

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA.**



**PAPEL DE LOS RECEPTORES BETA ADRENÉRGICOS EN LA
MODULACIÓN DEL DOLOR AGUDO Y NEUROPÁTICO**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
PAUL JONATHAN LAMOTHE MOLINA**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JORGE ALBERTO LÓPEZ ÁVILA
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ TUTOR:
DRA. MARTHA LEÓN OLEA
FACTULAD DE MEDICINA
DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR.**

MÉXICO D.F. ENERO 2015.



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.

Índice.

1. ABREVIATURAS.	5
2. RESUMEN.	7
3.0. INTRODUCCIÓN	12
4. ANTECEDENTES	14
4.1. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DE NEURONAS NORADRENÉRGICAS Y ADRENÉRGICAS.	14
4.2. RECEPTORES ADRENÉRGICOS	15
4.2.1. RECEPTORES ALFA1: (1A, 1C, 1D).	16
4.2.2. RECEPTORES ALFA2: (2A, 2B, 2C).	16
4.2.3. RECEPTORES BETA: (1, 2 Y 3).	16
4.2.4. LOCALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS.	16
4.3. MOLÉCULAS QUE AFECTAN A LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS.	17
4.4. NEUROBIOLOGÍA DE LA RESPUESTA DE ESTRÉS.	17
4.4.1. RESPUESTA HIPERAGUDA. (SISTEMA NERVIOSO SIMPÁTICO).	19
4.4.2. RESPUESTA SUBAGUDA-CRÓNICA. ACTIVACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIA-ADRENAL.	20
4.5. NEUROBIOLOGÍA DEL DOLOR.	22
4.5.1. ANATOMÍA DEL DOLOR.	22
4.5.1.1. Sistema periférico.	23
4.5.1.2. Sistema central.	24
4.5.1.3. Neuronas nociceptivas, no nociceptivas y neuronas de amplio rango dinámico (ARD).	25
4.5.1.4. Neurona de segundo orden.	27
4.5.2. FISIOLÓGÍA DEL DOLOR	27
4.5.2.1. Dolor neuropático: Mecanismos de sensibilización	29
4.5.2.2. Control inhibitor central o modulación supraespinal (top-down) de la transmisión dolorosa.	30
4.6. EVIDENCIA EXPERIMENTAL MODELOS ANIMALES EN DONDE SE MODIFICA LA PRECEPCIÓN DEL DOLOR AGUDO Y NEUROPÁTICO A TRAVÉS DE LA MANIPULACIÓN DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS.	31
4.6.1. HIPERALGESIA INDUCIDA POR LA RESPUESTA DE ESTRÉS.	31
4.6.2. ANALGESIA INDUCIDA POR LA RESPUESTA DE ESTRÉS.	32
4.6.3. EVIDENCIA DE LO MODIFICACIÓN DEL DOLOR POR MANIPULACIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS.	33
4.4. MODELOS ANIMALES DE DOLOR.	35
4.4.1. MODELOS DE ANÁLISIS ELECTROFISIOLÓGICOS DE NEURONAS SENSITIVAS.	35
4.4.2. MODELOS DE NOCICEPCIÓN CRÓNICA.	35
4.4.1. MODELO DE AUTOTOMÍA.	35
5. JUSTIFICACIÓN:	37
6. HIPÓTESIS.	37
7. MATERIAL, MÉTODO Y RESULTADOS.	38
7.1. ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DE DOLOR.	38
7.2. EXPERIMENTOS EN DOLOR AGUDO - METODOLOGÍA.	40
7.2.1 ELECTROFISIOLÓGÍA DE NEURONAS DE ARD DE MÉDULA ESPINAL.	40
7.2.2. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.	40
7.2.3. COLOCACIÓN DE LOS ELECTRODOS, CAMPO RECEPTIVO Y LA CARACTERIZACIÓN DE LAS NEURONAS.	40

7.2.4. ESTIMULACIÓN PERIFÉRICA.	41
7.2.5. REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO Y ANÁLISIS DE DATOS.	41
7.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	43
7.2.7. GRUPOS Y LA ADMINISTRACIÓN DEL FÁRMACO.	43
7.3. RESULTADOS.	44
7.3.1. EFECTOS DE LOS FÁRMACOS QUE AFECTAN LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS SOBRE LA FDB EN NEURONAS DE ARD DE MÉDULA ESPINAL (L3).	44
7.3.2. EFECTOS DE LOS FÁRMACOS QUE AFECTAN LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS SOBRE LA RESPUESTA EVOCADA POR ESTIMULACIÓN PERIFÉRICA NO DOLOROSA EN NEURONAS DE ARD DE MÉDULA ESPINAL (L3).	46
7.3.3. EFECTOS DE LOS FÁRMACOS QUE AFECTAN LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS SOBRE LA RESPUESTA EVOCADA POR ESTIMULACIÓN PERIFÉRICA DOLOROSA EN NEURONAS DE ARD DE MÉDULA ESPINAL (L3).	48
7.3.4. EFECTOS DE LA CO-ADMINISTRACIÓN DE EPI + ANT B 1 SOBRE LA FDB, LA RESPUESTA EVOCADA POR ESTIMULACIÓN PERIFÉRICA NO DOLOROSA Y LA RESPUESTA EVOCADA POR ESTIMULACIÓN PERIFÉRICA DOLOROSA EN NEURONAS DE ARD DE MÉDULA ESPINAL (L3).	50
7.4. MODELO CONDUCTUAL DE DOLOR NEUROPÁTICO INDUCIDO POR DENERVACIÓN CIÁTICA - METODOLOGÍA.	52
7.4.1. CUANTIFICACIÓN DEL GRADO DE AUTOTOMÍA.	52
7.5. MODELO DE ESTRÉS EXTRÍNSECO PRODUCIDO POR FIJACIÓN EXTERNA.	52
7.6. MODIFICACIÓN DE LA CONDUCTA DE AUTOTOMÍA POR LA EXPOSICIÓN A ESTRÉS POR FIJACIÓN EXTERNA.	54
7.6.1. EXPOSICIÓN A ESTRÉS POR FIJACIÓN PREVIO A LA DENERVACIÓN.	54
7.6.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	54
7.6.3 RESULTADOS.	54
7.6.4. EXPOSICIÓN A ESTRÉS POSTERIOR A LA DENERVACIÓN.	57
7.6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	57
7.6.6.1. Modificación del día de inicio de la autotomía.	57
7.7. MODIFICACIÓN DE LA CONDUCTA DE AUTOTOMÍA POR LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE B-BLOQUEADORES.	60
7.7.1. ADMINISTRACIÓN Y DOSIS DE FÁRMACOS.	60
7.7.2. GRUPOS EXPERIMENTALES.	60
7.7.4.1. Modificación del GA.	61
7.7.4.2. Modificación del inicio de la autotomía.	64
8. RESUMEN DE RESULTADOS.	65
9. DISCUSIÓN.	66
10. CONCLUSIONES.	70
11. REFERENCIAS.	71
12. ANEXOS.	77
12.1 PUBLICACIÓN	77
12.2. REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO.	85
12.2.1 NEURONAS NOCICEPTIVO-ESPECÍFICAS.	85
12.2.2 NEURONAS DE AMPLIO RANGO DINÁMICO.	86
12.2.3 HISTOGRAMA DEL REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO.	86
12.3. PLANTILLA DE MEDICIÓN DE LA CONDUCTA DE AUTOTOMÍA.	87

1. Abreviaturas.

ACTH – Hormona adrenocorticotrópica.
AE – Ausencia de estimulación.
AINE – Antiinflamatorio no esteroideo.
AIS – Analgesia inducida por estrés.
ANOVA – Análisis de varianza.
ARD – Amplio rango dinámico.
CGRP - *Calcitonin gene-related peptide*.
COX – Cicloxigenasa.
CRF – Factor liberador de corticotropina.
D – Doloroso.
DAG – Diacilglicerol.
MDS – **Menor** Diferencia significativa.
EPI – Epinefrina.
FDB – Frecuencia de disparo basal.
FMS – Fibromialgia.
GA – Grado de autotomía.
GABA – Ácido γ -Amino butírico.
HIS – Hiperalgia inducida por estrés.
HPA – Eje hipotálamo-hipófisis.
IASP – Asociación Internacional para el Estudio del Dolor, por sus siglas en inglés.
IP3 – Inositol trifosfato.
LC – Locus coeruleus
NE – Norepinefrina.
NMDA - *N-Methyl-D-aspartic acid*.
NO-D – No doloroso.
PKA – Proteína cinasa A.
PKC – Proteína cinasa C.
PVN – Núcleo paraventricular.
SdE – Secuencia de estimulación.
SNC – Sistema nervioso central.
SNS – Sistema nervioso simpático.
TRPV1 - *Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*.

2. Resumen.

Introducción: El dolor se define como “una experiencia sensorial y emocional desagradable con daño tisular actual o potencial o descrito en términos de dicho daño”. Tal definición es vaga ya que la percepción del dolor es subjetiva. El umbral al dolor puede variar de persona a persona, o bien puede variar en la misma persona en diferentes momentos. Esto es debido a que existen varios sistemas que modulan la transmisión de los impulsos dolorosos. Uno de esos sistemas es el sistema nervioso simpático (SNS) a través de la secreción de neurotransmisores, específicamente norepinefrina y epinefrina dentro del sistema nervioso y a nivel sistémico. En general estas moléculas se han implicado en un fenómeno llamado analgesia inducida por estrés (AIS), en donde se observa que aumenta el umbral al dolor así como la tolerancia cuando está activo el SNS. Esto se logra a través de la activación de receptores adrenérgicos o adrenoreceptores. Todos los receptores adrenérgicos pertenecen a la gran familia de receptores acoplados a proteínas G y se clasifican en tres grandes grupos ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y β). Actualmente se conoce que los receptores $\alpha 2$, los cuales son inhibidores, median mayormente la AIS. Por otro lado, poco se conoce, sobre el papel que tienen otro tipo de receptores en este fenómeno, en especial los receptores de la familia β . El objetivo de esta tesis es dilucidar a través de experimentos conductuales y experimentos electrofisiológicos, cuál es el papel de 2 de los subtipos de receptores de esta familia ($\beta 1$ y $\beta 2$). Esta tesis se divide en dos partes, la primera aproxima el problema en modelos de dolor agudo mientras que la segunda parte en modelos de dolor neuropático.

Métodos (primera parte): Se realizaron estudios de electrofisiología en ratas en donde se registró la actividad de neuronas de amplio rango dinámico en la médula espinal, mientras se ejecutaba una serie de estímulos (nociceptivos y no nociceptivos) en la pata trasera del animal. Dichas neuronas transmiten impulsos tanto dolorosos, como no dolorosos. Esto permite evaluar el efecto de estos receptores en la modulación del dolor agudo. Estos experimentos permitieron evaluar cómo fármacos que afectan los receptores adrenérgicos, aplicados directamente sobre la médula espinal, modifican los patrones de disparo de estas neuronas. **Métodos (segunda parte):** Para analizar el rol de estos receptores en el dolor neuropático, se realizaron experimentos conductuales en ratas, utilizando el modelo de autotomía descrito por Wall y Melzack así como el modelo modificado por Coderre et al. Dicho modelo consiste en realizar una axotomía (denervación) total del nervio ciático durante anestesia, y la evaluación de la conducta del animal en los días posteriores. Dicha lesión es cuantificable y nos permitió observar como la actividad del SNS y fármacos que actúan sobre los receptores β adrenérgicos, modulaban la génesis y mantenimiento del dolor neuropático. Posteriormente, se observó el efecto que tienen fármacos que bloquean los receptores β en la conducta de autotomía. **Resultados (primera parte):** En los experimentos de dolor agudo, que la epinefrina disminuye significativamente la frecuencia de disparo basal (FDB), así como disminuye la frecuencia de disparo evocada por estímulos nociceptivos (ANOVA, $p < 0.05$). La epinefrina, no modificó la frecuencia de disparo evocada por estímulos no nociceptivos. De los demás fármacos, el único que modificó el disparo de dichas neuronas fue el metoprolol, el cual es un antagonista selectivo de los receptores $\beta 1$. El

bloqueo de estos receptores, disminuyó significativamente (ANOVA, $p < 0.05$) la frecuencia de disparo evocada por estímulos nociceptivos, sin embargo no modificó la frecuencia de disparo basal, ni la frecuencia de disparo evocada por estímulos no nociceptivos. Posteriormente, se realizó un experimento en donde se administró conjuntamente, epinefrina y metoprolol, para observar si existía una potenciación del efecto analgésico. En este grupo se observó, al igual que en grupo de epinefrina, que disminuyó significativamente la FDB así como la frecuencia evocada por estímulos nociceptivos (ANOVA, $p < 0.05$). No obstante, no existieron diferencias significativas entre este grupo y el grupo de epinefrina. **(segunda parte):** En los experimentos de dolor neuropático observamos que el estrés por sujeción, previo a la denervación, disminuye significativamente el grado de autotomía (ANOVA, $p < 0.05$). Sin embargo, esto no se observa si la respuesta de estrés se produce posterior a la denervación (ANOVA, $p > 0.05$). Por otro lado, realizamos otros dos grupos en donde se sometió a sujeción a los animales por varios días previo a la denervación, para evaluar que parte de la respuesta de estrés es la que modula el dolor neuropático. Observamos que no existen cambios significativos en el grado de autotomía en estos grupos ($p > 0.05$). En el caso de la manipulación farmacológica, se usaron dos antagonistas no selectivos de los receptores β -adrenérgicos: pindolol y propranolol. En estos grupos pudimos observar que la administración sistémica de ambos fármacos modifica de manera significativa la conducta de autotomía. La dosis de 8mg/kg de pindolol, disminuyó el grado de autotomía del día 6-19 post-denervación (Kruskal-Wallis Test, $p < 0.05$), además de retrasar el día de inicio de la autotomía (T-test, $p < 0.05$). En el caso de propranolol, la dosis de 45mg/kg, disminuyó el grado de autotomía del día 10-11 así como del 20-25 post-denervación (Kruskal-Wallis Test, $p < 0.05$), además de retrasar significativamente el día de inicio de la autotomía (T-test, $p < 0.05$). **Discusión y conclusiones:** Nuestros resultados en conjunto apuntan a que la respuesta de estrés modifica tanto la percepción del dolor agudo como el crónico. En el caso del dolor agudo, el agonismo total de los receptores adrenérgicos genera un efecto analgésico y anestésico, por otro lado, el bloqueo de los receptores β_1 , produce analgesia. En el caso del dolor neuropático, observamos que el antagonismo no selectivo de los receptores β , disminuye el grado de autotomía, apuntando a que estos receptores están involucrados también en la génesis y mantenimiento del dolor neuropático.

Abstract.

Introduction: Pain is defined as "an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage". Such a definition is vague because pain perception is subjective. The threshold of pain can vary from person to person, or may vary in the same person at different times. This is because there are several systems that can modulate the transmission of pain. One of those systems is the sympathetic nervous system (SNS) and it modulates pain perception through the secretion of neurotransmitters, specifically norepinephrine and epinephrine within the nervous system and in the peripheral tissues. In general these molecules have been implicated in a phenomenon called stress-induced analgesia (SIA), where an increase in pain threshold and tolerance is seen when the SNS is activated. This is accomplished through activation of adrenoceptors. All adrenoceptors belong to the G-protein coupled receptors family; such family is divided into three groups (α_1 , α_2 and β). Currently, it is known that α_2 adrenoceptors, which are inhibitory, mediate the AIS in a greater extent. Nevertheless, little is known about the role that other adrenoceptors have in this phenomenon, particularly the β -adrenoceptor family. The objective of this thesis is to elucidate through behavioral experiments and electrophysiological experiments, what is the role of 2 subtypes of this family (β_1 and β_2). This thesis is divided into two parts; one approaches the problem in models of acute pain while the second part in models of neuropathic pain. **Methods (first part):** We performed electrophysiology studies in rats, recording the activity of wide-dynamic range neurons from the spinal cord. During the recording, we performed a series of stimuli (nociceptive and non-nociceptive) onto the hind paw of the animal. These neurons transmit both painful and non-painful impulses. **Methods (second part):** To analyze the role of these receptors in neuropathic pain, behavioral experiments were performed in rats, using the autotomy model described by Wall and Melzack and the model modified by Coderre et al. This model is characterized by generating a total axotomy (denervation) of the sciatic nerve during anesthesia; the animal's behavior is evaluated in the subsequent days. This injury is quantifiable and allowed us to observe how the activity of the SNS and drugs acting on β -adrenergic receptors, modulate the genesis and maintenance of neuropathic pain. Subsequently, we assessed the effect of drugs that block β -adrenoceptors on the autotomy behavior (AB).

Results: (First part) In the acute pain experiments we observed that epinephrine significantly decreased (ANOVA, $p < 0.05$) the basal firing rate (BFR) and decreased the firing rate evoked by nociceptive stimuli (ANOVA, $p < 0.05$). Epinephrine, did not alter the firing rate evoked by nociceptive stimuli not. Of other drugs, the only one that modified the firing rate these neurons was metoprolol, which is a selective β_1 receptor antagonist. Blocking these receptors, decreased significantly (ANOVA, $p < 0.05$) the firing rate evoked by noxious stimuli, but did not modify the BFR nor the firing frequency evoked by nociceptive stimuli. Subsequently, we performed an experiment where epinephrine and metoprolol were co-administered, to see if there was a potentiation of the analgesic effect. In this group was observed the same as in the epinephrine group, it significantly decreased the BFR and the firing rate evoked by nociceptive stimuli (ANOVA, $p < 0.05$). However, there were no significant differences between this group and the epinephrine group.

