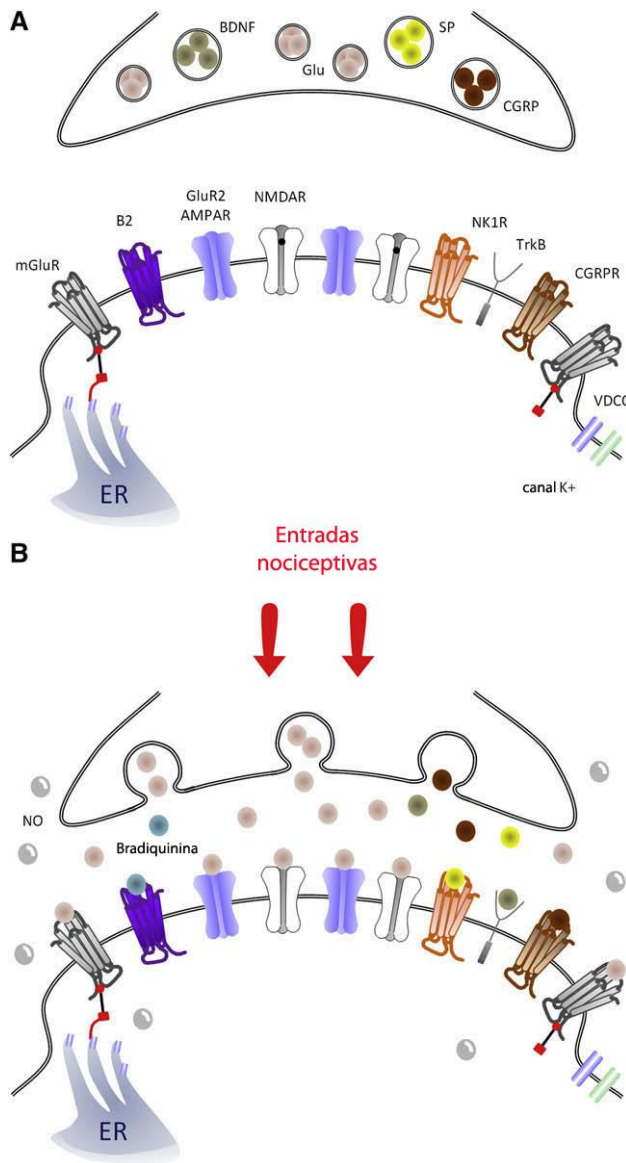


FIGURA 5 (A) MODELO DE LA SINAPSIS ENTRE LA TERMINAL DE UN NOCICEPTOR Y UNA NEURONA EN LA LÁMINA I EN CONDICIONES BASALES. LOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS SE SITUAN EN LAS EXTREMIDADES DE LA SINAPSIS Y SON LIGADOS AL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO (ER). MIENTRAS LOS RECEPTORES NMDA (NMDAR) SON BLOQUEADOS POR MAGNESIO EN EL PORO (PUNTO NEGRO). DESPUÉS DE UNA ACTIVACIÓN DEL NOCICEPTOR (B), LA TERMINAL DE LA AFERENTE PRIMARIA LIBERA GLUTAMATO (GLU) QUE SE UNE A RECEPTORES METABOTRÓPICOS, AMPA (AMPA) Y NMDA. ASIMISMO, LA SUSTANCIA P (SP), EL PÉPTIDO RELACIONADO AL GEN CALCITONINA (CGRP) Y EL FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF) SE UNEN A LOS RECEPTORES NK1, CGRP1 Y TrkB, RESPECTIVAMENTE. LOS RECEPTORES B2 QUE SON ACTIVADOS ESPINALMENTE PRODUCEN BRADIQUININA. EL ÓXIDO NÍTRICO (NO) ES PRODUCIDO POR VARIAS CÉLULAS EN LA MÉDULA ESPINAL Y PUEDE ACTUAR PRE Y POSTSINÁPTICAMENTE.

IMAGEN MODIFICADA DE: LATREMOLIERE & WOLF, 2009.

## Sensibilización central

La sensibilización central es un mecanismo fisiopatológico común del dolor inflamatorio y neuropático. La actividad generada por los nociceptores durante la inflamación produce un rápido inicio de la facilitación sináptica en el asta dorsal de la médula espinal. Los cambios en el umbral del dolor y la sensibilidad son una expresión de plasticidad neuronal, dicha plasticidad caracteriza esencialmente al dolor inflamatorio y neuropático (Scholz & Woolf, 2002). Además de la sensibilización del sistema nociceptivo a causa de los cambios dependientes de la actividad sináptica y la excitabilidad, la sensibilización central contribuye a una hipersensibilidad al dolor persistente y a largo plazo, presente en situaciones patológicas incluyendo la inflamación y el daño al sistema nervioso (Fig. 6) (Latremoliere & Woolf, 2009).

En el dolor neuropático, la actividad que se registra en los nervios lesionados es el detonante de la sensibilización central. La sensibilización central se asemeja a la actividad dependiente de la plasticidad sináptica en la corteza ya que varios moduladores sinápticos y aminoácidos excitatorios están involucrados. La acción del glutamato sobre los receptores NMDA, así como receptores metabotrópicos y AMPA; alteraciones en la cinética y las propiedades de los canales iónicos, el aumento de la densidad de receptores ionotrópicos, la activación de cinasas y neuropéptidos como la Sustancia P y el péptido relacionado al gen calcitonina (CGRP), la bradicinina, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el óxido nítrico pre y post-sinápticamente (Latremoliere & Woolf, 2009; Vanderah, 2007). El aumento en la actividad sináptica permite entradas subumbrales para la activación de las neuronas nociceptivas, reduciendo su umbral, aumentando su sensibilidad y expandiendo sus áreas receptoras (Costigan et al., 2009).

Por otro lado, la reducción en la síntesis, liberación y actividad de los transmisores inhibitorios conlleva a un estado de desinhibición. Las interneuronas inhibitorias del asta dorsal hacen sinapsis con las terminales centrales de las neuronas sensoriales primarias y presinápticamente modulan la entrada aferente (Costigan et al., 2009). En el dolor neuropático, hay una desinhibición sustancial en el asta dorsal, que implica una pérdida GABAérgica y una reducción del flujo glicinérgico y se atribuye en parte a la apoptosis de las interneuronas inhibitorias (Latremoliere & Woolf, 2009; Todd, 2010).

La lesión del nervio periférico da lugar a una degeneración de las fibras C en la lámina II. Esta pérdida de la entrada presináptica, junto con el aumento de la capacidad intrínseca del crecimiento axonal como parte de la respuesta regenerativa de las neuronas dañadas, ayuda a que las fibras mielinizadas A $\beta$  broten desde las láminas III y IV hacia las láminas I y II, haciendo contacto con neuronas nociceptivas específicas (Latremoliere & Woolf, 2009).

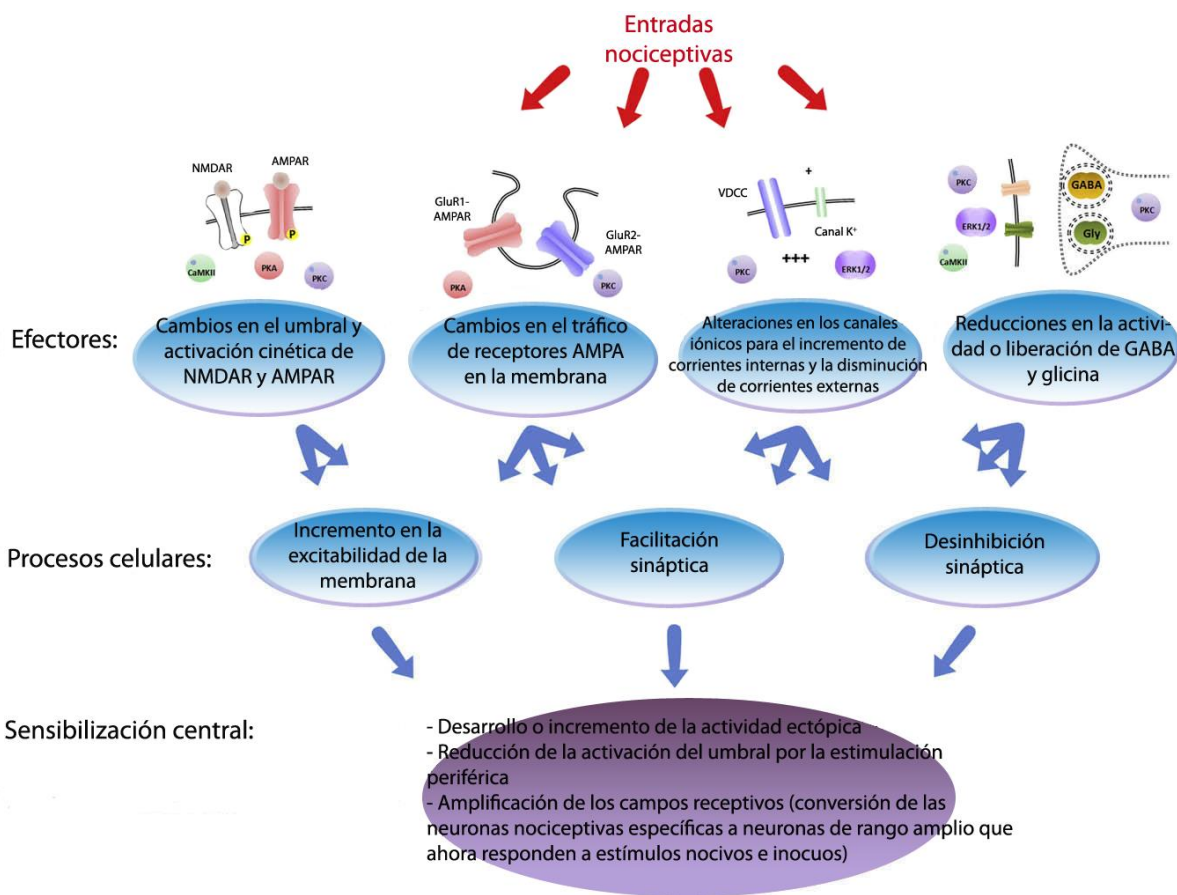


FIGURA 6 DURANTE LA SENSIBILIZACION CENTRAL, LAS NEURONAS MUESTRAN EL DESARROLLO DE UNA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA, LA REDUCCIÓN DEL UMBRAL POR ACTIVACIÓN Y UNA AMPLIACIÓN DE LOS CAMPOS RECEPTIVOS DE LAS NEURONAS NOCICEPTIVAS. ESTOS MECANISMOS PUEDEN SER GUÍADOS POR DIFERENTES EFECTORES MOLECULARES, INCLUYENDO PKA, PKC, CAMKII Y ERK1/2. ESTAS QUINASAS PARTICIPAN EN CAMBIOS EN EL UMBRAL Y LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES NMDA Y AMPA QUE CAUSAN ALTERACIONES EN EL FLUJO EN LOS CANALES IÓNICOS Y REDUCEN LA LIBERACIÓN O LA ACTIVIDAD DE GABA Y LA GLICINA. IMAGEN MODIFICADA DE : LATREMOLIERE & WOOLF, 2009

## Facilitación descendente

En la transición del dolor agudo al crónico, la facilitación descendente de la nocicepción desde sitios supraespinales es favorecida. La facilitación descendente es un contribuyente principal de la sensibilización central y el mantenimiento de la alodinia e hiperalgesia secundaria (Ambriz-Tututi, Cruz S, Urquiza-Marín, & Granados-Soto, 2011; Heinricher, Tavares, Leith, & Lumb, 2009).

Diferentes áreas del cerebro han sido evidenciadas como centros de control del dolor, como la sustancia gris periacueductal mesencefálica (PAG) y la médula rostral ventromedial (RVM). Asimismo, varias áreas en la médula caudal oblongata influyen en la modulación del dolor como en el núcleo dorsal reticular (nDr), la médula caudal ventromedial (CVLM) y el núcleo del *tractus solitarius* (NTS) también dirigidos por el procencéfalo (Almeida, Leite-Almeida, & Tavares, 2006).

### ***Núcleo dorsal reticular y su participación en nocicepción***

La participación del nDr en el procesamiento nociceptivo se ha mostrado en estudios anatómicos (Almeida, Cobos, Tavares, & Lima, 2002), electrofisiológicos (Sotgiu, Valente, Storchi, Caramenti, & Mario Biella, 2008) y farmacológicos (Almeida, Tjølsen, Lima, Coimbra, & Hole, 1996). En la rata se ha identificado una vía ascendente espinal conectando áreas nociceptivas con el núcleo dorsal reticular y una vía descendente que se origina en el nDr hasta el asta dorsal espinal (Tavares & Lima, 1994). Las neuronas del nDr proyectan y reciben proyecciones de áreas implicadas en el control directo e indirecto de la transmisión espinal nociceptiva, por ejemplo, en la médula oblongada la CVLM, el NTS, la RVM y la formación reticular; a nivel puente-cerebelo el *locus coeruleus*, grupos celulares noradrenérgicos A5 y A7; a nivel del mesencéfalo, la PAG y la sustancia nigra. Por último, a nivel del diencefalo, el núcleo hipotalámico paraventricular (PVN) y a nivel del telencéfalo, la amígdala (AMY) (Fig. 7)(Leite-Almeida, Valle-Fernandes, & Almeida, 2006).

El nDr parece estar implicado en la reacción motora del dolor en sí misma, ya que no sólo recibe una proyección de la corteza motora y de varias áreas motoras extrapiramidales (globus pallidus, sustancia nigra, núcleo basilar pontino, núcleo reticulotegmental del puente) sino que también proyecta hacia el asta ventral espinal (Almeida, Cobos, Tavares, & Lima, 2002). Existen conexiones ipsilaterales recíprocas ligadas en el área dorsal del nDr con las láminas I-II de la médula espinal (Polgár, Wright, & Todd, 2010) y en menor grado en las láminas III-VI en el área ventral (Tavares



&Lima, 1994). Por esto, se ha sugerido que el circuito del nDr hacia el asta dorsal superficial dirige la facilitación de la respuesta hacia un estímulo nociceptivo en las neuronas superficiales, particularmente las localizadas en la lámina I (Almeida, Størkson, Lima, Hole, & Tjølsen, 1999).

Por la naturaleza asimétrica de los contactos sinápticos espinales y medulares de este circuito se conoce que contienen glutamato, indicando que este sistema descendente aumenta la capacidad de respuesta de las neuronas espinales que proyectan hacia el nDr (Almeida et al., 1996). Sin embargo, el sistema de neurotransmisión dentro de este núcleo no ha sido elucidado y resulta de interés la evaluación del sistema glutamatérgico y más aún determinar su influencia en un modelo de nocicepción crónica.

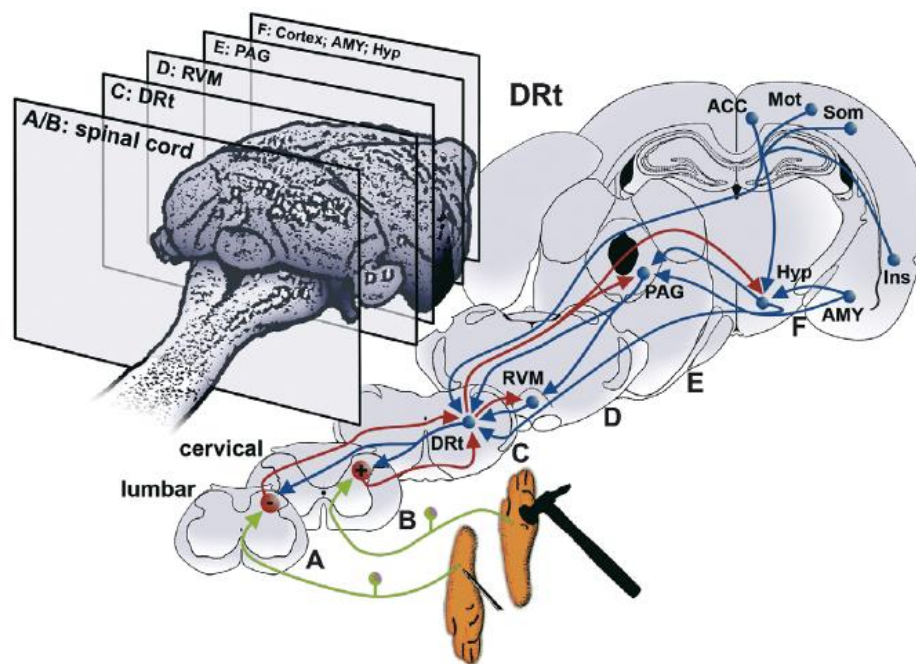


FIGURA 7 VÍA ESPINO-BULBO-ESPINAL Y CEREBRAL DEL nDR (DRt) Y SU IMPLICACIÓN EN LOS CIRCUITOS MODULADORES DEL DOLOR. NÓTESE LAS CONEXIONES RECÍPROCAS CON EL ASTA DORSAL ESPINAL, EL HIPOTÁLAMO (HYP), LA PAG Y LA RVM. IMAGEN MODIFICADA DE: ALMEIDA ET. AL., 2006.

## CAPÍTULO II

### Modelo del dolor en animales

La evaluación del dolor en humanos con fines de investigación es difícil ya que sólo se pueden utilizar los estímulos que no producen un daño irreversible. Asimismo, es complicado el reclutamiento de un número significativo de pacientes necesarios para el estudio clínico. Por lo tanto, hay una necesidad de utilizar modelos animales y ampliar nuestro conocimiento en un fenómeno tan complejo como el dolor. Dichos modelos deben resultar en déficits sensoriales reproducibles (alodinia, hiperalgesia y el dolor espontáneo) en un periodo sostenido de tiempo. Algunas condiciones fisiopatológicas observadas en los humanos son simuladas por los modelos animales, permitiendo la evaluación de farmacoterapias (Dowdall, Robinson, & Meert, 2005).

En contraste con la naturaleza polifórmica del dolor en humanos, el dolor en animales puede ser estimado solamente examinando sus reacciones. Zimmermann (1986) reinterpretó la definición de dolor del IASP para que se aplicase en animales: “Una experiencia sensorial aversiva causada por un daño real o potencial que induce reacciones motoras progresivas o vegetativas, resultando en una conducta aprendida de evitación, que puede modificar conductas específicas, incluyendo la conducta social”. Así, en el estudio de la nocicepción, las pruebas conductuales constituyen sistemas de *entrada-salida*. La *entrada*, siendo el estímulo aplicado por el examinador y la *salida*, la reacción del animal. Las *entradas* y las *salidas* de estos sistemas están íntimamente ligados con las características físicas (notablemente la naturaleza temporal) del estímulo (Le Bars & cols., 2001). Asimismo es importante mencionar que un organismo puede disminuir o suprimir por completo una respuesta a un estímulo recurrente neutro. Por otro lado, en la sensibilización la magnitud de la respuesta aumenta cuando es procedido por un estímulo nociceptivo (Rains, 2002)

Las conductas inducidas varían pero son relativamente estereotipadas en roedores. En este paradigma nunca es medido el umbral al dolor, sino que hay un puntaje conductual, en respuesta a un estímulo supraumbral (Le Bars & cols., 2001).

## **Alodinia e hiperalgesia producida por formalina**

La prueba de formalina es considerada un modelo de dolor inflamatorio agudo generado por un daño al tejido. De esta manera, difiere de los modelos de dolor más tradicionales que dependen de estímulos breves de una intensidad del umbral específica (Tjølsen, Berge, Hunskaar, Rosland, & Hole, 1992). La prueba de formalina permite evaluar la forma en que responde un animal al dolor moderado y continuo (Dubuisson & Dennis, 1977).

La inyección subcutánea de formalina 0.5-5% en la pata trasera de la rata consciente provoca una conducta nociceptiva que involucra actividad periférica predominante en las fibras C y sensibilización periférica y central (Tjølsen et al., 1992; Urban & Gebhart, 1999). Es caracterizada por la elevación, lamido, retiro e incluso mordida de la pata inyectada (Pitcher & Henry, 2002). Además, en la rata y el ratón, la inyección intraplantar de formalina produce una reacción conductual bifásica. La primera fase ocurre inmediatamente después de la inyección de formalina y la segunda fase es entre los 15 y 20 minutos (Dubuisson & Dennis, 1977). La primera fase resulta por el daño inicial al tejido y de una activación directa de las fibras aferentes periféricas por la formalina (Urban & Gebhart, 1999). Mientras que la segunda fase es mediada por una actividad nerviosa periférica, cuyos efectos son incrementados a nivel espinal e implica una sensibilización central (Cui, Khanijou, Rubino, & Aoki, 2004; Fu et al., 2000; Le Bars, Gozariu, & Cadden, 2001). No obstante, el origen central o periférico de la segunda fase ha sido sujeto a debate. Se ha propuesto que la actividad de las aferentes neuronales sensoriales durante la primera fase es capaz de producir cambios, como la sensibilización central, que ocurren independientemente de las entradas periféricas y que a su vez tienen influencia durante la segunda fase (Coderre & Melzack, 1992).

La inyección subcutánea de formalina tiene un efecto irritante, produce daño al tejido y al nervio a largo plazo (Lin et al., 2008). El curso temporal de las respuestas hiperalgésicas, en la pata inyectada y en la contralateral, hacia estímulos mecánicos y térmicos prosigue el día siguiente y el día tres. El pico de la hiperalgesia es en una semana después de la inyección y tiene una duración de hasta cuatro semanas (Fu, Light, & Maixner, 2000). Asimismo, se ha demostrado una activación robusta de la microglia en la porción medial del asta dorsal en el lado ipsilateral a la inyección de formalina, comenzando en el día 1-3 y un pico en el día 7 después de la inyección. El curso temporal de la activación de la microglia es paralelo a las respuestas hiperalgésicas a la aplicación

de estímulos térmicos y mecánicos en el lado contralateral del sitio de la inyección (Fu, Tan, Sung, & Mao, 2009). El daño del tejido, la inflamación o la lesión del nervio puede resultar en un dolor neuropático crónico y su desarrollo y mantenimiento es modulado por la microglia espinal (Lin et al., 2008).

La contribución de la estimulación de los nociceptores en el desarrollo y el mantenimiento de la conducta después de la segunda fase es apoyada por la observación de que la formalina produce la liberación de amino ácidos excitatorios y Sustancia P en la médula espinal (Chaplan, Malmberg, & Yaksh, 1997; Fu et al., 2000; Omote et al., 2000).

En la prueba de formalina generalmente se usan concentraciones que van desde 0.5% al 5% y diferentes mecanismos están involucrados en bajas y altas concentraciones, los comportamientos nociceptivos son dependientes de la dosis. A bajas concentraciones (<2%) hay una actividad sensible a la capsaicina predominante con componentes neurogénicos, mientras que a altas concentraciones (5%), existe una participación adicional de elementos inflamatorios más complejos (Sawynok & Reid, 2002). A bajas concentraciones de formalina la conducta nociceptiva es submáxima, esto facilita la detección de analgésicos leves y hace posible la detección de hiperalgesia ya que eleva la sensibilidad de la prueba (Tjølsen et al., 1992). La hiperalgesia y la alodinia observada en sitios remotos a la inyección de formalina, sugiere que la sensibilización central contribuye al desarrollo y mantenimiento de este estado de dolor (Fu et al., 2000). De esta manera, la prueba de la formalina sirve como un modelo potencial para situaciones clínicas que involucran sensibilización central y periférica.

De acuerdo a la evidencia previa que sugiere la participación de los receptores glutamatérgicos en estados de nocicepción crónicos, es importante determinar si estos receptores modulan el establecimiento o inicio de las conductas nociceptivas secundarias en este modelo.

## CAPÍTULO III

### Receptores glutamatérgicos y su papel en nocicepción

El aminoácido glutamato se ha identificado como el principal neurotransmisor en la transmisión de señales excitatorias a lo largo de las proyecciones axonales de las neuronas en el sistema nervioso central. La utilización de antagonistas y agonistas selectivos hicieron posible la clasificación de los receptores glutamatérgicos (Fig.8)

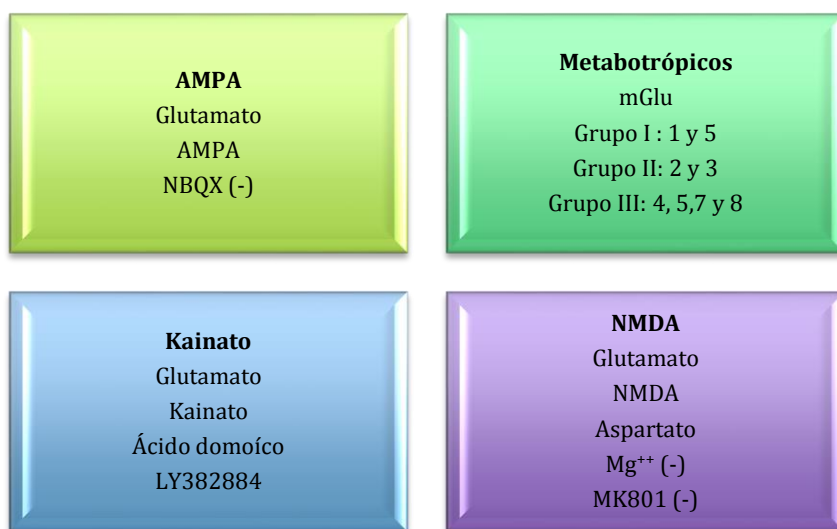


FIGURA 8 CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS Y SUS PRINCIPALES ANTAGONISTAS.

La transmisión sináptica excitatoria en las terminales de las aferentes primarias nociceptivas es mediada principalmente por la liberación postsináptica de glutamato actuando sobre los receptores AMPA y NMDA (Engelman, Allen, & MacDermott, 1999). Esta liberación de glutamato es lograda gracias a la actividad de canales de Ca<sup>++</sup> dependientes de voltaje y péptidos como la Sustancia P y/o el gen relacionado al péptido calcitonina (CGRP)(Campbell & Meyer, 2006).

Asimismo, la microglia y los astrocitos liberan agentes neuroactivos como citocinas proinflamatorias, prostaglandinas y neurotrofinas especialmente en condiciones de dolor persistente. Las elevaciones de Ca<sup>++</sup> en los astrocitos desencadenan la liberación de glutamato y las corrientes internas lentas mediadas por los receptores NMDA en la lámina II. Al incrementar estas corrientes se promueve el desarrollo de la alodinia mecánica (Bardoni et al., 2010).

La plasticidad asociada con la sensibilización central, presente en la alodinia secundaria, se expresa principalmente por alteraciones en la fosforilación de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos (AMPA y NMDA) y/o el aumento del tráfico del receptor AMPA hacia la membrana post-sináptica (Bleakman y cols., 2006). Los receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGlu) actuando pre o post-sinápticamente también han demostrado una modulación de la inducción y/o mantenimiento de la sensibilización central (Ji y cols., 2003).

## Receptores NMDA

Los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) han sido un importante objeto de estudio ya que tienen un papel crucial en la transmisión sináptica excitatoria, la plasticidad y la neurodegeneración en el SNC (Dickenson, 2002). Estos receptores controlan el canal de cationes, altamente permeable a iones monovalentes y  $Ca^{++}$ . La activación de los receptores NMDA (NMDAR) es más eficiente cuando el glutamato (agonista) y la glicina (coagonista) se unen. Sin embargo, se modula además por el reconocimiento de varios sitios de unión, incluyendo el sitio para el PCP (no competitivo) y el sitio modulador de poliamina (Fig.7). Cuando la membrana se encuentra en potencial de reposo, los canales de los NMDAR son bloqueados por un magnesio extracelular y sólo se abren cuando hay depolarización simultánea a la unión del agonista (Petrenko, Yamakura, Baba, & Shimoji, 2003).

El receptor NMDA tiene una estructura heteromérica compuesta por las subunidades, NR1, NR2 (A, B, C y D) y NR3 (A y B). La formación de estos receptores se compone de la subunidad NR1, una subunidad esencial para la formación del canal y al menos una de las subunidades de NR2 (Fig. 9), las cuales determinan su funcionalidad (Dickenson, 2002). Las propiedades heteroméricas de los canales de NMDAR NR1/NR2, tales como la sensibilidad al bloqueo del magnesio, las cinéticas de la desensibilización, la susceptibilidad a la modulación por la glicina, la reducción de agentes, la fosforilación y las poliaminas, y la afinidad de los antagonistas y agonistas; dependen del tipo de la subunidad NR2 incluida en el complejo (Petrenko et al., 2003).

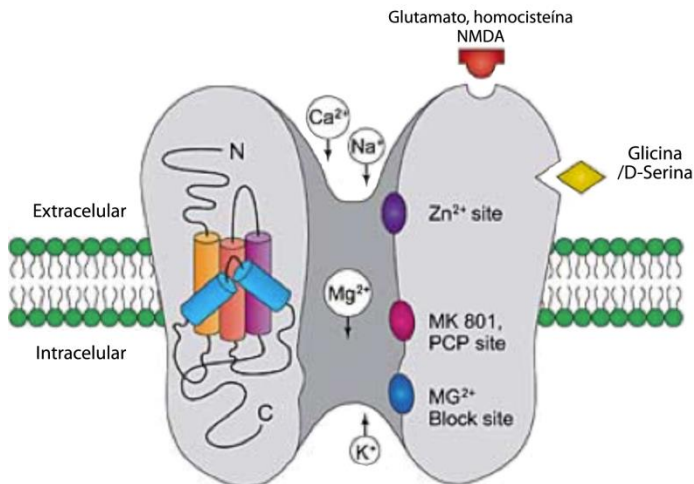


FIGURA 9 LOS RECEPTORES NMDA COMPUESTOS POR SUS SUBUNIDADES Y SUS SITIOS DE UNIÓN.

Evidencia sustancial apoya la participación de los receptores NMDA en varios de los estados patológicos del dolor dado que las subunidades del receptor NMDA están expresadas en cuerpos celulares de neuronas primarias del ganglio de la raíz dorsal, así como en sus axones mielinizados y no mielinizados en la médula espinal y periferia (Bleakman y cols., 2006). La activación de los receptores NMDA con una inyección intraplantar de NMDA en la pata trasera de la rata induce conductas nociceptivas, sugiriendo una participación potencial de los receptores NMDA periféricos en el procesamiento del dolor (Bleakman, Alt, & Nisenbaum, 2006).

### Receptores AMPA/KAINATO

Los receptores ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) están compuestos por cuatro subunidades, GluR1-GluR4 (Choi, Svensson, Koehrn, & Bhuskute, 2010) y se han involucrado en la transmisión glutamatérgica rápida (Chun et al., 2008). La expresión de receptores AMPA permeables a  $Ca^{++}$  en las fibras aferentes primarias, incluyendo las fibras A $\delta$  y A $\beta$ , en las láminas I y II, sugiere que están localizados en esa región para mediar la transmisión de la información nociceptiva (Coggeshall & Carlton, 1998; Engelman et al., 1999).

Los receptores AMPA son activados en respuesta a un breve estímulo agudo y están involucrados en los eventos rápidos de la transmisión del dolor (Dickenson, 2003).