(Second part): In the neuropathic pain experiments, we observed that restraint stress prior to denervation significantly decreased the autotomy score (ANOVA, $p < 0.05$). However, this was not observed if the stress response occurred after denervation (ANOVA, $p > 0.05$). Furthermore, we performed two other groups that underwent restraint for several days prior to denervation; there we evaluated which part of the stress response modulates neuropathic pain. We noted that there were no significant changes in the autotomy score in these groups ($p > 0.05$). We tested how pindolol and propranolol (both non-selective β -adrenoceptors antagonists), affect the AB. In these groups we observed that systemic administration of both drugs significantly modify the autotomy score. The dose of 8mg / kg of pindolol, decreased the autotomy score in the days 6-19 post-denervation (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$), and delayed the onset of autotomy (T-test, $p < 0.05$). In the case of propranolol, the dose of 45mg / kg decreased the autotomy score in the days 10-11 and 20-25 post-denervation (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$), and delay significantly onset of autotomy (T-test, $p < 0.05$).

Discussion and conclusions: Our results together suggest that the stress response affects both the perception of acute and chronic pain. For acute pain, total adrenoceptor agonism generates an anesthetic and analgesic effect; on the other hand, the β_1 receptor blockade produces analgesia. In the case of neuropathic pain, we note that the non-selective β adrenoceptor antagonism reduces the degree of autotomy, suggesting that these receptors are also involved in the genesis and maintenance of neuropathic pain.

3.0. Introducción

Veteranos de guerra cuentan historias de supervivencia en donde relatan haber perdido extremidades o haber sufrido lesiones graves con una mínima sensación de dolor;^[1-3] pacientes con depresión grave o enfermedades crónicas refieren dolor físico sin causa aparente e inclusive aquellos pacientes que padecen de dolor neuropático, el roce superficial de la piel puede causar un dolor extremo ¿Por qué es tan diferente la percepción del dolor entre estas personas?

El sistema de nocicepción es filogenéticamente muy antiguo y tiene una gran importancia en la supervivencia.^[2, 4] En los mamíferos, los receptores (nociceptores) y vías que transmiten estos estímulos (vías nociceptivas) son muy parecidas. La activación de estos receptores desencadena patrones de estimulación que ascienden a núcleos en centros superiores del sistema nervioso central (SNC), en donde son integrados y desencadenan una respuesta motora protectora. El dolor, por otra parte, es un proceso cognitivo, el cual es subjetivo y por lo tanto, puede variar de persona a persona, éste se integra y procesa en áreas tales como la corteza prefrontal, la ínsula y la corteza anterior del cíngulo, entre otras.^[5-7] En estas áreas es donde se contextualiza la situación y se agrega el componente emocional del dolor, en otras palabras, se evalúa la severidad y la planeación de la respuesta conductual.^[7] En este contexto, se entiende que en diferentes escenarios y circunstancias, la percepción del dolor puede ser modificada. La atención, la depresión, los estados de ánimo así como la empatía u otros procesos neuropsicológicos más sutiles pueden modificar el umbral y la tolerancia al dolor.^[8] La pregunta central de esta tesis es ¿la respuesta de estrés modifica y en que medida la percepción del dolor?.

Hablando específicamente de cómo el estrés modula la percepción del dolor podemos encontrar dos fenómenos: analgesia inducida por estrés (AIS) e hiperalgesia inducida por estrés (HIS). Estos dos fenómenos, que bien parecen ser opuestos, se presentan la mayoría de las veces sobrepuestos en un mismo momento.^[9] Se piensa que la AIS es un mecanismo de defensa innato que se presenta en todos los mamíferos en donde se observa un aumento al umbral al dolor en presencia de estresores externos o internos.^[1, 2, 4] La ventaja evolutiva de este fenómeno es evitar que el dolor distraiga al animal de situaciones que ponen en peligro la vida.^[2] Por otro lado la HIS es cuando la respuesta de estrés disminuye el umbral al dolor, sin embargo este fenómeno se presenta en animales más evolucionados en donde la capacidad cortical cerebral y de planeación del animal anticipan que el estrés es un evento que antecede alguna circunstancia que lesionará al individuo o inclusive lo pone en peligro, por consiguiente genera un estado de hipervigilancia que le es ventajoso para su supervivencia^[4, 9].

Existe evidencia que el estrés, a través de la acción de las catecolaminas sobre los adrenoreceptores, produce ambos fenómenos. No obstante, no se conoce por completo el papel que tienen los receptores beta-adrenérgicos en dicha modulación.

Es por eso que la aproximación de esta tesis es dilucidar a través de experimentos electrofisiológicos y experimentos conductuales qué papel tienen los receptores beta-adrenérgicos en la modulación del dolor agudo y neuropático en modelos animales.

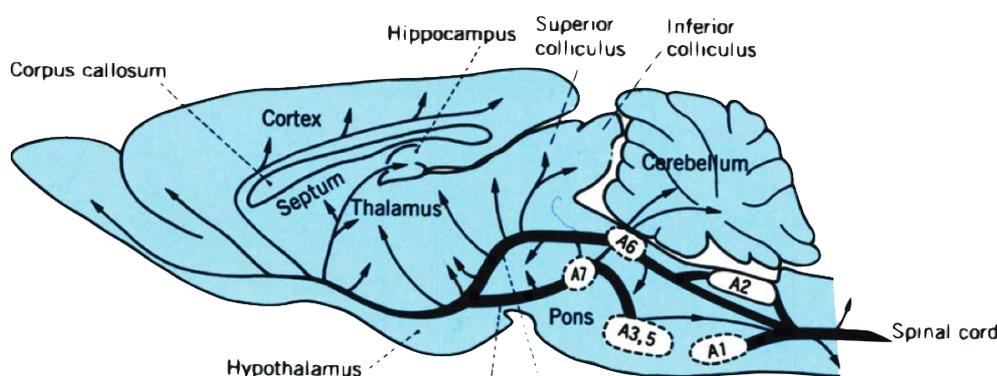
4. Antecedentes

4.1. Localización anatómica de neuronas noradrenérgicas y adrenérgicas.

Debido a la gran importancia filogenética que tienen la norepinefrina (NE) y epinefrina (EPI) como mediadores de la respuesta del sistema nervioso simpático, y por consiguiente para la supervivencia, no es sorprendente encontrar proyecciones neuronales ampliamente distribuidas en casi todos los órganos y sistemas. Específicamente en el SNC, existen núcleos de neuronas adrenérgicas o noradrenérgicas que proyectan tanto a la médula espinal como a diferentes áreas de la corteza.^[10]

Dahlström y Fuxe en 1964^[11], fueron los primeros en evidenciar la existencia de neuronas noradrenérgicas y adrenérgicas en el SNC; se han descrito 7 grupos de neuronas noradrenérgicas (A1-A7), A1 a nivel del área postrema, A2 distribuido en el complejo vagal dorsal, A3 en la formación reticular, A4 rodea al cuarto ventrículo, A5 se encuentra en el puente ventrolateral, A6 es el *locus coeruleus*, que se encuentra en el puente dorsal y A7 se localiza en la porción lateral del puente a lado del lemnisco lateral.^[10] De todos los núcleos, A5, A6 y A7 son los que tienen proyecciones hacia la médula espinal (vías descendentes)^[12-14]. (Figura 1).

Figura 1. Localización de neuronas noradrenérgicas en el SNC.



Esquema que muestra la localización anatómica de las núcleos de neuronas que contienen norepinefrina dentro del sistema nervioso central, en el cerebro de la rata. Esquema modificado de M. Tohyama, K. Takatsuji, 1998.

En cuanto a las neuronas adrenérgicas en el SNC se agrupan en 3 núcleos (C1-C3) y sus funciones son mucho más limitadas que las neuronas noradrenérgicas. Tanto las neuronas noradrenérgicas como las adrenérgicas tienen proyecciones a sitios importantes de la corteza y al sistema límbico^[10]. En el sistema nervioso periférico (SNP), las neuronas postganglionares del sistema nervioso autónomo simpático, producen NE. En este caso son neuronas que controlan funciones autónomas del organismo (frecuencia cardíaca, presión arterial, etc.). Encargadas de la respuesta estereotipada de “huir o pelear”.

4.2. Receptores adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Es interesante que a pesar de que los genes que codifican para dichos receptores se encuentran en diferentes cromosomas, la respuesta intracelular es muy parecida.^[15] Esto apunta a pensar que es tan importante su función en la biología que su respuesta es redundante o que existen diferencias mínimas que hasta la fecha no se han descrito.^[16] El estudio de la función de los diferentes subtipos de receptores se ha realizado desde hace más de 50 años. Hasta ahora existen tres grandes familias: $\alpha 1$, $\alpha 2$ y β . la distribución anatómica de los subtipos está resumida en la tabla 1.

Tabla 1. Subtipos de receptores adrenérgicos.

*Modificado de Siegel, G.J. 2006

Receptor	Mecanismo de transducción	Distribución anatómica
$\alpha 1A$	Acoplado a proteína G αq	Corazón, hígado, cerebelo, corteza cerebral, vasos sanguíneos
$\alpha 1B$	Acoplado a proteína G αq	Bazo, riñones, cerebro fetal, vasos sanguíneos
$\alpha 1D$	Acoplado a proteína G αq	Aorta, corteza cerebral
$\alpha 2A$	Acoplado a proteína G αi	Páncreas, intestino delgado, LC, hipocampo
$\alpha 2B$	Acoplado a proteína G αi	Hígado, tálamo
$\alpha 2C$	Acoplado a proteína G αi	Corazón, pulmones, aorta, hipocampo, bulbo olfatorio
$\beta 1$	Acoplado a proteína G αs	Corazón, riñones, corteza cerebral, hipotálamo
$\beta 2$	Acoplado a proteína G αs	Pulmones, hígado, cerebelo, hipocampo, corteza cerebral, músculo liso, bulbo olfatorio
$\beta 3$	Acoplado a proteína G αs	Tejido graso, bulbo olfatorio

El fundamento de esta nueva clasificación se basa en tres líneas de evidencia.^[15] En primer lugar, la diferencia en la afinidad de los fármacos selectivos es de 3 a 4 órdenes de magnitud entre los principales subtipos (por ejemplo, $\alpha 1$, $\alpha 2$, y β), mientras que las relaciones de afinidad entre los subtipos de cada uno de estos grandes grupos son por lo general sólo de 10 a 100. Segundo, las respuestas de segundos mensajeros son diferentes para cada uno de estos tres tipos principales. Finalmente, las secuencias de aminoácidos de los receptores adrenérgicos son más consistentes con tres en lugar de dos tipos principales (α y β).

A continuación se detallan los mecanismos intracelulares de cada familia y están basadas en las siguientes publicaciones: (Bylund 1988, Bylund, Eikenberg et al. 1994, Bylund 1995, Hieble, Bylund et al. 1995, Pupo and Minneman 2001, Siegel 2006, Kobilka 2011).^[15-21]

4.2.1. Receptores α 1: (α 1A, α 1C, α 1D).

Se encuentran acoplados a una proteína G α q/11, que por medio de la activación de la fosfolipasa C β (PLC β), genera dos segundos mensajeros, inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Esto culmina en la activación de la proteína cinasa C (PKC) y un aumento de la concertación de calcio intracelular, favoreciendo la unión de calcio-calmodulina. Esto último es importante en la regulación de la probabilidad de apertura de canales iónicos así como la unión de vesículas de neurotransmisor a la membrana plasmática dando como resultado la liberación de éste. Así entonces se considera a estos subtipos de receptores como excitadores.

4.2.2. Receptores α 2: (α 2A, α 2B, α 2C).

Se encuentran acoplados a una proteína G α i, que por medio de la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), disminuye la producción de adenosina trifosfato cíclico (cAMP), generando una disminución de la actividad de la proteína cinasa A (PKA). Creando una respuesta inhibitoria sobre el metabolismo celular. La función más estudiada de estos receptores es regular la liberación de NE en un control de retroalimentación negativa. Se conocen como autoreceptores o receptores presinápticos y se expresan en otros sitios diferentes a las dendritas (axones, cuerpos neuronales y botones sinápticos).

4.2.3. Receptores β : (β 1, β 2 y β 3).

Acoplados a una proteína G α s, estimulan la producción de cAMP, y aumentan la actividad de la PKA. Son receptores considerados como excitadores sin embargo el receptor β 2 también puede tener actividad inhibitoria en tejidos como vasos sanguíneos y corazón. Esto es debido a que a pesar de que la subunidad α del receptor tiene actividad sobre la AC, las subunidades β y γ , pueden activar un tipo de canales llamados GIRK, generando una hiperpolarización y por lo tanto inhiben a la célula.^[22, 23] Acerca del receptor β 3, éste se encuentra principalmente en tejido adiposo y escasamente en el SNC.

4.2.4. Localización de la expresión de receptores adrenérgicos.

Desde la tipificación de los receptores adrenérgicos se han tratado de fabricar agonistas y antagonistas específicos para cada uno de los subtipos de receptores, sin embargo no se ha logrado encontrar fármacos exclusivos para cada subtipo. Aunque se conocen las diferencias estructurales y algunas funcionales entre las grandes familias, no se entiende por completo la función de cada uno de los subtipos.^[16]

La expresión de receptores adrenérgicos no se limita a neuronas adrenérgicas o noradrenérgicas, neuronas de otros tipos (glutamatérgicas, GABAérgicas, colinérgicas, etc.), también pueden expresar receptores

adrenérgicos en estados fisiológicos.^[24] Así también se ha observado que neuronas nociceptivas, en estados patológicos, pueden llegar a sobreexpresar ciertos subtipos de receptores adrenérgicos.^[25-27]

4.3. Moléculas que afectan a los receptores adrenérgicos.

Todos los subtipos de los receptores adrenérgicos pueden ser activados por NE y EPI. Mientras que los receptores α -adrenérgicos son igualmente activados por las catecolaminas endógenas, los receptores β -adrenérgicos tienen afinidad diferencial en cada uno de los subtipos.^[16, 24] El receptor β -1 es igualmente activado por ambas catecolaminas, mientras que en el caso del receptor β -2, la EPI tiene una selectividad de hasta más de 100 veces que la NE. Existen más de 50 fármacos que tienen actividad sobre los receptores adrenérgicos.^[28]

4.4. Neurobiología de la Respuesta de estrés.

Los organismos, desde las bacterias hasta los seres humanos, se mantienen activamente alejados del equilibrio termodinámico por la búsqueda de recursos necesarios para la fabricación de los componentes que preservan la integridad del sistema.^[29] Debido a que su medio nunca es estático, los organismos alteran continuamente su estructura (es decir, sus componentes) y se adaptan a las características de su entorno. El resultado es la homeostasis, el estado de equilibrio sistémico dinámico mantenido por la organización y el comportamiento fisiológico de un organismo.^[30]

Filogenéticamente la respuesta de estrés tiene una clara relación con la supervivencia del individuo^[31]. Aunque la respuesta en animales más primitivos es exclusivamente motora y endócrina en animales más evolucionados afecta la percepción, la conducta así como la conciencia.^[32, 33] La respuesta de estrés favorece la supervivencia del individuo al modificar la homeostasia a un estado meta-estable en la que ésta se encuentra más idónea para “enfrentar” amenazas externas o internas, traducándose en un aumento de la frecuencia cardiaca, respiratoria, modificación del tono de los vasos sanguíneos y sobretodo cambios metabólicos.^[32]

Teniendo en cuenta esta base, todos los acontecimientos más destacados para el organismo se perciben en una de tres maneras: como aceptable o adecuada para la homeostasis continua (OK); como un reto o amenaza de la homeostasis (OK-); o como facilitación en el funcionamiento (OK +).^[33] El punto de referencia para tal evaluación se determina por el estado actual del organismo, según la interpretación total de su organización biológica. Los factores que contribuyen a esta interpretación incluyen parámetros homeostáticos inmediatos así como del estado del medio ambiente, aunque también depende de factores genéticos, de desarrollo, y factores cognitivos.^[32]

Cualquier situación que desafía a la homeostasis se denomina estímulo de estrés o estresor.^[34] Los estresores pueden ser externos (del entorno) o internos (fisiológicos o psicológicos). Todos los organismos tienen un

repertorio de procesos fisiológicos y de comportamiento con el fin de satisfacer las perturbaciones que se perciben como una amenaza a la supervivencia. [34] Entonces, estos patrones de respuesta que facilitan que un organismo se adapte al desafío homeostático son llamados en conjunto: respuesta de estrés.

Una respuesta de estrés por lo tanto se puede ver como un patrón del organismo que reacciona a que algo, ya sea en sí mismo o en su medio circundante se encuentra perturbado (OK-). Dicho estímulo puede ser peligroso para la vida o simplemente perturbador; tal como la falta o la presencia de algo (depredador, posibilidad de apareamiento, agua, comida, calor o frío, entre otras), pero siempre y cuando sea percibido como un desafío al punto de ajuste actual del organismo para su funcionamiento adecuado de tal manera que desencadena una acción defensiva para corregirlo. [35, 36]

Debido a la ambigüedad de la palabra “estrés” así como el hecho de que la respuesta puede ser tanto protectora como dañina para el organismo, Sterling y Eyer [37] introdujeron el término alostasis en 1988 para referirse al proceso activo por el cual el cuerpo responde a los acontecimientos diarios y mantiene la homeostasis (alostasis literalmente significa "lograr la estabilidad a través del cambio"). Debido a que la alostasis aumentada de forma crónica puede conducir a un estado patológico, se introdujo el término carga alostática o sobrecarga alostática para referirse al desgaste que se produce tras, ya sea el exceso de estrés, o de la gestión ineficiente de la alostasis, tal como no apagar la respuesta cuando está ya no se necesita [38] (figura 2).

Figura 2. Alostasis vs. sobrecarga alostática



Esquema que representa la respuesta de estrés dividida en fases. Se muestra el procesamiento de la información externa e interna así como la respuesta motora y conductual. En condiciones fisiológicas, esta respuesta protege al individuo y se adapta al entorno. En caso de presentarse en exceso, se pierde el equilibrio y se genera una carga alostática. Esquema modificado de Sterling P, Eyer J., 1988.

Para fines de esta tesis dividimos la alostasis en dos fases, tal como se muestra en la figura 2: 1) fase hiperaguda y 2) fase subaguda/crónica. Dicha división es didáctica mas no se debe interpretar como dos caras de una moneda, sino como dos movimientos de una misma sinfonía. Ambas fases se

potencian e interactúan sin embargo, lo que determina que se presenten las dos es la temporalidad de la exposición a la amenaza (estresores). Estresores de corta duración sólo activan la fase hiperaguda y si ésta desaparece pronto no se logra activar la segunda fase.^[37] Contrariamente en los casos en donde los estresores no desaparecen, la respuesta subaguda-crónica es disparada por la misma respuesta hiperaguda a través de la activación del sistema nervioso simpático y la liberación de EPI por las glándulas suprarrenales. Estas moléculas a su vez activan sitios del sistema límbico (LC, hipotálamo y amígdala) que desencadenan la liberación de cortisol y generan los cambios metabólicos, conductuales y cognitivos de la respuesta de estrés.

Es importante tener claro que la respuesta de estrés es una respuesta neuro-endócrina y que esta respuesta no se limita al efecto que tiene la secreción de EPI y NE por las neuronas sino que también la secreción endócrina de EPI por las glándulas suprarrenales puede afectar directamente al SNP y al SNC.

4.4.1. Respuesta hiperaguda. (Sistema Nervioso Simpático).

Willis, en 1664, describió por primera vez la anatomía correcta del sistema nervioso simpático. Dos siglos más tarde a través de exámenes histológicos mostró la densa inervación de las paredes de los vasos sanguíneos, lo que posteriormente llevó a Stelling en 1840 a concluir correctamente que las fibras vasomotoras eran nervios simpáticos provenientes desde el sistema nervioso central. En la mitad del siglo XIX, sobre la base de estas observaciones, Brown-Sequard, Waller, y Bernard sentaron las bases de los conceptos modernos de control circulatorio neuronal, a través de la demostración de la vasoconstricción con la estimulación eléctrica de los nervios cortados, y la vasodilatación tras la sección del nervio, lo que indica que las fibras simpáticas ejercen un tono vasoconstrictor.^[37]

El sistema nervioso simpático fue popularmente conocido hasta las primeras décadas del siglo XX como la respuesta de "lucha y huida", un término introducido por Cannon.^[31, 38] En las últimas tres décadas, el sistema nervioso simpático se ha desplazado hacia el centro del escenario en la medicina cardiovascular, con la demostración de la importancia de las aberraciones del sistema nervioso simpático de enfermedades como la hipertensión arterial sistémica, insuficiencia cardíaca, trastornos de control postural circulatorio que se manifiestan como síncope, entre otras. Las funciones del SNS son ubicuas en casi todos los tejidos y abarcan desde modificar la frecuencia cardíaca y respiratoria, hasta la redistribución de sangre a tejidos como músculo y cerebro.^[22] Todas las acciones que tiene el SNS son a través de la secreción de NE por las neuronas postganglionares de este sistema o a través de la secreción de EPI por las glándulas suprarrenales. Esto no se sabía hasta que Von Euler demostró definitivamente que el neurotransmisor del sistema nervioso simpático era NE.^[39] Este descubrimiento condujo rápidamente a la aplicación de métodos neuroquímicos, inicialmente medición de la excreción de norepinefrina en la orina, ahora en gran parte obsoleto, en los esfuerzos para cuantificar la actividad del sistema nervioso simpático en seres humanos.

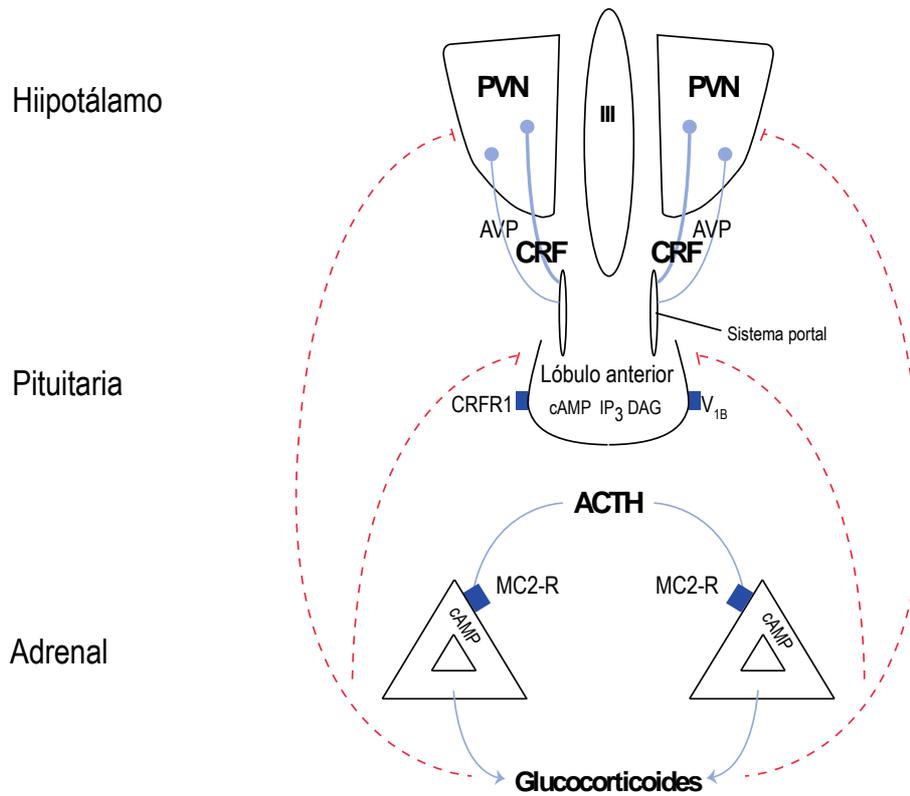
El desarrollo de una técnica de registro electrofisiológico de nervio simpático aplicable a los seres humanos (microneurografía clínica) en 1968 por Hagbarth y Vallbo y la publicación del primer ensayo de plasma-catecolamina sensible y específica, también en 1968, por Engelman et al.³⁴ fueron hitos posteriores en el campo.^[40]

4.4.2. Respuesta subaguda-crónica. Activación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal.

Las estructuras anatómicas que median la respuesta de estrés se encuentran tanto en el sistema nervioso central como en los tejidos periféricos. Los principales efectores de la respuesta de estrés se localizan en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, el lóbulo anterior de la glándula pituitaria, y la glándula adrenal. Este grupo de estructuras es denominado eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA).

Además del eje HPA, varias otras estructuras desempeñan un papel importante en la regulación de las respuestas de adaptación al estrés. Estos incluyen neuronas noradrenérgicas del tallo cerebral, circuitos adreno-medulares simpáticos, así como el sistema parasimpático.^[35, 41] Neuronas localizadas en la subdivisión parvocelular medial del PVN sintetizan y secretan factor liberador de corticotropina (CRF), el primer regulador del eje HPA en respuesta al estrés^[42, 43], el CRF es liberado en vasos portales hipofisarios que acceden a la glándula pituitaria anterior. La unión de CRF a su receptor en corticotropos en la pituitaria induce la liberación de hormona corticotropina (ACTH) en la circulación sistémica. El blanco principal de la ACTH circulante es el corteza suprarrenal, donde estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides en la zona fasciculada. Los glucocorticoides son los efectores del eje HPA y regulan los cambios fisiológicos a través de receptores intracelulares distribuidos de forma ubicua en el organismo.^[35, 42-45] Los efectos biológicos de los glucocorticoides son por lo general de adaptación. Sin embargo, la activación inadecuada o excesiva del HPA eje puede contribuir al desarrollo de patologías.^[42, 43] La figura 3 detalla el patrón de activación y regulación del eje HPA.

Figura 3. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.



Esquema que representa la activación y contrarregulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA). En azul se representa la acción activadora de las moléculas sobre los receptores en cada órgano blanco. En rojo se representa la contrarregulación (por retroalimentación negativa). PVN. Núcleo paraventricular del tálamo, CRF. Factor liberador de corticotropina, AVP. Vasopresina, ACTH. Hormona adeno-corticotrópica, cAMP. Adenosina-monofosfato cíclico. IP₃. Inositol trifosfato. DAG. Diacilglicerol. CRFR1. Receptor tipo 1 para CRF, V_{1B}. Receptor a vasopresina, MC2-R. Receptor a melanocortina tipo 2. Modificado de SM. Smith, WW. Vale; 2006

La respuesta de estrés es sumamente compleja e involucra tanto al sistema nervioso como el sistema endocrino. Fisiológicamente la respuesta es disparada por un agresor real o potencial que es percibido por los órganos de los sentidos o sistemas de autopercepción (baroreceptores, quimiorreceptores, termoreceptores) El papel del sistema endocrino en esta respuesta es aumentar el metabolismo de cualquier célula por medio del cortisol o corticoesterona en ratas. En el sistema nervioso, el cortisol estimula a neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus (LC), liberando NE a diferentes sitios de la corteza cerebral así como al sistema límbico y la médula espinal.^[37, 43] Este es un mecanismo que potencia la respuesta de estrés.

4.5. Neurobiología del dolor.

El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con una lesión presente o potencial o descrita en términos de la misma según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor^[46, 47] (IASP por sus siglas en inglés). Se puede clasificar como dolor agudo o crónico. El dolor agudo es la activación de las vías nociceptivas a través de un estímulo nocivo y éste tiene como función proteger al organismo.^[46] En el dolor crónico la relación entre lesión y dolor es difícil de precisar.

Asimismo el dolor se puede diferenciar en dos: en nociceptivo, como consecuencia de una lesión somática o visceral y en dolor neuropático como resultado de una lesión y alteración en la transmisión de la información nociceptiva a nivel del sistema central o periférico.^[48]

4.5.1. Anatomía del Dolor.

Podemos dividir vías dolorosas de la siguiente manera:

- a) Sistema periférico: nociceptores y axones.
- b) Sistema central: neurona de primero, segundo y tercer orden

4.5.1.1. Sistema periférico.

Nociceptores:

Son receptores sensoriales capaces de diferenciar entre estímulos inocuos y nocivos. Inervan la mayor parte de los órganos y sistemas del cuerpo. Se expresan en terminaciones periféricas de las fibras aferentes sensoriales primarias. Reciben y transforman los estímulos locales en potenciales de acción que son transmitidos a través de las fibras aferentes sensoriales primarias hacia el SNC. El umbral al dolor en cada fibra no es constante y depende del órgano inervado. En función de su localización y de sus distintas características, se distinguen tres grupos de nociceptores^[46, 48, 49]:

1. Cutáneos: alto umbral de estimulación. Se activan ante estímulos intensos y no tienen actividad en ausencia de estímulo nocivo. Existen 2 tipos:
 - Nociceptores A- δ , situados en la dermis y epidermis. Fibras mielínicas con velocidad de conducción alta y principalmente responden a estímulos mecánicos aunque también responden a otro tipo de estímulos. Los estímulos mecánicos a los cuales responden son pinchazos y pellizcos aplicados en la piel o penetraciones de objetos punzantes.
 - Nociceptores C amielínicos situados en la dermis con velocidad de conducción lenta. Responden a estímulos mecánicos, químicos y térmicos, así como a las sustancias liberadas de daño tisular (bradicinina, histamina, acetilcolina e iones de potasio). También llamados nociceptores polimodales.
2. Músculo-articulares: en el músculo los nociceptores A- δ responden a contracciones mantenidas del músculo, iones potasio, bradicinina y serotonina. Los de tipo C, responden a la presión, calor e isquemia muscular. Las articulaciones están inervadas por nociceptores que responden a movimientos articulares nocivos y son las terminaciones de fibras aferentes amielínicas. Se estimulan por daño tisular o inflamación.
3. Viscerales: la mayoría son fibras amielínicas. Existen en el corazón, pulmones, tracto respiratorio, testículos, sistema biliar, uréter y útero. Existiendo los de alto umbral que sólo responden a estímulos nocivos intensos, y los inespecíficos que pueden responder a estímulos inocuos o nocivos.

Axones:

Los impulsos dolorosos, después de la activación de los nociceptores, viajan a través de los axones de las fibras aferentes primarias. Específicamente el dolor se transmite a través de las fibras A δ y C [46, 49]

Tipos:

- Fibras A-delta: mielínicas, de bajo umbral y conducción rápida. Entran por la porción lateral hasta las láminas I, II y V. Perciben dolores agudos bien localizados y cuando se estimulan producen una respuesta adecuada.
- Fibras C: amielínicas, son de alto umbral. El 70% de las fibras entran por el lado lateral del asta posterior. El resto, una vez en el ganglio dorsal, se regresan y entran a la médula por el asta anterior hasta el asta posterior a nivel de la lámina II. Estas fibras se activan con estímulos intensos o repetitivos generando dolor continuo insoportable y mal localizado.
- Fibras A- β : de bajo umbral. Entran en la porción media del asta posterior sin hacer sinapsis y dan colaterales a diferentes láminas.

4.5.1.2. Sistema central.

Neurona de primer orden:

Las fibras aferentes de los nociceptores tienen sus cuerpos celulares en los ganglios de la raíz dorsal, llegan a la médula espinal a través de las raíces posteriores, y terminan en la sustancia gris del asta posterior. [5, 48, 49] Este recorrido corresponde a las neuronas de primer orden.

La localización anatómica en la médula espinal de los distintos tipos de neuronas y de las terminaciones de las fibras aferentes se suele hacer con referencia al esquema laminar de Rexed, por el cual la sustancia gris está dividida en diez láminas de las cuales las seis primeras (I a VI) corresponden al asta posterior. Las fibras A- δ cutáneas terminan fundamentalmente en las láminas I y V, mientras que las tipo C terminan en la lámina II (sustancia gelatinosa de Rolando), y en menor proporción en la lámina I y III. Las fibras procedentes de los nociceptores musculares y articulares hacen sinapsis en las láminas I, V y VI, y los nociceptores viscerales de tipo C, en las láminas I, V y X.[48, 49]

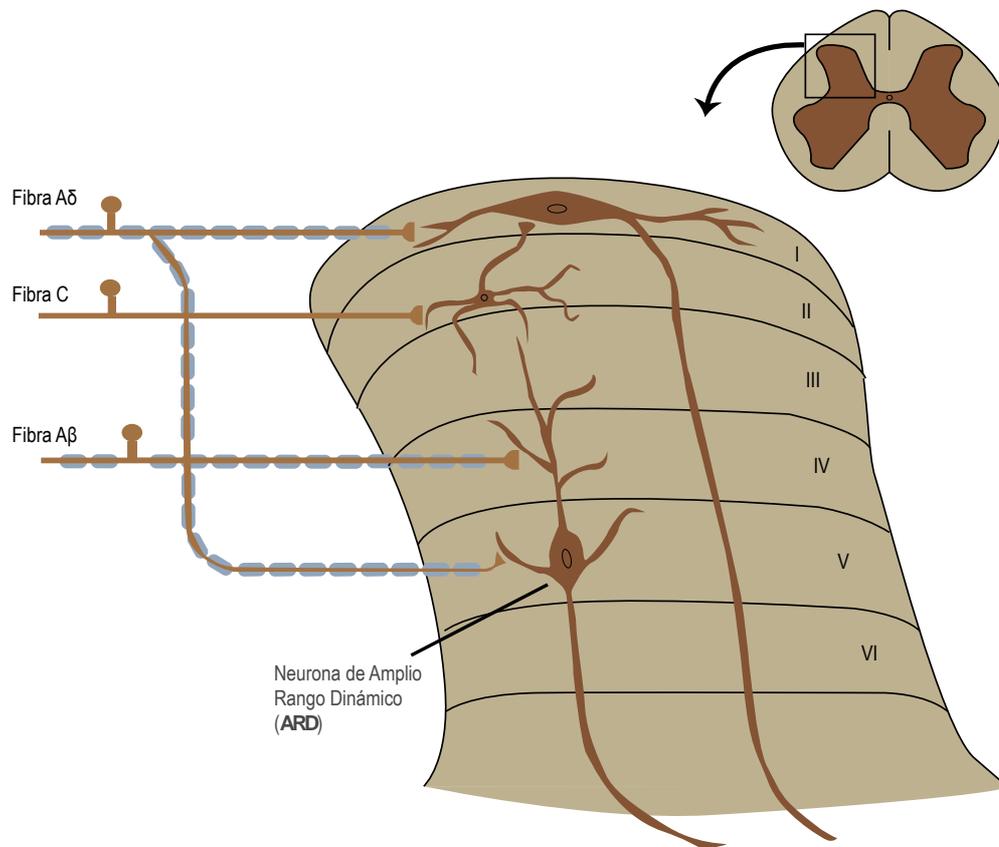
En el asta posterior, se logra un alto grado de procesamiento sensitivo que incluye la integración, selección, abstracción local y diseminación de estímulos, con lo que se logra un complejo procesamiento a nivel local; el cual es activado por los fenómenos de convergencia, sumación espacial y temporal, excitación e inhibición, procedentes de la periferia, de interneuronas locales, del tallo cerebral y del cerebelo^[8, 50]. Por esta situación, el asta posterior es un sitio de plasticidad notable y se le ha llamado "compuerta", donde los impulsos dolorosos se filtran.

Esta compuerta es también el sitio de acción de la hiperalgesia, de la modulación inhibitoria descendente [5, 6, 8, 51] y es donde actúan los opioides inhibiendo la transmisión de estímulos periféricos. [1, 5, 52]

4.5.1.3. Neuronas nociceptivas, no nociceptivas y neuronas de amplio rango dinámico (ARD).

Las neuronas nociceptivas están situadas en el asta dorsal superficial, en la capa marginal (también llamada lámina I) y la sustancia gelatinosa (lámina II). La mayoría de estas neuronas reciben entrada sináptica directa de las fibras A- δ y C. Muchas de las neuronas en la capa marginal (lámina I) responden exclusivamente a estímulos nocivos (y por lo tanto son llamadas nociceptivo-específicas). Posteriormente proyectan a centros superiores del cerebro. Algunas neuronas en esta capa, llamadas neuronas de amplio rango dinámico (ARD), responden de una manera gradual, tanto a la estimulación mecánica no nociva como la nociva. [48, 49] La sustancia gelatinosa (lámina II) se compone casi exclusivamente de las interneuronas (tanto excitadoras como inhibitorias), algunas de las cuales responden sólo a las entradas nociceptivas mientras que otros responden también a estímulos no nocivos. La lamina V, la cual contiene principalmente las neuronas ARD proyectan posteriormente hacia el tallo cerebral y a otras regiones talámicas. Estas neuronas reciben información monosináptica de fibras A- β y fibras A- δ . También reciben el aporte de fibras C, ya sea directamente en sus dendritas o indirectamente a través de interneuronas excitadoras. [48, 49] La figura 4 muestra un esquema de las láminas antes mencionadas de la médula espinal.