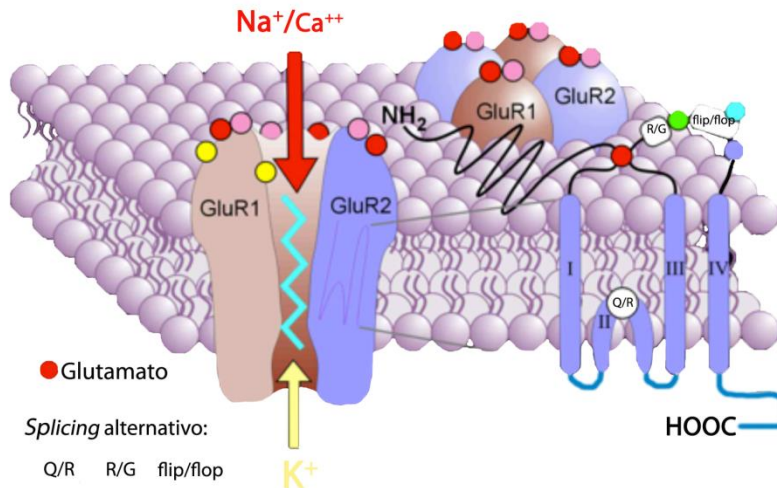


FIGURA 10 LOS RECEPTORES AMPA Y SUS SUBUNIDADES

Por otro lado, los receptores Kainato, compuestos de las subunidades GluR5-GluR7, KA1 y K2, son permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Estos receptores han sido identificados en ganglios sensoriales y en el asta dorsal de la médula espinal (Huettner, 1990).

Los receptores kainato tienen una función ligada a la liberación de glutamato. La mayoría de los receptores GluR5 son localizados en las terminales de las neuronas que liberan glutamato presinápticamente (Dickenson, 2002). Estos receptores modulan las corrientes monosinápticas en las membranas post sinápticas producidas por la liberación de glutamato en las fibras aferentes primarias (Jones & Sorkin, 2004).

No es claro si los receptores kainato tienen una participación en la sensibilización central por la estimulación nociceptiva. Substancialmente, estos receptores tienen una influencia en la actividad sináptica a lo largo del SNC, ya que su activación incrementa los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular durante la sinapsis y la excitotoxicidad (Jones & Sorkin, 2004).

### Receptores glutamatérgicos metabotrópicos

Aparte de los receptores mencionados, los receptores metabotrópicos (mGluR) pertenecen a la clase C de la familia de los receptores acoplados a la proteína-G (Fig. 11). Se subdividen en tres grupos basados en la secuencia de aminoácidos, su perfil farmacológico y su señal de transducción. En este proyecto nos centraremos en el grupo I. El grupo I (mGluR1 y mGluR5)



generalmente se une a las proteínas Gq, iniciando la activación de la vías de la fosfolipasa C y la proteína quinasa C y la generación de señales intracelulares de  $Ca^{++}$  (Ferraguti, Crepaldi, & Nicoletti, 2008; Goudet et al., 2009).

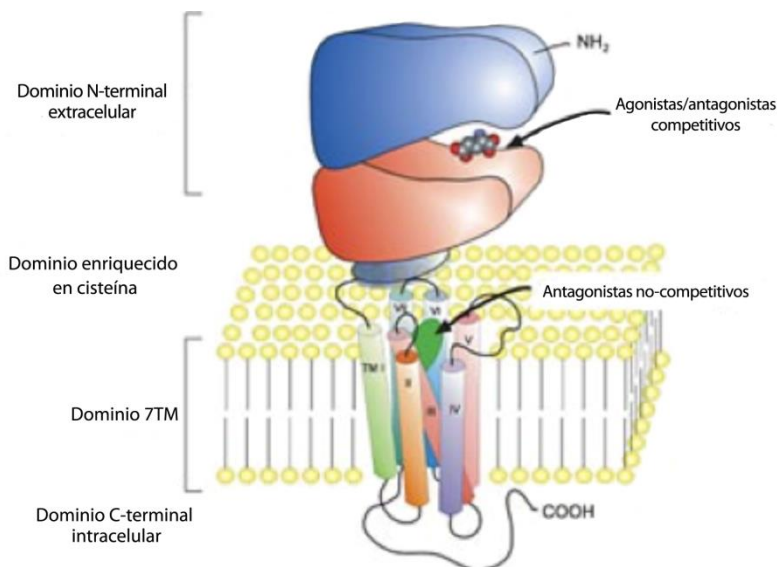


FIGURA 11 ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS. LA ARQUITECTURA TRANSMEMBRANAL DE LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS. ESTAS PROTEÍNAS MONOMÉRICAS CONTIENEN SIETE DOMINIOS TRANSMEMBRANALES. LAS PORCIONES DE LOS DOMINIOS II, III, IV Y VII FORMAN LA REGIÓN DE UNIÓN DEL NEUROTRANSMISOR. LAS PROTEÍNAS G SE UNEN ENTRE LOS DOMINIOS V Y VI Y EN PORCIONES DE LA REGIÓN DE LA TERMINAL-C. (SPOOREN & GASPARINI, 2004)

Los receptores metabotrópicos están expresados en elementos pre y post sinápticos dentro de las vías nociceptivas ascendentes y descendentes, donde regulan la excitabilidad de la célula y su transmisión sináptica (Bhave, Karim, Carlton, & Gereau, 2001). Cuando estos receptores se activan la sensibilidad a estímulos nocivos incrementa (Bhave et al., 2001). La distribución de los mGluRs del grupo I en la médula espinal, los ganglios de la raíz dorsal y las fibras nerviosas periféricas, así como la inducción de hipersensibilidad después de la administración de sus agonistas y el alivio del dolor inflamatorio y neuropático por el tratamiento periférico, intratecal o sistémico de sus antagonistas, como el A841720 (El-Kouhen et al., 2006); constituyen una evidencia contundente de su participación en la vía nociceptiva (Jang y cols., 2004; Jung y cols., 2011). Los receptores metabotrópicos del grupo I pueden modular la actividad de canales iónicos dependientes de voltaje, como los receptores AMPA y NMDA, contribuyendo a la inducción de la plasticidad sináptica (Ferraguti et al., 2008).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Un agente importante en la transmisión del dolor es el glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso. Éste ejerce su acción a través de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores glutamatérgicos en las vías nociceptivas regulan la transmisión del dolor y modulan la respuesta a estímulos nociceptivos. Hasta el momento existe controversia en la participación de estos receptores en modelos de alodinia secundaria porque se han evaluado bajo diferentes condiciones y protocolos experimentales. Debido a esto, es necesario desarrollar un estudio completo que explore el papel de los receptores glutamatérgicos a nivel periférico, espinal en un solo modelo de alodinia secundaria.

## HIPÓTESIS

El pre-tratamiento y post-tratamiento con antagonistas glutamatérgicos administrados a diferentes niveles (periférico, intratecal y supraespinal) disminuirá significativamente la alodinia secundaria producida por formalina, medida a través del umbral de la respuesta mecánica de retirada de la pata; proponiendo que los receptores glutamatérgicos presentes en las fibras aferentes primarias, médula espinal y en el núcleo dorsal reticular intervienen de manera importante en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia secundaria.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de los receptores glutamatérgicos a nivel periférico, espinal y supraespinal en el desarrollo o establecimiento de la alodinia secundaria producida por formalina a través de la administración de diferentes antagonistas glutamatérgicos en los protocolos de pre-tratamiento y post- tratamiento.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Evaluar la participación de los receptores NMDA, AMPA/KA y metabotrópicos (mGlu1) periféricos y espinales en la iniciación o mantenimiento de la alodinia secundaria.

-Estudiar el posible papel de los receptores glutamatérgicos en el núcleo dorsal reticular en el inicio o mantenimiento de la alodinia secundaria producida por formalina y determinar la vía de integración del estímulo nocivo en las astas dorsales de la médula espinal.

## MÉTODO

### Sujetos

Se utilizaron 84 ratas hembra Wistar, entre 180-200 g y se dividieron en 18 grupos experimentales (n=6) (ver Anexos, Tabla 1). Se mantuvieron con libre acceso al agua y comida, en un ciclo de 12 horas luz/oscuridad. Los animales se sacrificaron en una cámara de CO<sub>2</sub> al concluir cada experimento con excepción de aquellos grupos a los que se les extrajo la médula espinal para realizar la inmunohistoquímica. Los animales pertenecientes a estos grupos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). Este proyecto siguió las normas de cuidado del Comité de Bioética y Cuidado de Animales Experimentales del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México y las pautas éticas para el estudio del dolor en animales conscientes (Zimmermann, 1983).

### Canulación intratecal

Las ratas se anestesiaron con una mezcla de ketamina/xilacina (45/12 mg/kg; i.p.), después se colocaron en un aparato esterotáxico para fijar el cráneo, posteriormente se realizó una incisión a nivel occipital y se separaron los músculos hasta la visibilidad de la membrana atlanto-occipital. Se insertó la cánula de polietileno PE-10 de 7.5 cm de longitud avanzando caudalmente en el espacio subaracnoideo a través de una incisión en la membrana atlanto-occipital, hasta llegar a la región lumbo-sacra de la médula espinal para la administración espinal de los antagonistas

glutamatérgicos. Se excluyeron las ratas que presentaron algún tipo de lesión en cualquiera de sus extremidades, respetando la n=6.

## Canulación en el Núcleo Dorsal Reticular

Para la cirugía del núcleo dorsal reticular, las ratas se colocaron en un aparato esterotáxico bajo anestesia con isoflurano al 5%. La cánula guía de calibre 22G de acero inoxidable se posicionó en el núcleo dorsal reticular con las coordenadas AP=13.8 L=1.6 V=9.0 (Paxinos & Watson, 1998). La cánula se fijó de forma permanente en su posición con cemento dental y con un tornillo de acero inoxidable colocado en el cráneo.



FIGURA 12 CORTE CORONAL MOSTRANDO SITIO DE CÁNULA A NIVEL DEL NDR

Las ratas estuvieron en recuperación por un periodo de 5-7 días post-cirugía antes de su uso. Para confirmar la posición de la cánula, se seleccionaron unas ratas aleatoriamente para anestesarlas y remover el cerebro. El cerebro se fijó en paraformaldehído al 4% y se cortó coronalmente con una matriz para cerebro de rata en las coordenadas de Paxinos. Las secciones del cerebro fueron examinadas en un microscopio Leica DM6000 para comprobar la posición correcta de las cánulas guías (Fig. 12).

## Inducción de alodinia secundaria

Se administraron 50  $\mu$ l de formalina al 1% por vía subcutánea con ayuda de una jeringa 30G en el dorso de la pata derecha. Se esperaron seis días a que se estableciera la alodinia secundaria, y se evaluó en ambas patas, la pata administrada con formalina (ipsilateral) y la pata no administrada (contralateral) (Ambriz-Tututi et al., 2011).

## Evaluación de la alodinia secundaria

La alodinia táctil se determinó al cuantificar el umbral de retiro de la pata trasera ipsilateral y contralateral a la inyección de formalina por la aplicación de los filamentos von Frey. Los animales se colocaron en unas cajas de acrílico, sobre una malla metálica elevada (Figs. 13 y 14). Se habituaron por 30-40 minutos en el ambiente de evaluación conductual. Se aplicaron una serie de filamentos calibrados von Frey (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) perpendicularmente en la superficie

de la planta de la pata durante 5 segundos. El retiro brusco de la pata fue considerado como una respuesta positiva. En la ausencia de respuesta, el filamento de fuerza mayor fue aplicado. En la presencia de una respuesta positiva, el filamento de fuerza menor fue aplicado. El estímulo táctil que tiene una probabilidad del 50% de tener una respuesta positiva se calculó utilizando el método “up &down” (Chaplan et al., 1994).

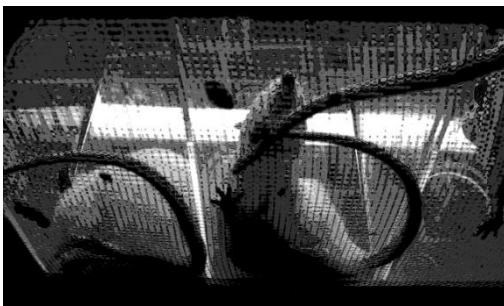


FIGURA 13 Y FIGURA 14 RATAS EN CAJAS DE ACRÍLICO SOBRE MALLA METÁLICA

El 50% de umbral de retiro se obtuvo con base a la siguiente fórmula:

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

Donde:

- Xf: valor del último filamento de von Frey usado (unidades log)
- k: valor tabulado con base en el patrón de respuestas positivas y negativas
- d: diferencias de promedio entre estímulos (unidades log)

Si el valor de umbral de retiro es menor a 4 g se dice que la rata está alodínica y si el valor está entre 4 y 15 g se habla de una rata normal (Fig. 15)

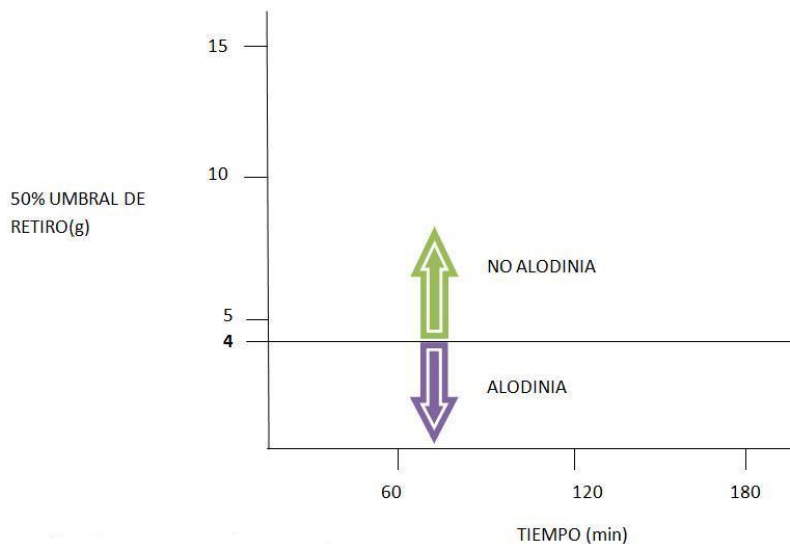
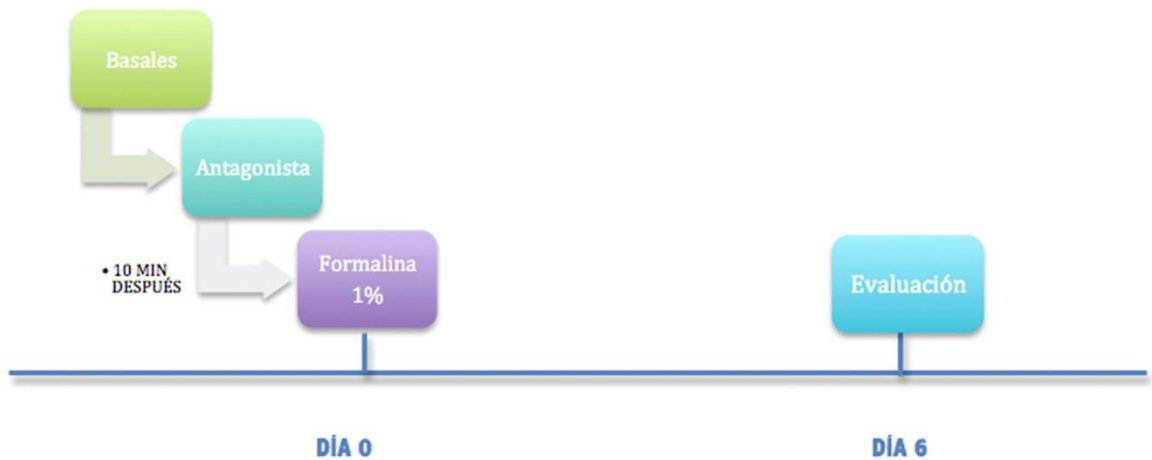


FIGURA 15 GRÁFICA QUE REPRESENTA EL 50% UMBRAL DE RETIRO

## Protocolo experimental

Se utilizaron dos protocolos de administración de los antagonistas glutamatérgicos (Fig. 16). En el protocolo de post-tratamiento se les administró la formalina al 1% y se esperaron 6 días para que se estableciera la alodinia secundaria. El día 6 se les administraron los antagonistas glutamatérgicos vía espinal, periférica o supraespinal. Se realizó la evaluación de la alodinia (10 minutos después de la administración de los antagonistas) con cursos temporales de las dosis probadas de cada uno de los antagonistas. El protocolo de pre-tratamiento consistió en administrar los antagonistas glutamatérgicos y después de 10 minutos inyectar la formalina al 1%. 6 días después se realizó la evaluación de la alodinia. En ambos protocolos, los grupos experimentales para la administración intratecal y del nDr, una vez que las ratas estuvieron canuladas, se midieron los puntajes basales para asegurar que su umbral de dolor no estuviera alterado por la cirugía.

### PRE-TRATAMIENTO



## POST-TRATAMIENTO



FIGURA 16 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

### Fármacos

En un grupo de cada protocolo se administraron tres tipos de antagonistas, CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona; TOCRIS, Ellisville, MO, USA), antagonista selectivo del receptor AMPA/kainato; MK801 ó Dizocilpina (5-metil-10,11 - dihidro-5H-dibenzo [a, d] ciclohepteno-5,10-imina maleato; TOCRIS, Ellisville, MO, USA), antagonista no selectivo del receptor NMDA y A841714 (9-(Dimetilamino)-3-(hexahidro-1H-azepin-1-il)pirido[3',2':4,5]tieno[3,2-d]pirimidin-4(3-H)-ona; TOCRIS, Ellisville, MO, USA) antagonista selectivo del receptor glutamatérgico metabotrópico 1 (mGluR1).

### Administración de los fármacos

Las ratas se inmovilizaron para la administración periférica subcutánea de los vehículos y los antagonistas CNQX 0.4-40 nM en post-tratamiento y 40nM en pre-tratamiento; MK801 3-30 nM en post-tratamiento y 30 nM en pre-tratamiento y A841720 10-100 nM en post-tratamiento y 100 nM en pre-tratamiento. Los fármacos y vehículos se administraron en un volumen de 50 µl con ayuda de una jeringa 30G en el dorso de la planta derecha. En la administración intratecal se utilizó un volumen de 10 µl para todos los fármacos con ayuda de una jeringa 27G conectada a un tubo de polietileno PE-50. Las ratas fueron inmovilizadas y se administraron los antagonistas CNQX (0.01-1 nM); MK801 (0.3-30 nM) y A841720 (10-100 nM) en post-tratamiento y CNQX 1 nM,

MK801 3 nM y A841720 40 nM en pre-tratamiento. Para la administración en el nDr, las ratas se anestesiaron con isoflurano al 5%. Los antagonistas CNQX 4 nM, MK801 3 nM y A841720 4 nM en post- y pre-tratamiento fueron microinyectados con una cánula interna 33G insertada en la cánula guía. La cánula interna estuvo conectada por un tubo de polietileno PE-10 a una jeringa Hamilton 10 µl. Todos los fármacos y vehículos se administraron en un volumen de 2.5 µl en un periodo de 90 seg.

## **Inmunohistoquímica**

Los sujetos utilizados para la inmunohistoquímica fueron: ratas intactas (n=6), ratas administradas subcutáneamente con formalina 1% (n=6) o solución salina (n=6), así como ratas de los grupos de pre-tratamiento en el núcleo dorsal reticular con solución salina (n=3), etanol 20% (n=3), o los antagonistas: CNQX (n=6), MK 801 (n=6) y A841720 (n=6).

Las ratas se sacrificaron por decapitación para la extracción de la médula espinal el día 6 posterior a la inyección de formalina, dos horas después de la estimulación con los filamentos de von Frey. La médula espinal se colocó en una solución de paraformaldehído al 4% por 24 horas. Después se cambiaron a una solución con sacarosa al 15% por 24 horas. Posteriormente se pasaron a una solución con sacarosa al 30% por 24 horas. Al término de esas horas, se cortaron las médulas en la región lumbar (L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub>) en secciones de 40 µm con ayuda de un crióstato a -20°C.

Se pasaron los cortes a PBS e inmediatamente se inhibió la peroxidasa endógena con ácido peróxido 0.28% por 1 minuto y se pasaron a H<sub>2</sub>O bidestilada por 5 minutos. Posteriormente se lavaron en PBS 3 veces. Cada lavado fue por 5 minutos. Se incubaron en una mezcla de PBS más albúmina (2.5%) y Triton x-100 (0.1%) durante 24 horas a 4° C. Después se incubó el anticuerpo primario anti c-Fos (1:500) por 48 hrs. Se lavó en PBS 3 veces por 5 minutos cada lavado. Luego se incubó en el anticuerpo secundario biotinilado (1:250) por 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó de nuevo en PBS 3 veces por 5 minutos cada uno. Se elaboró el complejo streptoavidina-peroxidasa con el kit de Vector con 2 gotas de A y 2 gotas de B en 5ml de PBS y se dejó 30 minutos. Posteriormente, los cortes se incubaron en este complejo por 30 minutos. Se lavaron en PBS 3 veces cada uno por 5 minutos. Se revelaron en una solución de revelado con PBS, DAB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se lavaron en PBS. Por último, se montaron en laminillas para su observación.



## **Cuantificación de células positivas a c-Fos**

Seis secciones de cada una de las médulas en la región lumbar (L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub>) se fotografiaron usando un objetivo de 10x en un microscopio Leica (DM6000 B), utilizando el software de LASAF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence, versión 2.1.0). Se trazaron manualmente los grupos de las láminas I-II, III y IV-V en los lados ipsilateral y contralateral a la inyección subcutánea de formalina con ayuda de una planilla. El agrupamiento fue acorde a un estudio en el que analizan la activación de c-Fos en la médula espinal y regiones supraespinales en el dolor inflamatorio agudo y crónico (Pinto et al., 2007). Los grupos de láminas fueron separados y contados con ayuda del software de análisis ImageJ (NIH). Los agrupamientos laminares trazados se convirtieron en imágenes de máscara binaria con los agrupamientos laminares en azul con un fondo rosa. Los núcleos positivos a c-Fos fueron identificados y contados automáticamente en cada una de las imágenes. Después se unió la imagen del conteo automático y la imagen de máscara binaria original y se comprobó que el conteo automático haya incluido todos los núcleos positivos. De no ser así, los núcleos positivos a c-Fos no incluidos se contaron manualmente y se sumaron al conteo automático.

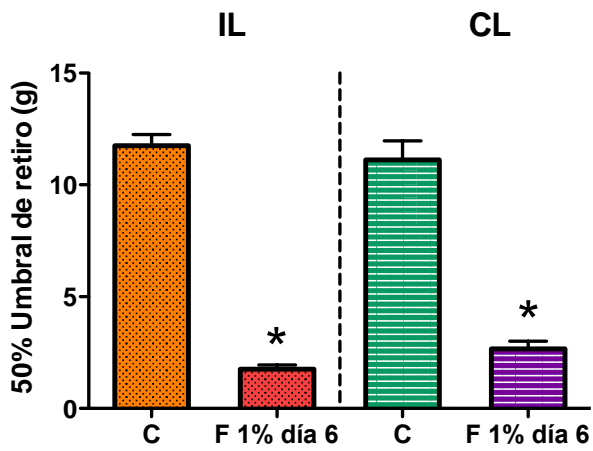
## **Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como la media del valor del retiro de la pata y el error estándar de cada grupo experimental (n=6). De los datos obtenidos se realizaron gráficas de barras representando el valor de retiro de la pata de 0 a 15. Asimismo, se graficó el área bajo la curva de los cursos temporales obtenida por el método de los trapecoides. Para comparar tres o más grupos experimentales se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnett para los grupos de post-tratamiento y la prueba de Tukey para los grupos de pre-tratamiento. Una  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativa.

## RESULTADOS

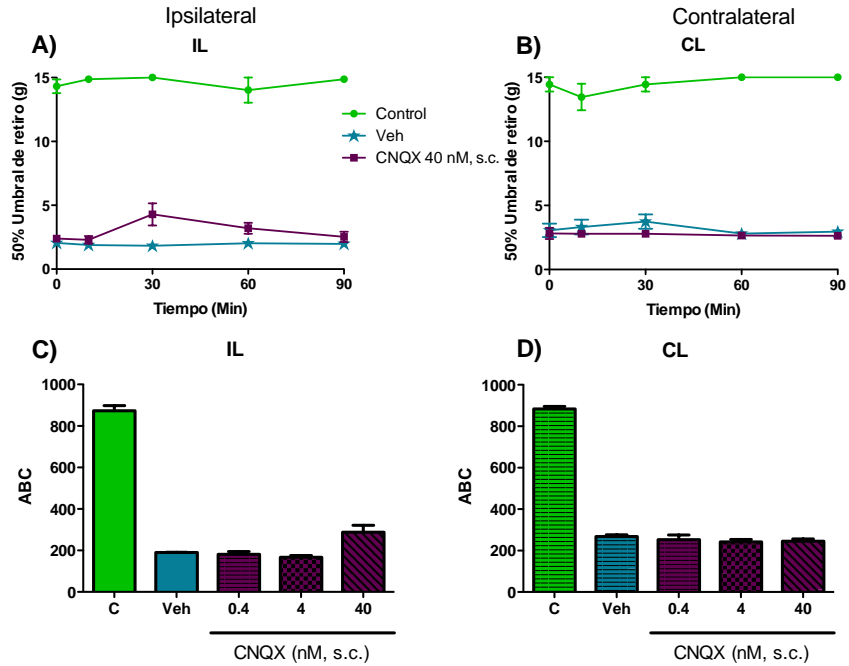
### Post- tratamiento periférico de los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5

Los resultados muestran que en ratas tratadas con la inyección con formalina al 1% en la pata derecha de la rata (ipsilateral) disminuyó el umbral de retiro de forma significativa en ambas patas al sexto día con respecto al grupo de ratas intactas (control) (Gráf. 1).

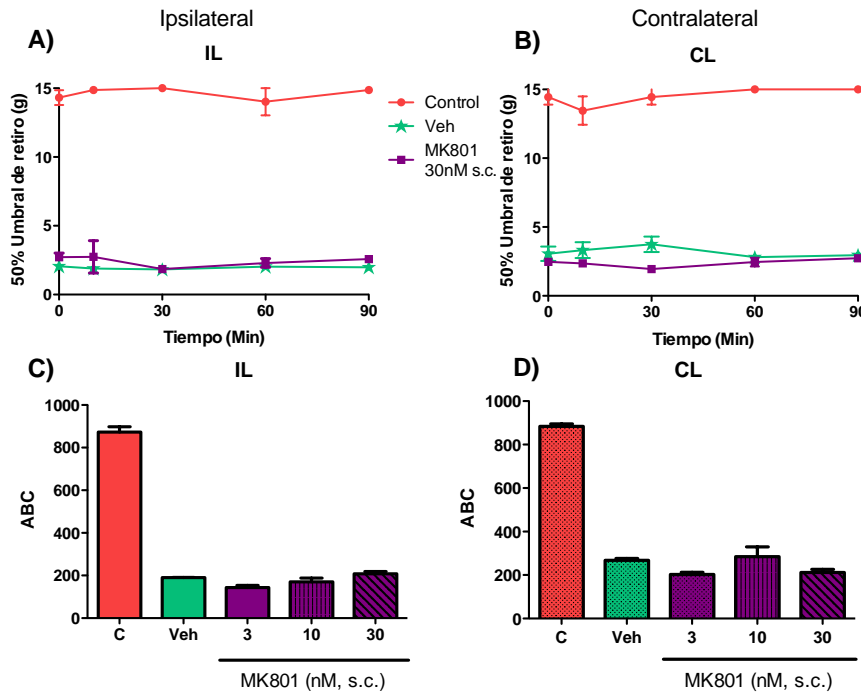


GRÁFICA 1 EFECTO DE LA INYECCIÓN DE FORMALINA AL 1% (F 1% DÍA 6) Y EN RATAS INTACTAS (C) EN EL UMBRAL DE RETIRO DE LAS PATAS IPSILATERAL (IL) Y CONTRALATERAL (CL) EVALUADO EL SEXTO DÍA. \* $p < 0.05$  VS. CONTROL, PRUEBA T (N=6).

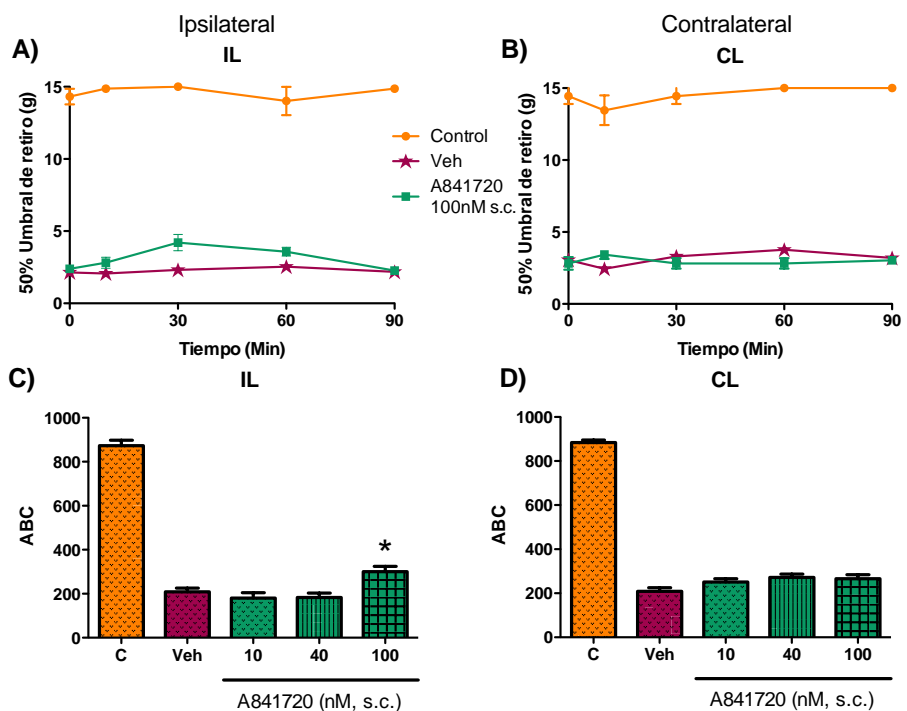
Por otro lado, en la Gráf. 2. se indica que el grupo tratado con el vehículo no modificó la alodinia inducida por la administración de formalina y tiene una diferencia significativa con el grupo control ( $p < 0.05$ ). Asimismo, se observó que el tratamiento con el antagonista CNQX (0.4-40 nM, s.c.) o con MK-801 (3-30 nM, s.c.) no mostró una diferencia significativa respecto al grupo administrado con el vehículo durante los 90 minutos de evaluación (Gráf. 2 y 3). El área bajo la curva (ABC) demostró que el grupo tratado con el antagonista A841720 (100 nM) reduce la alodinia mecánica en la pata ipsilateral de forma significativa respecto al ABC del vehículo ( $p < 0.05$ ) (Gráf. 4).



GRÁFICA 2 EFECTO DEL POST-TRATAMIENTO PERIFÉRICO (S.C) CON EL ANTAGONISTA CNQX. A) Y B) CURSO TEMPORAL DEL RETIRO DE LA PATA IPSILATERAL O CONTRALATERAL EN RATAS CONTROL, CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y CON TRATAMIENTO DEL ANTAGONISTA EN LA DOSIS MÁS ALTA (CNQX, 40NM). C) Y D) REPRESENTACIÓN EN ÁREA BAJO LA CURVA DEL CURSO TEMPORAL DE LOS GRUPOS CONTROL (C), CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y LAS DIFERENTES DOSIS DEL ANTAGONISTA CNQX (0.4, 4 Y 40NM) (N=6).