Figura 4. Primera sinapsis de la vía nociceptiva - Asta posterior de la médula espinal.



Esquema que representa la distribución anatómica de cada subtipo de fibras sensitivas en el asta posterior de la médula espinal. En números romanos se expresa la lámina (Rexed). Se observan las fibras que provienen de la periferia y hacen sinapsis con diferentes subtipos dependiendo del estímulo que transmiten (ver texto). En los experimentos de electrofisiología se registraron neuronas de ARD y se estimularon periféricamente neuronas nociceptivo-específicas (fibras C y Aδ) y neuronas no nociceptivas (fibras Aβ). Modificado de Al. Basbaum, TM. Jessell, 2000.

4.5.1.4. Neurona de segundo orden.

Una gran proporción de las neuronas nociceptivas de la médula espinal envía sus axones a centros supraespinales, bulbares y talámicos. La mayor parte de la información se transmite por vías cruzadas ascendentes situadas en la región anterolateral de la médula espinal, aunque también existen fibras que ascienden homolateralmente. Los fascículos ascendentes mejor definidos anatómicamente son: espinotalámico, espinoreticular y espinomesencefálico^[48]

4.5.2. Fisiología del dolor

El proceso de nocicepción puede dividirse en los cuatro procesos individuales siguientes: transducción, transmisión, modulación y percepción. ^[5, 8, 46, 48-50]

Substancias involucradas en la nocicepción:

El daño tisular producido por una lesión, enfermedad o inflamación libera sustancias químicas, entre ellas: iones (H^+ y K^+), neurotransmisores (serotonina, norepinefrina e histamina), mediadores (citocinas, eicosanoides, prostaglandinas, leucotrienos) y péptidos (sustancia P, CGRP). ^[46]

Algunas de estas sustancias estimulan directamente al receptor nociceptivo y otras modifican su sensibilidad a otros agentes. La activación y desactivación de los nociceptores se produce como consecuencia de cambios en la membrana neuronal, la mayoría de ellos calcio-dependientes. ^[46] En relación a la estimulación del receptor presináptico hay que distinguir 2 situaciones:

- La estimulación simple de un nociceptor que no haya sido sensibilizado previamente.
- La estimulación nociceptiva en presencia de una lesión inflamatoria que induce la liberación de mediadores químicos y que por consiguiente genera procesos ofensivos más duraderos; apareciendo sensibilización, hiperalgesia periférica, plasticidad, etc.

Los principales mediadores periféricos que activan simultáneamente mecanismos excitadores e inhibidores determinando las características de la señal dolorosa cuando alcanza el asta dorsal medular son:

- Hidrogeniones y potasio - los exudados inflamatorios poseen un pH ácido y soluciones ácidas aplicadas a tejidos expuestos producen dolor. Originan una despolarización rápida y mantenida de la fibra algida, consecuencia del aumento de la conductancia al Na^+ y Ca^{2+} a través de canales iónicos asociados al receptor para capsaicina (sustancia procedente del chile que activa neuronas sensoriales). Dicha sustancia tiene efecto sobre un receptor acoplado a un canal de calcio denominado TRPV1. ^[49]

- Adenosina trifosfato (ATP) - se encuentra en concentraciones escasas en todas las células, pudiendo a estas concentraciones excitar determinadas subpoblaciones neuronales por un aumento de la permeabilidad catiónica. Su administración intradérmica produce un dolor agudo, aunque transitorio.^[48, 49]
- Norepinefrina - en aquellas situaciones en que la norepinefrina entra en contacto con nervios seccionados o nociceptores lesionados, las terminaciones sensoriales expresan receptores α -adrenérgicos y esta sustancia induce una excitación y sensibilización de la fibra periférica. Sobre la médula y otros centros superiores, la norepinefrina participa en la modulación inhibitoria del dolor.^[10, 53]
- Serotonina - interviene en distintos niveles y por mecanismos diferentes; ya que puede activar directamente y producir dolor o sensibilizar a los nociceptores. La serotonina a nivel periférico activa las fibras nociceptivas mientras que a nivel central, participa más en la modulación inhibitoria del dolor.^[48, 49]
- Bradicinina - es uno de los más potentes inductores de dolor presentes en exudados inflamatorios y tejidos lesionados. Estimula los nociceptores por un mecanismo calcio-dependiente, en el que se activan la fosfolipasa A y se sintetizan prostaglandinas. También tiene actividad mitogénica, estimula la secreción, contrae la fibra muscular lisa, estimula las células endoteliales y activa la síntesis de prostanoides a partir del ácido araquidónico.^[46]
- Histamina - origina vasodilatación y edema en los procesos inflamatorios. Su papel en la activación directa del nociceptor es cuestionada estando más relacionada con la producción de prurito.^[46]
- Oxido nítrico - es un radical libre que actúa como mensajeros. Parece estar implicado en la nocicepción tanto a nivel periférico como central. A este último nivel, modula la liberación de diversos neurotransmisores (GABA, serotonina, glutamato) y podría participar en procesos de plasticidad y sensibilización central. Además, parece que el sistema del óxido nítrico está implicado en la analgesia inducida por antiinflamatorios no esteroideos (AINE's), opioides y anestésicos locales.^[46]

- Prostaglandinas y eicosanoides - no activan directamente los nociceptores, sino que intervienen en la sensibilización de los mismos u otros mediadores químicos y en el desarrollo de hiperalgesia. Estas sustancias son producidas cuando se altera la integridad de la membrana celular de tejidos conectivos, debido a la entrada de calcio al espacio intracelular y posteriormente la activación de la fosfolipasa A2. Los fosfolípidos de la membrana son metabolizados por esta enzima convirtiéndolos a ácido araquidónico, posteriormente este compuesto es metabolizado por la cicloxigenasa (COX) produciendo prostaglandinas. El bloqueo de la COX ha sido el blanco de la mayoría de los fármacos analgésicos, ya que estos compuestos juegan un papel muy importante en el dolor inflamatorio.^[46]
- Citocinas - los nociceptores son estimulados de forma indirecta por las interleucinas, el factor de necrosis tumoral o los interferones, al activar la síntesis y liberación de prostaglandinas.^[48]

4.5.2.1. Dolor neuropático: Mecanismos de sensibilización

Estos cambios en la excitabilidad de la médula espinal se desencadenan por mecanismos neurofisiológicos o moleculares mediados por:

- Fenómeno de wind-up y N-metil-D-aspartato (NMDA) – la estimulación repetida de fibras C que conduce a un aumento en el tamaño de los campos receptivos y un aumento en la respuesta de las neuronas nociceptivas espinales. Esto se produce a través de cambios estructurales como fisiológicos. Al activar los canales NMDA, se permite la entrada de iones Ca^{+} que permite la activación de una proteína llamada calmodulina, la calmodulina está involucrada en diferentes mecanismos intracelulares. Al activar estos mecanismos, se producen cambios en el citoesqueleto de las espinas sinápticas y se aumenta el área de contacto con el botón sináptico, además esto produce un incremento de la expresión de receptores AMPA en la neurona postsináptica. Lo anterior ocurre por fusión de vesículas que contienen dichos receptores que se encuentran en el citoplasma de las espinas sinápticas y también por activación de mecanismos intracelulares que activan factores de transcripción de genes que codifican para receptores glutamatérgicos. Todos estos cambios, producen una sensibilización a nivel de la neurona de segundo orden, la cual se denomina sensibilización central^[8]
- Cambios genéticos mediados por proteínas - hiperexpresión de ciertos genes ante una estimulación nociceptiva mantenida que determina un incremento de la síntesis de receptores y canales en las neuronas nociceptivas disminuyendo el umbral de neuroexcitación²¹. Cambio en el fenotipo de las fibras aferentes primarias hiperexcitabilidad simpática por un aumento de la expresión de α -adrenoreceptores en los axones de las fibras nociceptivas primarias. También los estímulos de baja intensidad activan fibras A- β que expresan neuropéptidos excitadores (sustancia P y CGPR) favoreciendo su liberación en el asta dorsal medular y produciendo una hiperexcitabilidad.^[10, 53]

- Mecanismo de modulación de la compuerta espinal - descrito en 1965 por Melzack y Wall. [6, 7, 51] La actividad de la sustancia gelatinosa (lámina II o III del asta dorsal) modula y regula el ingreso de los impulsos nerviosos procedentes de fibras aferentes a las células de transición. Estas células influyen presinápticamente bloqueando los impulsos o reduciendo la cantidad de neurotransmisor liberado por los axones de las fibras A y C.

4.5.2.2. Control inhibitor central o modulación supraespinal (top-down) de la transmisión dolorosa.

Los sistemas principales de inhibición del asta posterior de la médula espinal son los sistemas descendentes supraespinales y las interneuronas inhibitorias como mecanismo intrínseco espinal.

Durante el procesamiento de estímulos nociceptivos o posterior a éste, los mismos impulsos de las vías nociceptivas activan a la vez mecanismos encargados de la modulación inhibitoria tanto a nivel periférico, como espinal y/o supraespinal. Las vías descendentes que modifican la actividad de todos los sistemas ascendentes son las fibras corticoespinales, originadas en los lóbulos parietal terminando en el cuerno dorsal y el tracto rafeespinal. Pasan a las áreas de la médula espinal a través del cordón dorsolateral y hacen sinapsis en las láminas I, II y V. Los principales mecanismos son inhibidores a través de serotonina y norepinefrina. [7, 48, 54-57]

Diversos sistemas endógenos desde centros supraespinales modulan la información aferente. Las sustancias implicadas son:

- Ácido gaminobutirico (GABA)- Procesa estímulos de bajo umbral. Su papel preferente parece ser inhibitor medular presináptico. Disminuye la liberación de neurotransmisores excitadores, especialmente el glutamato. [56]
- Serotonina- la mayoría se encuentran en los núcleos del rafe y bulbopontinos. Sus acciones a nivel central son inhibitorias. [56]
- Acetilcolina - activa los receptores muscarínicos y aumenta la latencia de los estímulos dolorosos.
- Norepinefrina - se encuentra en los núcleos pontobulbares, locus coeruleus y subcoeruleus y terminan en las láminas I, II, IV, VI y X. Sus acciones antinociceptivas en el ámbito espinal son mediadas preferentemente por receptores α -2, y a nivel supraespinal participan tanto receptores α -2 como α -1. [10, 53, 58, 59]

4.6. Evidencia experimental en modelos animales en donde se modifica la precepción del dolor agudo y neuropático a través de la manipulación de receptores adrenérgicos.

4.6.1. Hiperalgnesia inducida por la respuesta de estrés.

Los primeros reportes en donde se observó que la respuesta de estrés modulaba la percepción del dolor fue hace aproximadamente 150 años. Weir Mitchell en 1872 describió un síndrome caracterizado por hiperalgnesia, hiperestesia (aumento en la intensidad de la percepción de estímulos táctiles o mecánicos no dolorosos), alodinia (estímulos táctiles no dolorosos que se perciben como dolorosos), sensación de quemadura y cambios tanto en la temperatura como en el color de la piel.^[60, 61] Este fenómeno se denominó causalgia, por la sensación de calor acompañada de dolor y sugirió que este dolor era producido por el sistema nervioso simpático (SNS), ya que al diseccionar quirúrgicamente y retirar los nervios del SNS (simpatectomía), los síntomas disminuían parcial o totalmente.^[62]

En el transcurso del siglo pasado, tras otras investigaciones, se describieron otros síndromes con un aumento del tono simpático que cursan con dolor y se clasificaron generando así un grupo de síndromes conocidos como distrofia simpática refleja.^[61]

Recientemente se han encontrado otras patologías que cursan con dolor y alteraciones del SNS. La fibromialgia (FMS) es una enfermedad que afecta el 2% de la población mundial, principalmente mujeres, y la incidencia ha aumentado drásticamente con el paso de los años. Cuenta con una amplia gama de sintomatología en donde los más importantes son dolor crónico generalizado e hipersensibilidad a la palpación en puntos específicos, también se presentan alteraciones del sueño, depresión, así como alteraciones del tono simpático.^[63, 64]

Específicamente hablando de los receptores beta-adrenérgicos, hasta ahora se ha descrito poco en la literatura pero tanto Kress y cols. como Schmidt y cols. sugieren que tanto el receptor α_1 como el β_1 están involucrados en la alodinia producida por la neuralgia postherpética.^[65, 66]

Todas estas patologías apoyan a pensar que los receptores adrenérgicos, el sistema nervioso simpático así como núcleos de neuronas noradrenérgicas en el SNC, están involucradas en la génesis y mantenimiento del dolor agudo y neuropático. El fin de esta tesis es aumentar el conocimiento del papel de los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos en la modulación del dolor agudo y neuropático.

4.6.2. Analgesia Inducida por la Respuesta de Estrés.

La analgesia inducida por estrés (AIS) es un mecanismo de supresión al dolor que se presenta en mamíferos, que se produce durante o después de la exposición a un estímulo estresante o peligroso. El dolor puede ser considerado como una defensa desarrollada evolutivamente como respuesta a un estímulo aversivo o nocivo. Conductas aversivas (por ejemplo, el miedo, la ansiedad, el pánico), o comportamientos pueden ser vistos como parte del sistema de defensa del organismo frente a los estímulos que podrían causar dolor⁶⁵. Por lo tanto, la nocicepción y aversión tienen características superpuestas. La coincidencia es fácilmente aparente en el nivel de la vía y el sustrato neural. Desde una perspectiva evolutiva la AIS puede ser pensado como un componente de la respuesta de "lucha o huida". [1, 2, 67, 68] Desde el punto de vista evolutivo, atender una lesión dolorosa no sería favorable para la supervivencia de un organismo si existe la posibilidad de más lesiones o inclusive la muerte. Por otro lado, una vez que el organismo ya no está en peligro, la nocicepción es benéfica ya que evita agravar las lesiones con comportamientos y movimientos normales.^[8] Muy probablemente las interacciones depredador-presa jugaron un papel importante en el desarrollo evolutivo de la AIS. Los depredadores tienden a preferir a las presas heridas. Esto ocurre debido a que se necesita menos energía para atrapar a la presa herida en comparación a la presa que no presenta ninguna lesión, generando entonces una ventaja evolutiva de los animales que expresaron AIS sobre los que no. [2]

En el siglo XVII, Rene Descartes propuso una "teoría de la especificidad", en donde postuló que la intensidad del dolor y el daño tisular están directamente relacionados.^[48] Esta teoría fue generalmente aceptada por muchos años a pesar del hecho de que el dolor podría ser modulado por muchos factores, incluyendo la experiencia y el estado emocional, así como la existencia de miembro fantasma doloroso en personas que sufrían amputaciones de las extremidades. La teoría de control de compuerta, primero descrita por Melzack y Wall (1962)[51]⁴⁸, postulan que el dolor es modulado por la interacción entre las neuronas en el nivel espinal y no por una activación directa de los receptores del dolor. La teoría sugiere que las fibras A- β no-nociceptivas forman sinapsis en las mismas láminas junto con las fibras A-delta nociceptivas y junto con fibras C. Entonces, el disparo de las fibras A- β "cerraría la compuerta" a la señalización nociceptiva. ^[50] Por el contrario, el disparo de fibras nociceptivas inhibiría la transmisión de la señalización no nociceptiva y por lo tanto "abriría la compuerta".

La teoría de control de la compuerta proporciona un avance considerable en la comprensión de la modulación del dolor sin embargo, no fue hasta que esta teoría fue posteriormente integrada con el descubrimiento de la modulación del dolor a través de vías descendentes conocidas como modulación supraespinal que se entendió más a fondo dicha modulación.^[69] La modulación supraespinal del dolor puede bien facilitar la nocicepción^[70], como puede inhibir la nocicepción, también conocido como inhibición descendente.^[52] Curiosamente, la sustratos y regiones anatómicas implicadas en la facilitación y la inhibición de la nocicepción son a menudo idénticas.

Como Millan⁶⁹ (2002) señala en su extensa revisión del control descendente del dolor, la diferencia en los mecanismos de facilitación y la inhibición de la nocicepción radica en subtipos de receptores acoplados a diferentes mecanismos intracelulares. Todos estos mecanismos descritos tienen un papel en la génesis de la AIS a través de la modulación supraespinal e intraespinal que proviene de la exposición a un estresor o situación que pone en peligro la vida del organismo.^[71-73]

Muchos mecanismos diferentes median AIS; ésta se produce principalmente a través de la activación del sistema nervioso simpático al liberar NE dentro del SNC^{3,5}, además de la NE muchas otras moléculas están involucrados en este proceso, pero en un menor grado (por ejemplo opioides endógenos^[1, 73], endocannabinoides ^[74] así como el ácido γ -aminobutírico^[56]). A pesar de que muchas áreas del cerebro han sido implicadas en AIS (amígdala^[75], sustancia gris periacueductal^[55]) se cree que la médula espinal es el sitio de regulación más importante. Esto es debido a que es la primera puerta a la percepción del dolor^[48] y por tanto donde la mayor parte de la regulación se produce, sobre todo en las neuronas de amplio rango dinámico (ARD).^[7] Estas neuronas se consideran de ARD, porque son polimodales y responden a estímulos somatosensoriales así como estímulos nociceptivos. Por otra parte, también vías descendentes inhibitorias juegan un papel en AIS mediante la inhibición de estas neuronas.^[7, 53, 76]

4.6.3. Evidencia de la modificación del dolor por manipulación de los receptores adrenérgicos.

Se sabe que la EPI / NE en la médula espinal tienen efectos analgésicos.^[58, 74, 77, 78] Los receptores adrenérgicos se dividen en tres familias (ver sección 4.2): Las familias $\alpha 1$ y β son receptores principalmente excitadores, mientras que $\alpha 2$ son receptores inhibidores. Puesto que el último es inhibidores, la mayoría de los estudios se han centrado en el papel de estos receptores en la modulación del dolor, lo que sugiere que la AIS está mediada sólo por la activación de este subtipo de receptores que se expresan en las neuronas sensoriales.^[58, 77, 79] De todos los subtipos de β -adrenoreceptores, $\beta 1$ y $\beta 2$ subtipos son los más expresan en el SNC.^[16, 28, 80] A pesar de que hay evidencia escasa, no concluyente de que β -adrenoreceptores están implicados en la modulación del dolor en modelos animales^[81-83] hay un amplio espectro de estados clínicos en los que el dolor mejora después de tomar antagonistas β -adrenérgicos como la fibromialgia^[84], la migraña^[85], y también en miembro fantasma doloroso^[86]. Específicamente hablando de la fibromialgia, el Dr. Martínez-Lavín ha propuesto que estos pacientes se encuentran con un tono elevado del SNS, traduciéndose en una elevación de la concentración de NE. Además el autor argumenta que existe un componente del dolor cuando existe un tono adrenérgico elevado. Esto se probó con un electrocardiograma de 24hr, observando que las pacientes con FMS tienen menos variabilidad de la frecuencia cardiaca (FC) en comparación a mujeres control. En otro estudio se observa que el aumento de la presión arterial y la FC en a prueba de la mesa de inclinación es mucho menor en pacientes con FMS en que en pacientes sanos. Como se mencionó

antes, el dolor en estos pacientes es agudizado por eventos de estrés, tanto físico como emocional. [63, 64]

En ejemplos más concretos, en pacientes con dolor oncológico intratable, el labetalol (antagonista no selectivo de los receptores adrenérgicos β) alivió el dolor en el 40% de los pacientes tratados. Más recientemente, otros autores reportaron en un modelo en ratones de dolor neuropático que los receptores β_2 adrenérgicos están implicados en el efecto antihiperálgésico que tienen los inhibidores la recaptura de serotonina y norepinefrina no selectivos. [81, 87] Los autores argumentan que al bloquear este receptor, se abole el efecto que tienen dichos fármacos y más aún se observa el mismo efecto al administrar clenbuterol sin exponer al animal a los inhibidores de recaptura.

4.4. Modelos animales de dolor.

4.4.1. Modelos de análisis electrofisiológicos de neuronas sensitivas.

Tras conocer puntualmente la anatomía de las vías neuronales así como las áreas corticales que están involucradas en la nocicepción, se han generado una serie de diferentes modelos en donde se analiza la actividad de dichas neuronas. En específico, en la médula espinal se cuentan con modelos experimentales en donde se analiza la actividad eléctrica de las neuronas sensitivas. Específicamente hablando de la modulación más que de la transmisión fisiológica de la nocicepción, los métodos que analizan las neuronas de ARD son de gran ayuda.^[76]

Debido a que la lámina V en la médula espinal es el primer sitio de integración de la nocicepción, además de ser uno de los lugares en donde se conoce que existe modulación a través de la liberación de NE y EPI tras la respuesta de estrés, entonces es de gran ayuda que se analice la modulación electrofisiológica que ocurre a este nivel, específicamente en neuronas de ARD (ver apartado 4.5.1.3.).

4.4.2. Modelos de nocicepción crónica.

La clasificación de modelos animales (generalmente ratas) para el estudio de dolor crónico está dividida en 3 grupos según Albe-Fessard y cols.^[88] Dicha división está basada en el mecanismo de origen del mismo. Los 3 grupos son: hiperestimulación, deafferentación y foco irritativo central. En estos modelos el animal expresa una conducta nociceptiva caracterizada por vocalización, auto-lesión y pérdida de la función del área afectada o bien sólo una de estas características.

Es importante que en todos los grupos se observa que los animales presentan conductas autodirigidas tales como lamido intenso, mordisqueo, rasguño e incluso auto-amputación del sitio afectado. Varios autores^[89, 90] argumentan que esta conducta autodirigida es el resultado de la estimulación nociceptiva periférica y directamente proporcional a la intensidad del estímulo. Se piensa que dichos estímulos generan alteraciones morfo funcionales en la percepción de la nocicepción a nivel central.

4.4.1. Modelo de autotomía.

Debido a que el dolor neuropático es una alteración en la integridad física o fisiológica de las vías nociceptivas, los modelos consisten en dañar dichas fibras, ya sea física como químicamente. Melzack y Wall, crearon uno de los primeros modelos de dolor neuropático el cual consiste en generar una lesión periférica en el nervio ciático (denervación/axotomía total del nervio). Posteriormente, Coderre y cols. modificaron el modelo al agregar un estímulo doloroso 30 minutos antes de la denervación, el cual consiste en la inmersión de la pata trasera del animal en agua a 55°C durante 20 min bajo anestesia general. La teoría detrás de este acción es la activación de termorreceptores (TRPV1) por ese periodo permite la entrada de iones de calcio y activa los mecanismos de potenciación a largo plazo (*wind-up*). Véase apartado 4.5.2.1. En esta variación del modelo el grado de autotomía se evalúa durante 25 días y no durante 50.

La evaluación de la conducta de autotomía consiste en dos partes: el grado y el día de inicio de la autotomía. Para el caso de la evaluación del grado, este va en un rango de 0 a 13 puntos. Esta escala fue propuesta por Wall y cols. Y frecuentemente usada por nuestro grupo^[91] y consiste en cuantificar el grado de lesión, se atribuye puntos a cada región anatómica de la pata. La tabla 3 explica a detalle la puntuación.

Tabla 3. Cuantificación del grado de autotomía - Escala de Wall.

Región anatómica	Cantidad por pata	Puntuación unitaria	Puntuación total
Uña/uñas	5	1	5
Falanges distales.	5	1 punto c/ una	5
Falanges proximales	5	1 punto c/ una	5
Pata distal	1	1 punto c/ una	1
Puntuación máxima			13

Además, se evalúa en cada grupo cual es el día promedio de inicio de la autotomía y se evalúa la prevalencia, es decir cuántos de todos los animales mostraron la conducta. Es suficiente 1 punto en el grado de autotomía para considerar que la conducta fue positiva. Esto se evalúa de igual manera en el modelo original y en la modificación de Coderre y cols.

5. Justificación:

Debido a la relación estrecha entre los mecanismos neuroquímicos que transmiten el dolor y los circuitos involucrados en la respuesta de estrés, es interesante estudiar si la modulación de la respuesta de estrés puede modificar el primer fenómeno. Específicamente como los receptores β -adrenérgicos afectan la modulación del dolor agudo y neuropático.

El amplio y seguro uso de la terapia beta bloqueadora, facilita analizar que si ese fuera el caso, los beta bloqueadores puedan funcionar como agentes coadyuvantes para el manejo del dolor o del estrés asociado a dicha patología. Sería entonces de gran impacto para la población en general ya que el dolor es el síntoma más frecuente de consulta.

Además no se conoce por completo la fisiopatología del dolor agudo y neuropático, y si existiese un componente que sea dependiente del estrés y a su vez éste puede ser mermado por los beta-bloqueadores, podría representar una ventaja en la calidad de vida de los pacientes que tienen esta enfermedad.

6. Hipótesis.

H₀: El bloqueo de los receptores β -1, β -2 o de ambos, no modificará significativamente la percepción del dolor agudo ni del dolor neuropático en modelos experimentales animales.

H₁: El bloqueo de los receptores β -1, β -2 o ambos modificará significativamente la percepción del dolor agudo y del dolor neuropático en modelos experimentales animales.

7. Material, método y resultados.

7.1. *Ética en investigación de dolor.*

La investigación experimental del dolor realizada en animales íntegros, se ve afectada por diversos problemas metodológicos que involucran aspectos éticos así como el análisis e interpretación de resultados a través del tiempo. Es importante tener en cuenta las guías para la experimentación del dolor en animales, las cuales se cumplieron en esta tesis y son mencionados a continuación: (IASP, 1983).^[92]

1. Es esencial que los experimentos destinados al estudio del dolor en animales conscientes sean revisados previamente tanto por científicos como por personas que no trabajen dentro del campo. Se debe demostrar fehacientemente el beneficio potencial de tales experimentos a nuestra comprensión de los mecanismos del dolor y terapia del dolor si es el caso. El investigador debe ser consciente de la necesidad ética de continuar.
2. Si es posible, el investigador debe probar el estímulo doloroso en sí mismo, este principio se aplica para la mayoría de los estímulos no invasivos que causan dolor agudo.
3. Para hacer posible la evaluación de los niveles de dolor, el investigador debe evaluar cuidadosamente cambios en la conducta normal del animal. Para este fin, se deben medir parámetros fisiológicos y de comportamiento.
4. En los estudios de dolor agudo o crónico debe existir una seguridad razonable de que el animal está expuesto al dolor mínimo necesario para los fines del experimento.
5. Un animal que presumiblemente esté experimentando dolor crónico debe ser tratado para el alivio del dolor, o se debe permitir la auto-administración de agentes o procedimientos analgésico, siempre y cuando esto no interfiera con el objetivo de la investigación.
6. Los estudios de dolor en animales paralizados con un agente de bloqueo neuromuscular no deben ser realizados sin anestesia general o sin un procedimiento quirúrgico adecuado que elimine la conciencia sensorial.
7. La duración del experimento debe ser tan corta como sea posible y el número de animales implicados reducirse al mínimo.

Todos los experimentos se realizaron en ratas Wistar macho (250-350g). El comité de ética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz aprobó la metodología descrita a continuación, y además todos los experimentos se realizaron bajo los lineamientos antes descritos. Dichos experimentos se ejecutaron a temperatura ambiente (25-27°C) y las ratas se mantuvieron en grupos de 5 por caja con comida y agua ad libitum hasta el momento del experimento.

Nuestros experimentos se dividen en dos categorías:

- Experimentos en dolor agudo.
- Experimentos dolor neuropático.

Primera Parte: Modulación del dolor agudo por fármacos que afectan a los receptores beta-adrenérgicos.

7.2. Experimentos en dolor agudo - metodología.

Se realizaron registros electrofisiológicos de neuronas de ARD de médula espinal mientras se aplicaban estímulos nociceptivos periféricos en los animales. A continuación se describe la metodología utilizada. Esta serie de experimentos fueron publicados en octubre de 2014^[93] como parte del programa del Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.

7.2.1 Electrofisiología de neuronas de ARD de médula espinal.

Debido a la gran modulación que existe en las neuronas ARD de la médula espinal, decidimos realizar el análisis electrofisiológico en este tipo de neuronas la médula espinal en ratas a nivel del segmento medular L3. Dicho segmento es a donde llegan las fibras aferentes de las patas traseras del animal.

7.2.2. Procedimientos quirúrgicos.

Se usó uretano intraperitoneal (1.3 mg/kg) como anestésico general en todos los animales. Para la exposición de la médula espinal se realizó una disección anteroposterior medial en la piel, posteriormente se retrajeron los músculos de la masa de común de la médula espinal y sí realizó una disección bilateral sobre las láminas de las vértebras L2 -L4. Esto con el fin de introducir los fijadores medulares estereotáxicos. (figura 4). Después, quitamos las láminas de L2 y L3, así como el tejido meníngeo de tal manera que el tejido nervioso de la médula espinal quedó expuesto para la inserción de electrodos.

7.2.3. Colocación de los electrodos, campo receptivo y la caracterización de las neuronas.

Se usaron electrodos de tungsteno (70mm, 3MΩ, FHC Inc. Bowdoin. ME) para obtener un registro electrofisiológico unitario extracelular *in-vivo* de neuronas de ARD. Para la colocación de los electrodos se utilizó un microposicionador hidráulico manual (Kopf Instruments, modelo 640, Tujunga, California). Para registrar las neuronas sensoriales de la pata trasera derecha del animal, el electrodo se colocó en el lado derecho de la médula espinal dorsal a nivel L3. Posteriormente se descendió el electrodo desde la superficie de la médula espinal hasta una profundidad máxima de 500 micras. Para hallar el campo receptivo de la pata derecha, durante el descenso del electrodo se aplicó continuamente un estímulo táctil no-nociceptivo en la pata derecha del animal. Una vez encontrado el campo receptivo, se procedió a examinar que fuera una neurona de ARD. Sólo fueron consideradas como de amplio rango aquellas neuronas que respondieron tanto a los estímulos dolorosos como a no dolorosos, por lo tanto, una vez se ha encontrado el campo receptivo, un estímulo doloroso no nocivo se aplicó con el fin de caracterizar la neurona como amplia dinámica o como una neurona sensorial no dolorosa. Sólo neuronas de ARD se incluyeron en el estudio.

7.2.4. Estimulación periférica.

Dos tipos diferentes de estímulos se aplicaron a la pata trasera derecha durante el registro:

- No dolorosos (No-D) estímulos mecánicos con una brocha.
- Estímulos dolorosos (D): estímulos mecánicos con una pinza.

La duración de cada estímulo fue de 10 s. Cada D y No-D estímulos se alternaron y separados por un intervalo de 10 s donde no se aplicó ningún estímulo (ausencia de estimulación, AE) con el fin de cuantificar la tasa de disparo basal de cada neurona. La secuencia de estímulos (SdE) se dividió en intervalos de la siguiente manera: AE – No-D - AE - D -AE – No-D -AE. La duración de la secuencia de estímulos era de 90 s.

7.2.5. Registro electrofisiológico y análisis de datos.

Para cada animal, se llevó a cabo la misma SdE dos veces separadas por un intervalo de 300 s libre de estimulación periférica. El esquema experimento completo se representa en la Figura 5.

Figura 5. Esquema metodológico del experimento 1.

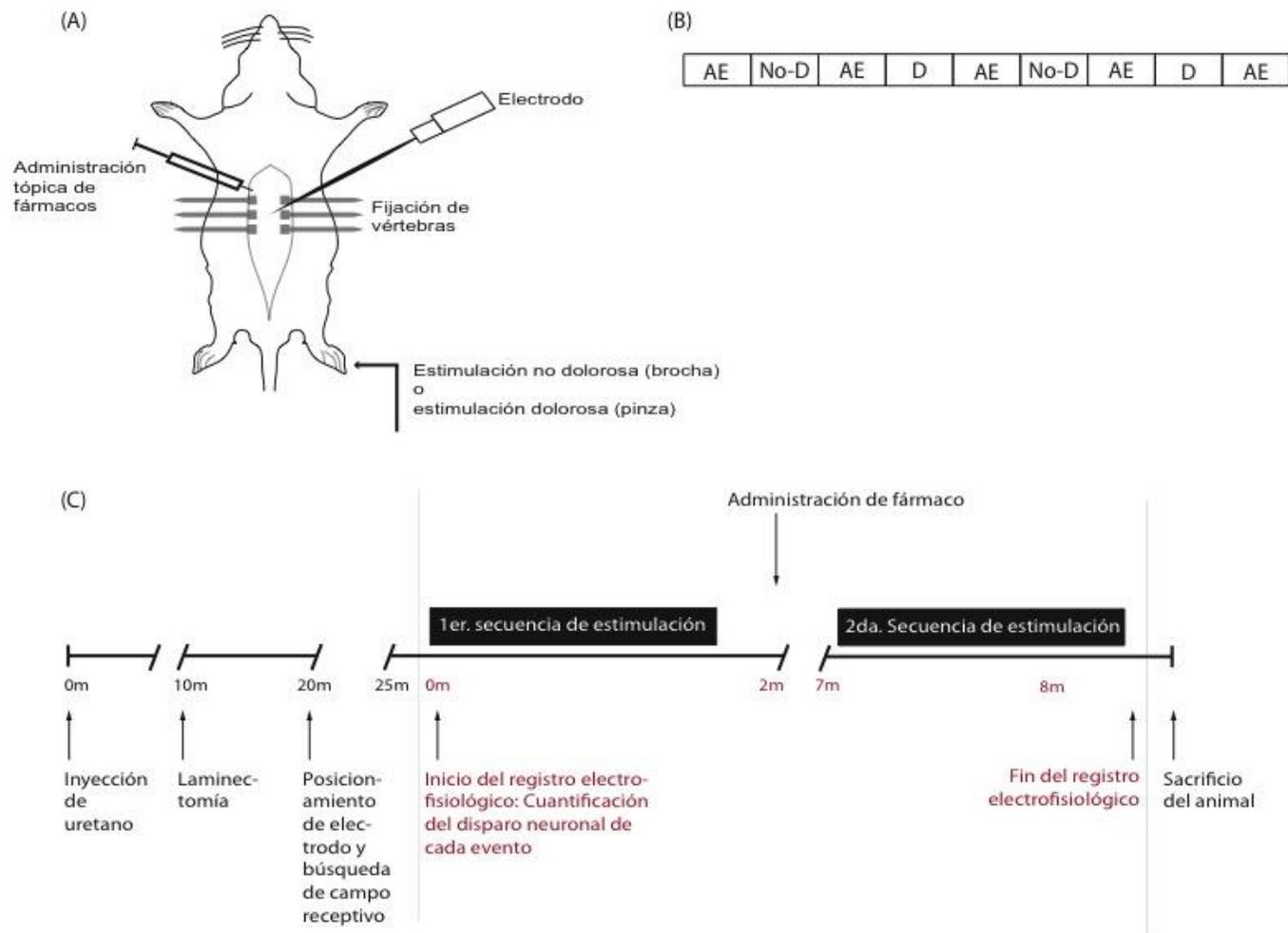


Diagrama esquemático Experimental. **A.** Después de la laminectomía de L2-L4, se registró electrofisiológicamente las neuronas espinales de ARD; la actividad de estas neuronas y su respuesta a la estimulación no dolorosa y doloroso se analizaron con la administración de fármacos adrenérgicos. **B** secuencia de estímulos: ausencia de estimulación (AE), la estimulación no dolorosa (No-D), la estimulación dolorosa (D). **C.** esquema completo experimento.