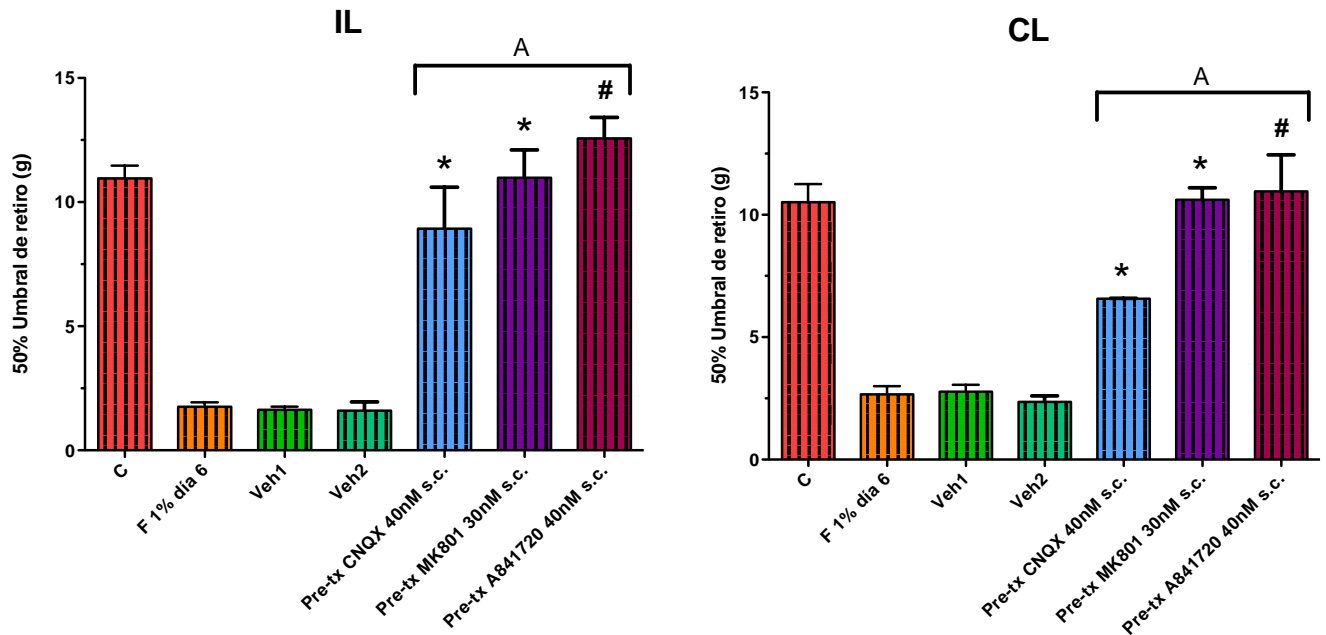
GRÁFICA 3 EFECTO DEL POST-TRATAMIENTO PERIFÉRICO (S.C.) DEL ANTAGONISTA MK801. A) Y B) CURSO TEMPORAL DEL RETIRO DE LA PATA IPSILATERAL O CONTRALATERAL EN RATAS CONTROL, CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y CON TRATAMIENTO DEL ANTAGONISTA EN LA DOSIS MÁS ALTA (MK801, 30NM). C) Y D) REPRESENTACIÓN EN ÁREA BAJO LA CURVA DEL CURSO TEMPORAL DE LOS GRUPOS CONTROL (C), CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y LAS DIFERENTES DOSIS DEL ANTAGONISTA MK801 (3, 10 Y 30NM) (N=6).



GRÁFICA 4 EFECTO DEL POST-TRATAMIENTO PERIFÉRICO (S.C.) DEL ANTAGONISTA A841720. A) Y B) CURSO TEMPORAL DEL RETIRO DE LA PATA IPSILATERAL O CONTRALATERAL EN RATAS CONTROL, CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y CON TRATAMIENTO DEL ANTAGONISTA EN LA DOSIS MÁS ALTA (A841720, 100NM). C) Y D) REPRESENTACIÓN EN ÁREA BAJO LA CURVA DEL CURSO TEMPORAL DE LOS GRUPOS CONTROL (C), CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y EL TRATAMIENTO CON LAS DIFERENTES DOSIS DEL ANTAGONISTA A841720 (10, 40 Y 100NM)(N=6).

## Pre-tratamiento periférico de los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5

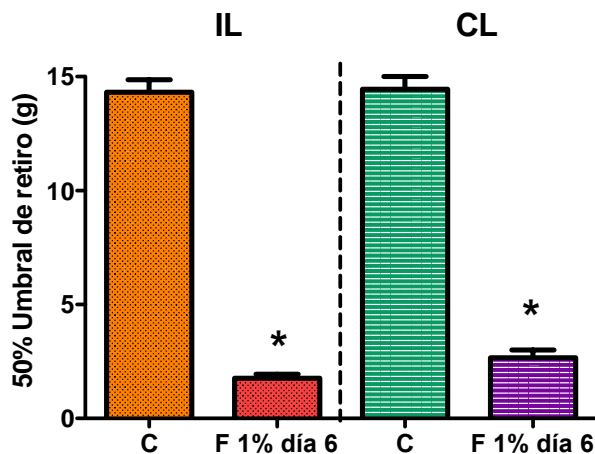
En la Gráf. 5 se muestran los resultados obtenidos del pre-tratamiento (-10 min) con los diferentes antagonistas o vehículos (al día 6). El pre-tratamiento con salina (Veh1) o etanol al 20% (Veh2) no bloqueó el establecimiento de alodinia secundaria después de la inyección de formalina y los valores fueron semejantes al grupo de formalina (F 1% día 6). En contraste, los antagonistas A841720 (40 nM), MK-801 (30 nM) o CNQX (40 nM) previnieron el desarrollo de alodinia secundaria en las ratas ( $p < 0.05$ , vs. Vehículo), manteniendo los valores previos a la inyección de formalina (control). Igualmente, se observó que los pre-tratamientos con los antagonistas tienen una diferencia significativa vs. F 1% al día 6 ( $p < 0.05$ ).



GRÁFICA 5 EFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO PERIFÉRICO (S.C.) CON LOS ANTAGONISTAS CNQX (40NM), MK801 (30NM) Y A841720 (40NM). GRUPO CONTROL (C), RATAS CON FORMALINA AL 1% EN EL SEXTO DÍA (F 1% DÍA 6). \*  $p < 0.05$  vs. VEH1, ANOVA SEGUIDA DE TUKEY (N=6); #  $p < 0.05$  vs. VEH2, ANOVA SEGUIDA DE TUKEY (N=6); A  $p < 0.05$  vs. F1% DÍA 6, ANOVA SEGUIDA DE TUKEY (N=6).

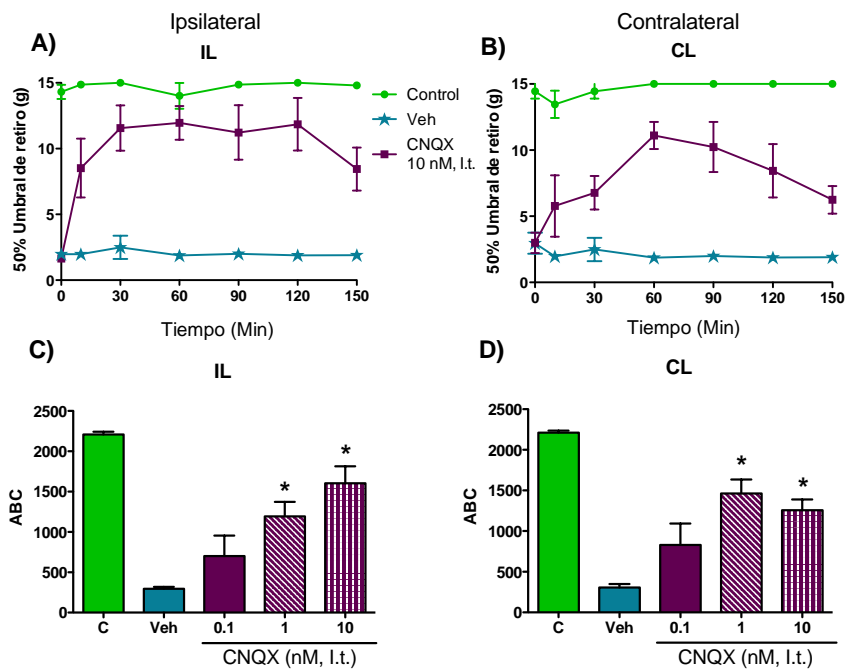
## Post- tratamiento espinal de los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5

Los resultados obtenidos indican que el umbral de retiro (día 6) de ratas operadas para la canulación intratecal y ratas tratadas con la inyección con formalina al 1% fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ).

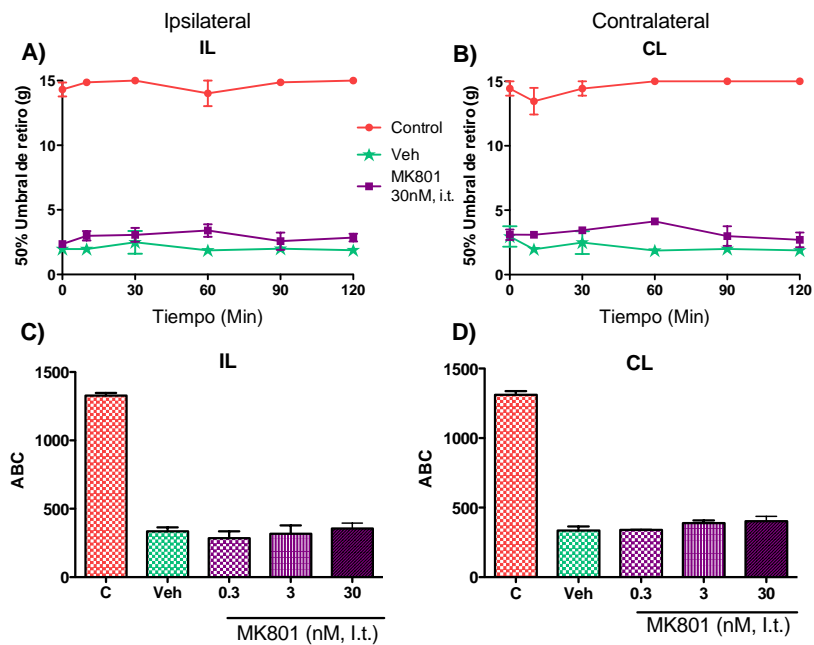


GRÁFICA 6 EFECTO DE LA INYECCIÓN DE FORMALINA AL 1% (F 1% DÍA 6) Y EN RATAS OPERADAS (C) EN EL UMBRAL DE RETIRO DE LA PATA IPSILATERAL (IL) O CONTRALATERAL (CL) EVALUADO EL SEXTO DÍA. \* $p < 0.05$  VS. CONTROL, PRUEBA T (N=6).

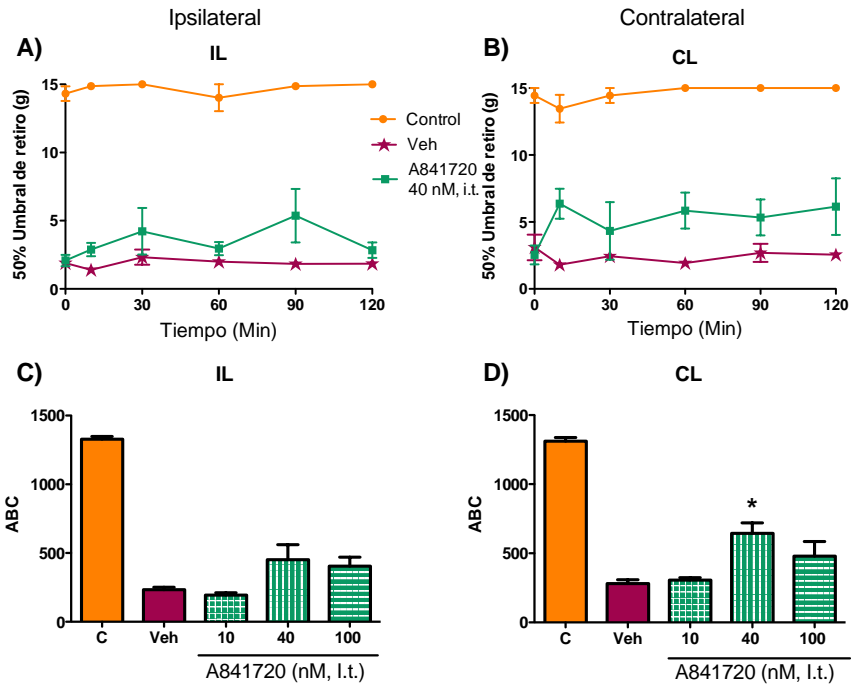
El grupo administrado con los vehículos no modificó la alodinia inducida por la formalina y tiene una diferencia significativa con el grupo control ( $p < 0.05$ ). El tratamiento con los antagonistas MK-801 (0.3-30 nM) y A841720 (0.01-10 nM) no fue significativamente diferente respecto al grupo tratado con los vehículos a lo largo del periodo de evaluación (Gráfs. 8 y 9). En cambio, como demuestran las ABC de CNQX y el vehículo, el grupo administrado con el antagonista CNQX (1-10 nM) redujo la alodinia mecánica en ambas patas de la rata de manera significativa hasta por dos horas ( $p < 0.05$ ) (Gráf. 7).



GRÁFICA 7 EFECTO DEL POST-TRATAMIENTO INTRATECAL (I.T) CON EL ANTAGONISTA CNQX. A) Y B) CURSO TEMPORAL DEL RETIRO DE LA PATA IPSILATERAL O CONTRALATERAL EN RATAS CONTROL, CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y CON TRATAMIENTO DEL ANTAGONISTA EN LA DOSIS MÁS ALTA (CNQX, 10NM). C) Y D) REPRESENTACIÓN EN ÁREA BAJO LA CURVA DEL CURSO TEMPORAL DE LOS GRUPOS CONTROL (C), CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y LAS DIFERENTES DOSIS DEL ANTAGONISTA CNQX (0.1, 1 Y 10NM). \* P<0.05, ANOVA SEGUIDA DE DUNNETT (N=6).



GRÁFICA 8 EFECTO DEL POST-TRATAMIENTO INTRATECAL (I.T.) DEL ANTAGONISTA MK801. A) Y B) CURSO TEMPORAL DEL RETIRO DE LA PATA IPSILATERAL O CONTRALATERAL EN RATAS CONTROL, CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y CON TRATAMIENTO DEL ANTAGONISTA EN LA DOSIS MÁS ALTA (MK801, 30NM). C) Y D) REPRESENTACIÓN EN ÁREA BAJO LA CURVA DEL CURSO TEMPORAL DE LOS GRUPOS CONTROL (C), CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y LAS DIFERENTES DOSIS DEL ANTAGONISTA MK801 (0.3, 3 Y 30NM) (N=6).

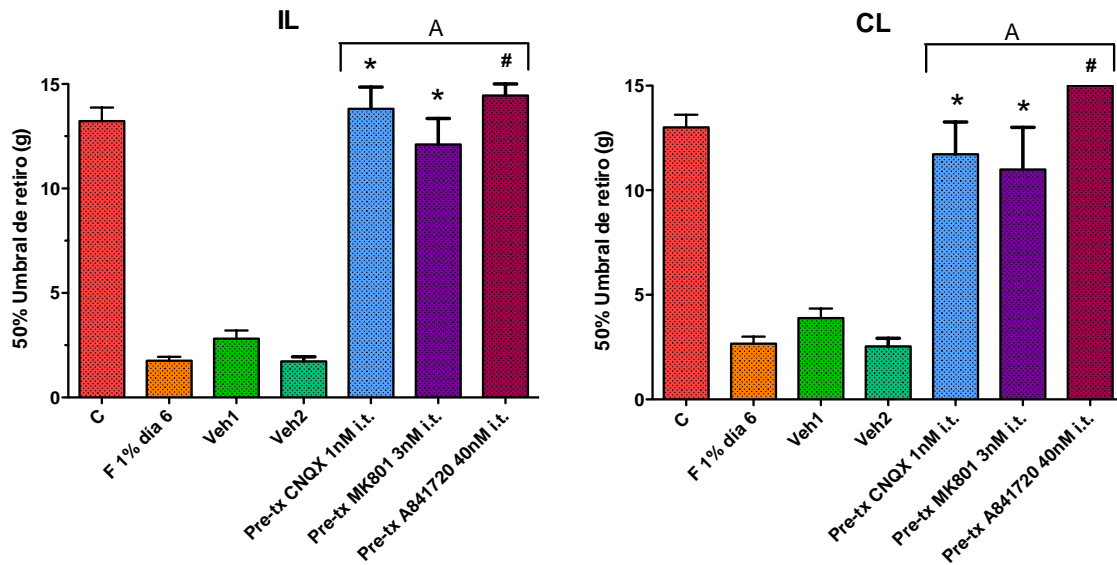


GRÁFICA 9 EFECTO DEL POST-TRATAMIENTO INTRATECAL (I.T.) DEL ANTAGONISTA A841720. A) Y B) CURSO TEMPORAL DEL RETIRO DE LA PATA IPSILATERAL O CONTRALATERAL EN RATAS CONTROL, CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y CON TRATAMIENTO DEL ANTAGONISTA EN LA DOSIS MÁS ALTA (A841720, 100nM). C) Y D) REPRESENTACIÓN EN ÁREA BAJO LA CURVA DEL CURSO TEMPORAL DE LOS GRUPOS CONTROL (C), CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y EL TRATAMIENTO CON LAS DIFERENTES DOSIS DEL ANTAGONISTA A841720 (10, 40 Y 100nM) (N=6).



## Pre-tratamiento espinal con los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5

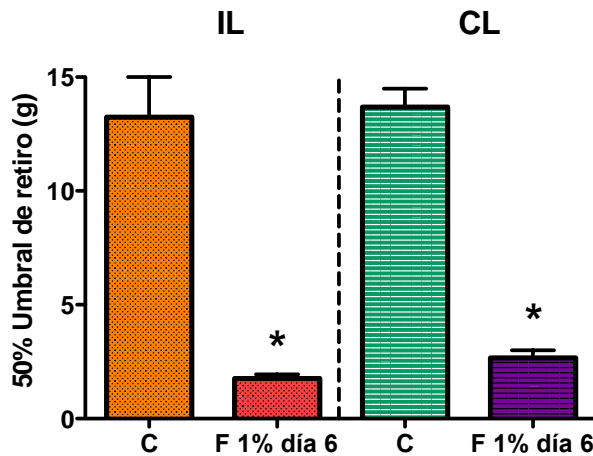
En la Gráf. 10 se muestran los resultados obtenidos de los grupos administrados con los vehículos y los diferentes antagonistas (-10 min). El grupo de formalina (F 1% día 6) y el pre-tratamiento con salina (Veh1) o etanol al 20% (Veh2) no mostraron diferencia significativa, indicando que los vehículos no influyeron en el desarrollo de la alodinia mecánica. Por el contrario, los antagonistas A841720 (40 nM), MK-801 (3 nM) o CNQX (1 nM) previnieron el establecimiento de la alodinia secundaria ( $p < 0.05$ , vs. Vehículo), alcanzando umbrales de retiro semejantes a ratas control. Además, los pre-tratamientos con los antagonistas tuvieron una diferencia significativa vs. F 1% al día 6 ( $p < 0.05$ ).



GRÁFICA 10 EFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO INTRATECAL (i.t.) CON LOS ANTAGONISTAS CNQX (1nM), MK801 (3nM) Y A841720 (40nM). GRUPO CONTROL (C), RATAS CON FORMALINA AL 1% EN EL SEXTO DÍA (F 1% DÍA 6) \*  $p < 0.05$  vs. VEH1, #  $p < 0.05$  vs. VEH2, A  $p < 0.05$  vs. F1% DÍA 6; ANOVA SEGUIDA DE TUKEY (N=6).

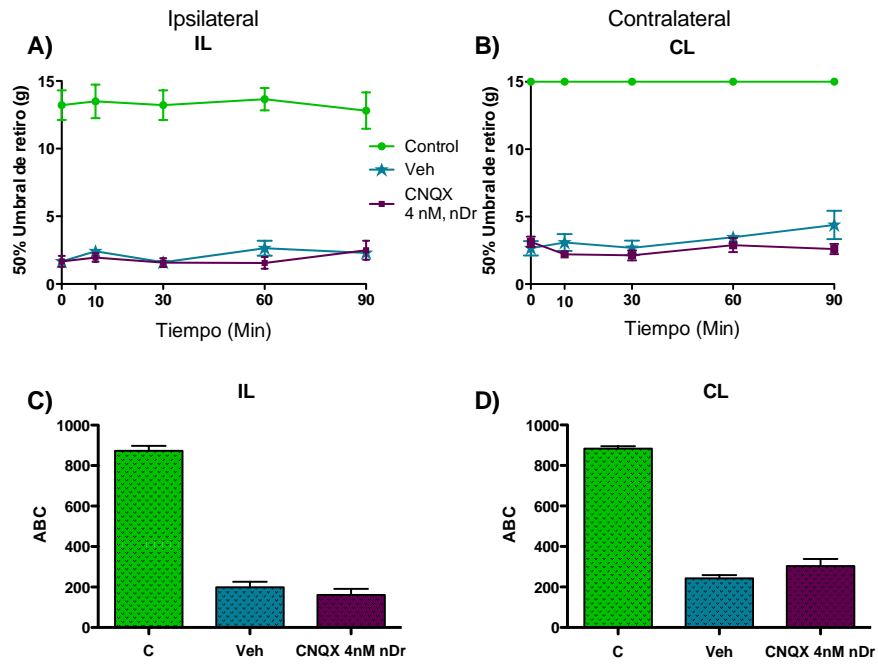
## Post- tratamiento en el nDr de los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5

Los resultados obtenidos demuestran que en ratas administradas con formalina al 1% disminuyó significativamente el umbral de retiro evaluado al día seis con respecto a ratas canuladas en el nDr (control) (Gráf. 11).

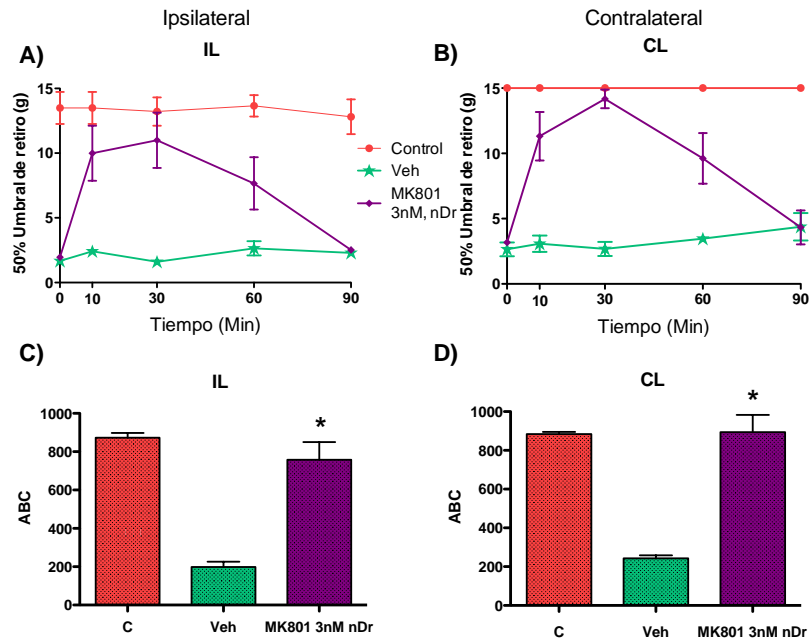


GRÁFICA 11 EFECTO DE LA INYECCIÓN DE FORMALINA AL 1% (F 1% DÍA 6) Y EN RATAS OPERADAS (C) EN EL UMBRAL DE RETIRO DE LAS PATAS IPSILATERAL (IL) O CONTRALATERAL (CL) EVALUADO EL SEXTO DÍA. \* $p < 0.05$  vs. CONTROL, PRUEBA T (N=6).

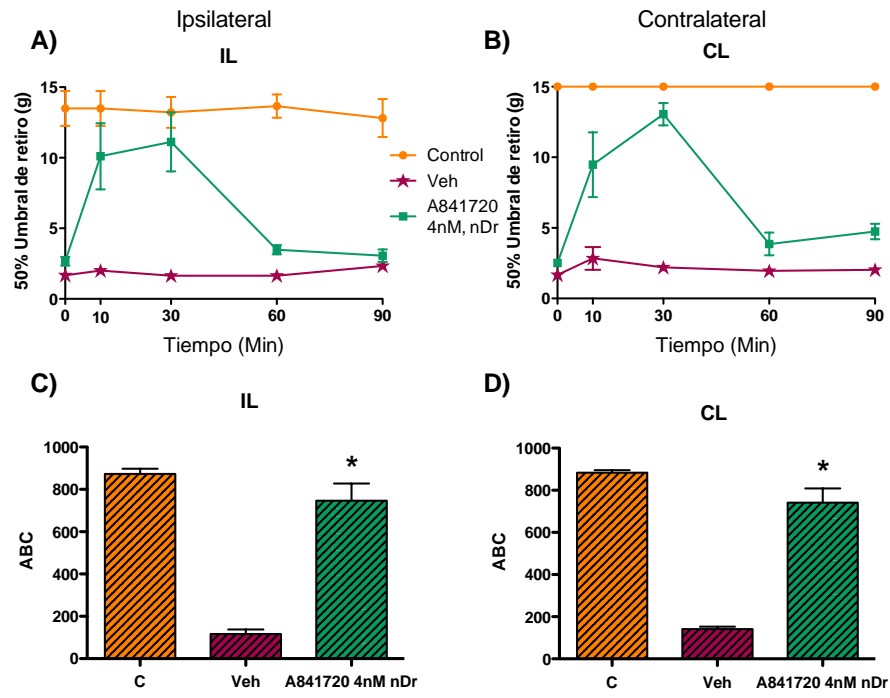
La administración de los vehículos no intervino en el establecimiento de la alodinia inducida por formalina y fue significativamente diferente al grupo control ( $p < 0.05$ ). El grupo tratado con el antagonista CNQX (3 nM) no mostró una diferencia significativa respecto al tratamiento con el vehículo en los 120 minutos de evaluación (Gráf. 12). En contraste, las ABC's de los grupos administrados con los antagonistas MK-801 (3 nM) y A841720 (4 nM) demuestran que éstos redujeron la alodinia secundaria en ambas patas de forma significativa en relación a las ABC's de los vehículos ( $p < 0.05$ ) (Gráfs. 12 y 13).



GRÁFICA 12 EFECTO DEL POST-TRATAMIENTO EN EL NÚCLEO DORSAL RETICULAR (nDr) DEL ANTAGONISTA CNQX. A) Y B) CURSO TEMPORAL DEL RETIRO DE LA PATA IPSILATERAL O CONTRALATERAL EN RATAS CONTROL, CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y CON TRATAMIENTO DEL ANTAGONISTA (CNQX, 4nM). C) Y D) REPRESENTACIÓN EN ÁREA BAJO LA CURVA DEL CURSO TEMPORAL DE LOS GRUPOS CONTROL (C), CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y EL ANTAGONISTA CNQX (4nM) (N=6).



GRÁFICA 13 EFECTO DEL POST-TRATAMIENTO EN EL NÚCLEO DORSAL RETICULAR (nDr) DEL ANTAGONISTA MK801. A) Y B) CURSO TEMPORAL DEL RETIRO DE LA PATA IPSILATERAL O CONTRALATERAL EN RATAS CONTROL, CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y CON TRATAMIENTO DEL ANTAGONISTA (MK801, 3nM). C) Y D) REPRESENTACIÓN EN ÁREA BAJO LA CURVA DEL CURSO TEMPORAL DE LOS GRUPOS CONTROL (C), CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y EL ANTAGONISTA MK801 (3nM). \* P<0.05 vs. Veh; ANOVA SEGUIDA DE DUNNETT (N=6).

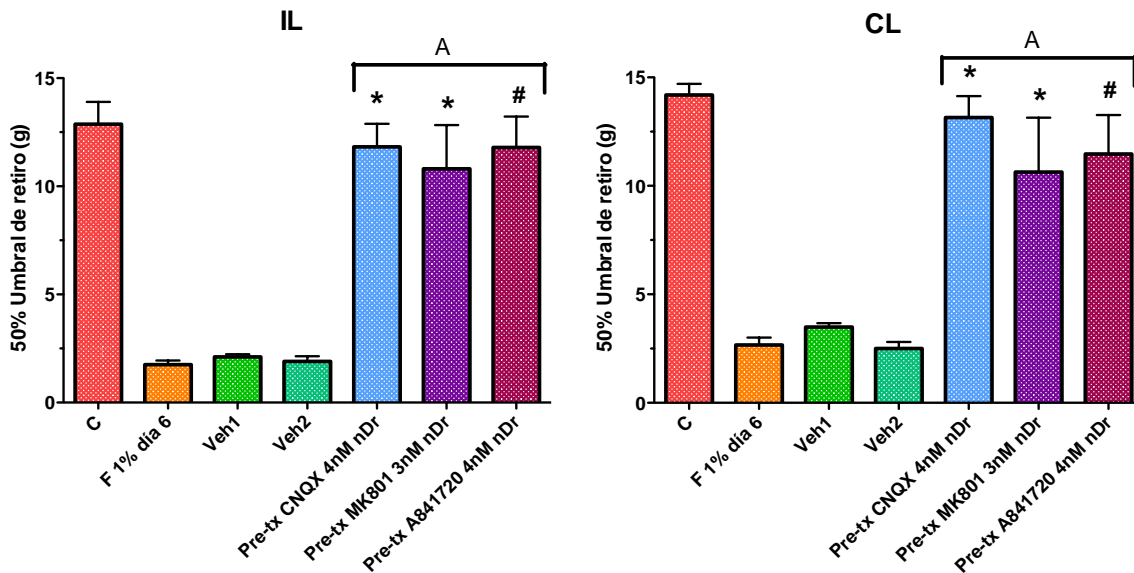


GRÁFICA 14 EFECTO DEL POST-TRATAMIENTO EN EL NÚCLEO DORSAL RETICULAR (NDR) DEL ANTAGONISTA A841720. A) Y B) CURSO TEMPORAL DEL RETIRO DE LA PATA IPSILATERAL O CONTRALATERAL EN RATAS CONTROL, CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y CON TRATAMIENTO DEL ANTAGONISTA (A841720, 4nM). C) Y D) REPRESENTACIÓN EN ÁREA BAJO LA CURVA DEL CURSO TEMPORAL DE LOS GRUPOS CONTROL (C), CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO (VEH) Y EL TRATAMIENTO DEL ANTAGONISTA A841720 (4nM). \*  $p < 0.05$  vs. VEH, ANOVA SEGUIDA DE DUNNETT (N=6).