Se utilizó un sistema Cerebus (Cyberkinects INC, EE.UU.) para la amplificación de la señal. Todas las neuronas se caracterizaron como neuronas ARD con Spikesorter (versión 1.0.0.1). Neuroexplorer (versión 4.097) se utilizó para analizar los datos. Toda el registro de 520 s se dividió en histogramas de 10 s, que se correlacionan con la duración de cada intervalo. De la longitud completa del registro, sólo se analizaron los primeros y los últimos 90 s, correspondientes a la SdE antes de la administración de fármacos y a la SdE después de la administración del fármaco (véase la figura 4). La respuesta registrada detectadas para cada tipo de intervalo se promedió, obteniendo tres valores diferentes por SdE, 1) promedio de cinco intervalos AE, 2) media de dos intervalos No-D y 3) la media de dos intervalos P, (ver figura 4).

Los datos obtenidos para cada tipo de intervalo se convirtieron en valores porcentuales, donde el 100% de respuesta correspondió a la media de los picos de todos los intervalos AS durante la primer SdE para cada neurona analizada. Ha este porcentaje lo definimos como la frecuencia de disparo basal (FDB). El efecto de la administración del fármaco sobre la frecuencia de disparo se calculó mediante la comparación de la tasa de disparos antes y después de la administración del mismo para cada tipo de estímulos con la FDB. Así también se comparó la tasa de disparos evocada por cada tipo de estímulos con su equivalente de la segunda SdE . Por lo tanto, se observó un aumento o una disminución en el porcentaje de FDB y en la tasa de disparos evocado estímulos D y los estímulos No-D.

7.2.6. Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por una prueba de la menor diferencia significativa (MDS) para analizar los resultados. Se consideró aquellos resultados de $p < 0.05$ como significativos para estos experimentos.

7.2.7. Grupos y la administración del fármaco.

El vehículo para todas los fármacos fue solución salina al 0.9%. Los fármacos se administraron por vía tópica sobre la médula espinal (volumen: 100 μ L). Los detalles experimentales para cada grupo se muestran en la tabla 3.

Tabla 2. Detalles de los grupos experimentales - experimentos de electrofisiología.

Grupo	n	Fármaco.	Dosis.	Mecanismo de acción.
Control.	11	Salina al 0.9%.	--	--
EPI.	8	Epinefrina.	100mcg.	Agonista no selectivo de los receptores adrenérgicos.
AGO β 1	8	Dobutamina.	125mcg.	Agonista del adrenoreceptor β 1.
ANT β 1	9	Metoprolol.	100mcg.	Antagonista del adrenoreceptor β 1.
AGO β 2	7	Clenbuterol.	100mcg.	Agonista del adrenoreceptor β 2.
ANT β 2	8	Butoxamina.	100mcg.	Antagonista del adrenoreceptor β 2.
ANT β 1+EPI	10	Metoprolol + epinefrina.	100mcg + 100mcg.	Agonista no selectivo de los receptores adrenérgicos + Antagonista del adrenoreceptor β 1.

7.3. Resultados.

Se analizaron un total de cincuenta y tres neuronas ARD espinales en nuestro estudio. Los resultados se presentarán en valores porcentuales, lo que indica una disminución o un aumento tanto en la tasa de disparo basal y / o la velocidad de disparo evocada por estímulos No-D y D, estímulos producidos bajo la aplicación de drogas con efecto en los receptores adrenérgicos.

7.3.1. Efectos de los fármacos que afectan los receptores adrenérgicos sobre la FDB en neuronas de ARD de médula espinal (L3).

La figura 6 muestra los cambios en FDB obtenidos por la comparación de la media de todos los intervalos a partir del primer SdE con todos los intervalos AE de la segunda SdE. En el grupo control (n = 11) se observó que el FDB fue mayor (aumento de 27,49%) durante el segundo SdE sin ningún fármaco presente, sin embargo, este aumento no fue significativo. De esta manera, que decidimos comparar los datos de todos los grupos de prueba de drogas con esta diferencia. Agonista adrenérgico completo (epinefrina, grupo EPI) la administración produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) en el FDB de -34,1%. Ninguno de los fármacos que afectan a los receptores β -adrenérgicos cambió significativamente la FDB ($p > 0,05$); los resultados fueron los siguientes: agonista β 1-adrenérgico (dobutamina, grupo AGO β 1) produjo una disminución en el FDB de -0,05%, agonista β 2-adrenérgico (clenbuterol, AGO β 2 grupo) produjo un cambio mínimo de 0,52%, antagonista de los receptores adrenérgicos β 1-(metoprolol, grupo ANT β 1) produjo un aumento del 10,56%, mientras que el antagonista β 2-adrenérgico (butoxamina, grupo ANT β 2) produjo un aumento del 4%.

Figura 6. Efectos de los fármacos que afectan los receptores adrenérgicos sobre la FDB en neuronas de ARD de médula espinal (L3).

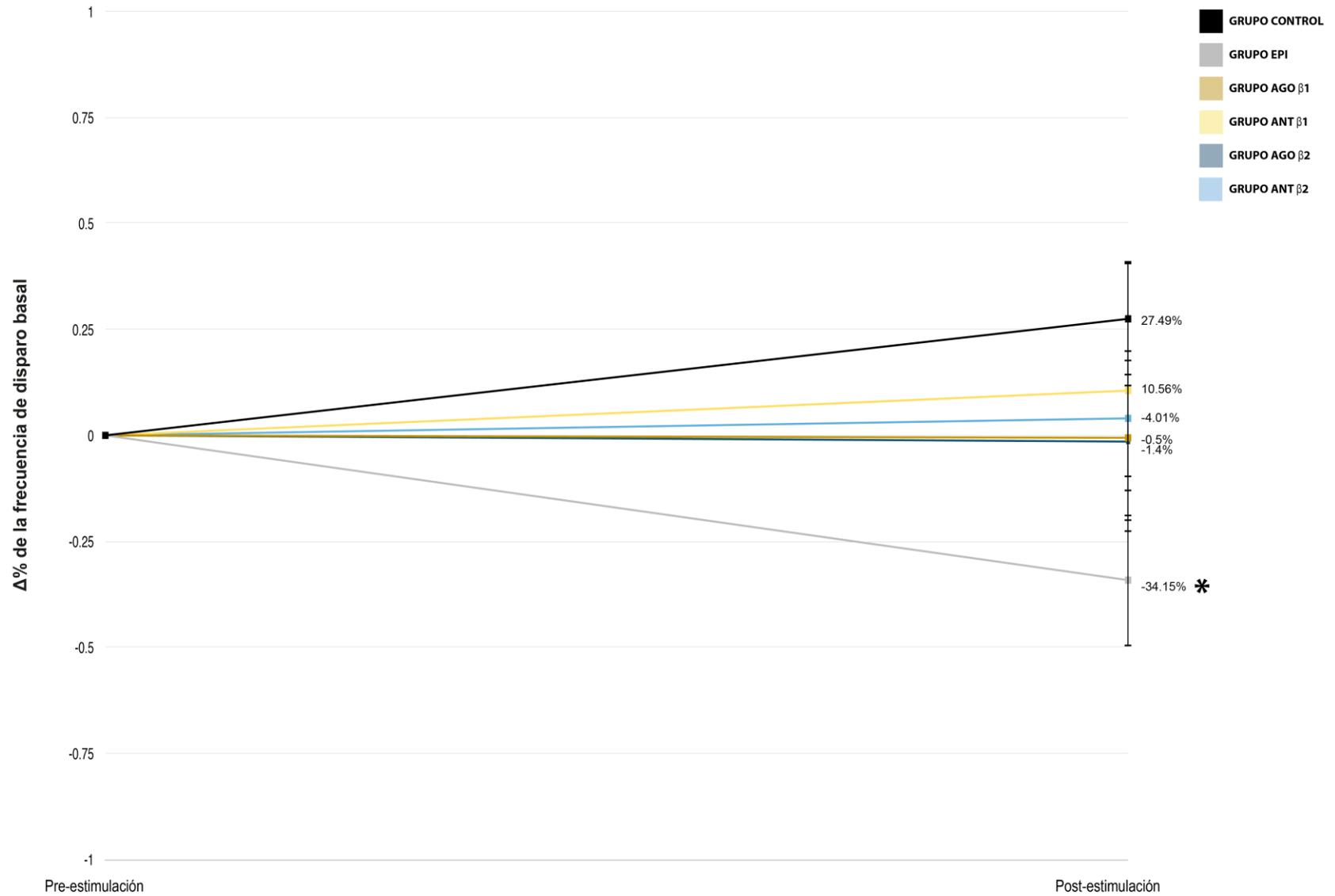
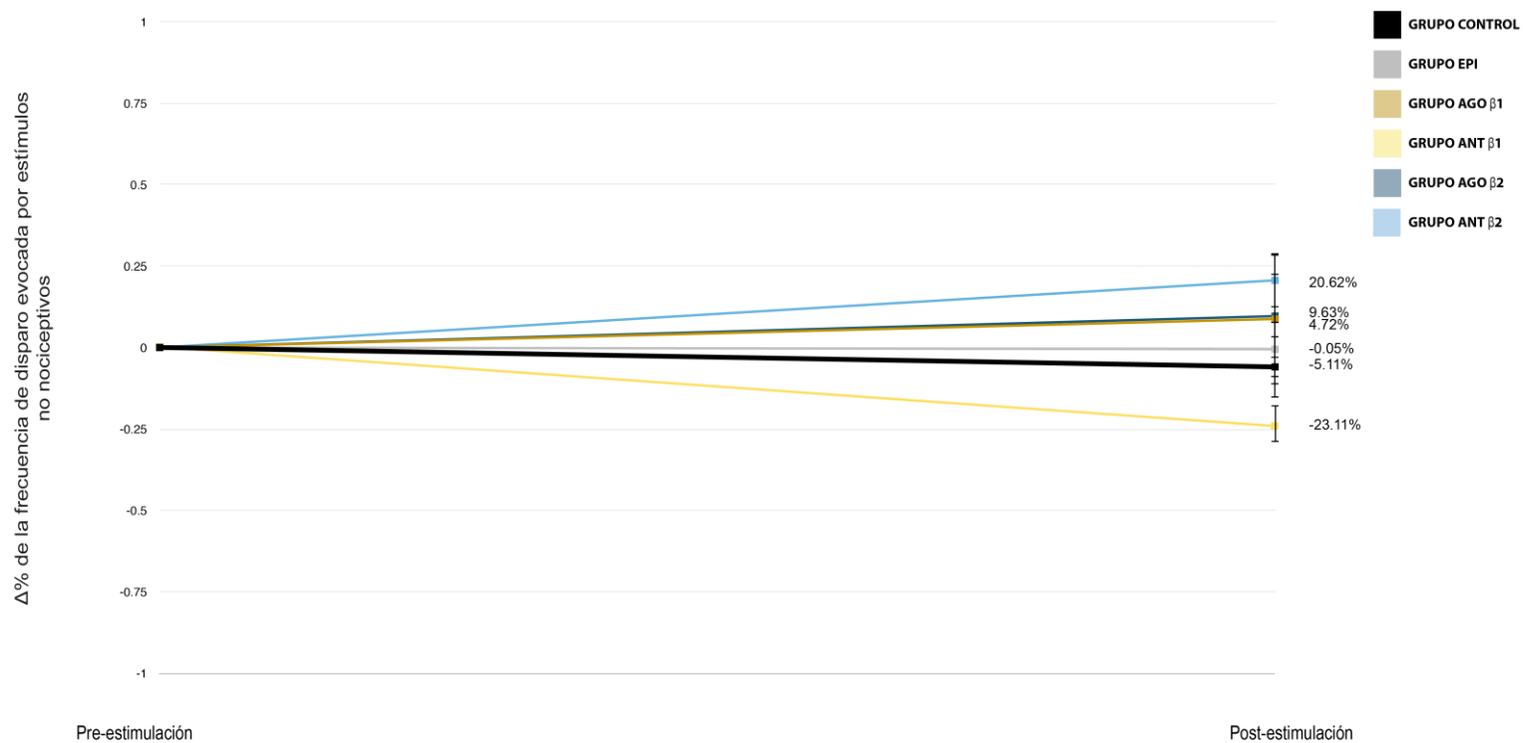


Fig. Efectos de los fármacos que afectan los receptores adrenérgicos sobre la frecuencia de disparo basal (FDB) en neuronas de ARD (L3) expresados en porcentaje. (*) La reducción en el FDB visto en el grupo EPI (n=8) fue significativamente diferente en comparación con el grupo control (n = 11), (ANOVA $p < 0.05$). AGO β 1 grupo (n = 8), el grupo ANT β 1 (n = 9), el grupo AGO β 2 (n = 7) y el grupo ANT β 2 (n = 8). Ninguno de los fármacos β -adrenérgicos cambió de manera significativa la FDB (ANOVA, $p > 0.05$). FDB: Frecuencia de disparo basal, ARD: Amplo rango dinámico.

7.3.2. Efectos de los fármacos que afectan los receptores adrenérgicos sobre la respuesta evocada por estimulación periférica no dolorosa en neuronas de ARD de médula espinal (L3).

Los cambios en la tasa de disparo evocada por estímulos no dolorosos se obtuvieron por comparación de la media de los dos intervalos de No-D de la primera SdE con el promedio de los dos intervalos de No-D de la segunda SdE. En el grupo control (n = 11) se observó una reducción (-5,97%) en la tasa de disparos evocada por estimulación no dolorosa, sin embargo, no fue significativa. Todos los grupos en donde se usaron fármacos se compararon a este grupo. No se observó ningún cambio significativo en el grupo de control o de cualquiera de los grupos de prueba con las drogas (ANOVA $p > 0,05$). Los resultados fueron los siguientes: En el grupo de EPI se observó un cambio de -0,05%, en el grupo AGO β 1 un cambio de 8,73%, en el grupo ANT β 1 un cambio de -23%, en el grupo AGO β 2 un cambio de 9,63% y finalmente en el grupo ANT β 2 se observó un cambio de 20,62% (Figura 7).

Figura 7. Efectos de los fármacos que afectan los receptores adrenérgicos sobre la respuesta evocada por estimulación periférica no dolorosa en neuronas de ARD de médula espinal (L3).

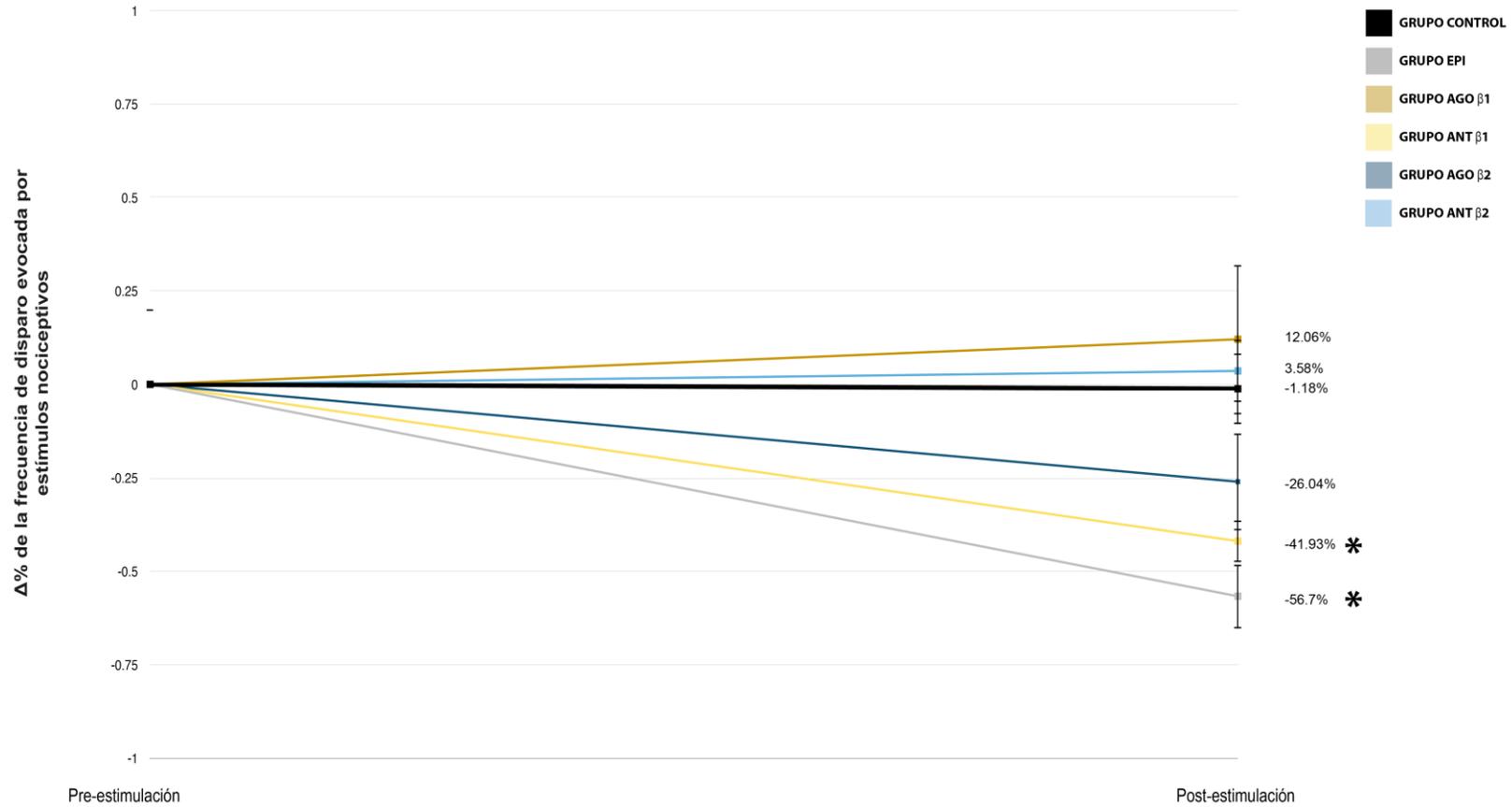


Cambios en la frecuencia de disparo en neuronas de ARD de la médula espinal, producido por estímulos no dolorosos, después de la administración de los fármacos; expresado en porcentaje. El grupo de control (n = 11) en comparación con los demás grupos. Epinefrina (n = 8), AGO β 1 (n = 8), el grupo ANT β 1 (n = 9), el grupo AGO β 2 (n = 7) y el grupo ANT β 2 (n = 8). Ninguno de los fármacos probados cambió significativamente la frecuencia evocada por estímulos no dolorosos (ANOVA, p > 0.05). **ARD**: Amplio rango dinámico.