## Pre-tratamiento en el nDr de los antagonistas de los receptores AMPA/ka, NMDA y mGluR1/5

Efecto de la administración en el nDr de los antagonistas glutamatérgicos en la conducta nociceptiva inducida por formalina

Los resultados del umbral de retiro obtenidos el sexto día del pre-tratamiento (-10 min) con los diferentes antagonistas o vehículos se muestran en la gráf. 15. El pre-tratamiento con salina (Veh1) o etanol al 20% (Veh2) no previno el desarrollo de la alodinia mecánica después de la inyección de formalina ya que el efecto fue semejante al grupo de formalina (F 1% día 6). Al contrario, los antagonistas A841720 (4 nM), MK-801 (3 nM) o CNQX (4 nM) previnieron el desarrollo de alodinia secundaria en las ratas ( $p < 0.05$ , vs. Vehículo) alcanzando los valores previos a la inyección de formalina (control). Asimismo, hubo una diferencia significativa en los pre-tratamientos con los antagonistas vs. F 1% al día 6 ( $p < 0.05$ ).



GRÁFICA 15 EFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO EN EL NÚCLEO DORSAL RETICULAR (nDr) CON LOS ANTAGONISTAS CNQX (4nM), MK801 (3nM) Y A841720 (4nM). GRUPO CONTROL (C), RATAS CON FORMALINA AL 1% EN EL SEXTO DÍA (F 1% DÍA 6) \*  $p < 0.05$  vs. VEH1, #  $p < 0.05$  vs. VEH2, A  $p < 0.05$  vs. F1% DÍA 6; ANOVA SEGUIDA DE TUKEY (N=6).

## Efecto de la administración en el nDr de los antagonistas glutamatérgicos en la expresión de c-Fos en la médula espinal seis días después de la inyección de formalina

Las neuronas inmunoreactivas a Fos (IR-Fos) distribuidas en las láminas I-V del asta dorsal espinal se identificaron por el precipitado de color marrón oscuro a la reacción de DAB (Fig. 17). En los animales inyectados con solución salina (S.S.), el número de las neuronas IR-Fos fue similar a las ratas intactas en todas las láminas analizadas. En cambio, en los animales administrados con formalina 1% se observó un aumento significativo en el número de neuronas IR-Fos en las tres áreas analizadas (Gráf. 16).

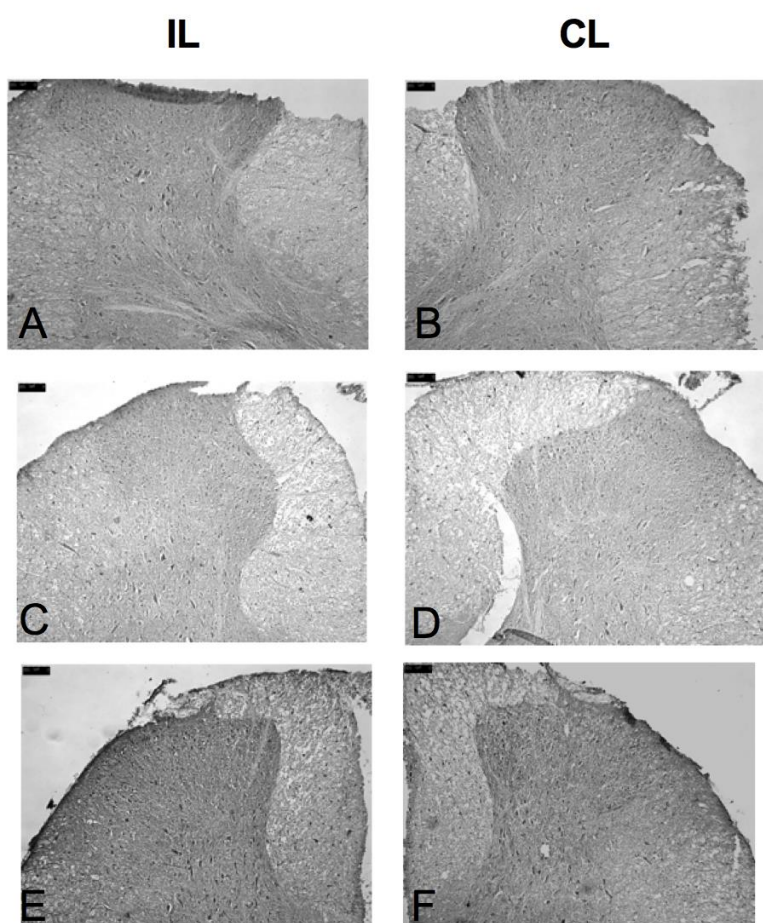
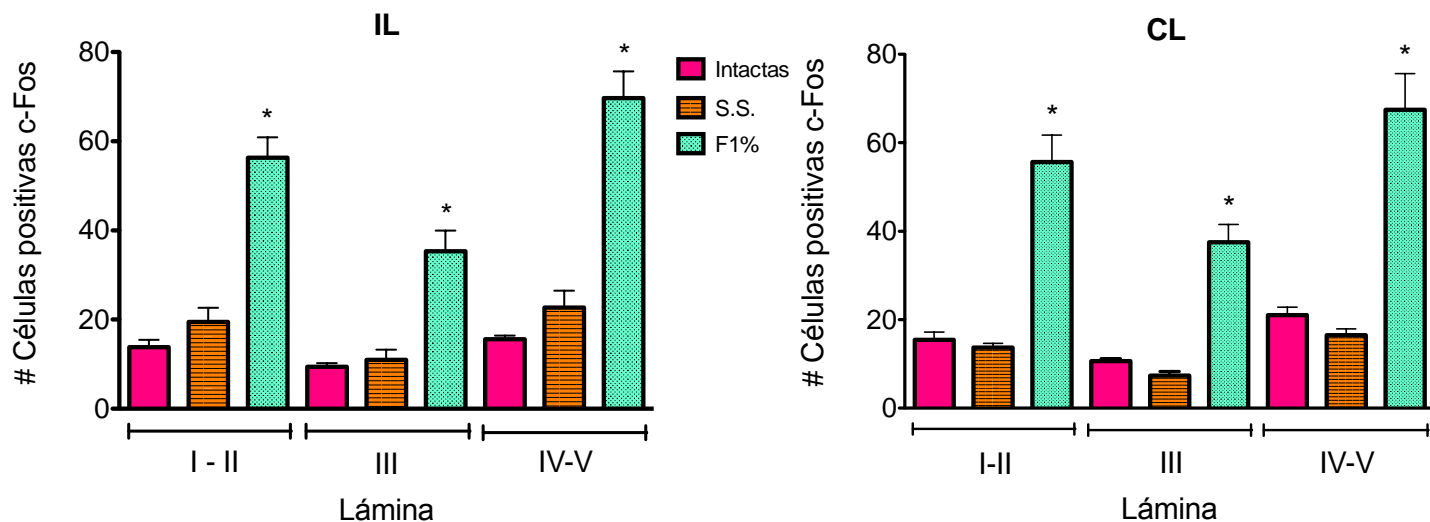


FIGURA 17 INMUNOHISTOQUÍMICA REPRESENTATIVA DE LA EXPRESIÓN DE c-FOS EN EL ASTA DORSAL ESPINAL DE RATAS CONTROL (A-B), INYECTADAS CON SALINA (C-D) O CON FORMALINA AL 1% (E-F). LA INMUNOHISTOQUÍMICA FUE REALIZADA 6 DÍAS DESPUÉS DE LA INYECCIÓN CON SALINA O FORMALINA. SE MUESTRAN LOS LADOS IPSILATERAL (IL) Y CONTRALATERAL (CL) A LA INYECCIÓN.



GRÁFICA 16 EXPRESIÓN DE c-FOS EN RATAS INTACTAS O 6 DÍAS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SOLUCIÓN SALINA (S.S.) O FORMALINA AL 1% (F1%), EN LAS LÁMINAS I-V EN EL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA ESPINAL IPSILATERAL (IL) Y CONTRALATERAL (CL) A LA INYECCIÓN. \*  $p < 0.05$ ; ANOVA SEGUIDA DE DUNNETT (N=6).

El número de neuronas IR-Fos en las láminas I-V en el asta dorsal aumentó drásticamente en animales inyectados con formalina 1% o pre-administrados con los vehículos. El grupo pre-tratado con el antagonista CNQX (4 nM) tuvo un número de neuronas IR-Fos en las láminas I-V significativamente menor ( $p < 0.05$ ) al grupo pre-tratado con el vehículo y al grupo con formalina 1% (Gráf. 17). Los grupos administrados previamente con los antagonistas MK-801 (3 nM) y A841720 (4 nM) tuvieron un número de neuronas positivas significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) en las láminas I-II y IV-V respecto al pre-tratamiento con el vehículo y al grupo sin tratamiento (Graf. 18 y 19). El número de neuronas positivas en la lámina III de los grupos pre-tratados con estos antagonistas son significativamente menores al grupo sin tratamiento. Sin embargo, no logran ser significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) al grupo pre-tratado con el vehículo.



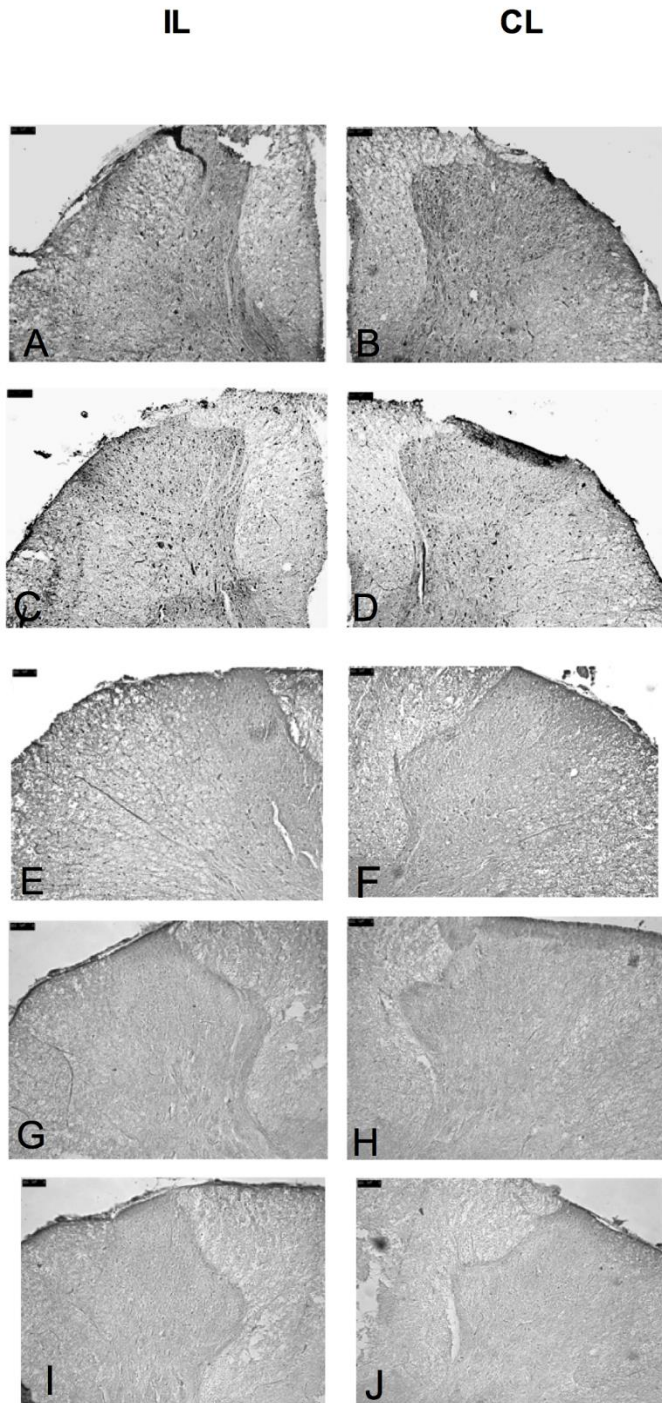
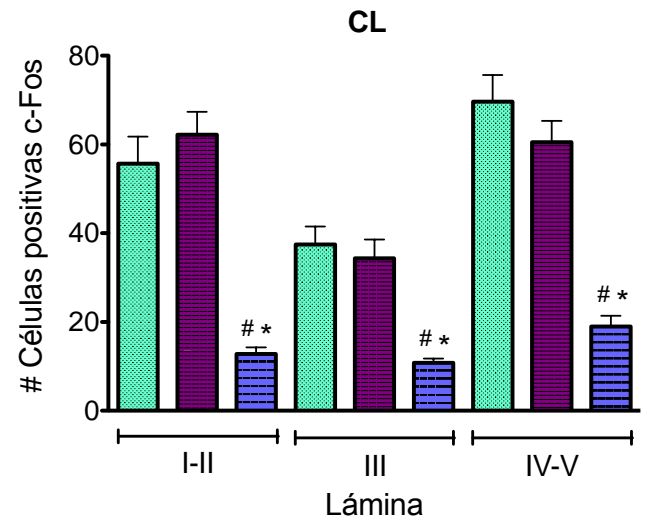
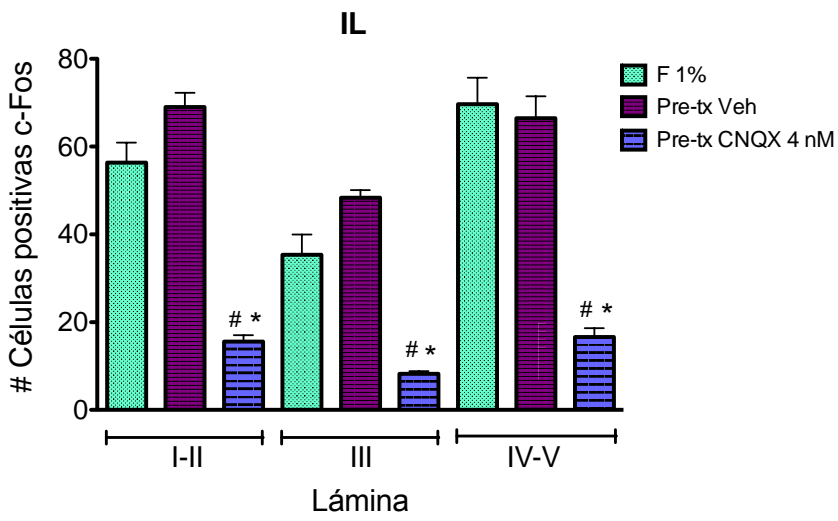
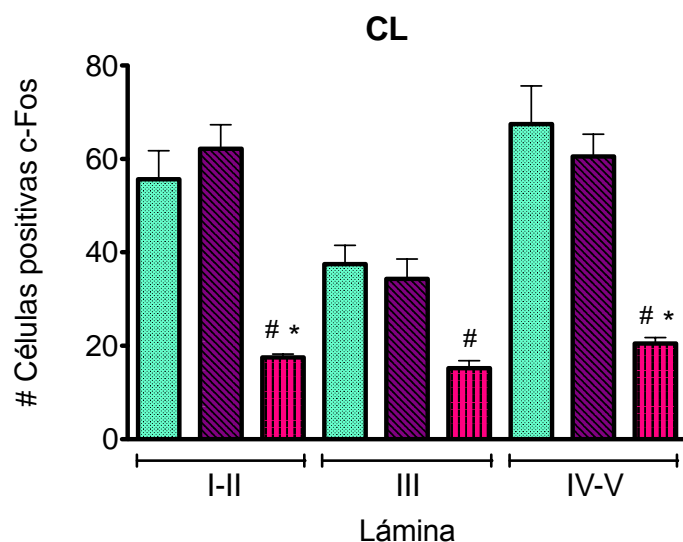
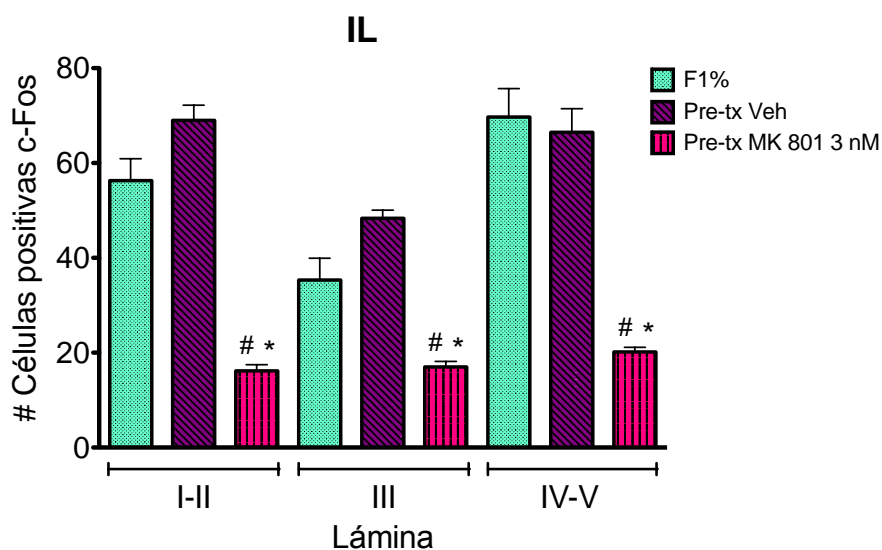


FIGURA 18 INMUNOHISTOQUÍMICA REPRESENTATIVA DE LA EXPRESIÓN DE C-FOS EN EL ASTA DORSAL ESPINAL 6 DÍAS DESPUÉS DE LA INYECCIÓN DE FORMALINA EN RATAS PRETRATADAS (10 MIN. ANTES) CON LA MICROINYECCIÓN EN EL NDR CON SALINA (A-B), ETANOL AL 20% (C-D), CNQX (E-F), MK-801 (G-H) O A841720 (I-J). LOS LADOS IPSILATERAL (IL) Y CONTRALATERAL (CL) A LA INYECCIÓN SON MOSTRADOS.

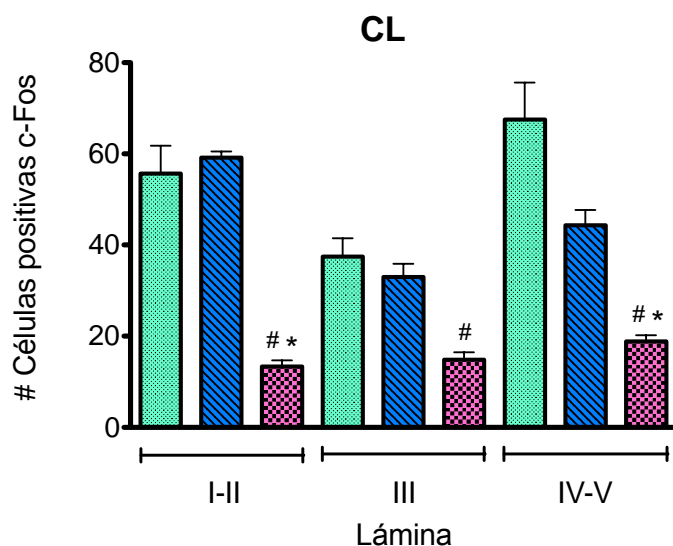
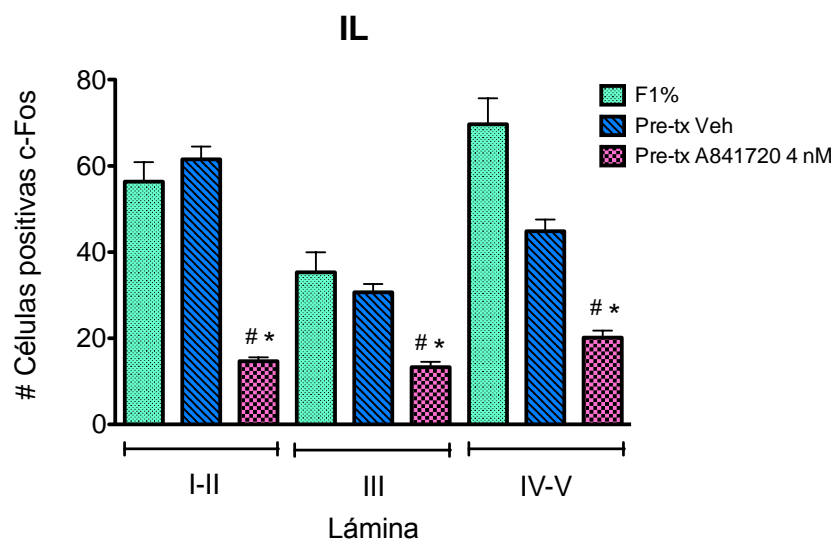




GRÁFICA 17 EFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO (-10 MIN.) CON EL ANTAGONISTA CNQX (4 nM) EN EL NÚCLEO DORSAL RETICULAR (NDR) EN LA EXPRESIÓN DE C-FOS EN LAS LÁMINAS I-V EN EL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA ESPINAL. IPSILATERAL (IL) Y CONTRALATERAL (CL) A LA INYECCIÓN DE FORMALINA 1%. RATAS CON FORMALINA AL 1% EN EL SEXTO DÍA (F 1%), GRUPO DEL PRE-TRATAMIENTO CON EL VEHÍCULO (PRE-TX VEH), GRUPO DEL PRE-TRATAMIENTO CON CNQX (PRE-TX CNQX). #  $p < 0.05$  vs. F1%, \*  $p < 0.05$  vs. VEH; ANOVA SEGUIDA DE TUKEY (N=6).



GRÁFICA 18 EFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO (-10 MIN.) CON EL ANTAGONISTA MK 801(3 nM) EN EL NÚCLEO DORSAL RETICULAR (NDR) EN LA EXPRESIÓN DE C-FOS EN LAS LÁMINAS I-V EN EL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA ESPINAL. IPSILATERAL (IL) Y CONTRALATERAL (CL) A LA INYECCIÓN DE FORMALINA 1%. RATAS CON FORMALINA AL 1% EN EL SEXTO DÍA (F 1%), GRUPO DEL PRE-TRATAMIENTO CON EL VEHÍCULO (PRE-TX VEH), GRUPO DEL PRE-TRATAMIENTO CON MK 801(PRE-TX MK 801). #  $p < 0.05$  vs. F1%, \*  $p < 0.05$  vs. VEH; ANOVA SEGUIDA DE TUKEY (N=6).



GRÁFICA 19 EFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO (-10 MIN.) CON EL ANTAGONISTA A841720 (4nM) EN EL NÚCLEO DORSAL RETICULAR (NDR) EN LA EXPRESIÓN DE C-FOS EN LAS LÁMINAS I-V EN EL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA ESPINAL. IPSILATERAL (IL) Y CONTRALATERAL (CL) A LA INYECCIÓN DE FORMALINA 1%. RATAS CON FORMALINA AL 1% EN EL SEXTO DÍA (F 1%), GRUPO DEL PRE-TRATAMIENTO CON EL VEHÍCULO (PRE-TX VEH), GRUPO DEL PRE-TRATAMIENTO CON CNQX (PRE-TX CNQX). #  $p < 0.05$  vs. F1%, \*  $p < 0.05$  vs. VEH; ANOVA SEGUIDA DE TUKEY (N=6).

## DISCUSIÓN

### **Post- tratamiento y pre-tratamiento periférico de los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5**

La prueba de formalina se considera un modelo de dolor inflamatorio agudo generado por un daño al tejido (Tjølsen et al., 1992). En este estudio, la administración de formalina al 1% disminuyó el umbral del retiro de la pata respecto a todos los grupos control, permitiendo evaluar el dolor moderado y continuo (Dubuisson & Dennis, 1977). Asimismo, está bien establecido que la inyección subcutánea de formalina en la pata trasera de la rata provoca una conducta nociceptiva que involucra actividad periférica predominante en las fibras C y sensibilización periférica y central (Tjølsen et al., 1992; Urban & Gebhart, 1999).

Los impulsos evocados por una lesión que viajan por las fibras aferentes primarias (FAP) inducen la liberación de glutamato desde las terminales periféricas de estas aferentes (Miller, Hoffman, Sutharshan, & Schechter, 2011). Se ha observado que varias subclases de los receptores glutamatérgicos están presentes en procesos periféricos de las FAP (Coggeshall & Carlton, 1998).

Cuando la sensibilización central resulta en un dolor inflamatorio, ésta depende fuertemente de la entrada de la señal (*input*) desde los nociceptores. Sin embargo, si la entrada nociceptiva se bloquea en la zona dañada, el desarrollo de la alodinia se interrumpe. Este estudio corrobora que la entrada periférica también influye en la sensibilización central asociada al dolor neuropático. El presente estudio demostró que los receptores periféricos glutamatérgicos en los axones cutáneos pueden ser manipulados para reducir el dolor con origen periférico. Se demostró que los receptores mGlu1/5 periféricos intervienen en la inducción y el mantenimiento del dolor neuropático. Mientras que los receptores NMDA y AMPA/Ka periféricos no contribuyen al mantenimiento pero sí a la inducción del dolor neuropático. Por lo tanto, la señalización periférica glutamatérgica puede ser un fenómeno general donde la activación de cada receptor AMPA, NMDA y el grupo I mGluR conlleva al incremento de la sensibilidad mecánica, mientras que el bloqueo de cualquiera de estos receptores puede prevenir completamente los efectos del glutamato. Esta observación sugiere que estos receptores no actúan completamente independiente para mediar la hipersensibilidad inducida por glutamato, pero probablemente éstos interactúen y funcionen a nivel molecular y del circuito neuronal.

## Receptores periféricos AMPA/Ka

Los receptores AMPA son activados en respuesta a un breve estímulo agudo y están involucrados en los eventos rápidos de la transmisión del dolor (Dickenson, 2003). El bloqueo o la pérdida de la función de la subunidad GluR1 en los nociceptores periféricos inhibe la hiperalgesia y la alodinia mecánica en el dolor inflamatorio ya que esta subunidad es requerida para los cambios de señalización del  $Ca^{++}$  (Luo, Seeburg, Sprengel, & Kuner, 2008). Además, aunque los receptores AMPA periféricos sean escasos, la hiperalgesia secundaria se reduce (Gangadharan et al., 2011). Evidencia de ello es que el bloqueo de los receptores AMPA con antagonistas, como CNQX, atenúa ciertas conductas nociceptivas de la fase tardía de la prueba de formalina (Davidson, Coggeshall, & Carlton, 1997). En este estudio el antagonista CNQX por vía periférica no logró aminorar la conducta nociceptiva, esta observación es consistente con otros resultados que muestran el dolor inflamatorio no disminuye con antagonistas del receptor AMPA/Ka en distintos modelos con irritantes, como el veneno de abeja (You, Chen, Morch, & Arendt-Nielsen, 2002) o el adyuvante completo de Freund (CFA) (Leem et al., 2001); así como en el modelo de lesión del nervio espinal L5 (L5 SNL) (Jang, Kim, Sang Nam, Se Paik, & Leem, 2004).

Este estudio demuestra que el antagonista CNQX previene la alodinia secundaria mediante el bloqueo de los receptores AMPA/Ka previo a la inyección de formalina. No obstante, no se han logrado los mismos resultados en otros modelos (Jang et al., 2004; You et al., 2002). Esto se puede deber al daño que producen los diferentes modelos, el tiempo de administración y el momento de evaluación, ya que algunos estudios evalúan el dolor inflamatorio agudo y otros el dolor neuropático. Los resultados de este estudio indican que los receptores AMPA y kainato están involucrados en la inducción pero no en el mantenimiento del dolor inflamatorio crónico inducido por formalina.

## Receptores periféricos NMDA

Los receptores NMDA están presentes en las fibras aferentes primarias (Coggeshall & Carlton, 1998) y la expresión se incrementa significativamente conforme a la progresión general de la inflamación persistente (Du, Zhou, Coggeshall, & Carlton, 2003). Hay estudios que han

demostrado la efectividad de los antagonistas a los receptores periféricos NMDA en modelos animales de inflamación y dolor neuropático (Aley & Levine, 2002; Du et al., 2003; Jang et al., 2004; Leem et al., 2001; Taniguchi et al., 1997; You et al., 2002). En el presente estudio se demostró que los receptores periféricos NMDA son necesarios para la inducción del dolor inflamatorio, ya que la administración periférica de MK-801 previa a la inyección de formalina detiene el desarrollo de la alodinia secundaria. Igualmente, estos resultados han sido presentados en diversas investigaciones en otros modelos de nocicepción (Davidson et al., 1997; Jang et al., 2004; You et al., 2002). Se ha reportado que la administración pre-tratamiento y post- tratamiento de estos antagonistas ha sido efectiva, sugiriendo que la inducción y mantenimiento de estos estados de dolor continuo son dependientes de eventos mediados por los receptores NMDA (Berrino et al., 2003). El presente estudio comprobó que los antagonistas de receptores periféricos NMDA reducen la iniciación o el desarrollo de los cambios centrales producidos por la inyección de formalina, pero no el mantenimiento de estos cambios, una vez que éstos se han desarrollado (Berrino et al., 2003) ya que el post-tratamiento periférico con el antagonista MK-801 no logra disminuir la alodinia secundaria inducida por formalina.

## Receptores periféricos mGlu1/5

Investigaciones en años pasados han llevado a la conclusión de que el grupo I de los receptores metabotrópicos tienen un papel pro-nociceptivo. Roles específicos de los mGluR1/5 en la modulación de la nocicepción han sido identificados en la periferia, en la médula espinal, el cerebelo, el tálamo, la corteza y la amígdala (Goudet et al., 2009).

El grupo I de los mGluR's están expresados en las terminales de los nociceptores en la periferia y su activación produce hiperalgesia mientras que el bloqueo o el *knockdown* de éstos inhibe la transmisión espinal y reduce la hiperalgesia (Bhave et al., 2001; M E Fundytus et al., 2001; Walker et al., 2001). Existe evidencia que sugiere que el aumento en la expresión de los receptores del grupo 1 está involucrado en la iniciación de los estados de alodinia e hiperalgesia (Jung, Sung, Lee, & Shin, 2011). La expresión incrementada de receptores mGlu5 en neuronas de las fibras A ha sido asociada con el desarrollo de hiperalgesia térmica (Bleakman & cols., 2006). Además, los

receptores mGlu1/5 pueden modular la actividad de los canales iónicos activados por un ligando, como los receptores AMPA y NMDA, contribuyendo así a la inducción de la plasticidad sináptica (Ferraguti et al., 2008).

Estos estudios han demostrado un papel funcional del grupo I de los mGluR's en la periferia en la mediación de la sensibilización del dolor. El aumento de estudios preclínicos sugieren que los antagonistas del receptor mGlu1 podrían ser un tratamiento contra el dolor prometedor (Neugebauer, 2002). El bloqueo de los receptores mGlu1/5 periféricos utilizando antagonistas selectivos como MPEP o AIDA, ha producido efectos antinociceptivos en modelos de dolor inflamatorio y neuropático (Jang et al., 2004; Jung et al., 2006; S. S. Jung et al., 2011; Lee et al., 2007). Al contrario de resultados en otros estudios (Jung et al., 2011; Lee et al., 2007); en el presente estudio, el antagonista A841720 administrado periféricamente no revirtió la alodinia secundaria establecida. Sin embargo, esta investigación evalúa la alodinia secundaria establecida a largo plazo, mientras que los demás estudios evalúan a corto plazo. Una demostración de lo anterior es un estudio con el modelo de dolor L5 SNL (Jang et al., 2004), donde se obtuvieron resultados similares. Esta investigación muestra la participación de los receptores mGlu1/5 en la periferia en la inducción del dolor inflamatorio.

### **Post- tratamiento y pre-tratamiento espinal de los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5**

La médula espinal es un sitio importante en el que varias señales nociceptivas se someten a la convergencia y modulación. La respuesta a estas señales en la médula espinal está sujeta a alteraciones por la interacción de varios neurotransmisores particularmente en condiciones patológicas. La mayoría de las FAP que realizan sinapsis en el asta dorsal de la médula espinal utilizan el glutamato. El glutamato tiene un efecto excitatorio en sus receptores encontrados en las neuronas espinales post-sinápticas, llevando a la despolarización de la membrana a través de los receptores AMPA, NMDA y mGlu1/5.

Este estudio muestra que la alodinia secundaria inducida por formalina se reduce con el antagonista CNQX. Las conductas nociceptivas de la alodinia secundaria no fueron influenciadas por el antagonista MK-801. La administración intratecal del antagonista A841720 causó un decremento modesto de la alodinia secundaria. Estos hallazgos indican que el receptor AMPA/Ka

influye en el procesamiento espinal que conduce a la alodinia secundaria. Por otro lado, los antagonistas CNQX, MK-801 y A841720 previnieron completamente las conductas nociceptivas relacionadas con la alodinia secundaria. Estos resultados demuestran que la inducción de la alodinia secundaria depende de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGlu1.

## Receptores espinales AMPA/Ka

La aplicación sistémica o iontoforética de antagonistas selectivos de receptores AMPA suprime el disparo de un gran rango de neuronas en el asta dorsal en respuesta a estímulos nocivos e inocuos, sugiriendo que los receptores AMPA al nivel de la médula espinal están involucrados en la transmisión sensorial normal y nociceptiva (Budai y Larson, 1994).

El tráfico de los receptores AMPA en sitios extrasinápticos de las neuronas del asta dorsal espinal también cambia durante la inflamación. En condiciones normales, el medio extrasináptico en la sustancia gelatinosa de las neuronas del asta dorsal espinal consiste predominantemente en receptores AMPA impermeables a  $Ca^{++}$  con la subunidad GluR2. La actividad mediada por los receptores AMPA con la subunidad GluR1 está asociada a la excitabilidad en la médula espinal, la cual, por ende facilita la plasticidad central involucrada en la hiperalgesia secundaria. Durante la inflamación, la expresión y proporción extrasináptica de receptores permeables a  $Ca^{++}$  con la subunidad GluR1 incrementa (Kopach et al., 2011). Esta expresión exacerbada de estos receptores es una evidencia contundente de su participación en la inflamación. Los receptores AMPA están presentes en las láminas superficiales del asta dorsal y median la transmisión excitatoria incluyendo las entradas nociceptivas (Bleakman et al., 2006). Las observaciones en el presente estudio sugieren que los receptores AMPA participan en el mantenimiento de la alodinia inducida por formalina así como en la modulación del dolor crónico a nivel espinal.

En lo que respecta al papel de los receptores AMPA en la facilitación de los estados de dolor, se han encontrado resultados contradictorios con los antagonistas de AMPA administrados por vía intratecal. Se ha encontrado que la administración intratecal de CNQX aumenta el umbral de retiro (Jones & Sorkin, 2004; Nozaki-Taguchi & Yaksh, 2002; Pogatzki et al., 2003). Sin embargo, en otra investigación, el antagonista CNQX en el post-tratamiento no tuvo ningún efecto en las conductas

nociceptivas espontáneas en el dolor agudo provocadas por veneno de escorpión *Buthus martensi Karsch* (Liu et al., 2007).

## Receptores espinales NMDA

La neuropatía puede producir una prolongada activación de los receptores NMDA debido a la entrada de señales sostenida en la médula espinal, y esto puede resultar en un incremento relativamente pequeño de glutamato en el espacio extracelular (Dickenson, 2003; Bleakman, Alt, Nisenbaum, 2006). La activación de los receptores NMDA y P2, la óxido-nítrico sintetasa, la cicloxigenasa 1 y 2 conllevan a conductas nociceptivas a largo plazo (Wiertelak y cols., 1994). En el modelo de formalina, se han observado cambios en la expresión/localización de los receptores NMDA o de subunidades específicas (Bleakman y cols., 1992). En este modelo se ha demostrado que el bloqueo farmacológico de estos receptores como pre-tratamiento ha reducido el efecto nociceptivo de la formalina en la segunda fase.

En el modelo de formalina hay un cambio en la distribución anatómica de los estímulos periféricos que conllevan a una activación concurrente de las neuronas espinales que están ligadas a interneuronas glutamatérgicas, las cuales actúan a través de los receptores NMDA. Como se comprueba en este estudio, esta hipótesis es acorde con el impedimento del establecimiento de la alodinia secundaria a través del bloqueo de los receptores NMDA previo a la inyección de formalina. Otros estudios han mostrado los mismos resultados en el modelo de formalina (Berrino et al., 2003; Yashpal, Fisher, Chabot, & Coderre, 2001; Yoon, Bae, & Choi, 2005)

Los antagonistas de los receptores NMDA administrados espinalmente, en dosis iguales a las reportadas anteriormente, no disminuyeron la alodinia mecánica secundaria. Estos resultados son acordes con la ausencia de efecto de los antagonistas de NMDA a nivel intratecal en otros modelos (Liu et al., 2007; Nozaki-Taguchi & Yaksh, 2002; Pogatzki et al., 2003; Yashpal et al., 2001). La efecto antialodínico del pre-tratamiento con el antagonista de los receptores NMDA y la ineficacia de la misma posterior a la formalina sugiere que los receptores NMDA tienen una importancia en la inducción, pero no en el mantenimiento de la sensibilización central.



## Receptores espinales mGlu1/5

Los receptores metabotrópicos se encuentran expresados en las células de los ganglios de la raíz dorsal a nivel L5 de la médula espinal. Los análisis muestran que el grupo III tiene la mayor expresión seguido por el grupo II. Por último, el grupo I (mGluR1) se expresa con sólo el 6.8%. Aproximadamente la mitad de las células que expresan el grupo I (mGluR1) también expresan, ya sea el grupo II (mGluR2/3) o el grupo III (mGluR8) (Carlton & Hargett, 2007).

El mGluR1 tiene un papel importante en el dolor crónico, ya que el bloqueo de éste invierte la hiperalgesia y la alodinia asociadas con un daño neuropático establecido (Marian E Fundytus, Osborne, Henry, Coderre, & Dray, 2002).

Estudios recientes han demostrado que los subtipos de los receptores mGlu están expresados diferencialmente en el asta dorsal de la médula espinal en respuesta a la inflamación persistente y sugieren que la actividad de los receptores mGlu puede estar involucrada en conductas alteradas asociadas con dolor inflamatorio clínico (Dolan & cols., 2003).

En este estudio, la administración del antagonista A841720 posterior a la formalina, aumentó moderadamente el umbral de retiro sin diferencia significativa respecto a vehículo. El papel de los receptores mGlu5 en la nocicepción inflamatoria es más controversial y los antagonistas de mGluR5 han fallado en reducir el dolor inflamatorio en ratas (Walker et al., 2001). Sin embargo, el pre-tratamiento del antagonista A841720 evitó el desarrollo de la alodinia secundaria inducida por formalina. Estos resultados son consistentes con otros estudios (Fisher, Lefebvre, & Coderre, 2002; Jesse, Savegnago, & Nogueira, 2008; Sevostianova & Danysz, 2006). Por otro lado, en el modelo de inflamación de la articulación de la rodilla, el pre y post-tratamiento con un antagonista de mGluR1, redujo significativamente la hiperalgesia térmica (Zhang, Lu, Chen, & Westlund, 2002). No obstante, la hiperalgesia térmica viaja por fibras aferentes primarias distintas a la alodinia mecánica (Lanz et al., 2011).

## **Post- tratamiento y pre-tratamiento en el nDr de los antagonistas de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1/5**

Efecto de la administración en el nDr de los antagonistas glutamatérgicos en la conducta nociceptiva inducida por formalina

La facilitación descendente de la nocicepción es un contribuyente importante en la transición del dolor agudo al crónico (Heinricher et al., 2009). Basados en la importancia de las vías bulbo-espinales en la sensibilización central, las conexiones recíprocas del nDr con la médula espinal proporciona antecedentes anatómicos importantes para la participación de esta área en la sensibilización central durante el dolor crónico (Heinricher et al., 2009).

La participación de esta área medular en la facilitación nociceptiva durante el dolor agudo ha sido demostrada anteriormente. La lesión el nDr disminuyó la conducta nociceptiva en las dos fases de la prueba de formalina (Almeida et al., 1999). El nDr afectó no sólo los reflejos nociceptivos mediados espinal y supraespinalmente (Almeida et al., 1996) sino también respuestas nociceptivas complejas, múltiples, organizadas supraespinalmente, como aquellas medidas por la prueba de formalina (Almeida et al., 1999). En el presente estudio, se muestra por primera vez la participación pronociceptiva del nDr en un modelo de dolor crónico.

Existen conexiones recíprocas ipsilaterales que conectan con la parte dorsal del nDr con la médula espinal en la lámina I, en menor grado con la IV-V; y la parte ventral del nDr con las láminas IV-V (Tavares & Lima, 1994). Estudios anatómicos utilizando rastreo bidireccional desde el nDr, muestran proyecciones descendentes del nDr que establecen sinapsis asimétricas con las neuronas superficiales del asta dorsal espinal que proyectan a su vez al nDr (Almeida et al., 2002)., Como se demuestra en este estudio, la administración de los antagonistas unilateralmente en el nDr puede tener efecto ipsi y contralateralmente a la lesión debido a estas proyecciones bidireccionales. Además, ya que la naturaleza de los contactos sinápticos asimétricos es excitatoria, se ha postulado la existencia de una vía reverberante que resulta en la amplificación de las respuestas de las neuronas nociceptivas superficiales del asta dorsal.

Registros individuales en el asta dorsal espinal, en combinación con la aplicación de glutamato en el nDr sugieren que la actividad las neuronas espinales está modulada por acciones excitatorias

originadas en el nDr, las cuales pueden contrarrestar las acciones inhibitorias (Dugast, Almeida, & Lima, 2003). A pesar de la evidencia de la participación del nDr en la nocicepción, la contribución de los receptores glutamatérgicos no había sido determinada.

En estados de dolor inflamatorio prolongado se ha observado el aumento de receptores AMPA, así como su fosforilación en estructuras supraespinales como en la RVM (Guan, Terayama, Dubner, & Ren, 2002). La evidencia mostrada en este estudio sugiere que los receptores AMPA en el nDr juegan un papel importante en la facilitación descendente ya que el bloqueo de éstos inhibe completamente el desarrollo de la alodinia secundaria. Estos resultados muestran que los receptores AMPA del nDr no actúan de manera inhibitoria una vez que la alodinia secundaria se halla establecida. Es posible que estos receptores sean la base de la transmisión sináptica excitatoria rápida asociada con la señalización glutamatérgica en las vías descendentes nociceptivas del nDr hasta las neuronas del asta dorsal espinal.

Durante el dolor crónico, el sistema supraespinal modulador del dolor sufre cambios de plasticidad mejorando la facilitación en la transmisión en la médula espinal (Gebhart, 2004). Los receptores NMDA en el asta dorsal espinal están involucrados en mecanismos de facilitación descendente suscitados por el dolor inflamatorio. Se ha sugerido que esto refleja una liberación de glutamato desde las vías descendientes preferentemente a las fibras aferentes primarias (Watkins et al., 1994; Wiertelak et al., 1997). Los receptores NMDA participan en mecanismos de sensibilización y excitación neuronal en regiones supraespinales como el tálamo o la corteza (Millan, 2002). De acuerdo a lo anterior, se ha propuesto que los receptores NMDA intensifican los mecanismos de facilitación descendente desde la RVM en estados de dolor neuropático (Guan et al., 2002). Al limitar el efecto antinociceptivo espinal de los antagonistas de los receptores NMDA (Näsström, Karlsson, & Berge, 1993) y el provocar una disminución en la expresión de receptores opioides (Pinto et al., 2008) es evidencia de que el nDr exhibe cambios plásticos durante el dolor inflamatorio crónico. En este estudio, obtuvimos evidencia respaldando la facilitación descendente del nDr y específicamente de la participación de los receptores NMDA de esta región en la sensibilización central. Estos receptores influyen no sólo en el desarrollo de la alodinia secundaria sino también en su mantenimiento ya que su bloqueo previo o durante el dolor inflamatorio atenúa la conducta nociceptiva.

El grupo I de los receptores metabotrópicos cooperan con los NMDAR en excitar y sensibilizar las neuronas proyectivas. Millan 2002 Nuestros resultados muestran evidencia de la participación de

los receptores metabotrópicos (grupo I) supraespinales en el desarrollo y el mantenimiento de la alodinia secundaria

### **Efecto de la administración en el nDr de los antagonistas glutamatérgicos en la expresión de c-Fos en la médula espinal seis días después de la inyección de formalina**

El nivel de expresión de c-Fos inducido por la formalina está directamente correlacionado con la intensidad del dolor (Menétrey et al., 1989). El efecto de la formalina (y de los tratamientos) fue pronunciada en niveles L<sub>4</sub>-L<sub>5</sub>, segmentos espinales en los que se ha demostrado su importancia en la alodinia secundaria. Estos segmentos reciben la entrada de áreas cutáneas estimuladas cercanas al sitio de lesión (Coggeshall, 2005). Como se observa en nuestros resultados, la formalina incrementó significativamente el número de células positivas a c-Fos tanto en las láminas superficiales como en las láminas profundas en el asta dorsal ipsi y contralateral 6 días después de la inyección. Esto indica que la estimulación inocua en ratas alodínicas promueve la activación de c-Fos en la médula espinal a nivel lumbar. En contraste, hay una disminución en la activación de c-Fos en la médula espinal a nivel lumbar cuando se logra aminorar la alodinia e hiperalgesia inducidas por formalina a largo plazo (Tao & Johns, 2002). Previamente se ha demostrado que la estimulación mediante un toque inocuo aumenta el número de células positivas a c-Fos en las láminas superficiales y profundas del asta dorsal (Ma & Woolf, 1996). Este aumento se debe a una sensibilización de los nociceptores de las fibras A $\beta$  durante la sensibilización periférica e incluso puede referirse a una sensibilización central (Latremoliere & Woolf, 2009). Este estudio comprueba que cuando el dolor inflamatorio es crónico, hay un aumento significativo en la expresión de c-Fos tanto en láminas superficiales como en láminas profundas reflejando una posible sensibilización periférica y central. Este fenómeno se había demostrado antes con un modelo de dolor inflamatorio crónico utilizando el coadyuvante de Freund, analizando la expresión de c-Fos después de los 14 días (Castro, Pinto, Lima, & Tavares, 2006).

El número de células positivas a c-Fos aumenta al máximo en las láminas superficiales de 2 a 4 horas después de la estimulación, tiempo en el cual las láminas V y VI muestran una expresión considerable con alguna expresión en las láminas III y IV (Coggeshall, 2005). Si bien nuestro agrupamiento es distinto, esto es acorde con los resultados de este estudio, donde las láminas I-II

y las láminas IV-V aumenta considerablemente en ratas estimuladas mecánicamente dos hrs. antes de su decapitación en comparación con ratas intactas o inyectadas con salina.

Hay una vía espinal-nDr que está involucrada en la transmisión del dolor como ha sido demostrada con la detección inmunohistoquímica de c-Fos. Esta vía está conformada por conexiones entre el nDr dorsal y las láminas I y IV-VI, ipsilateralmente, y el nDr ventral y las láminas IV-VI, bilateralmente (Lima & Almeida, 2002). Se ha demostrado que la lámina I es la mayor fuente de entrada nociceptiva hacia el nDr (Lima & Almeida, 2002). Sin embargo, esto ocurre en condiciones de dolor inflamatorio periférico producido por una agresión nociceptiva leve sin ninguna importancia clínica. Es posible que en condiciones de dolor crónico, el nDr proyecte a otras láminas en el asta dorsal espinal. Nuestros resultados demuestran que hay una conexión desde el nDr hacia láminas más profundas en respuesta a una entrada nociceptiva agresiva. El bloqueo ipsilateral de los receptores glutamatérgicos en el nDr, disminuye significativamente el número de células positivas a c-Fos no sólo en la lámina I, sino también en las láminas II-V en el asta dorsal espinal en el lado ipsilateral y contralateral a la lesión. Esto último puede deberse a las conexiones bilaterales del nDr y la médula espinal, como se había mencionado anteriormente.

La expresión de c-Fos inducida durante la prueba de formalina (fase aguda) está significativamente disminuida en láminas superficiales y profundas siguiendo la lesión ipsilateral del nDr (Almeida et al., 1999). Esta disminución en la expresión de c-Fos favorece la posibilidad que la facilitación nociceptiva del nDr sea mediada por neuronas espinales. De hecho, la disminución de la activación neuronal de c-Fos a nivel espinal evocada por el estímulo nocivo es acompañada por una disminución de la conducta nociceptiva en el modelo de dolor producido por la formalina (Almeida et al., 1999; Lima & Almeida, 2002; Pinto et al., 2007). Es posible que el aumento de la entrada ascendente desde la médula espinal hacia el nDr durante la inflamación crónica desencadene la facilitación descendente desde el nDr (Pinto et al., 2007; Marta Pinto et al., 2008).

Las conexiones recíprocas en los núcleos supraespinales (Almeida et al., 2000; Leite-Almeida et al., 2006) y su participación en sistemas facilitatorios e inhibitorios proveen un soporte anatómico y un contexto funcional en la actividad de esta vía. Los datos en la literatura y los presentes resultados indican que el nDr es un componente de la vía espino-bulbo-espinal que contribuye significativamente para el mantenimiento de la sensibilización central de las neuronas (Urban and Gebhart, 1999).

La naturaleza asimétrica de los contactos sinápticos espinales y medulares que ocurren entre el nDr dorsal y el asta dorsal sugiere la existencia de un circuito mediado por neurotransmisores excitatorios dirigiendo la facilitación de la respuesta de una entrada nociceptiva de las neuronas superficiales. Conforme a esto, al estimular el nDr con la administración local de glutamato, las respuestas nociceptivas al dolor agudo e inflamatorio aumentan significativamente (Almeida et al., 1996).

Estudios electrofisiológicos soportan la participación de las neuronas espinales en la facilitación nociceptiva desde el nDr. La estimulación ipsilateral en el nDr con glutamato ejerce una acción facilitatoria en las neuronas de amplio rango en las láminas profundas del asta dorsal al incrementar su capacidad para responder a la estimulación periférica a través de la prolongación de su descarga (Dugast et al., 2003). En otro estudio se demuestra que la actividad del nDr facilita la sensibilización de las neuronas de amplio rango en el asta dorsal espinal, ya que su bloqueo con lidocaína reduce significativamente la hiperactividad inducida por NMDA exógeno de las neuronas espinales en ratas (Sotgiu et al., 2008). Una de las implicaciones es que la facilitación que ejerce el nDr sobre la hiperexcitabilidad neuronal, contribuye al mantenimiento de los procesos de sensibilización, como se ha propuesto también para la facilitación descendente de la médula rostroventromedial (Sotgiu et al., 2008).

Acorde con esto, la administración sistémica del antagonista MK-801 aminora significativamente la hiperalgesia inducida por formalina a largo plazo, un fenómeno de dolor crónico que conlleva sensibilización central (Tao & Johns, 2002). La evidencia anterior y los resultados del presente estudio sugieren que los receptores NMDA actúan principalmente en estructuras supraespinales como el nDr y participan en la sensibilización central en el dolor crónico. Nuestros resultados demuestran que los receptores NMDA ubicados en el nDr están involucrados en la facilitación descendente nociceptiva ya que cuando se administra un antagonista como pre-tratamiento, éste evita la activación de c-Fos en las neuronas espinales.

## CONCLUSIONES

Este estudio muestra que en el modelo de alodinia secundaria producida por formalina, la participación de los receptores glutamatérgicos NMDA, AMPA/Ka y mGlu1 es de acuerdo a su ubicación (periférico, espinal o supraespinal). Pudimos observar que un factor importante es el tiempo de administración ya que dependiendo del protocolo de pre- o post-tratamiento encontramos diferencias en los 3 niveles de regulación del dolor. En esta investigación se observó la disminución de la conducta nociceptiva al bloquear los receptores glutamatérgicos en el nDR acompañada por una disminución en la expresión de c-Fos en las láminas I-V del asta dorsal espinal. Esto comprueba que el nDr participa en el desarrollo de la alodinia secundaria y este fenómeno conlleva alteraciones en el sistema glutamatérgico local. La participación de los receptores AMPA/Ka, NMDA y mGluR1 en el nDr es importante en la facilitación de la transmisión del dolor hacia la médula espinal.

## REFERENCIAS

- Abrahamsen, B., Zhao, J., Asante, C. O., Cendan, C. M., Marsh, S., Martinez-Barbera, J. P., Nassar, M. a, et al. (2008). The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain. *Science (New York, N.Y.)*, *321*(5889), 702–5. doi:10.1126/science.1156916
- Adwanikar, H., Karim, F., & Gereau, R. W. (2004). Inflammation persistently enhances nocifensive behaviors mediated by spinal group I mGluRs through sustained ERK activation. *Pain*, *111*(1-2), 125–35. doi:10.1016/j.pain.2004.06.009
- Aley, K. O., & Levine, J. D. (2002). Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. *Neuroscience*, *111*(2), 389–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11983324>
- Almeida, A., Cobos, A., Tavares, I., & Lima, D. (2002). Brain afferents to the medullary dorsal reticular nucleus: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *European Journal of Neuroscience*, *16*(1), 81–95. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02058.x
- Almeida, A., Leite-Almeida, H., & Tavares, I. (2006). Medullary control of nociceptive transmission: Reciprocal dual communication with the spinal cord. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, *3*(3), 305–312. doi:10.1016/j.ddmec.2006.09.001
- Almeida, A., Størkson, R., Lima, D., Hole, K., & Tjølsen, A. (1999). The medullary dorsal reticular nucleus facilitates pain behaviour induced by formalin in the rat. *The European journal of neuroscience*, *11*(1), 110–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9987016>
- Almeida, A., Tjølsen, A., Lima, D., Coimbra, A., & Hole, K. (1996). The medullary dorsal reticular nucleus facilitates acute nociception in the rat. *Brain research bulletin*, *39*(1), 7–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8846110>
- Ambriz-Tututi, M., Cruz, S. L., Urquiza-Marín, H., & Granados-Soto, V. (2011). Formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia are maintained by descending facilitation. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *98*(3), 417–24. doi:10.1016/j.pbb.2011.02.012
- Bardoni, R., Ghirri, A., Zonta, M., Betelli, C., Vitale, G., Ruggieri, V., Sandrini, M., et al. (2010). Glutamate-mediated astrocyte-to-neuron signalling in the rat dorsal horn. *The Journal of physiology*, *588*(Pt 5), 831–46. doi:10.1113/jphysiol.2009.180570
- Berrino, L., Oliva, P., Massimo, F., Aurilio, C., Maione, S., Grella, A., & Rossi, F. (2003). Antinociceptive effect in mice of intraperitoneal N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in the formalin test. *European journal of pain (London, England)*, *7*(2), 131–7. doi:10.1016/S1090-3801(02)00086-1



- Bhave, G., Karim, F., Carlton, S. M., & Gereau, R. W. (2001). Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. *Nature neuroscience*, *4*(4), 417–23. doi:10.1038/86075
- Bleakman, D., Alt, A., & Nisenbaum, E. S. (2006). Glutamate receptors and pain. *Seminars in cell & developmental biology*, *17*(5), 592–604. doi:10.1016/j.semcdb.2006.10.008
- Cafferty, W. B. J., McGee, A. W., & Strittmatter, S. M. (2008). Axonal growth therapeutics: regeneration or sprouting or plasticity? *Trends in neurosciences*, *31*(5), 215–220. doi:10.1016/j.tins.2008.02.004.Axonal
- Campbell, J. N., & Meyer, R. A. (2006). Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*, *52*(1), 77–92. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627306007288>
- Carlton, S. M., & Hargett, G. L. (2007). Colocalization of Metabotropic Glutamate Receptors in Rat Dorsal Root Ganglion Cells. *The Journal of comparative neurology*, *501*(December 2006), 780–789. doi:10.1002/cne
- Castro, a R., Pinto, M., Lima, D., & Tavares, I. (2006). Secondary hyperalgesia in the monoarthritic rat is mediated by GABAB and NK1 receptors of spinal dorsal horn neurons: a behavior and c-fos study. *Neuroscience*, *141*(4), 2087–95. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.05.048
- Chaplan, S. R., Malmberg, a B., & Yaksh, T. L. (1997). Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, *280*(2), 829–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9023297>
- Choi, J., Svensson, C., Koehn, F., & Bhuskute, A. (2010). Peripheral inflammation induces tumor necrosis factor dependent AMPA receptor trafficking and Akt phosphorylation in spinal cord in addition to pain behavior. *Pain*, *149*(2), 243–253. doi:10.1016/j.pain.2010.02.008.Peripheral
- Chun, Y.-H., Frank, D., Lee, J.-S., Zhang, Y., Auh, Q.-S., & Ro, J. Y. (2008). Peripheral AMPA receptors contribute to muscle nociception and c-fos activation. *Neuroscience research*, *62*(2), 97–104. doi:10.1016/j.neures.2008.06.007
- Coderre, T. J., & Melzack, R. (1992). The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *12*(9), 3665–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1326610>
- Coggeshall, R. E. (2005). Fos, nociception and the dorsal horn. *Progress in neurobiology*, *77*(5), 299–352. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.11.002
- Coggeshall, R. E., & Carlton, S. M. (1998). Ultrastructural analysis of NMDA, AMPA, and kainate receptors on unmyelinated and myelinated axons in the periphery. *The Journal of*

*comparative neurology*, 391(1), 78–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9527543>

- Costigan, M., Scholz, J., & Woolf, C. J. (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual review of neuroscience*, 32, 1–32. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135531
- Cui, M., Khanijou, S., Rubino, J., & Aoki, K. R. (2004). Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain*, 107(1-2), 125–133. doi:10.1016/j.pain.2003.10.008
- Davidson, E. M., Coggeshall, R. E., & Carlton, S. M. (1997). Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. *Neuroreport*, 8(4), 941–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9141069>
- Dowdall, T., Robinson, I., & Meert, T. F. (2005). Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 80(1), 93–108. doi:10.1016/j.pbb.2004.10.016
- Du, J., Zhou, S., Coggeshall, R. E., & Carlton, S. M. (2003). N-methyl-D-aspartate-induced excitation and sensitization of normal and inflamed nociceptors. *Neuroscience*, 118(2), 547–562. doi:10.1016/S0306-4522(03)00009-5
- Dubuisson, D., & Dennis, S. G. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4(2), 161–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/564014>
- Dugast, C., Almeida, A., & Lima, D. (2003). The medullary dorsal reticular nucleus enhances the responsiveness of spinal nociceptive neurons to peripheral stimulation in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 18(3), 580–588. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02782.x
- D’Mello, R., & Dickenson, a H. (2008). Spinal cord mechanisms of pain. *British journal of anaesthesia*, 101(1), 8–16. doi:10.1093/bja/aen088
- El-Kouhen, O., Lehto, S. G., Pan, J. B., Chang, R., Baker, S. J., Zhong, C., Hollingsworth, P. R., et al. (2006). Blockade of mGluR1 receptor results in analgesia and disruption of motor and cognitive performances: effects of A-841720, a novel non-competitive mGluR1 receptor antagonist. *British journal of pharmacology*, 149(6), 761–74. doi:10.1038/sj.bjp.0706877
- Engelman, H. S., Allen, T. B., & MacDermott, a B. (1999). The distribution of neurons expressing calcium-permeable AMPA receptors in the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn. *Neuroscience*, 19(6), 2081–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066261>
- Ferraguti, F., Crepaldi, L., & Nicoletti, F. (2008). Metabotropic Glutamate 1 Receptor : Current Concepts and Perspectives. *Pharmacological reviews*, 60(4), 536–581. doi:10.1124/pr.108.000166.536

- Fisher, K., Lefebvre, C., &Coderre, T. J. (2002). Antinociceptive effects following intrathecal pretreatment with selective metabotropic glutamate receptor compounds in a rat model of neuropathic pain. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 73(2), 411–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117596>
- Fu, K. Y., Light, a R., & Maixner, W. (2000). Relationship between nociceptor activity, peripheral edema, spinal microglial activation and long-term hyperalgesia induced by formalin. *Neuroscience*, 101(4), 1127–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113361>
- Fu, K. Y., Tan, Y.-H., Sung, B., & Mao, J. (2009). Peripheral formalin injection induces unique spinal cord microglial phenotypic changes. *Neuroscience letters*, 449(3), 234–9. doi:10.1016/j.neulet.2008.11.009
- Fundyus, M E, Yashpal, K., Chabot, J. G., Osborne, M. G., Lefebvre, C. D., Dray, a, Henry, J. L., et al. (2001). Knockdown of spinal metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR(1)) alleviates pain and restores opioid efficacy after nerve injury in rats. *British journal of pharmacology*, 132(1), 354–67. doi:10.1038/sj.bjp.0703810
- Fundyus, Marian E, Osborne, M. G., Henry, J. L., Coderre, T. J., & Dray, A. (2002). Antisense oligonucleotide knockdown of mGluR1 alleviates hyperalgesia and allodynia associated with chronic inflammation. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 73(2), 401–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117595>
- Gangadharan, V., Wang, R., Ulzhöfer, B., Luo, C., Bardoni, R., Bali, K. K., Agarwal, N., et al. (2011). Peripheral calcium-permeable AMPA receptors regulate chronic inflammatory pain in mice. *The Journal of clinical investigation*, 121(4), 1608–23. doi:10.1172/JCI44911DS1
- Gebhart, G. F. (2004). Descending modulation of pain. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 27(8), 729–37. doi:10.1016/j.neubiorev.2003.11.008
- Giordano, J. (2005). The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. *Pain physician*, 8(3), 277–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16850085>
- Goudet, C., Magnaghi, V., Landry, M., Nagy, F., Gereau, R. W., & Pin, J.-P. (2009). Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. *Brain research reviews*, 60(1), 43–56. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.12.007
- Guan, Y., Terayama, R., Dubner, R., & Ren, K. (2002). Plasticity in excitatory amino acid receptor-mediated descending pain modulation after inflammation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 300(2), 513–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11805211>
- Heinricher, M. M., Tavares, I., Leith, J. L., & Lumb, B. M. (2009). Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain research reviews*, 60(1), 214–25. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.12.009