7.3.3. Efectos de los fármacos que afectan los receptores adrenérgicos sobre la respuesta evocada por estimulación periférica dolorosa en neuronas de ARD de médula espinal (L3).

Los cambios en la tasa de disparo evocada por estímulos dolorosos se obtuvieron mediante la comparación de la media de los dos intervalos D de la primera SdE con el promedio de los dos intervalos D de la segunda SDE y se muestran en la figura 7. En el grupo control se observó una reducción (-1,18%) en la tasa de disparos evocada por la estimulación dolorosa, sin embargo, no fue significativa. Todos los grupos de prueba con el fármaco se compararon a este grupo. Se observó reducción en la tasa de disparos evocada por la estimulación dolorosa de -56,6%. Esta diferencia fue significativamente diferente en comparación con el grupo control (ANOVA, post-hoc LSD $p < 0,05$). En el grupo ANT β 1 se observó una reducción significativa en la tasa de disparo de -41% (ANOVA, post-hoc LSD $p < 0,05$). Ninguno de los otros agentes β -adrenoreceptores cambió de manera significativa la tasa de disparos evocada por la estimulación dolorosa (ANOVA, post-hoc LSD $p > 0,05$). En la AGO β 2 se observó un cambio de -26%, en el grupo AGO β 1 un cambio de 12% y finalmente en el grupo ANT β 2 un cambio de 3,5% (Figura 8).

Figura 8. Efectos de los fármacos que afectan los receptores adrenérgicos sobre la respuesta evocada por estimulación periférica dolorosa en neuronas de ARD de médula espinal (L3).

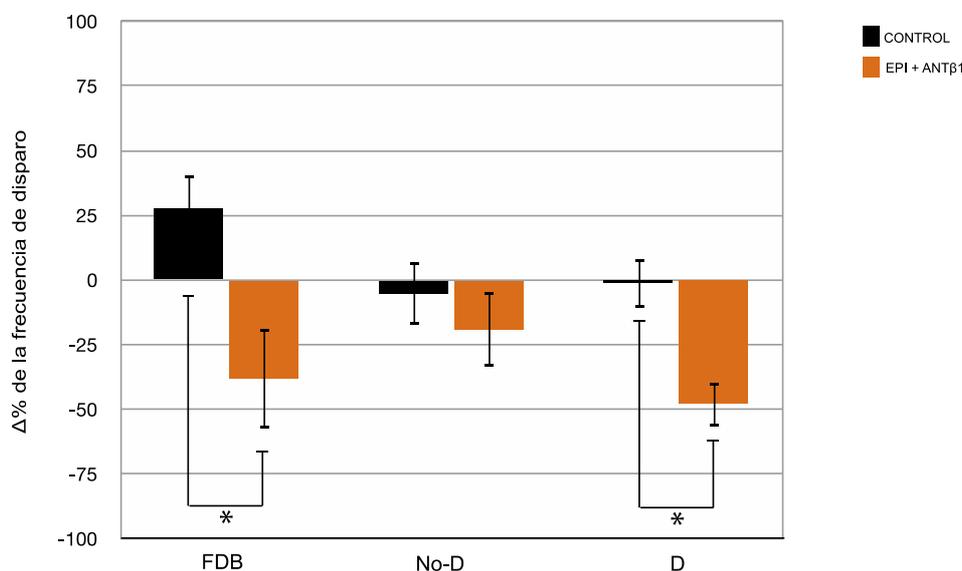


Efectos de las fármacos con acción sobre los receptores adrenérgicos sobre la frecuencia de disparo evocada por la estimulación dolorosa en neuronas de ARD de médula espinal (L3); expresados en porcentaje. (*) La reducción de la tasa de disparos evocado por la estimulación dolorosa en grupos EPI y ANT β 1 fue significativa en ambos casos en comparación con el grupo control (n = 11) (ANOVA, p <0.05). AGO β 1 grupo (n = 8), el grupo ANT β 1 (n = 9), el grupo AGO β 2 (n = 7) y el grupo ANT β 2 (n = 8), ninguno de estos fármacos cambiaron significativamente la tasa de disparos evocado por la estimulación dolorosa. ARD: Amplio rango dinámico.

7.3.4. Efectos de la co-administración de EPI + ANT β 1 sobre la FDB, la respuesta evocada por estimulación periférica no dolorosa y la respuesta evocada por estimulación periférica dolorosa en neuronas de ARD de médula espinal (L3).

De las 10 neuronas analizadas, siete neuronas (70%) mostraron una disminución significativa en su FDB y en la respuesta evocada a la estimulación dolorosa, mientras que tres de las neuronas no cambió significativamente la FDB o la respuesta evocada a cualquier tipo de estímulos. Los cambios en la tasa de disparos se obtuvieron de la misma manera que el resto de los grupos. Aquí se presentan los resultados de las neuronas sensibles. La Figura 8 muestra los cambios en el FDB, así como los cambios en la tasa de disparo evocado por la estimulación no dolorosa y dolorosa en presencia de la co-administración de EPI + ANT β 1 y en comparación con el grupo control. EPI + ANT β 1 redujo el FDB en -37,9% y la tasa de disparos evocada por estímulos dolorosos en -47.81%. Ambos cambios fueron significativos cuando se compara con el grupo control (ANOVA <0,05; LSD post-hoc <0,05). Esta combinación de drogas no cambió significativamente (-19%, $p > 0,05$) la respuesta evocada a la estimulación no dolorosa.

Figura 9. Efectos de la co-administración de EPI + ANT β 1 sobre la FDB, la respuesta evocada por estimulación periférica no dolorosa y la respuesta evocada por estimulación periférica dolorosa en neuronas de ARD de médula espinal (L3).



Cambios en la frecuencia de disparo basal (FDB) y en la frecuencia de disparo evocada por estímulos no dolorosos (No-D) y dolorosos (D) en neuronas de ARD de la médula espinal (L3) a la co-administración de EPI + ANT β 1 (*) (ANOVA <0,05).

Segunda parte: Modulación del dolor neuropático por la respuesta de estrés y la manipulación de receptores beta-adrenérgicos.

A pesar de que está bien descrito que la respuesta de estrés modula la nocicepción aguda, poco se sabe acerca de la modulación que tiene en modelos de dolor neuropático así que en esta fase decidimos evaluar el efecto que tiene la respuesta de estrés sobre la conducta de autotomía.

7.4. Modelo conductual de dolor neuropático inducido por denervación ciática - metodología.

Se utilizó el modelo de dolor neuropático inducido por denervación⁸⁷. Este enfoque experimental desencadena una conducta auto-lesiva cuantificable conocido como conducta de autotomía que se relaciona directamente con el grado de dolor neuropático. En algunos grupos y con el fin de potenciar y acortar su inicio, previo a la denervación se aplicó calor nocivo.^[89, 90] En aquellos grupos que no se aplicó la termnocicepción, el grado de autotomía (GA) se midió por 50 días. Explicado brevemente, se sumergió la pata trasera derecha de la rata en agua caliente a 55 °C durante 20 s, 30 min antes de la denervación. El nervio ciático derecho fue expuesto por micro disección. El nervio se cortó y se ligó con seda 3-0 de sutura. Cinco milímetros del extremo distal fueron retirados con el fin de evitar la reinervación. La piel se suturó con seda 3-0 de sutura. Los animales fueron anestesiados con 2% de isofluorano a lo largo de estos procedimientos. Las heridas fueron revisadas todos los días por posibles signos de infección y el comportamiento de las ratas se comparó con la de los controles para el resto de los experimentos.

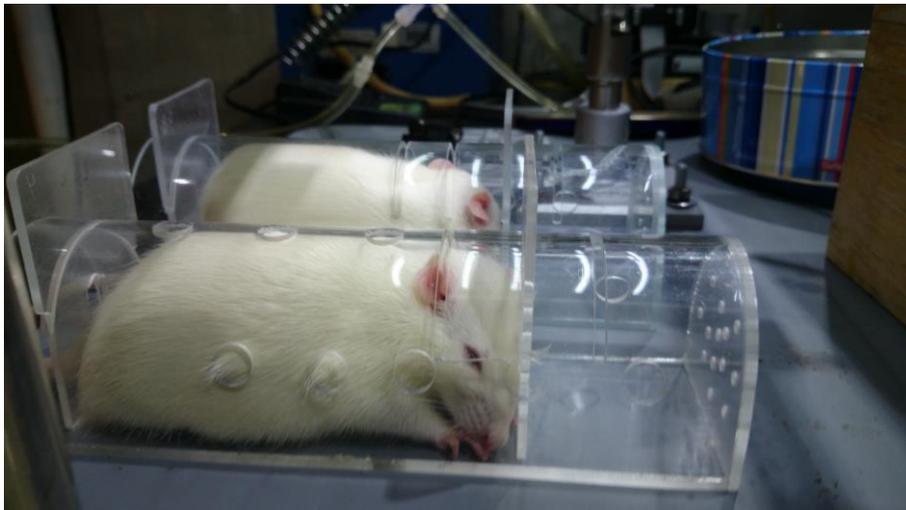
7.4.1. Cuantificación del grado de autotomía.

El GA diario se calculó utilizando un escala modificada creada por Wall et al. (1979). Esta escala se cuantifica de la siguiente manera: 1 punto para la eliminación de una o más uñas; 1 punto adicional para cada falange distal y un punto más por cada falange proximal que sea eliminado. Si la parte distal o proximal de la pata fue eliminado un punto de 1 adicional se añade para cada uno. (Ver tabla 3). El GA fue registrado cada día durante 25 días. Este modelo ha demostrado ser una herramienta útil para estudiar los mecanismos centrales de dolor neuropático.^[89, 90]

7.5. Modelo de estrés extrínseco producido por fijación externa.

Uno de los modelos más usados para activar la respuesta de estrés es la fijación externa a través de cilindros de acrílico. Está probado que después de 30 minutos, es suficiente para desencadenar la respuesta de estrés en ambas fases (ver apartado 4.4) y por lo tanto se encuentran elevados a nivel sistémico tanto las catecolaminas así como el cortisol (corticoesterona en las ratas). Restricción en cilindro de plástico: Se introduce al animal a un cilindro de plástico durante 1 hora en cada evento. (figura 10).

Figura 10. Fotografía que muestra a los animales durante el proceso de restricción.



La fotografía muestra varios ángulos del método de restricción. Los tubos están hechos de acrílico resistente que inmoviliza a los animales. El cilindro cuenta con ranuras para permitir respirar a los animales. En todos los grupos, se sometió a los animales a restricción durante 1hr

7.6. Modificación de la conducta de autotomía por la exposición a estrés por fijación externa.

7.6.1. Exposición a estrés por fijación previo a la denervación.

- Grupo Elx5 (n=13): Fijación durante -1hr- cada día durante 5 días. 2 semanas previas a la denervación.
- Grupo Elx1 (n=12): Fijación durante -1hr- sólo por 1 día. 2 semanas previas a la denervación.
- Grupo control (n=19): Denervación ciática sin fijación.

Nota: Para los grupos anteriores se evalúa el grado de autotomía durante 50+ días.

- Grupo EiPre (n=13): Sujeción durante 1hr, inmediatamente antes de la termonocicepción + denervación.
- Grupo Control (n=13). Termonocicepción + denervación ciática sin estrés.

Nota: Para los grupos anteriores se evalúa el grado de autotomía durante 25 días solamente.

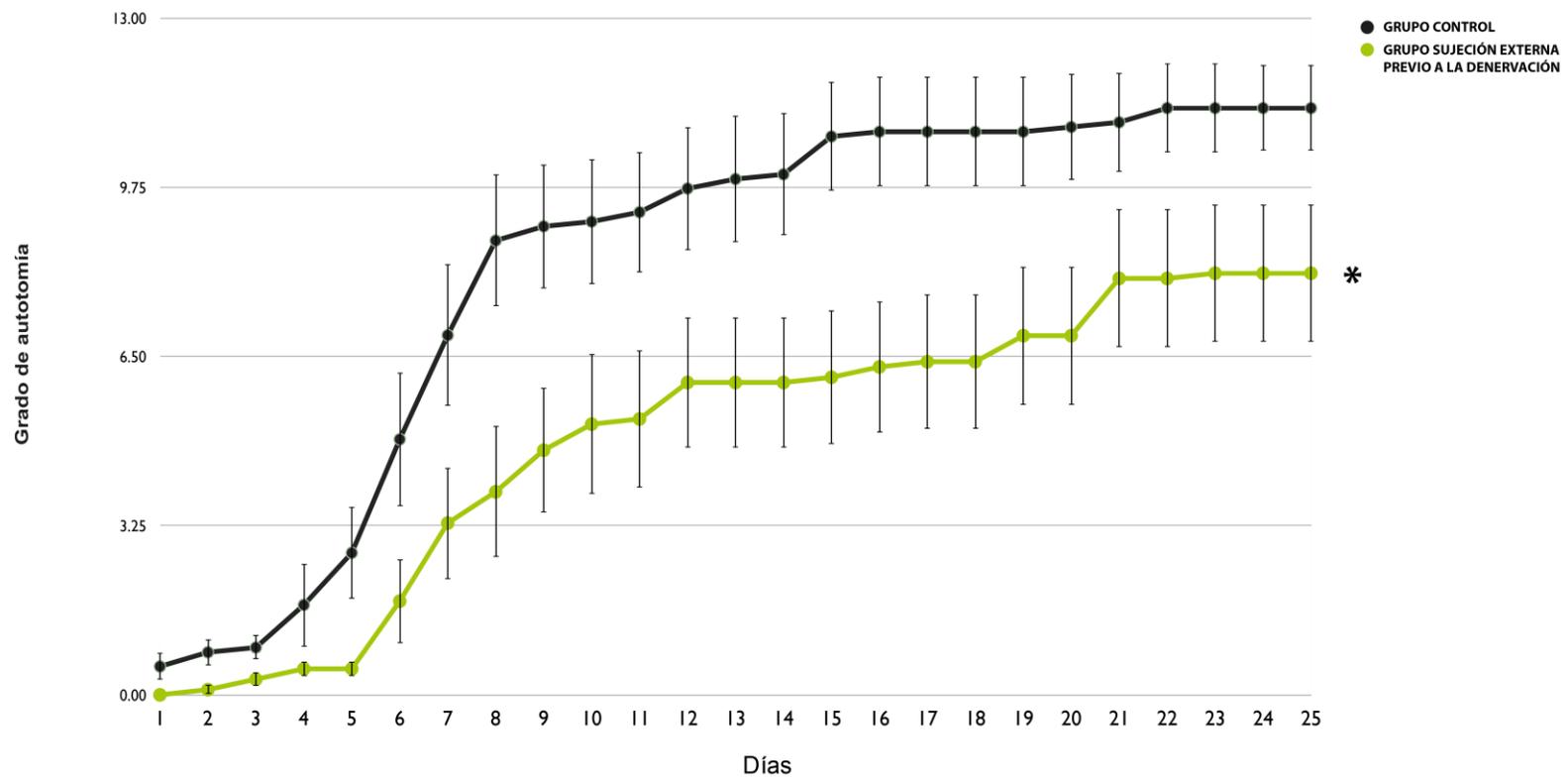
7.6.2 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por una prueba de la menor diferencia significativa (MDS) para analizar los cambios en la GA. Se consideró aquellos resultados de $p < 0.05$ como significativos para estos experimentos.

7.6.3 Resultados.

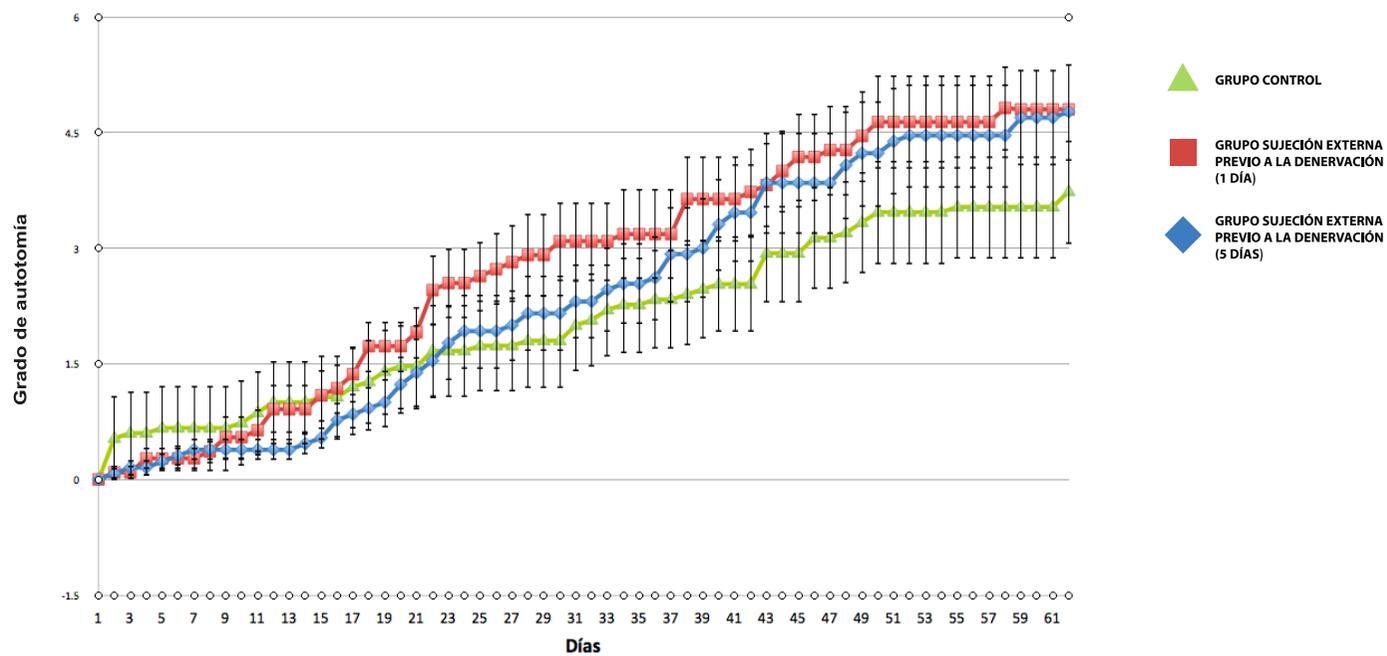
El grupo EiPre mostró un promedio en el grado de autotomía final de 8.11, mientras que se observó en el grupo control un promedio de 11.2. La disminución observada en este grupo es estadísticamente significativa (ANOVA, $p < 0.05$) al compararlo con el control (figura 11).. En los grupos en donde la lesión nervio periférico se realizó 2 semanas después de la exposición a estrés, se observó que tanto el estrés intermitente por 5 días (Elx5) así como el intermitente por 1 día (Elx1) aumentan la autotomía de forma no significativa en el modelo de nocicepción crónica inducida por denervación ciática. El grado de autotomía para los grupos fue, Elx5 - 4.77, Elx1 - 4.82, C - 3.73 (figura 12).