- Herdegen, T., Tölle, T. R., Bravo, R., Zieglgänsberger, W., & Zimmermann, M. (1991). Sequential expression of JUN B, JUN D and FOS B proteins in rat spinal neurons: cascade of transcriptional operations during nociception. *Neuroscience letters*, *129*(2), 221–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1745403>
- Hoffman, E. M., & Miller, K. E. (2010). Peripheral inhibition of glutaminase reduces carrageenan-induced Fos expression in the superficial dorsal horn of the rat. *Neuroscience letters*, *472*(3), 157–60. doi:10.1016/j.neulet.2010.01.066
- Hucho, T., & Levine, J. D. (2007). Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron*, *55*(3), 365–76. doi:10.1016/j.neuron.2007.07.008
- Jang, J. H., Kim, D.-W., Sang Nam, T., Se Paik, K., & Leem, J. W. (2004). Peripheral glutamate receptors contribute to mechanical hyperalgesia in a neuropathic pain model of the rat. *Neuroscience*, *128*(1), 169–76. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.06.040
- Jesse, C. R., Savegnago, L., & Nogueira, C. W. (2008). Effect of a metabotropic glutamate receptor 5 antagonist, MPEP, on the nociceptive response induced by intrathecal injection of excitatory aminoacids, substance P, bradykinin or cytokines in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *90*(4), 608–13. doi:10.1016/j.pbb.2008.05.003
- Jones, T. L., & Sorkin, L. S. (2004). Calcium-Permeable  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid/Kainate Receptors Mediate Development, but Not Maintenance, of Secondary Allodynia Evoked by First-Degree Burn in the Rat. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *310*(1), 223–229. doi:10.1124/jpet.103.064741.sensitization
- Julius, D., & Basbaum, a I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, *413*(6852), 203–10. doi:10.1038/35093019
- Jung, C. Y., Lee, S. Y., Choi, H. S., Lim, E. J., Lee, M. K., Yang, G. Y., Han, S. R., et al. (2006). Participation of peripheral group I and II metabotropic glutamate receptors in the development or maintenance of IL-1 $\beta$ -induced mechanical allodynia in the orofacial area of conscious rats. *Neuroscience letters*, *409*(3), 173–8. doi:10.1016/j.neulet.2006.09.043
- Jung, S. S., Sung, K. W., Lee, S. E., & Shin, H. K. (2011). Capsaicin prevents the hyperalgesia induced by peripheral group I mGluRs activation. *Neuroscience letters*, *500*(3), 197–201. doi:10.1016/j.neulet.2011.06.035
- Khan, G. M., Chen, S.-R., & Pan, H.-L. (2002). Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats. *Neuroscience*, *114*(2), 291–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204199>
- Kopach, O., Kao, S.-C., Petralia, R. S., Belan, P., Tao, Y.-X., & Voitenko, N. (2011). Inflammation alters trafficking of extrasynaptic AMPA receptors in tonically firing lamina II neurons of the rat spinal dorsal horn. *Pain*, *152*(4), 912–23. doi:10.1016/j.pain.2011.01.016

- Lanz, S., Seifert, F., & Maihöfner, C. (2011). Brain activity associated with pain, hyperalgesia and allodynia: an ALE meta-analysis. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, *118*(8), 1139–54. doi:10.1007/s00702-011-0606-9
- Latremoliere, A., & Woolf, C. J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*, *10*(9), 895–926. doi:10.1016/j.jpain.2009.06.012
- Le Bars, D., Gozariu, M., & Cadden, S. W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacological reviews*, *53*(4), 597–652. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21341540>
- Lee, K. S., Kim, J., Yoon, Y. W., Lee, M.-G., Hong, S. K., & Han, H. C. (2007). The peripheral role of group I metabotropic glutamate receptors on nociceptive behaviors in rats with knee joint inflammation. *Neuroscience letters*, *416*(2), 123–7. doi:10.1016/j.neulet.2007.01.063
- Leem, J. W., Hwang, J. H., Hwang, S. J., Park, H., Kim, M. K., & Choi, Y. (2001). The role of peripheral N-methyl-d-aspartate receptors in Freund's complete adjuvant induced mechanical hyperalgesia in rats. *Neuroscience Letters*, *297*(3), 155–158. doi:10.1016/S0304-3940(00)01662-1
- Leite-Almeida, H., Valle-Fernandes, a, & Almeida, a. (2006). Brain projections from the medullary dorsal reticular nucleus: an anterograde and retrograde tracing study in the rat. *Neuroscience*, *140*(2), 577–95. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.02.022
- Lima, D., & Almeida, A. (2002). The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive centre of the pain control system. *Progress in neurobiology*, *66*(2), 81–108. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11900883>
- Lin, T., Li, K., Zhang, F.-Y., Zhang, Z.-K., Light, A. R., & Fu, K.-Y. (2008). Dissociation of spinal microglia morphological activation and peripheral inflammation in inflammatory pain models. *Neuroimmunology*, *192*(1-2), 40–48. doi:10.1016/j.bbi.2008.05.010
- Liu, T., Pang, X.-Y., Bai, Z.-T., Chai, Z.-F., Jiang, F., & Ji, Y.-H. (2007). Intrathecal injection of glutamate receptor antagonists/agonist selectively attenuated rat pain-related behaviors induced by the venom of scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, *50*(8), 1073–84. doi:10.1016/j.toxicon.2007.07.012
- Luo, C., Seeburg, P. H., Sprengel, R., & Kuner, R. (2008). Activity-dependent potentiation of calcium signals in spinal sensory networks in inflammatory pain states. *Pain*, *140*(2), 358–67. doi:10.1016/j.pain.2008.09.008
- Ma, Q. P., & Woolf, C. J. (1996). Basal and touch-evoked fos-like immunoreactivity during experimental inflammation in the rat. *Pain*, *67*(2-3), 307–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8951924>
- Menétrey, D., Gannon, a, Levine, J. D., & Basbaum, a I. (1989). Expression of c-fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic,

- articular, and visceral stimulation. *The Journal of comparative neurology*, 285(2), 177–95. doi:10.1002/cne.902850203
- Merskey, H. (1980). Some features of the history of the idea of pain. *Pain*, 9(1), 3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6999425>
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progress in neurobiology*, 57(1), 1–164. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9987804>
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Progress in neurobiology*, 66(6), 355–474. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12034378>
- Miller, K. E., Hoffman, E. M., Sutharshan, M., & Schechter, R. (2011). Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms. *Pharmacology & therapeutics*, 130(3), 283–309. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.01.005
- Nagy, G. G., Al-Ayyan, M., Andrew, D., Fukaya, M., Watanabe, M., & Todd, A. J. (2004). Widespread expression of the AMPA receptor GluR2 subunit at glutamatergic synapses in the rat spinal cord and phosphorylation of GluR1 in response to noxious stimulation revealed with an antigen-unmasking method. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(25), 5766–77. doi:10.1523/JNEUROSCI.1237-04.2004
- Neugebauer, V. (2002). Metabotropic glutamate receptors--important modulators of nociception and pain behavior. *Pain*, 98(1-2), 1–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12098611>
- Nozaki-Taguchi, N., & Yaksh, T. L. (2002). Pharmacology of spinal glutamatergic receptors in post-thermal injury-evoked tactile allodynia and thermal hyperalgesia. *Anesthesiology*, 96(3), 617–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11873037>
- Näsström, J., Karlsson, U., & Berge, O. G. (1993). Systemic or intracerebroventricular injection of NMDA receptor antagonists attenuates the antinociceptive activity of intrathecally administered NMDA receptor antagonists. *Brain research*, 623(1), 47–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8221092>
- Omote, K., Kawamata, T., Kawamata, M., Nakayama, Y., Hazama, K., & Namiki, A. (2000). Activation of peripheral NMDA–nitric oxide cascade in formalin test. *Anesthesiology*, 93(1), 173–8. Retrieved from [http://journals.lww.com/anesthesiology/Abstract/2000/07000/Activation\\_of\\_Peripheral\\_NMDA\\_Nitric\\_Oxide\\_Cascade.28.aspx](http://journals.lww.com/anesthesiology/Abstract/2000/07000/Activation_of_Peripheral_NMDA_Nitric_Oxide_Cascade.28.aspx)
- Petrenko, A. B., Yamakura, T., Baba, H., & Shimoji, K. (2003). The Role of N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) Receptors in Pain: A Review. *Anesthesia & Analgesia*, 1108–1116. doi:10.1213/01.ANE.0000081061.12235.55

- Pinto, Lima, D., & Tavares, I. (2007). Neuronal activation at the spinal cord and medullary pain control centers after joint stimulation: a c-fos study in acute and chronic articular inflammation. *Neuroscience*, *147*(4), 1076–89. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.05.019
- Pinto, M., Castro, A. R., Tshudy, F., Wilson, S. P., Lima, D., & Tavares, I. (2008). Opioids modulate pain facilitation from the dorsal reticular nucleus. *Molecular and cellular neurosciences*, *39*(4), 508–18. doi:10.1016/j.mcn.2008.07.008
- Pitcher, G. M., & Henry, J. L. (2002). Second phase of formalin-induced excitation of spinal dorsal horn neurons in spinalized rats is reversed by sciatic nerve block. *European Journal of Neuroscience*, *15*(9), 1509–1515. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.01984.x
- Pogatzki, E. M., Niemeier, J. S., Sorkin, L. S., & Brennan, T. J. (2003). Spinal glutamate receptor antagonists differentiate primary and secondary mechanical hyperalgesia caused by incision. *Pain*, *105*(1-2), 97–107. doi:10.1016/S0304-3959(03)00169-6
- Polgáar, E., Wright, L., & Todd, A. J. (2010). A quantitative study of brainstem projections from lamina I neurons in the cervical and lumbar enlargement of the rat. *Brain research*, *1308*(5), 58–67. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899309022197>
- Porreca, F., Ossipov, M. H., & Gebhart, G. F. (2002). Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends in neurosciences*, *25*(6), 319–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086751>
- Rains, G.D., (2002), *Principios de neuropsicología humana*, México: McGraw Hill Book Co., 38-39 pp.
- Sawynok, J., & Reid, A. (2002). Modulation of formalin-induced behaviors and edema by local and systemic administration of dextromethorphan, memantine and ketamine. *European journal of pharmacology*, *450*(2), 153–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12206853>
- Scholz, J., & Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain? *Nature neuroscience*, *5 Suppl*(november), 1062–7. doi:10.1038/nn942
- Sevostianova, N., & Danysz, W. (2006). Analgesic effects of mGlu1 and mGlu5 receptor antagonists in the rat formalin test. *Neuropharmacology*, *51*(3), 623–30. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.05.004
- Sotgiu, M. L., Valente, M., Storchi, R., Caramenti, G., & Mario Biella, G. E. (2008). Contribution by DRt descending facilitatory pathways to maintenance of spinal neuron sensitization in rats. *Brain research*, *1188*, 69–75. doi:10.1016/j.brainres.2007.10.030
- Taniguchi, K., Shinjo, K., Mizutani, M., Shimada, K., Ishikawa, T., Menniti, F. S., & Nagahisa, a. (1997). Antinociceptive activity of CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit antagonist. *British journal of pharmacology*, *122*(5), 809–12. doi:10.1038/sj.bjp.0701445

- Tao, Y.-X., & Johns, R. a. (2002). Activation and up-regulation of spinal cord nitric oxide receptor, soluble guanylate cyclase, after formalin injection into the rat hind paw. *Neuroscience*, *112*(2), 439–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044461>
- Tavares, I., & Lima, D. (1994). Descending projections from the caudal medulla oblongata to the superficial or deep dorsal horn of the rat spinal cord. *Experimental brain research*, *99*, 455–463. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/w5ul324428283m70.pdf>
- Tjølsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., & Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, *51*(1), 5–17. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030439599290003T>
- Todd, A. J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature reviews. Neuroscience*, *11*(12), 823–36. doi:10.1038/nrn2947
- Urban, M. O., & Gebhart, G. F. (1999). Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(14), 7687–92. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=33602&tool=pmcentrez&render type=abstract>
- Vanderah, T. W. (2007). Pathophysiology of pain. *The Medical clinics of North America*, *91*(1), 1–12. doi:10.1016/j.mcna.2006.10.006
- Walker, K., Reeve, a, Bowes, M., Winter, J., Wotherspoon, G., Davis, a, Schmid, P., et al. (2001). mGlu5 receptors and nociceptive function II. mGlu5 receptors functionally expressed on peripheral sensory neurones mediate inflammatory hyperalgesia. *Neuropharmacology*, *40*(1), 10–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11077066>
- Woolf. (2004). Review Pain : Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific. *Annals of Internal Medicine*, 441–451.
- Woolf, C. J., & Salter, M. W. (2000). Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain. *Science*, *288*(5472), 1765–1768. doi:10.1126/science.288.5472.1765
- Wu, L.-J., & Zhuo, M. (2009). Targeting the NMDA receptor subunit NR2B for the treatment of neuropathic pain. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *6*(4), 693–702. doi:10.1016/j.nurt.2009.07.008
- Yamamoto, W., Sugiura, A., Nakazato-Imasato, E., & Kita, Y. (2008). Characterization of primary sensory neurons mediating static and dynamic allodynia in rat chronic constriction injury model. *Journal of Pharmacy*, *60*, 717–722. doi:10.1211/jpp.60.6.0006
- Yashpal, K., Fisher, K., Chabot, J. G., & Coderre, T. J. (2001). Differential effects of NMDA and group I mGluR antagonists on both nociception and spinal cord protein kinase C translocation in the formalin test and a model of neuropathic pain in rats. *Pain*, *94*(1), 17–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11576741>



- Yoon, M. H., Bae, H. B., & Choi, J. I. (2005). Antinociceptive interactions between intrathecal gabapentin and MK801 or NBQX in rat formalin test. *Journal of Korean medical science*, 20(2), 307–12. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2808611&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- You, H.-J., Chen, J., Morch, C. D., & Arendt-Nielsen, L. (2002). Differential effect of peripheral glutamate (NMDA, non-NMDA) receptor antagonists on bee venom-induced spontaneous nociception and sensitization. *Brain research bulletin*, 58(6), 561–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372559>
- Zhang, L., Lu, Y., Chen, Y., & Westlund, K. N. (2002). Group I metabotropic glutamate receptor antagonists block secondary thermal hyperalgesia in rats with knee joint inflammation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 300(1), 149–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752110>
- Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16(2), 109–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6877845>

# ANEXOS

## Grupos experimentales

Tratamiento	Administración	Fármaco/veh	n
Pre-tratamiento	Periférico	MK-801	6
		CNQX	6
		A841714	6
		Etanol	6
		S.s.	6
	Intratecal	MK-801	6
		CNQX	6
		A841714	6
		Etanol	6
		S.s.	6
	nDr	MK-801	6
		CNQX	6
		A841714	6
		Etanol	6
		S.s.	6
Post-tratamiento	Periférico	MK-801	6
		CNQX	6
		A841714	6
		Etanol	6
		S.s.	6
	Intratecal	MK-801	6
		CNQX	6
		A841714	6
		Etanol	6
		S.s.	6

## El papel de los receptores glutamatérgicos en la alodinia secundaria

Tabla 1. Administración periférica

Antagonista	Área	Modelo	Tx/dosis	Efecto	Ref
MK 801/ AP5	s.c. pata trasera	Veneno de abeja	Pre-tx y post-tx 2mM, 50 mcl	Reducieron la alodinia mecánica	You et al, 2002
CNQX			Pre-tx y post-tx 5mM, 50 mcl	No tuvo efecto	
DHPG (agonista gpo1 mGluR)	s.c. pata trasera	Capsaicina Nervio ciático	Post-tx 40 y 80µg	Aumentó hiperalgesia (HA) mecánica	Jung et al, 2011
CHPG (agonista mGluR 5)			Post-tx 40 y 80µg	Aumentó HA mecánica	
AIDA (antagonista, gpo1 mGluR)			Post-tx 300µg	Redujo HA mecánica	
MPEP (antagonista, mGluR 5)			Post-tx 100µg	Redujo HAmecánica	
RBI (solución de NMDA)	s.c. pata trasera	CFA	Post- tx 1.0mM	Disminuyó umbral mecánico	Du et al, 2003
MK 801	intraplantar		Post-tx 0.5mM	Incrementó umbral mecánico	
	Pata trasera contralateral		Pos-tx	No tuvo efecto	
BIMM (inhibidor PKC)	i.d. pata trasera	Tratamiento con vincristina	Post-tx	Incrementó umbral mecánico	Aley & Levine, 2002
WIPTIDE (inhibidor PKA)	i.d. pata trasera		Post-tx		
L-NMA (inhibidor NOS)	i.d. pata trasera	Tratamiento con vincristina	Post-tx	Ningún efecto significativo	
MK-801	i.d. pata trasera		Post-tx		
BIMM	i.d. pata trasera	Modelo	Post-tx	Ningúnefecto significativo	

WIPTIDE	i.d. pata trasera	Seltzer (neuropatía traumática)	Post-tx	Ningún efectosignificante	Aley & Levine, 2002		
L-NMA	i.d. pata trasera		Post-tx	Ningún efecto significante			
MK-801	i.d. pata trasera		Post-tx				
MK 801	i.pl.  (intraplantar)	Lesión del nervio espinal lumbar 5  (L5 SNL)	Pre-tx 20 nM	Retrasó el comienzo de la reducción del umbral	Jang, 2004		
			Post- tx20 nM	Revirtió la reducción del umbral			
dl-AP3 (antagonista mGlu gpo I)	i.pl.		Pre-tx 70 nM	Retrasó el comienzo de la reducción del umbral			
			Post-tx 70 nM	Ningún efecto			
APDC (agonista group-II mGlu)	i.pl.		Pre-tx 20 nM	Retrasó el comienzo de la reducción del umbral			
			Post-tx 20 nM	Ningún efecto			
NBQX (antagonista AMPA)	i.pl.		Pre-tx 100 nM	Ningún efecto			
			Post-tx 100 nM	Ningún efecto			
MK801	i.pl.		Adyuvante  Completo de Freud (CFA)	Post-tx 1 pmol/0.1 ml		Incrementó el umbral mecánico	Leem et al, 2001
CNQX	i.pl.			Post-tx 10 pmol/0.1 ml		Ningún efecto	

CP-101,606 (antagonista selectivo subunidad NR2B)	s.c.	Carragenina	Post-tx 10 mg kg <sup>-1</sup> and 30 mg kg <sup>-1</sup>	Inhibió casi completamente HA (1 <sup>ria</sup> )	Taniguchi, 1997
CP-101,606	s.c.	Capsaicina	Post-tx 7.5 mg kg <sup>-1</sup>	Redujo las lamidas	
MK801			Post-tx 14.5 mg kg <sup>-1</sup>	Redujo las lamidas	
CP-101,606	s.c.	PMA	Post-tx 5.7 mg kg <sup>-1</sup>	Redujo las lamidas	
AIDA (antagonista mGluR1)	i.a. (intra-articularmente)	Carragenina 1%	Pre-tx 200 μM/25 μl	Efecto antinociceptivo en la HA secundaria	Lee et al, 2007
	i.a.		Post-tx 200 μM/25 μl		
MPEP (antagonista mGluR5)	i.a.		Pre-tx 50, 100, 200 nM/25 μl		
	i.a.		Post-tx 50, 100, 200 nM/25 μl		

Tabla 2. Administración sistémica

ANTAG	AREA	Model	Tx/dosis	Efecto	REF
MK 801	i.p.	Venenoabeja	Pre-tx y post-tx 0.01 mg/kg	Bloqueo y redujo la HA térmica pero no la mecánica	Chen & Chen, 2000
MK801	i.p.	Lesión de la médula espinal	Post- tx 2 mg/kg	Disminución de neutrófilos, activación de NF-B, citosinas y expresión de neutrofinas	Esposito et al, 2011

MK801	i.p.	Lesión de constricción crónica (CCI)	Post-tx 0.4 mg/kg	Disminuyó significativamente la alodinia mecánica	Sarkis, 2011
Apomorfina	i.p.		Post-tx 3 mg/kg		
MK801	i.p.	Lesión con nervio preservado (SNI)	Post-tx 0.4 mg/kg		
Apomorfina	i.p.		Post-tx 3 mg/kg		
MK801	i.p.	Paclitaxel	Post-tx 0.2 mg/kg	Ningún efecto	Flatters & Bennett, 2004
YM-230888 (antagonista mGluR1)	p.o. (oral)	Ligación del nervio espinal	Post-tx10 and 30 mg/kg	Recuperación de la alodinia mecánica dependiente de la dosis	Kohara et al, 2007
	p.o.	Hiperalgnesia inducida por estreptozotocina	Post-tx 10 and 30 mg/kg	Significativamente prolongó la latencia de respuesta nociceptiva	
	p.o.	Adyuvante Completo de Freund (CFA)	Post-tx10 and 30 mg/kg	Ningún efecto significativo	
R(-)-norketamina	i.p.	Lesión de constricción crónica del nervio ciático (CCI)	Post-tx 2,4,8,16, 32 mg/kg	Revirtió la HA mecánica dependiente de la dosis, sin atenuar la alodinia mecánica	Holtman et al, 2008
	p.o.				
S(+)- norketamina	i.p.		Post-tx 2, 4, 8, 16 mg/kg		
	p.o.				
	i.p.		Post-tx 32 mg/kg	Disminución de alodinia mecánica	
	p.o.		Adyuvante Completo de	Post-tx1-	

MPEP (antagonista mGluR5)		Freund(CFA)	100 mg/kg	la dosis HA establecida	Walker et al, 2001
	p.o.	Carragenina	Post-tx3– 100 mg/kg	Revirtió HAMecánica	
	p.o.	Ligadura parcial del nervio ciático	Post-tx10 y 100 mg/kg	Ningún efecto	

Tabla 3. Administración intratecal

Antagonista	Área	Modelo	Tx/dosis	Efecto	REF
MK 801/ AP5	i.t.	Lesión térmica, SA	Pre-tx, post-tx	Efecto pequeño o ningún efecto	Nozaki- Taguchi & Yaksh, 2002
AMPA/Ka	i.t.		Pre-tx, post-tx	Redujoalodinia 2 <sup>ria</sup>	
LY393053 (antagonista mGluR1)	i.t.	Inflamación de la articulación de la rodilla HA 2 <sup>ria</sup> térmica	Pre-tx, Post- tx	Redujoalodinia 2 <sup>ria</sup>	Zhang et al, 2002
MK 801/ AP5	i.t.	Incisión, HA 2 <sup>nd</sup> mecánica	Post-tx 2 hr 15, 30, 40 nM	Efecto no significante	Pogatzki et al, 2003
NBQX	i.t.		Pos-tx 5, 10 nM	Bloqueó HA	
MK801	i.t.	Veneno de escorpión	Pre-tx 40nM	Bloqueó HA	Liu et al, 2007
			Post- tx	Ningún efecto	
CNQX	i.t.		Pre-tx 40nM	Bloqueó HA	
			Post-tx	Ningún efecto	
MPEP (antagonista mGluR5)	i.t.	SP(sustancia P)	Pre-tx1- 50nM	Inhibición significante de mordida	Jesse, Savegnago & Nogueira, 2008
	i.t.	BK (bradquinina)		Inhibición significante de mordida	

	i.t.	NMDA (450 pmol)		Ningún efecto significativo	Jesse, Savegnago & Nogueira, 2008
	i.t.	Glutamato (175 nM)		Efecto inhibitorio máximo	
	i.t.	<i>trans</i> -ACPD		Efecto inhibitorio máximo	
	i.t.	AMPA		No efecto significativo	
	i.t.	Kainato		No efecto significativo	
	i.t.	TNF- $\alpha$		Inhibición significativa de mordida	
	i.t.	IL-1 $\beta$		Inhibición significativa de mordida	
CNQX	i.t.	Modelo de lesión térmica	Post-tx 36 nM	Revirtió alodinia	Jones & Sorkin, 2004
PHTX (antagonista AMPA/KA)	i.t.		Post-tx 13 nM	Revirtió alodinia 1 <sup>ra</sup> pero no 2 <sup>ra</sup>	
JST (toxina de araña joro)	i.t.		Post-tx 9 nM	Revirtió alodinia 1 <sup>ra</sup> pero no 2 <sup>ra</sup>	
AIDA (antagonista mGluR1)	i.t.	Lesión de constricción crónica del nervio ciático (CCI)	Pre-tx 90 ó 270 nM/30 $\mu$ l	Reducieron desarrollo de alodinia mecánica	Fisher et al, 2002
MPEP (antagonista mGluR5)	i.t.		Pre-tx 90 ó 270 nM/30 $\mu$ l		
APDC (agonista mGluR gpo II)	i.t.		Pre-tx 30, 90 ó 270 nM/30 $\mu$ l		
L-AP4 (agonista mGluR gpo III)	i.t.		Pre-tx 90 or 270 nM/30 $\mu$ l		
MK 801	i.t.	Lesión de	Pre-tx	No hubo reducción	



		constricción crónica del nervio ciático (CCI)	30nM	significante en alodinia mecánica o térmica	Yashpal et al, 2001
(S)-4CPG (antagonista mGluR1/5)	i.t.		Pre-tx 90nM		
DHPG(antagonista mGluR1/5)	i.t.	Adyuvante Completo de Freund (CFA)	Pre-tx 10nM/5 µl	Incrementó conducta nociceptiva	Adwanikar et al., 2004
U0126 (inhibidor MEK)	i.t.		Pre-tx 0.5nM ó 2.6nM/5 µl	Atenuó significativamente la conducta nociceptiva	
U0124 (análogo inactivo de U0126)	i.t.		Pre-tx 0.5nM ó 2.6nM/5 µl	Ningún efecto	
AIDA(antagonista mGluR1/5)	i.t.	Melitina	Pre-tx 100 y 200 µl	Redujo significativamente el umbral mecánico	Cho & Shin, 2008
LY367385(antagonista mGluR1)	i.t.		Pre-tx 50 y 100 µl		
MPEP(antagonista mGluR5)	i.t.		Pre-tx 200 y 300 µl		

Tabla 4. Administración supraespalinal

Antagonista	Área	Modelo	Tx/dosis	Efecto	REF
AP5	Médula rostro-medial(RVM)	Aceite de mostaza	Pre-tx 0.5, 1 ó 2 nmol/200 nl	Previno HA térmica	Xu et al, 2007
CNQX			Pre-tx 250 ó 500 pM	Ningún efecto	
D-AP5(NMDA antagonista)	Intra-	Compresión de la raíz del nervio	Post-tx 10 y 20 µg	Redujo HA	
PPPA (antagonista sub)			Post-tx 1 y 10 µg	Redujo HA	

unidad NR2A)	cisternal	trigémino			Jeon et al, 2011
Ro25-6981 (antagonista subunidad NR2B)			Post-tx 50 y 100µg	Ningún efecto	
PPDA (antagonista NR2C/D)			Post-tx 5 y 10µg	Redujo HA	
MK801	Núcleo Central de la Amígdala (NAC)	Lesión con nervio preservado (SNI)	Post-tx 10nmol/µl/h	Disminuyó alodinia mecánica	Sarkis et al, 2011
APO (apomorfinina)	NAC		Post-tx 3 mg/ml		
DHPG (agonista mGluR1/5)	NAC	Lesión de nervio periférico	Post-tx 10 nmol/ 0.5 µl	Aumentó conducta nociceptiva	Ansah et al, 2009
CPCCOEt (antagonista mGluR1)			Post-tx 10 nmol/ 0.5 µl	Disminuyó conducta nociceptiva	
NMDA	RVM	Adyuvante Completo de Freund (CFA)	Post-tx 0.1, 1.0, 10, 50, 100, ó 1000 pmol	Incrementó significativamente latencia de respuesta nociceptiva	Guan et al, 2002
APV (antagonista NMDA)	RVM		Post-tx 0.1, 1.0, y 10 pmol	Ningún efecto	
AMPA	RVM	Adyuvante Completo de Freund (CFA)	Post-tx 0.1, 1.0, 10, 50, y 100 pmol	Indujo HA inflamatoria	Guan et al, 2002
NBQX (antagonista AMPAR/Ka)	RVM		Pos-tx 0.1, 1.0, y 10 pmol	Redujo significativamente respuesta nociceptiva	

Tabla 5. Papel de los receptores glutamatérgicos en el modelo de formalina

ANTAG	AREA	Tx/dose	Efecto	REF
MK801	s.c. pata trasera	Pre-tx	Aumentó sacudidas y disminuyó lamidas	Davidson et al, 1997
		Post- tx	Aumentó sacudidas y disminuyó lamidas	
CNQX	s.c. pata trasera	Pre-tx	Aumentó lamidas y disminuyó sacudidas	
		Post-tx	Aumentó lamidas y disminuyó sacudidas	
MK801	i.t.	Pre-tx 30mcg	Disminuyó sacudidas en las dos fases	Yoon et al, 2005
NBQX	i.t.	Pre-tx 3mcg		
MK801	i.p.	Pre-tx 0.01, 0.025, and 0.05 mg/ kg	Redujo significativamente y dependiente de la dosis la conducta nociceptiva en fase tardía	Berrino et al, 2003
Memantina (antagonista NMDAR)	i.p.	Pre-tx 0.1, 0.5, and 1 mg/kg		Berrino et al, 2003
Ketamina	i.p.	Pre-tx 0.125, 0.25, and 0.5 mg/kg		
Dextrometorfano (antagonista NMDAR)	i.p.	Pre-tx 5, 10, and 20 mg/kg		
CGP 37849	i.p.	Pre-tx 4, 6,		

(antagonista NMDAR)		and 8 mg/kg		
CGP 37849	i.p.	Post-tx 8 mg/kg	Ningún efecto	
MK801	i.p.	Post-tx 0.05 mg/kg		
Memantine	i.p.	Post-tx 1 mg/kg		
Ketamina	i.p.	Post-tx 0.5 mg/kg		
Dextrometorfano	i.p.	Post-tx 20 mg/kg		
R(-)-norketamina	i.p./ p.o.	Post-tx 2,4,8,16, 32 mg/kg	Atenuó sacudidas en fase tardía	Holtman et al, 2008
MK 801	i.t.	Pre-tx60nM	Redujo significativamente conducta nociceptiva	Yashpal et al, 2001
S)-4CPG (mGluR1/5 antagonist)				

## MOLECULAR AND SYNAPTIC MECHANISMS

# Role of glutamate receptors in the dorsal reticular nucleus in formalin-induced secondary allodynia

Mónica Ambriz-Tututi, Marcela Palomero-Rivero, Fernanda Ramirez-López, Diana Millán-Aldaco and René Drucker-Colín

División de Neurociencias, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

**Keywords:** descending facilitation, dorsal reticular nucleus, glutamate receptors, rat, secondary allodynia

## Abstract

The role of glutamate receptors present in the medullary dorsal reticular nucleus (DRt) in the formalin test and formalin-induced secondary nociception was studied in rats. Secondary mechanical allodynia was assessed with von Frey filaments applied to the rat's hindpaw, and secondary thermal hyperalgesia was evaluated with the tail-immersion test. The selective glutamate receptor antagonists MK801 (*N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) (AMPA/KA receptor antagonist) and A841720 (metabotropic glutamate 1 receptor antagonist) were injected into the DRt before or 6 days after formalin injection in the rat. In the formalin test, the three antagonists significantly reduced the number of flinches in both phases of the test. DRt microinjection of MK801 or A841720, but not of CNQX, reduced both secondary nociceptive behaviors. Moreover, pre-treatment with the three antagonists injected into the DRt prevented the development of secondary mechanical allodynia and secondary thermal hyperalgesia. Similarly, in these rats, the number of c-Fos-like immunoreactive neurons were markedly reduced in both the superficial and deep lamina of the dorsal horn. Our findings support the role of DRt as a pain facilitator in acute and chronic pain states, and suggest a key role of glutamate receptors during the development and maintenance of formalin-induced secondary allodynia.

## Introduction

Several supraspinal sites have been shown to modulate spinal nociceptive transmission via descending neuronal projections (Fields *et al.*, 1991). Neuroplastic changes in the nervous system, especially supraspinal structures such as periaqueductal gray matter or the rostroventromedial medulla (RVM), are key for the generation and maintenance of chronic pain (Pertovaara *et al.*, 1996; Woolf & Salter, 2000).

The medullary dorsal reticular nucleus (DRt) has been described in different species, including monkeys (Villanueva *et al.*, 1990) and humans (Villanueva & Le Bars, 1995). It extends from the bulbo-spinal transition up to the level of the area postrema, neighboring the spinal dorsal horn lamina V and the parvocellular reticular nucleus (Newman, 1985). Neurons in the DRt respond either exclusively or preferentially to noxious somatic or visceral stimuli (Villanueva *et al.*, 1988; Roy *et al.*, 1991; Lima & Almeida, 2002). Within the DRt, there are two neuronal classes: total nociceptive convergence neurons, which are activated by noxious stimuli, and partial nociceptive convergent neurons, which are activated by both noxious and innocuous stimuli (Villanueva *et al.*, 1988). The DRt has projections to multiple areas of the brain related to pain perception, i.e. the amygdala, hypothalamus, periaqueductal gray matter,

parabrachial nuclei, RVM, and the nucleus tractus solitarius (Almeida *et al.*, 2002). Interestingly, a descending pathway targeting the spinal dorsal horn originates in the DRt (Bernard *et al.*, 1990; Lima, 1990; Villanueva *et al.*, 1991; Almeida *et al.*, 1993; Tavares & Lima, 1994; Villanueva & Le Bars, 1995). The involvement of the DRt in pain facilitation has been studied in acute and short-lasting inflammatory pain models (Almeida & Lima, 1997; Almeida *et al.*, 1999). There is electrophysiological evidence suggesting a contribution of the DRt to the maintenance of spinal sensitization (Sotgiu *et al.*, 2008). It has been reported that, during chronic inflammatory pain, the DRt shows a decrease in opioid receptor expression (Pinto *et al.*, 2008), whereas in neuropathic pain, there is an enhanced facilitatory action of noradrenaline (Martins *et al.*, 2010).

Secondary allodynia is defined as increased sensitivity to innocuous stimuli in a region adjacent to or distinct from the site of injury. It is a common feature of chronic pain states, such as neuropathies, fibromyalgia, complex regional pain syndrome, and post-herpetic neuralgia, to mention only a few (Merskey & Bogduk, 1994). Formalin injection into the rat's hindpaw not only produces acute inflammatory pain (Dubuisson & Dennis, 1977; Wheeler-Aceto & Cowan, 1991), but also induces long-term secondary hyperalgesia and allodynia (Wiertelak *et al.*, 1994; Fu *et al.*, 2000, 2001; Wu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007; Vierck *et al.*, 2008; Ambriz-Tututi *et al.*, 2009). Previous reports have shown the involvement of the RVM in formalin-induced secondary allodynia (Ambriz-Tututi *et al.*, 2011), but the involvement of the DRt in this model is unknown.

Correspondence: Dr R. Drucker-Colín, as above.

E-mails: rdrucker@ifc.unam.mx, drucker@servidor.unam.mx

Received 27 November 2012, revised 16 May 2013, accepted 9 June 2013

The DRt has been found to be immunoreactive to glutamate (Beart *et al.*, 1994). Moreover, glutamate injection into the DRt induces an increase in the neuronal responses to electrical stimulation of the sciatic nerve (Dugast *et al.*, 2003). This evidence suggests the possible participation of glutamate receptors in the pronociceptive role of the DRt. The purpose of the present study was to assess the pronociceptive action of DRt in long-term nociception and determine for the first time the role of glutamate receptors in the DRt in formalin-induced finches and secondary allodynia.

## Materials and methods

### Animals

Female Wistar rats aged 8–9 weeks (weight range, 250–350 g) from our own breeding facilities were used in this study ( $n = 6$  per group). Rats were housed on a 12-h light/dark cycle, and had free access to food and drinking water before experiments. Experiments were carried out at the same time of day (11:00–16:00 h). All experiments followed the Guidelines on Ethical Standards for Investigation of Experimental Pain in Animals (Zimmermann, 1983). Additionally, our experiments were conducted in accordance with the Principles and Procedures described by the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and in accordance with the Local Committee of the Universidad Nacional Autónoma de México.

### DRt surgery

For DRt surgery, rats were anaesthetised with isoflurane in oxygen (3% for induction and 1.5% for maintenance), and placed in a stereotaxic frame. A permanent 28-gauge stainless steel guide cannula (Plastics-One, Roanoke, VA, USA) was positioned in the DRt with stereotaxic coordinates (AP, 13.8; L, 1.6; and DV, 9.0) (Paxinos & Watson, 1997). The cannula was held in position by dental cement attached to stainless steel screws placed into the skull. Rats were allowed 4–6 days post-surgery to recover. To confirm correct cannula placement, rats were randomly selected and anaesthetised, and then perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The brainstem was then removed and post-fixed with the same solution. Coronal slices of 35  $\mu\text{m}$  were cut with a cryostat at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Each section was then stained with 0.17% cresyl fast violet in acetic acid (pH 4.8). Brain sections were examined under a light microscope to check the correct positioning of cannula guides according to Paxinos & Watson (1997). Drugs were microinjected into the DRt through a 33-gauge internal cannula inserted through and extending 2 mm beyond the tip of the guide cannula. The internal cannula was connected to a 10- $\mu\text{L}$  Hamilton syringe with polyethylene-10 tubing. Microinjections were performed by delivering drug or vehicle solution (2.5  $\mu\text{L}$ ) over a 1.5-min period.

### Behavioral testing

#### Formalin test

For the formalin test, rats were placed in open Plexiglas observation chambers for 30 min to allow them to acclimatise to their surroundings (Dubuisson & Dennis, 1977). Fifty microliters of 1% formalin was injected subcutaneously into the dorsal surface of the right hindpaw with a 30-gauge needle. The rats were returned to the chambers, and the nociceptive behavior was observed immediately after formalin injection. Nociceptive behavior was quantified as the

number of finches of the injected paw during 1-min periods every 5 min, up to 60 min after injection (Wheeler-Aceto & Cowan, 1991). Flinching was readily discriminated, and was characterised as rapid and brief withdrawal, or as flexing of the injected paw.

#### Formalin-induced mechanical allodynia

Rats were evaluated 6 days after formalin injection in the plantar surface of the right (ipsilateral) and the left (contralateral) paw (Fu *et al.*, 2000, 2001, 2009). This time point was selected because previous reports have shown well-established secondary allodynia at this time (Fu *et al.*, 2000, 2001; Ambriz-Tututi *et al.*, 2009, 2011). Rats were killed in a  $\text{CO}_2$  chamber at the end of the experiment.

Tactile allodynia was determined according to a previously reported method (Chaplan *et al.*, 1994). Briefly, rats were transferred to a clear plastic, wire mesh-bottomed cage, and allowed to acclimatise for 30 min. Von Frey filaments (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) were used to determine the 50% paw withdrawal threshold, with the up-down method of Dixon (Dixon, 1980; Chaplan *et al.*, 1994). Filaments, starting with one that had a buckling weight of 2 g, were applied in consecutive sequence to the plantar surface of the hindpaw with a pressure causing the filament to buckle. Lifting of the paw indicated a positive response, and prompted the use of the next weaker filament, whereas an absence of paw withdrawal after 5 s indicated a negative response, and prompted the use of the next stronger filament. This paradigm continued until four more measurements had been made after the initial change of the behavioral response, or until five consecutive negative (assigned a score of 15 g) or four consecutive positive (assigned a score of 0.25 g) responses had occurred. The resulting scores were used to calculate the 50% response threshold by using the formula: 50% g threshold =  $10(X_f + \kappa\delta)/10\ 000$ , where  $X_f$  is the value (in log units) of the final von Frey filament used,  $\kappa$  is the value (Chaplan *et al.*, 1994) for the pattern of positive and/or negative responses, and  $\delta$  is the mean difference (in log units) between stimulus strengths. Allodynia was considered to be present when paw withdrawal thresholds were  $< 4$  g. All formalin-injected rats were verified to be allodynic.

#### Formalin-induced thermal hyperalgesia

Six days after 1% formalin injection, rats were tested in the tail-immersion test to evaluate thermal hyperalgesia. The tail-immersion test was carried out as described by Janssen *et al.* (1963). The water bath was pre-heated to  $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rats were wrapped in a soft cloth, and the lower 5-cm portion of the tail was immersed in the water bath (Bölcskei, 2012). The time in seconds until tail withdrawal from the water was taken as the tail withdrawal latency or reaction time, with the cut-off time of immersion set at 12 s. The rat was returned to its home cage between measurements. The reaction time was measured before drug treatment and at 15, 30, 60 and 90 min after drug treatment.

#### Immunohistochemistry

After behavioral evaluation, randomly selected rats pre-treated with glutamate receptor antagonists were killed by decapitation, and the spinal cords were removed. The spinal cords from the thoracic to sacral regions were carefully dissected along with intact dura, fixed in buffered 4% paraformaldehyde, cryoprotected overnight with 15 and 30% sucrose (each for 24 h), and finally cut into 40- $\mu\text{m}$  slices

with a cryostat at a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Leica CM1900). Fos immunohistochemistry was performed with the avidin–biotin–peroxidase method. After blockade with 2.5% albumin, sections were incubated for 24 h in the presence of a Fos antibody (1 : 1000 dilution) (Chemicon, MS, USA) in phosphate-buffered saline and 3% Triton-X overnight. Sections were then washed in phosphate-buffered saline, and incubated for 4 h with goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1 : 250; Vector Labs, Burlingame, CA, USA) and washed again. After being washed, the sections were treated with the Vectastain ABC kit (Vector Labs). Sections were immersed for 3–5 min in 1 mg/mL diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.02% hydrogen peroxide in phosphate buffer, mounted on gelatinised slides, left overnight to dry, dehydrated in alcohol, and then coverslipped. Sections were evaluated with a Leica DM6000 vertical microscope and digitised with Leica LAS AF software; c-Fos-like immunoreactive (Fos-LI) cells were counted with a computerised image analyser (IMAGEJ software). Fos-LI nuclei were analysed without considering the intensity of the staining; five sections were selected from each rat ( $n = 3$ ). The region to be measured was outlined with a standard frame, and its area was measured and divided into sections for each experimental group according to delineations described by others (Pinto *et al.*, 2006): laminae I–II and laminae III, IV and V. For statistical analysis, mean c-Fos-like immunoreactivity for the defined regions of each subject was calculated and analysed by ANOVA and the Dunnett *post hoc* test.

### Drugs

The following drugs were used: the AMPA/KA receptor antagonist 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist MK801 [5-methyl-10, 11-dihydro-5*H*-dibenzo(a,d)cycloheptene-5,10-imine maleate], and the metabotropic glutamate 1 (mGlu1) receptor antagonist A841714 [9-(dimethylamino)-3-(hexahydro-1*H*-azepin-1-yl)pyrido(3',2':4,5)thieno(3,2-d)pyrimidin-4(3-*H*)-one], all of which were obtained from Tocris (Ellisville, MO, USA). CNQX and MK801 were dissolved in saline (0.9% NaCl), and A841720 was dissolved in 20% ethanol.

### Study design

#### Post-treatment protocol

Six days after formalin injection, rats were verified to be allodynic as described above. Glutamate receptor antagonists were administered into the DRt, and secondary mechanical allodynia or secondary thermal hyperalgesia was evaluated after each treatment. Control groups received vehicle (saline or 20% ethanol). To exclude the possibility that the effects of the different antagonists resulted from motor impairment, rats were evaluated by observing the righting, rearing and stepping reflexes, 15 min after the administration of glutamate antagonists, as previously reported (Malmberg & Yaksh, 1992).

#### Pre-treatment protocol

Glutamate receptor antagonists were administered into the DRt 10 min before the formalin injection. Control rats received vehicle 10 min before formalin injection. Evaluation of the formalin test was performed immediately after drug injection. Secondary mechanical allodynia and secondary thermal hyperalgesia evaluation was performed 6 days after formalin administration. Immunohistochemistry

for Fos was performed in spinal cord slices of DRt pre-treated rats.

### Data and statistical analysis

Data of behavioral experiments are given as the mean  $\pm$  SEM of six rats per group. Curves were constructed by plotting the nociceptive response as a function of time. The area under the nociceptive response–time curve (AUC) was calculated with the trapezoidal method. One-way ANOVA, followed by Dunnett's test, was used to compare differences between treatments in behavioral experiments. Differences were considered to be statistically significant at  $P \leq 0.05$ .

## Results

### Effect of glutamate receptor antagonist injection into the DRt in the formalin test

Formalin-induced finching behavior was biphasic (Fig. 1A). The initial acute phase (0–10 min) was followed by a relatively short quiescent period, which was then followed by a prolonged tonic response (15–60 min). The formalin-induced nociceptive behavior, expressed as mean finches/min, was significantly reduced by the injection of CNQX (4 nM), MK801 (3 nM) and A841720 (4 nM) into the DRt, given 10 min prior to formalin injection. During phase 1, CNQX and A841720 but not MK801 significantly reduced the number of finches as compared with vehicle ( $F_{4,21} = 7.506$  and  $P = 0.006$  in one-way ANOVA; Fig. 1B). In phase 2 of the test, the three drugs reduced the number of finches significantly ( $F_{4,21} = 17.58$  and  $P < 0.001$  in one-way ANOVA; Fig. 1C). No reduction in the assessed reflexes was observed in vehicle-treated groups.

### Formalin-induced secondary allodynia

Six days after formalin injection, rats developed secondary allodynia in ipsilateral (injected) and contralateral (non-injected) hindpaws (Fig. 2). The mean ( $\pm$  SEM) paw withdrawal thresholds of formalin-injected rats decreased significantly, from  $14.33 \pm 0.661$  g to  $2.80 \pm 0.39$  g, in ipsilateral hindpaws, and from  $15 \pm 0$  g to  $3.51 \pm 0.18$  g in contralateral hindpaws ( $t = 29$  and  $P < 0.001$ ; Fig. 2).

### Post-treatment with glutamate receptor antagonists

After verification that the rats were allodynic, glutamate receptor antagonists were administered into the DRt; the concentration of each antagonist was chosen according to previous reports (Spinella *et al.*, 1996). Administration of CNQX (4–100 nM) into the DRt of formalin-injected rats did not produce an antiallodynic effect (Fig. 3). The mechanical thresholds of ipsilateral and contralateral hindpaws were similar to those with vehicle treatment (saline) (Fig. 3C and D). The AUCs of withdrawal thresholds from 10 to 90 min after CNQX or vehicle administration are shown in Fig. 3C and D. In contrast, administration of MK801 (3 nM) into the DRt produced a significant antiallodynic effect that lasted for  $\sim 60$  min in both ipsilateral and contralateral hindpaws ( $F_{5,22} = 94.32$  and  $P < 0.001$  in one-way ANOVA; Fig. 4A and B). The AUCs of withdrawal thresholds from 10 to 90 min after MK801 or vehicle administration are shown in Fig. 4C and D. On the other hand, A841720 (4 nM) also reversed secondary



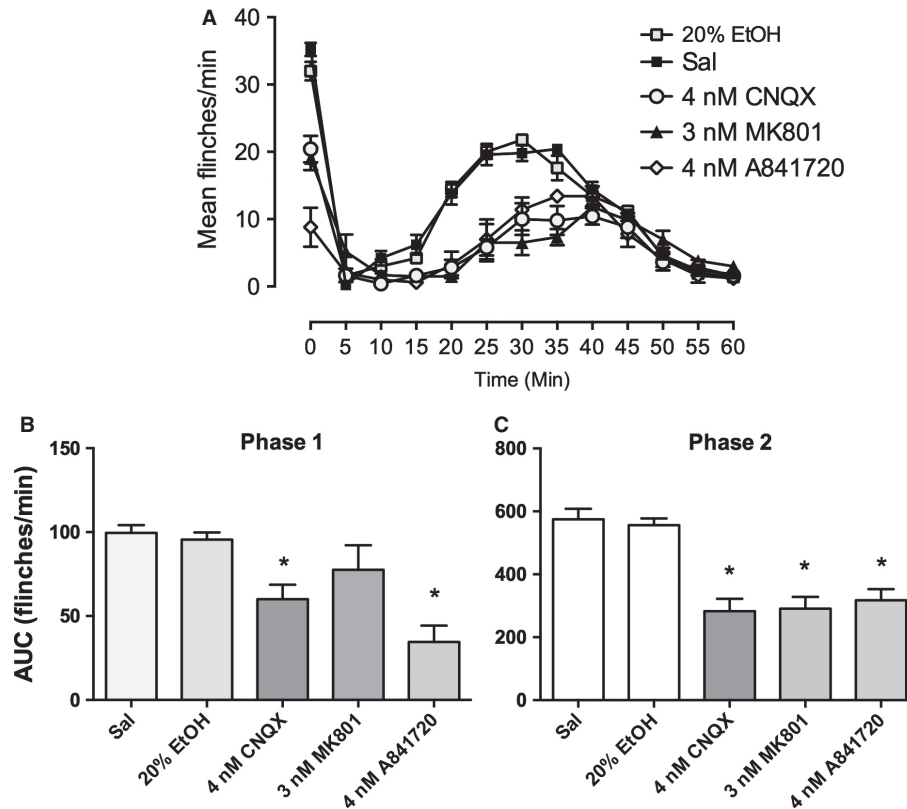


FIG. 1. (A) Time course of the antinociceptive effect of glutamate receptor antagonists injected into the DRt in the formalin test. Rats were pretreated with an injection into the DRt of saline or drugs 10 min before formalin injection. (B and C) Data are expressed as the area under the nociceptive response-time curve (AUC). Bars are mean  $\pm$  SEM of six rats. \* $P < 0.05$  vs. saline; # $P < 0.05$  vs. 20% ethanol; one-way ANOVA followed by Dunnett's test. EtOH, ethanol; Sal, saline.

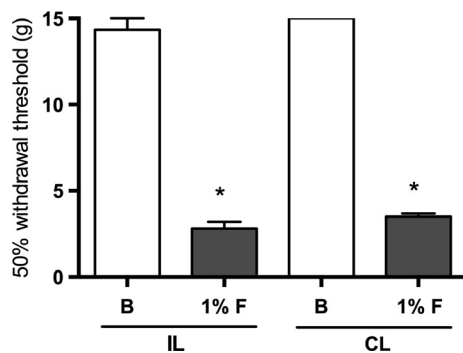


FIG. 2. Secondary allodynia induced 6 days after hindpaw injection of formalin. Data are expressed as the 50% withdrawal threshold responses to the applications of von Frey filaments to the plantar surface of rat paws. Data are presented as mean  $\pm$  SEM for 6 rats. \* $P < 0.05$  vs. basal group, *t*-test. B, basal, before formalin injection; CL, contralateral; 1% F, 6 days after 1% formalin injection; IL, ipsilateral.

mechanical allodynia in both ipsilateral and contralateral hindpaws ( $F_{5,23} = 38.64$  and  $P < 0.001$  in one-way ANOVA; Fig. 5A and B). Vehicle injections did not produce changes in nociceptive threshold. The AUCs of withdrawal thresholds from 10 to 90 min after drug or vehicle administration are shown in Fig. 5C and D). Histological examination revealed correct cannula positions in all rats. This is illustrated by representative sections in Fig. 6. No side effects on motor activity were observed in any of the treated groups.

#### Pre-treatment with glutamate receptor antagonists

In order to determine the role of glutamate receptors located in the DRt in formalin-induced secondary mechanical allodynia, glutamate receptor antagonists were administered into the DRt 10 min before formalin injection. We found that the pre-treatment with CNQX (4 nM), MK801 (3 nM) or A841720 (4 nM) prevented the development of secondary allodynia in both ipsilateral and contralateral hindpaws ( $F_{6,24} = 13.29$  and  $P < 0.001$  in one-way ANOVA; Fig. 7A and B). Statistical analysis did not show a significant difference as compared with control rats ( $F_{3,18} = 0.8176$  and  $P = 0.773$  in one-way ANOVA; Fig. 7). Vehicle, saline or 20% ethanol administration into the DRt under the same conditions produced no significant changes in rats injected with 1% formalin ( $F_{2,6} = 0.3747$  and  $P = 0.7025$  in one-way ANOVA).

#### Formalin-induced secondary thermal hyperalgesia

Before performing the tail immersion-test, we determined the baseline in each rat. In the post-treatment protocol, injection of MK801 or A841720 (3 and 4 nM, respectively) increased tail-immersion latencies, with the maximal antinociceptive response being reached at 15 min (MK801) or 30 min (A841720) after drug injection (Fig. 8A) ( $F_{5,20} = 24.30$  and  $P = 0.013$  in two-way ANOVA). However, the AMPA/KA receptor antagonist CNQX (4 nM) did not modify tail-immersion latency in formalin-injected rats (Fig. 8A). On the other hand, pre-treatment with each one of the antagonists ( $-10$  min) prevented the development of secondary thermal hyperalgesia 6 days after formalin injection ( $F_{5,20} = 19.02$  and  $P < 0.001$



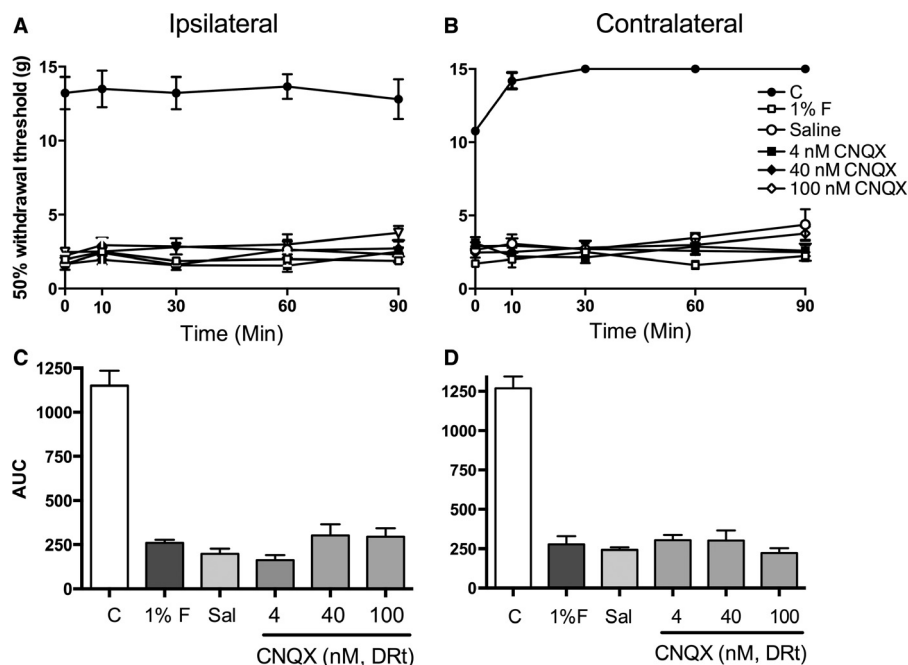


FIG. 3. (A and B) Time course of the effect of CNQX (4–100 nM, DRt) on formalin-induced secondary mechanical allodynia in ipsilateral (A) and contralateral (B) hindpaws. Data are expressed as the 50% withdrawal threshold responses to the applications of von Frey filaments to the plantar surface of rat paws. C, control before formalin injection; 1% F, 6 days after 1% formalin injection; Sal, saline 6 days after formalin injection. (C and D) Respective areas under the nociceptive response-time curve (AUC). Data are mean  $\pm$  SEM for 6 rats.

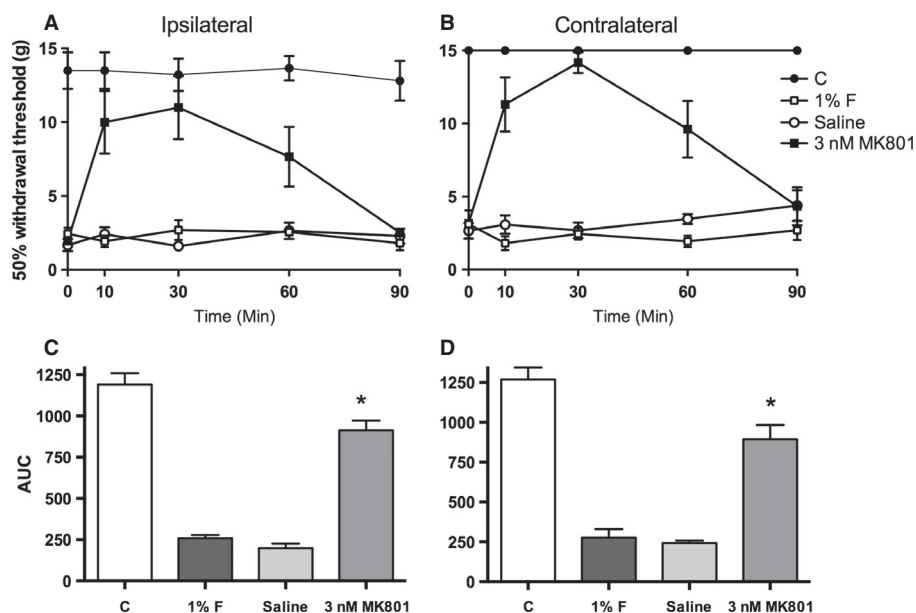


FIG. 4. (A and B) Time course of the effect of MK801 (3 nM, DRt) on formalin-induced secondary mechanical allodynia in ipsilateral (A) and contralateral (B) hindpaws. Data are expressed as the 50% withdrawal threshold responses to the applications of von Frey filaments to the plantar surface of rat paws. C, control before formalin injection; 1% F, 6 days after 1% formalin injection. (C and D) Respective areas under the withdrawal threshold-time curve (AUC). Data are mean  $\pm$  SEM for 6 rats. \* $P < 0.05$  vs. saline; one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

in one-way ANOVA; Fig. 8B). Vehicle injection did not modify the development of secondary hyperalgesia.

#### Fos immunohistochemistry

Six days after local subcutaneous injection of formalin, a significant increase in c-Fos-like immunoreactivity was observed in the spinal

dorsal horn (lumbar level) as compared with control intact rats or saline-injected rats ( $F_{3,18} = 42.59$  and  $P < 0.001$  in one-way ANOVA; Fig. 9). Increases in the density of Fos-positive nuclei were observed in both the ipsilateral and the contralateral sides in formalin-injected rats ( $F_{3,18} = 30.17$  and  $P < 0.001$  in one-way ANOVA; Fig. 9A–F). The number of Fos-positive cells in control intact rats was not significantly different from that in saline-injected rats

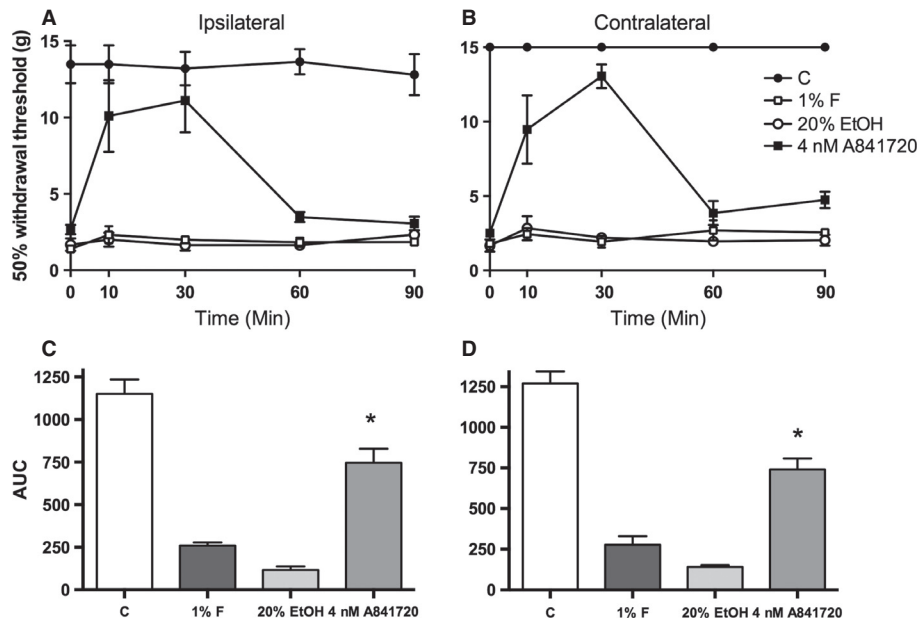


FIG. 5. (A and B) Time course of the effect of A841720 (4 nM, DRt) on formalin-induced secondary mechanical allodynia in ipsilateral (A) and contralateral (B) hindpaws. Data are expressed as the 50% withdrawal threshold responses to the applications of von Frey filaments to the plantar surface of rat paws. C, control before formalin injection; 1% F, 6 days after 1% formalin injection; EtOH, 20% ethanol 6 days after formalin injection. (C and D) Respective areas under the withdrawal threshold–time curve (AUC). Data are mean  $\pm$  SEM for 6 rats. \* $P < 0.05$  vs. vehicle; one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

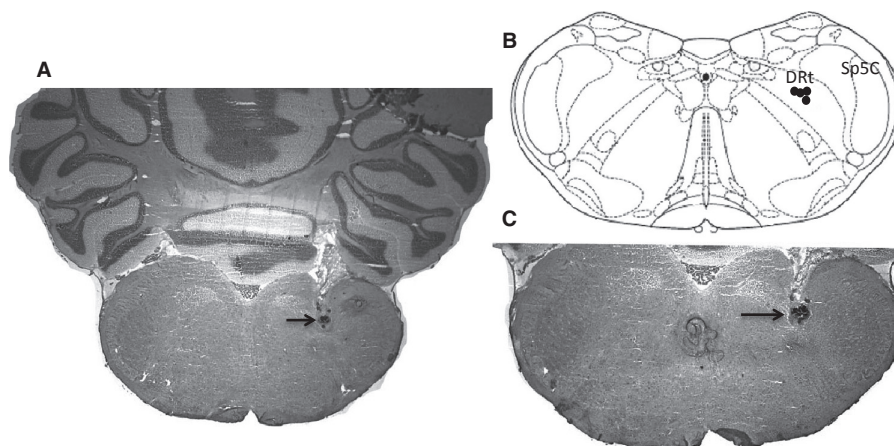


FIG. 6. Histological verification of injection sites. (A) Typical injection site located  $-13.8$  posterior to bregma. (B) Summary diagram of injection sites. All functionally identified sites were within the anatomical boundaries of the DRt. Sp5c, caudal spinal trigeminal nucleus.

( $F_{5,27} = 2.115$  and  $P = 0.0943$  in one-way ANOVA; Fig. 9G and H). Rats subjected to the pre-treatment protocol with antagonists or vehicles were processed in parallel. Pre-treatment with 4 nM CNQX, 3 nM MK801 or 4 nM A841720 reduced the density of Fos-positive neurons as compared with the respective vehicle in both ipsilateral and contralateral dorsal horns ( $F_{8,42} = 38.24$  and  $P < 0.001$  in one-way ANOVA; Fig. 10A–J). Quantitative analysis showed a significant difference between drug-treated rats and rats treated with vehicle or formalin ( $F_{8,42} = 24.08$  and  $P < 0.001$  in one-way ANOVA; Fig. 10K–P). The numbers of Fos-positive neurons appeared to be markedly reduced both in the superficial and the deeper laminae of the spinal dorsal horn at the lumbar level.

## Discussion

The present study has shown that, in an acute or chronic state of nociception, the pronociceptive role of DRt involves the participation

of glutamate receptors. Previously, it was shown that chemical or electrolytic lesion of the DRt decreased pain behavior during the formalin test, suggesting that DRt is involved in the facilitation of acute nociception in the formalin test (Almeida *et al.*, 1999). Our results suggest that the AMPA/KA, NMDA and mGlu1 glutamate receptors, located in the DRt, are involved in this effect, as their antagonists reduced the flinching behavior significantly. We extended this result to the role of DRt in the establishment and maintenance of formalin-induced long-term nociception. Furthermore, our results showed a glutamate receptor-mediated process within the DRt that is required for the development of secondary mechanical allodynia and secondary thermal hyperalgesia. Previous reports have shown that DRt stimulation by local administration of glutamate leads to a decrease in the tail-flick latency, whereas lesioning the nucleus with quinolinic acid results in an increase in response thresholds in the tail-flick and hot-plate tests (Almeida *et al.*, 1996). This evidence settled the basis of the putative role of glutamate receptors inside the

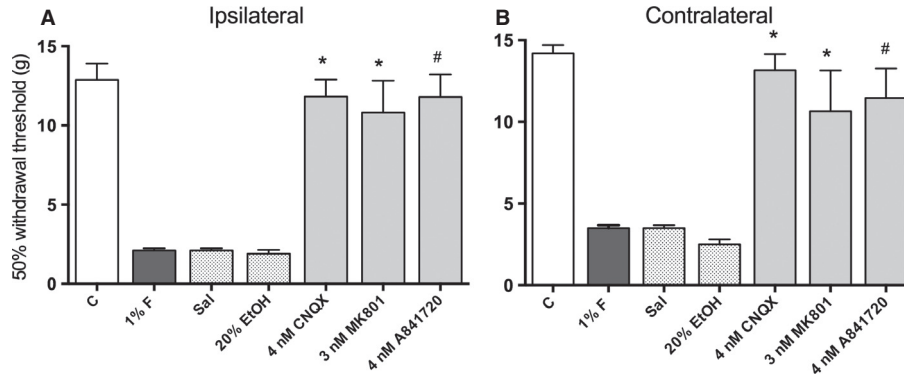


FIG. 7. Effect of pre-treatment with CNQX (4 nM), MK801 (3 nM) or A841720 (4 nM) on formalin-induced secondary mechanical allodynia in ipsilateral (A) and contralateral (B) hindpaws. Antagonists were administered 10 min before formalin injection. Data are expressed as the 50% withdrawal threshold responses to the applications of von Frey filaments to the plantar surface of rat paws. C, control before formalin injection; EtOH, ethanol; 1% F, 6 days after 1% formalin injection; Sal, saline 6 days after formalin injection. Data are mean  $\pm$  SEM for 6 rats. \* $P < 0.05$  vs. saline; # $P < 0.05$  vs. 20% ethanol; one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

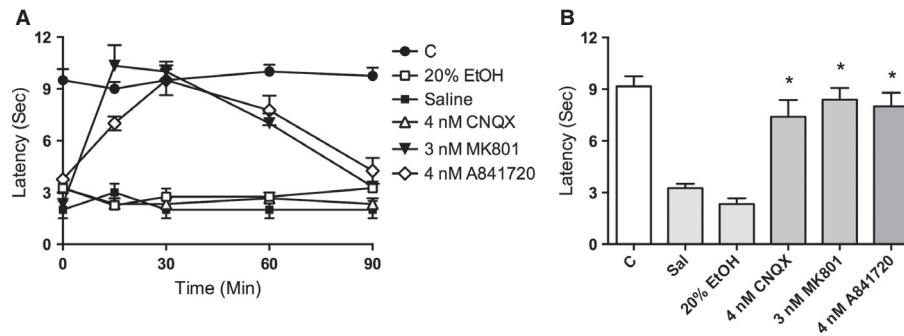


FIG. 8. Effect of glutamate receptor antagonists injected into the DRt on formalin-induced secondary thermal hyperalgesia. Thermal hyperalgesia was evaluated in the tail-immersion test. (A) Time course of post-treatment with glutamate receptor antagonists. (B) Effect of pre-treatment with glutamate receptor antagonist, 6 days after formalin injection. C, control before formalin injection; EtOH, ethanol; Sal, saline. Data are mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs. saline; # $P < 0.05$  vs. 20% ethanol; one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

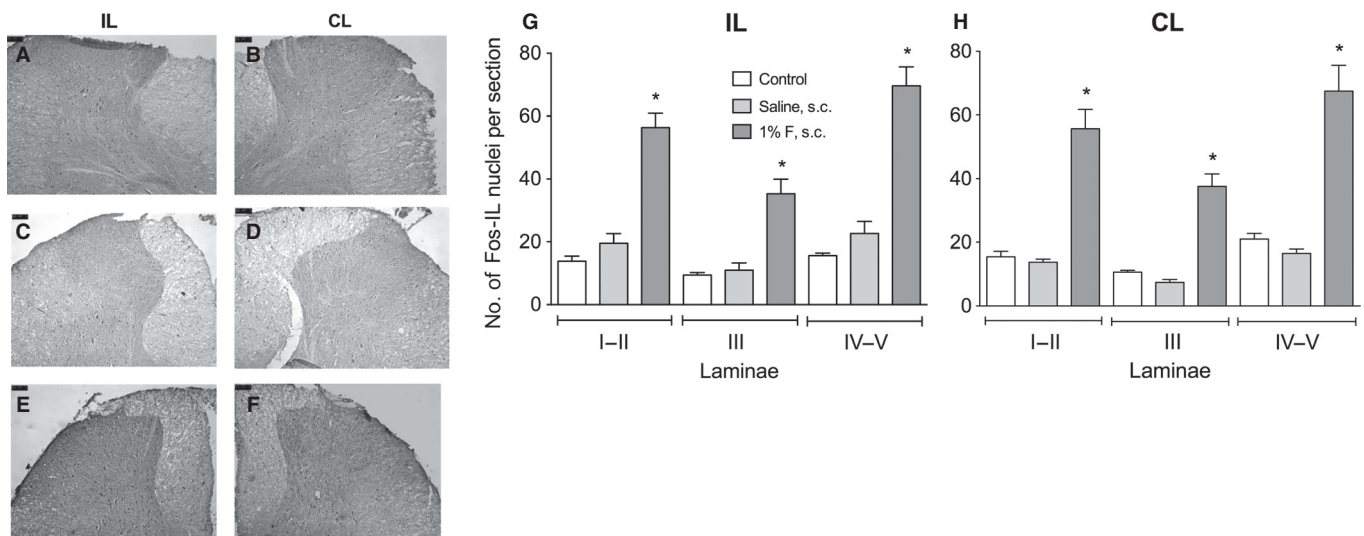


FIG. 9. (A–F) Representative c-Fos-like immunoreactivity in spinal dorsal horns of control (A and B), saline-treated (C and D) and 1% formalin-treated (E and F) rats. Immunohistochemistry was performed 6 days after saline or formalin injection. The ipsilateral and contralateral sides are shown. (G and H) Quantitative data indicating the number of Fos-LI neurons in the superficial (I–II) and deep (III–V) laminae of each group. Three rats were used for each group. The data represent the mean number of Fos-LI neurons from five randomly selected sections of each rat. All data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs. intact control group; one-way ANOVA followed by Dunnett's test. CL, contralateral; 1% F, 6 days after 1% formalin injection; IL, ipsilateral; s.c., subcutaneous.



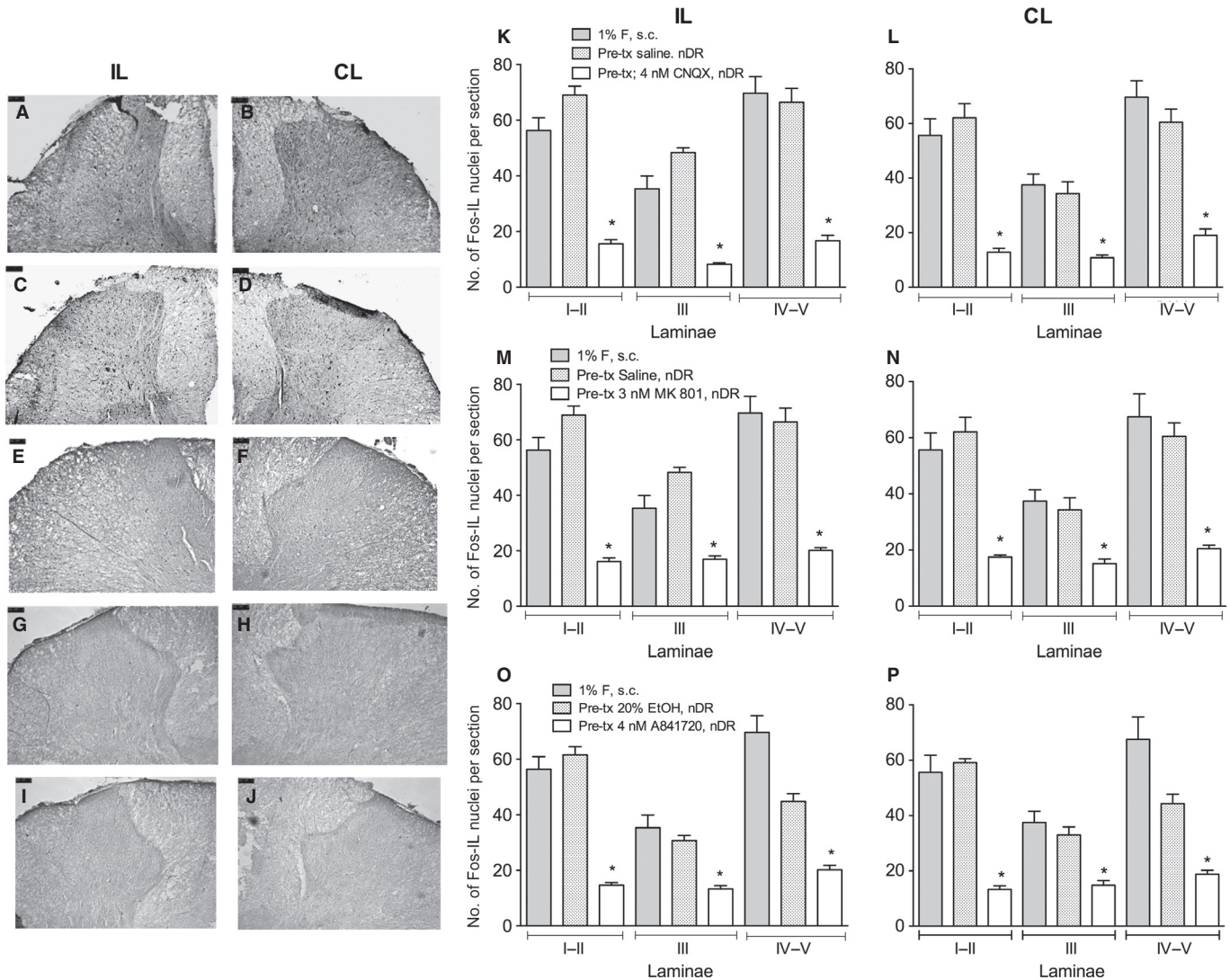


FIG. 10. (A–J) Representative c-Fos-like immunoreactivity in the spinal dorsal horn 6 days after subcutaneous (s.c.) formalin injection in rats pre-treated (10 min) with saline (A and B), 20% ethanol (C and D), CNQX (E and F), A841720 (G and H) or MK801 (I and J) in the DRt. The ipsilateral and contralateral sides are shown. (K–P) Quantitative data indicating the number of Fos-LI neurons in the superficial (I–II) and deep (III–V) laminae of each group. Three rats were used for each group. The data represent the mean number of Fos-LI neurons from five randomly selected sections of each rat. All data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs. 1% formalin group; one-way ANOVA followed by Dunnett's test. CL, contralateral; EtOH, ethanol; 1% F, 6 days after 1% formalin injection; IL, ipsilateral; nDR; tx, treatment.

DRt. We showed that NMDA, AMPA/Ka and mGlu1 receptors located in the DRt play a key role in the establishment and maintenance of secondary nociceptive behavior. Interestingly, it has also been reported that the DRt contributes to a chronic pain condition through the activation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors (Martins *et al.*, 2010). These findings reveal at least some of the mechanisms whereby DRt facilitates nociception.

In the present study, the injection of NMDA or mGlu1 receptor antagonists into the DRt reduced formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia. This evidence, along with other studies, supports the role of glutamate receptors in supraspinal modulation of inflammatory or neuropathic pain (Coutinho *et al.*, 1998; Urban & Gebhart, 1999; Varty *et al.*, 2005; Ansah *et al.*, 2009; Jeon *et al.*, 2011). Other studies have shown the importance of spinal mechanisms (Nozaki-Taguchi & Yaksh, 2002; Pogatzki *et al.*, 2003) and the contribution of other supraspinal structures (i.e. the RVM) (Ambriz-Tututi *et al.*, 2011) in the development of secondary allodynia. In our study, the administration of MK801 or A841720 did

not reverse formalin-induced allodynia completely, suggesting that there is an additional mechanism involved. In the case of post-treatment with CNQX, we did not observe an antiallodynic or antihyperalgesic effect. This finding suggests that AMPA/KA receptors in the DRt are not involved in the maintenance of formalin-induced secondary nociception. In accordance with our results, Jones and Sorkin (2004) found that antiallodynic doses of AMPA/KA receptor antagonists did not reverse secondary mechanical allodynia when administered spinally 5 min after thermal injury. As Pinto *et al.* (2008) found that the DRt shows a decrease in opioid receptor expression during chronic inflammatory pain, it would be interesting to determine the expression of glutamate receptors under our conditions. In the RVM, post-treatment with AMPA/KA receptor antagonist has been reported to produce an antinociceptive effect in the complete Freund's adjuvant model (Guan *et al.*, 2002), which is in contrast to our results, but this difference could be attributed to the time of evaluation, the pain model, and, most importantly, to the site of administration.

On the other hand, pre-treatment with each of the glutamate receptor antagonists prevented the development of secondary allodynia in both hindpaws and secondary hyperalgesia in the tail; this correlates with the decrease in the number of Fos-LI dorsal horn neurons in our rats. Also, it correlates with our results in the formalin test, where pre-treatment with the glutamate receptor antagonists significantly reduced the nociceptive behavior. It has been reported that intracerebroventricular injection of MK801 or CNQX 15 min prior to the formalin test reduces formalin-induced nociceptive responses (Chung *et al.*, 2000). Moreover, pre-treatment with intracerebroventricular NMDA receptor antagonist blocked the development of secondary hyperalgesia (Xu *et al.*, 2007). However, the exact site of action of the antagonist was unknown. Our results suggest that glutamate receptors located in the DRt contribute significantly to the induction of formalin-induced secondary nociception.

We observed that, after 6 days of formalin injection, c-Fos-like immunoreactivity was still present in the dorsal spinal cord. This agrees with findings in chronic inflammation models (i.e. CFA), where c-Fos-like immunoreactivity usually persists for several weeks in superficial and deep laminae (Leah *et al.*, 1996; Schadrack *et al.*, 1998). On the other hand, we observed a reduction in c-Fos-like immunoreactivity in the dorsal horn of rats pre-treated with glutamate receptor antagonists administered into the DRt, which correlates with the prevention of secondary allodynia and hyperalgesia. Almeida *et al.* (1999) reported that c-Fos-like immunoreactivity induced during the formalin test is significantly reduced in the dorsal horn of rats with DRt lesions. This evidence correlates with the anatomical projections from the DRt to the spinal cord, and supports the suggestion of Lima & Almeida (2002) that the DRt facilitates pain through spinal neurons. Descending bilateral projections connecting the DRt with spinal cord laminae I, IV and V have been demonstrated with tracing techniques (Lima & Coimbra, 1988; Villanueva & Le Bars, 1995). In agreement with this, we found a reduction in c-Fos-like immunoreactivity in these laminae in both ipsilateral and contralateral dorsal horns of rats pre-treated with glutamate receptor antagonists, even after injection only in the ipsilateral DRt. In the formalin test, pain behavior was decreased after a contralateral DRt lesion; the authors suggested that the ventral DRt–spinal loop, which connects bilaterally with the deep dorsal horn, could mediate this effect (Tavares & Lima, 1994; Almeida *et al.*, 1995, 1999). Our c-Fos-like immunoreactivity results show, for the first time, that, in more prolonged pain conditions, activation of DRt-projecting deep dorsal horn cells also occurs.

Electrophysiological evidence shows that microinjection of lidocaine into the DRt leads to decreases in C-fiber evoked responses to sciatic nerve stimulation and the post-discharge activity of wide dynamic range spinal neurons (Dugast *et al.*, 2003). Together, these findings support the involvement of the DRt in pain facilitation through spinal neurons. Although formalin-induced secondary allodynia involves tissue and nerve damage (Shields *et al.*, 2010), the nociceptive behaviors induced in the rat do not last for more than 4 weeks (Fu *et al.*, 2000, 2001). It would be interesting to determine the role of the DRt in other models of inflammatory and neuropathic pain, as it is possible that a different pattern of descending facilitation could be developed, depending on the etiology and duration of the injury. A study showed that, in monoarthritic animals, both  $\mu$ -opioid and  $\delta$ -opioid receptors located in the DRt are downregulated (Pinto *et al.*, 2006). The authors suggested that such changes can amplify the DRt–spinal loop facilitatory effects. This, together with our results, suggests that more than one mechanism is developed inside the DRt to maintain long-term pain. In summary, our study supports the hypothesis that DRt activation may be involved in the

descending pain facilitation that underlies long-lasting nociception related to formalin injection. The antiallodynic and antihyperalgesic actions of DRt-administered glutamate receptor antagonists suggest that the tonic activity of glutamate may be critical in maintaining the abnormal pain after formalin injection. Increased release of glutamate or increased sensitivity of glutamate receptors in the DRt may be at least one mechanism by which secondary nociception is maintained. Sustained afferent input induced by formalin injection could lead to the increased glutamate activity in the DRt, probably activating descending circuits in the spinal cord. The comprehensive understanding of the involvement of the DRt in pain processing prompts an extensive evaluation of its functions in other pain conditions, mainly in different forms of chronic pain.

## Acknowledgements

F. Ramirez-López is a graduate student from the Universidad Nacional Autónoma de México. The authors greatly appreciate the technical assistance of Diana Millán-Aldaco and Marcela Palomero-Rivero. This study was supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT IB202112, DGAPA-PAPITT IN204612 and Secretaria de Ciencia, Tecnología e Innovación del DF PINV11-30 grants to R. Drucker-Colin.

## Abbreviations

AUC, area under the nociceptive response–time curve; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; DRt, medullary dorsal reticular nucleus; Fos-LI, c-Fos-like immunoreactive; mGlu1, metabotropic glutamate 1; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; RVM, rostroventromedial medulla; SEM, standard error of the mean.

## References

- Almeida, A. & Lima, D. (1997) Activation by cutaneous or visceral noxious stimulation of spinal neurons projecting to the medullary dorsal reticular nucleus in the rat: a c-fos study. *Eur. J. Neurosci.*, **9**, 686–695.
- Almeida, A., Tavares, I., Lima, D. & Coimbra, A. (1993) Descending projections from the medullary dorsal reticular nucleus make synaptic contacts with spinal cord lamina I cells projecting to that nucleus: an electron microscopic tracer study in the rat. *Neuroscience*, **55**, 1093–1096.
- Almeida, A., Tavares, I. & Lima, D. (1995) Projection sites of superficial or deep dorsal horn in the dorsal reticular nucleus. *NeuroReport*, **6**, 1245–1248.
- Almeida, A., Tjølsen, A., Lima, D., Coimbra, A. & Hole, K. (1996) The medullary dorsal reticular nucleus facilitates acute nociception in the rat. *Brain Res. Bull.*, **39**, 7–15.
- Almeida, A., Størkson, R., Lima, D., Hole, K. & Tjølsen, A. (1999) The medullary dorsal reticular nucleus facilitates pain behaviour induced by formalin in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 110–122.
- Almeida, A., Cobos, A., Tavares, I. & Lima, D. (2002) Brain afferents to the medullary dorsal reticular nucleus: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, **16**, 81–95.
- Ambriz-Tututi, M., Rocha-González, H.I., Castañeda-Corral, G., Araiza-Saldaña, C.I., Caram-Salas, N.L., Cruz, S.L. & Granados-Soto, V. (2009) Role of opioid receptors in the reduction of formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **619**, 25–32.
- Ambriz-Tututi, M., Cruz, S.L., Urquiza-Marin, H. & Granados-Soto, V. (2011) Formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia are maintained by descending facilitation. *Pharmacol. Biochem. Be.*, **98**, 417–424.
- Ansah, O.B., Gonçalves, L., Almeida, A. & Pertovaara, A. (2009) Enhanced pronociception by amygdaloid group I metabotropic glutamate receptors in nerve-injured animals. *Exp. Neurol.*, **216**, 66–74.
- Beart, P.M., Summers, R.J., Stephenson, J.A. & Christie, M.J. (1994) Excitatory amino acid projections to the nucleus of the solitary tract in the rat: a retrograde transport study utilizing D-[<sup>3</sup>H]aspartate and [<sup>3</sup>H]GABA. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **50**, 109–122.
- Bernard, J.F., Villanueva, L., Carroué, J. & Le Bars, D. (1990) Efferent projections from the subnucleus reticularis dorsalis (SRD): a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neurosci. Lett.*, **116**, 257–262.



- Bölskei, K. (2012). Methods to study thermnociception in rodents. In Szalasi, A. & Biró, T. (Eds), *TRP Channels in drug discovery*, Vol II. Humana Press, Springer Protocols, NY, pp. 401–417.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M. & Yaksh, T.L. (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Meth.*, **53**, 55–63.
- Chung, K.M., Song, D.K., Huh, S.O., Kim, Y.H., Choi, M.R. & Suh, H.W. (2000) Supraspinal NMDA and non-NMDA receptors are differentially involved in the production of antinociception by morphine and beta-endorphin administered intracerebroventricularly in the formalin pain model. *Neuropeptides*, **34**, 158–166.
- Coutinho, S.V., Urban, M.O. & Gebhart, G.F. (1998) Role of glutamate receptors and nitric oxide in the rostral ventromedial medulla in visceral hyperalgesia. *Pain*, **78**, 59–69.
- Dixon, W.J. (1980) Efficient analysis of experimental observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **20**, 441–462.
- Dubuisson, D. & Dennis, S.G. (1977) The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, **4**, 161–174.
- Dugast, C., Almeida, A. & Lima, D. (2003) The medullary dorsal reticular nucleus enhances the responsiveness of spinal nociceptive neurons to peripheral stimulation in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 580–588.
- Fields, H.L., Heinricher, M.M. & Mason, P. (1991) Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu. Rev. Neurosci.*, **14**, 219–245.
- Fu, K.Y., Light, A.R. & Maixner, W. (2000) Relationship between nociceptor activity, peripheral edema, spinal microglial activation and long-term hyperalgesia induced by formalin. *Neuroscience*, **101**, 1127–1135.
- Fu, K.Y., Light, A.R. & Maixner, W. (2001) Long-lasting inflammation and long-term hyperalgesia after subcutaneous formalin injection into the rat hindpaw. *J. Pain*, **2**, 2–11.
- Fu, K.Y., Tan, Y.H., Sung, B. & Mao, J. (2009) Peripheral formalin injection induces unique spinal cord microglial phenotypic changes. *Neurosci. Lett.*, **449**, 234–239.
- Guan, Y., Terayama, R., Dubner, R. & Ren, K. (2002) Plasticity in excitatory amino acid receptor-mediated descending pain modulation after inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**, 513–520.
- Janssen, P.A., Niemegeers, C.J. & Dony, J.G. (1963) The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. *Arzneimittelforschung*, **13**, 502–507.
- Jeon, H.J., Han, S.R., Lim, K.H., Won, K.A., Bae, Y.C. & Ahn, D.K. (2011) Intracisternal administration of NR2 subunit antagonists attenuates the nociceptive behavior and p-p38 MAPK expression produced by compression of the trigeminal nerve root. *Mol. Pain*, **7**, 46.
- Jones, T.L. & Sorkin, L.S. (2004) Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid/kainate receptors mediate development, but not maintenance, of secondary allodynia evoked by first-degree burn in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **310**, 223–229.
- Leah, J.D., Porter, J., de-Pommery, J., Menétreay, D. & Weil-Fugazza, J. (1996) Effect of acute stimulation on Fos expression in spinal neurons in the presence of persisting C-fiber activity. *Brain Res.*, **719**, 104–111.
- Lima, D. (1990) A spinomedullary projection terminating in the dorsal reticular nucleus of the rat. *Neuroscience*, **34**, 577–589.
- Lima, D. & Almeida, A. (2002) The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive center of the pain control system. *Prog. Neurobiol.*, **66**, 81–108.
- Lima, D. & Coimbra, A. (1988) The spinothalamic system of the rat: structural types of retrogradely labelled neurons in the marginal zone (lamina I). *Neuroscience*, **27**, 215–230.
- Malmberg, A.B. & Yaksh, T.L. (1992) Isobolographic and dose–response analyses of the interaction between intrathecal mu and delta agonists: effects of naltrindole and its benzofuran analog (NTB). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **263**, 264–275.
- Martins, I., Costa-Araújo, S., Fadel, J., Wilson, S.P., Lima, D. & Tavares, I. (2010) Reversal of neuropathic pain by HSV-1-mediated decrease of nor-adrenaline in a pain facilitatory area of the brain. *Pain*, **151**, 137–145.
- Merskey, H. & Bogduk, N. (1994). *Classification of Chronic Pain*, 2nd edn. IASP Press, Seattle, WA, pp. 40–43.
- Newman, D.B. (1985) Distinguishing rat brainstem reticulospinal nuclei by their neuronal morphology. *I. Medullary nuclei. J. Hirnforsch.*, **26**, 187–226.
- Nozaki-Taguchi, N. & Yaksh, T.L. (2002) Spinal and peripheral mu opioids and the development of secondary tactile allodynia after thermal injury. *Anesth. Analg.*, **94**, 968–974.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Sydney.
- Pertovaara, A., Wei, H. & Hämäläinen, M.M. (1996) Lidocaine in the rostroventromedial medulla and the periaqueductal gray attenuates allodynia in neuropathic rats. *Neurosci. Lett.*, **218**, 127–130.
- Pinto, M., Lima, D. & Tavares, I. (2006) Correlation of noxious evoked c-fos expression in areas of the somatosensory system during chronic pain: involvement of spino-medullary and intra-medullary connections. *Neurosci. Lett.*, **409**, 100–105.
- Pinto, M., Castro, A.R., Tshudy, F., Wilson, S.P., Lima, D. & Tavares, I. (2008) Opioids modulate pain facilitation from the dorsal reticular nucleus. *Mol. Cell. Neurosci.*, **39**, 508–518.
- Pogatzki, E.M., Niemeier, J.S., Sorkin, L.S. & Brennan, T.J. (2003) Spinal glutamate receptor antagonists differentiate primary and secondary mechanical hyperalgesia caused by incision. *Pain*, **105**, 97–107.
- Roy, G., Philippe, E., Gaulin, F. & Guay, G. (1991) Peripheral projections of the chick primary sensory neurons expressing gamma-aminobutyric acid immunoreactivity. *Neuroscience*, **45**, 177–183.
- Schadrack, J., Castro-Lopes, J.M., Avelino, A., Zieglgänsberger, W. & Tölle, T.R. (1998) Modulated expression of c-Fos in the spinal cord following noxious thermal stimulation of monoarthritic rats. *J. Neurosci. Res.*, **53**, 203–213.
- Shields, S.D., Cavanaugh, D.J., Lee, H., Anderson, D.J. & Basbaum, A.I. (2010) Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *Pain*, **151**, 422–429.
- Sotgiu, M.L., Valente, M., Storchi, R., Caramenti, G. & Mario Biella, G.E. (2008) Contribution by DRt descending facilitatory pathways to maintenance of spinal neuron sensitization in rats. *Brain Res.*, **1188**, 69–75.
- Spinella, M., Cooper, M.L. & Bodnar, R.J. (1996) Excitatory amino acid antagonists in the rostral ventro-medial medulla inhibit mesencephalic morphine analgesia in rats. *Pain*, **64**, 545–552.
- Tavares, I. & Lima, D. (1994) Descending projections from the caudal medulla oblongata to the superficial or deep dorsal horn of the rat spinal cord. *Exp. Brain Res.*, **99**, 455–463.
- Urban, M.O. & Gebhart, G.F. (1999) Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7687–7692.
- Varty, G.B., Grilli, M., Forlani, A., Fredduzzi, S., Grzelak, M.E., Guthrie, D.H., Hodgson, R.A., Lu, S.X., Nicolussi, E., Pond, A.J., Parker, E.M., Hunter, J.C., Higgins, G.A., Reggiani, A. & Bertorelli, R. (2005) The antinociceptive and anxiolytic-like effects of the metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antagonists, MPEP and MTEP, and the mGluR1 antagonist, LY456236, in rodents: a comparison of efficacy and side-effect profiles. *Psychopharmacology*, **179**, 207–217.
- Vierck, C.J., Yezierski, R.P. & Light, A.R. (2008) Long-lasting hyperalgesia and sympathetic dysregulation after formalin injection into the rat hind paw. *Neuroscience*, **153**, 501–506.
- Villanueva, L. & Le Bars, D. (1995) The activation of bulbo-spinal controls by peripheral nociceptive inputs: diffuse noxious inhibitory controls. *Biol. Res.*, **28**, 113–125.
- Villanueva, L., Bouhassira, D., Bing, Z. & Le Bars, D. (1988) Convergence of heterotopic nociceptive information onto subnucleus reticularis dorsalis neurons in the rat medulla. *J. Neurophysiol.*, **60**, 980–1009.
- Villanueva, L., Cliffer, K.D., Sorkin, L.S., Le Bars, D. & Willis, W.D. Jr. (1990) Convergence of heterotopic nociceptive information onto neurons of caudal medullary reticular formation in monkey (*Macaca fascicularis*). *J. Neurophysiol.*, **63**, 1118–1127.
- Villanueva, L., de Pommery, J., Menétreay, D. & Le Bars, D. (1991) Spinal afferent projections to subnucleus reticularis dorsalis in the rat. *Neurosci. Lett.*, **134**, 98–102.
- Wheeler-Aceto, H. & Cowan, A. (1991) Neurogenic and tissue-mediated components of formalin-induced edema: evidence for supraspinal regulation. *Agents Actions*, **34**, 264–269.
- Wiertelak, E.P., Furness, L.E., Horan, R., Martinez, J., Maier, S.F. & Watkins, L.R. (1994) Subcutaneous formalin produces centrifugal hyperalgesia at a non-injected site via the NMDA–nitric oxide cascade. *Brain Res.*, **649**, 19–26.
- Woolf, C.J. & Salter, M.W. (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, **288**, 1765–1769.
- Wu, Y., Willcockson, H.H., Maixner, W. & Light, A.R. (2004) Suramin inhibits spinal cord microglia activation and long-term hyperalgesia induced by formalin injection. *J. Pain*, **5**, 48–55.
- Xu, M., Kim, C.J., Neubert, M.J. & Heinricher, M.M. (2007) NMDA receptor-mediated activation of medullary pro-nociceptive neurons is required for secondary thermal hyperalgesia. *Pain*, **127**, 253–262.
- Zhang, F.Y., Wan, Y., Zhang, Z.K., Light, A.R. & Fu, K.Y. (2007) Peripheral formalin injection induces long-lasting increases in cyclooxygenase 1 expression by microglia in the spinal cord. *J. Pain*, **8**, 110–117.
- Zimmermann, M. (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, **16**, 109–110.