Figura 11. Efecto de la sujeción externa previo a la denervación sobre la conducta de autotomía.



Modificando el modelo de Coderre et al., se introdujo al animal en un cilindro de acrílico durante 1hr. Posteriormente se anestesió al animal y se continuó con el procedimiento de denervación. Se observa en esta figura como el estrés desencadenado por la sujeción disminuye significativamente la conducta de autotomía. *(ANOVA, $p < 0.05$)

Figura 12. Efecto de la sujeción externa días antes de la denervación sobre la conducta de autotomía.



En estos grupos se realizó el modelo de Melzack y Walli. Se evaluó la autotomía por 50 días. Se sometieron los animales a sujeción durante 1hr previo a la denervación. En verde se presenta el grupo control, en azul el grupo donde se expuso a los animales sólo una vez a la sujeción 1 día antes de la denervación. En rojo se presenta el grupo que se expuso a la sujeción durante 5 días previo al día de denervación. Se observa en la figura como ninguno de los grupos modificó significativamente la conducta de autotomía. (ANOVA, $p > 0,05$)

7.6.4. Exposición a estrés posterior a la denervación.

- Grupo R1-5PD: Restricción 1hr en los días 1-5 post-denervación (Termonocicepción). n=9
- Grupo R7-12PD: Restricción 1hr en los 7-12 post-denervación + termonocicepción. n=11
- Grupo control: denervación + termonocicepción. n=13 (CT)

Nota: Para los grupos anteriores se evaluó el grado de autotomía durante 25 días solamente.

7.6.5. Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por una prueba de la menor diferencia significativa (MDS) para analizar los cambios en la GA. Para el análisis del inicio de la conducta se usó una t de student de dos colas de la misma varianza. Se consideró aquellos resultados de $p < 0.05$ como significativos para estos experimentos.

7.6.6. Resultados.

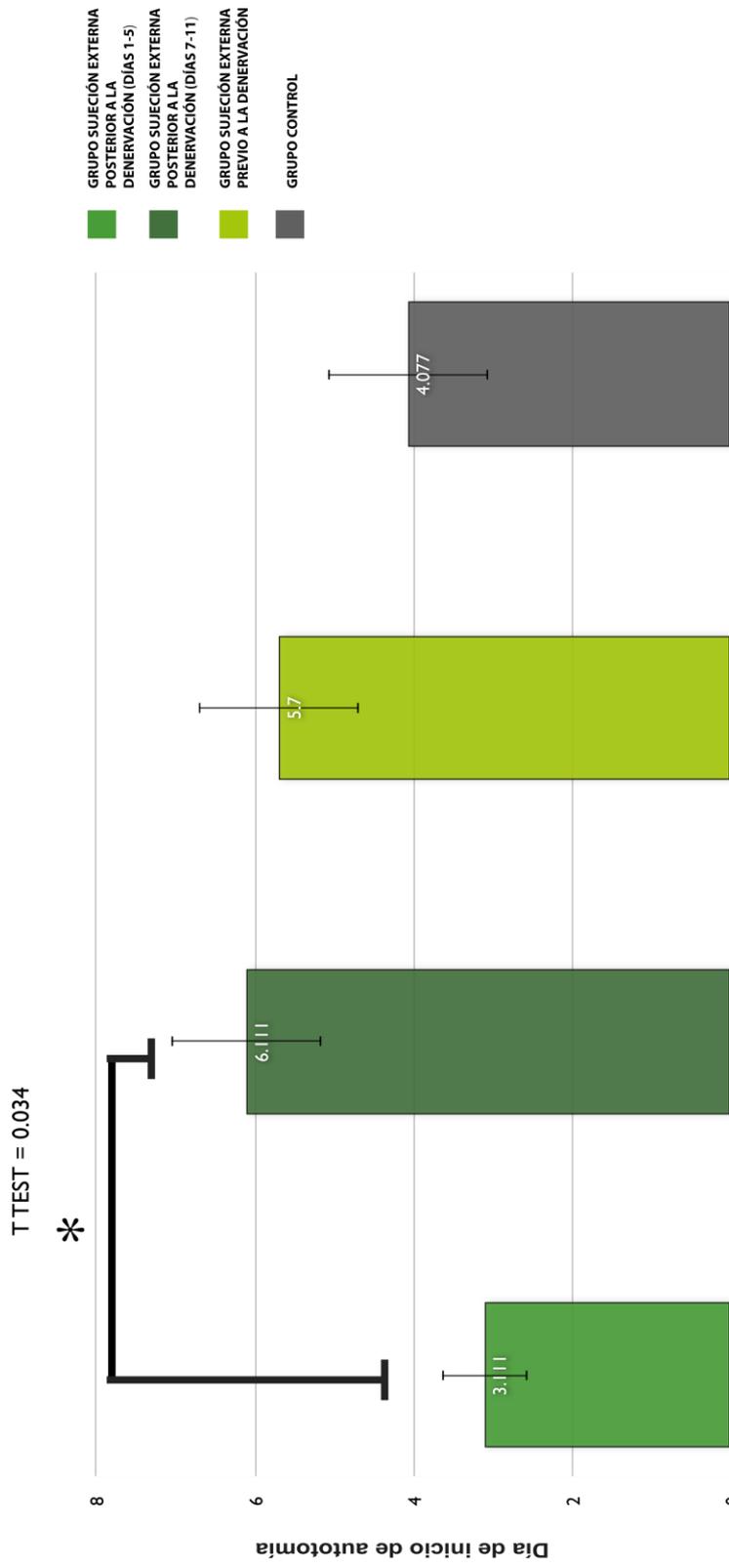
7.6.6.1. Modificación del día de inicio de la autotomía.

Se agruparon todos los grupos de sujeción externa en los que se usó el modelo de Coderre y cols. en la figura 13, para mostrar las modificaciones en el día de inicio de la autotomía. El promedio del día de inicio fueron:

Para el grupo R1-5PD: 3.1 (SD 0.53), para el grupo R7-12PD: 6.11 (SD 0.94), para el grupo EPre: 5.7 (SD 1.01) (y para el grupo control: 4.07 (SD 1.002).

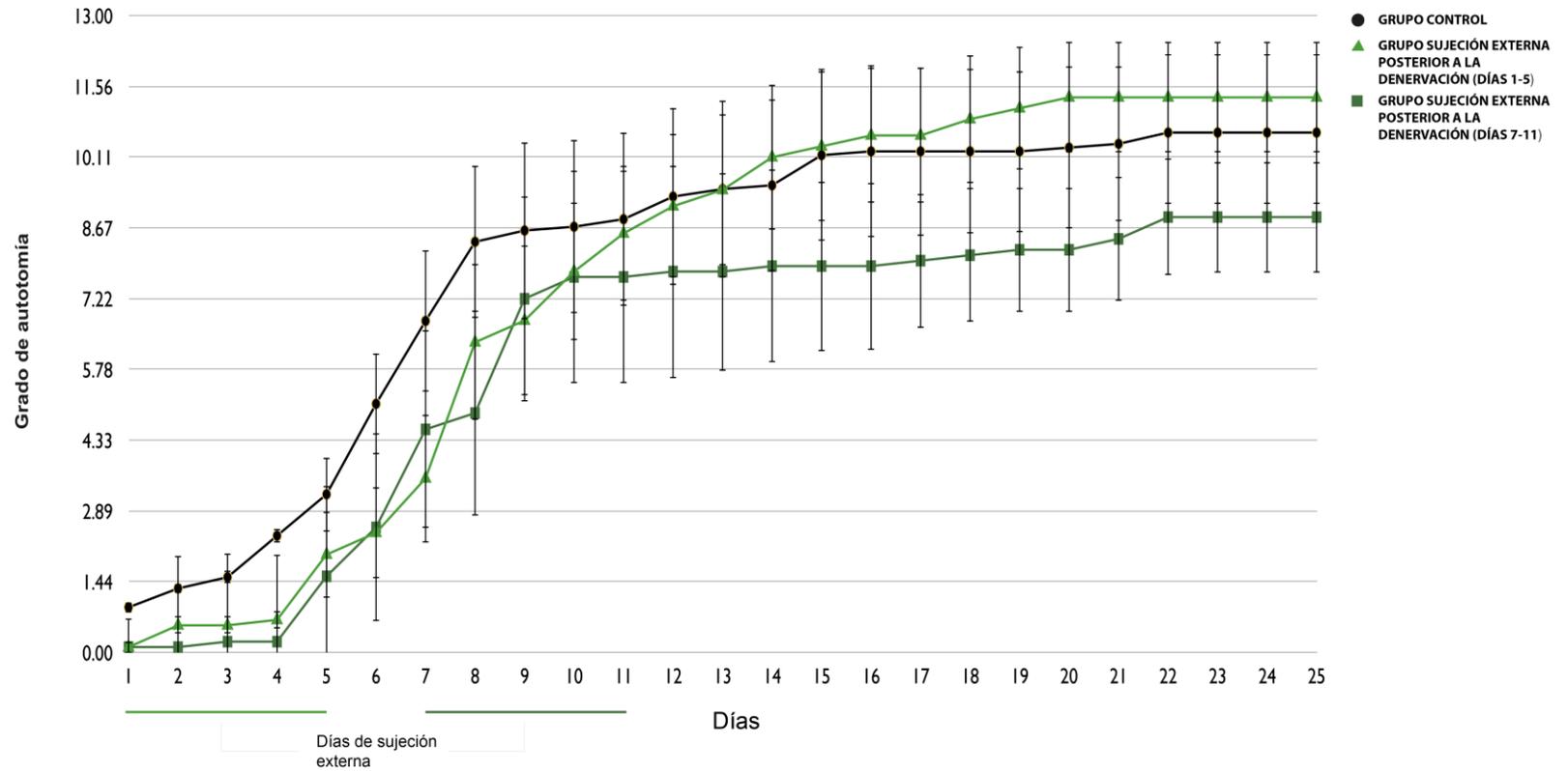
Se observó una diferencia significativa en el día de inicio de la autotomía entre los grupos E1 1-5 D y E1 7-11 D (figura 13). Sin embargo no se observó ninguna diferencia entre grupos (figura 14).

Figura 13. Efecto de la sujeción externa sobre el día de inicio de la autotomía.



Comparación de los promedios del día de inicio para los grupos que se sometieron a estrés por restricción. El grupo que se sometió a restricción durante los primeros 5 días es significativamente diferente al grupo que se sometió a restricción del día 7-11 (*T-test, $p < 0.05$), sin embargo, ninguno es diferente al control. El grupo que se sometió a restricción previo a la denervación, tampoco mostró diferencias significativas con ninguno de los grupos, ni contra el control. (T-test, $p > 0.05$)

Figura 14. Efecto de la sujeción externa posterior a la denervación sobre la conducta de autotomía.



En estos grupos se realizó el modelo de Coderre et al. Posterior a la denervación, se introdujo a los animales en un cilindro de acrílico durante 1hr, cada día, durante 5 días. Un grupo se sometió a la restricción del día 1 al 5 mientras que el otro grupo del día 7 al 11. Se observa en la figura como ninguno de los grupos modificó significativamente la conducta de autotomía. (ANOVA, $p > 0.05$)

7.7. Modificación de la conducta de autotomía por la administración oral de β -bloqueadores.

7.7.1. Administración y dosis de fármacos.

Debido a la vida media de los fármacos, la administración fue por vía oral a través de una cánula cada 12 horas por los 25 días de evaluación de la conducta de autotomía.

Se usó pindolol a una dosis de 2, 4 y 8mg/kg de peso de rata y para el propranolol se usó una dosis de 15, 30 y 45mg/kg de rata. Ambos fármacos son bloqueadores no selectivos de los receptores β -adrenérgicos sin embargo el pindolol tiene también efecto sobre los receptores serotoninérgicos. Se utilizaron estos dos fármacos ya que son los que son más usados en las patologías que cursan con dolor y alteraciones del SNS (ver apartado 4.6.).

7.7.2. Grupos experimentales.

Se realizó el mismo procedimiento de denervación más termonocicepción que fue explicado anteriormente.

Fueron 7 grupos:

- Grupo control n=10.
 - 2ml de agua bidestilada cada 12hr.
- Grupos experimentales.
 - Pindolol - 2mg (n=8), 4mg (n=6), 8mg (n=8) por kg. de peso.
 - Propranolol -15mg (n=4), 30mg (n=4), 45mg (n=7) por kg. de peso.
 - Metoprolol 10mg/kg de peso de rata.

Nota: Para los grupos anteriores se evalúa el grado de autotomía durante 25 días solamente.

7.7.3. Análisis estadístico.

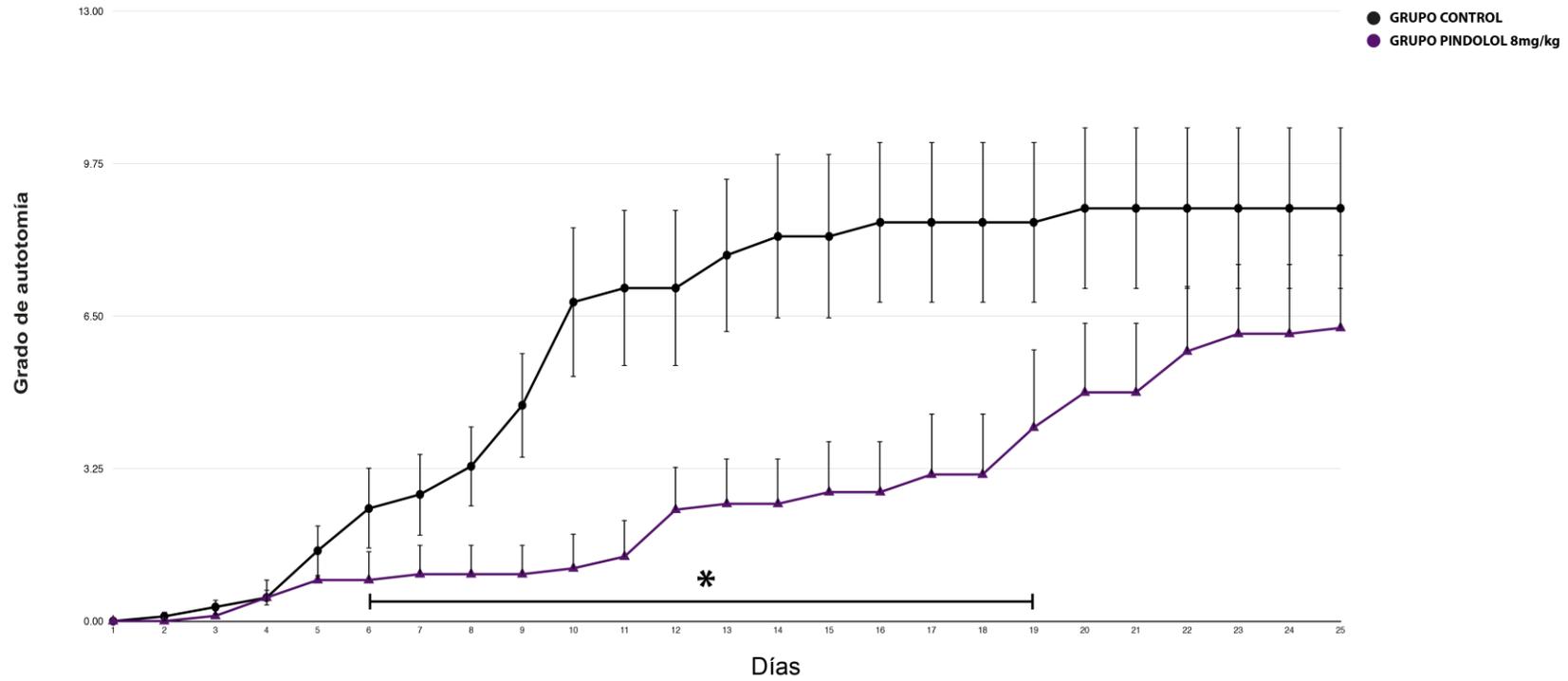
Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para analizar los cambios en la GA a lo largo del tiempo. Para el análisis del inicio de la conducta se usó una t de student de dos colas de la misma varianza. Se consideró aquellos resultados de $p < 0.05$ como significativos para estos experimentos.

7.7.4. Resultados.

7.7.4.1. Modificación del GA.

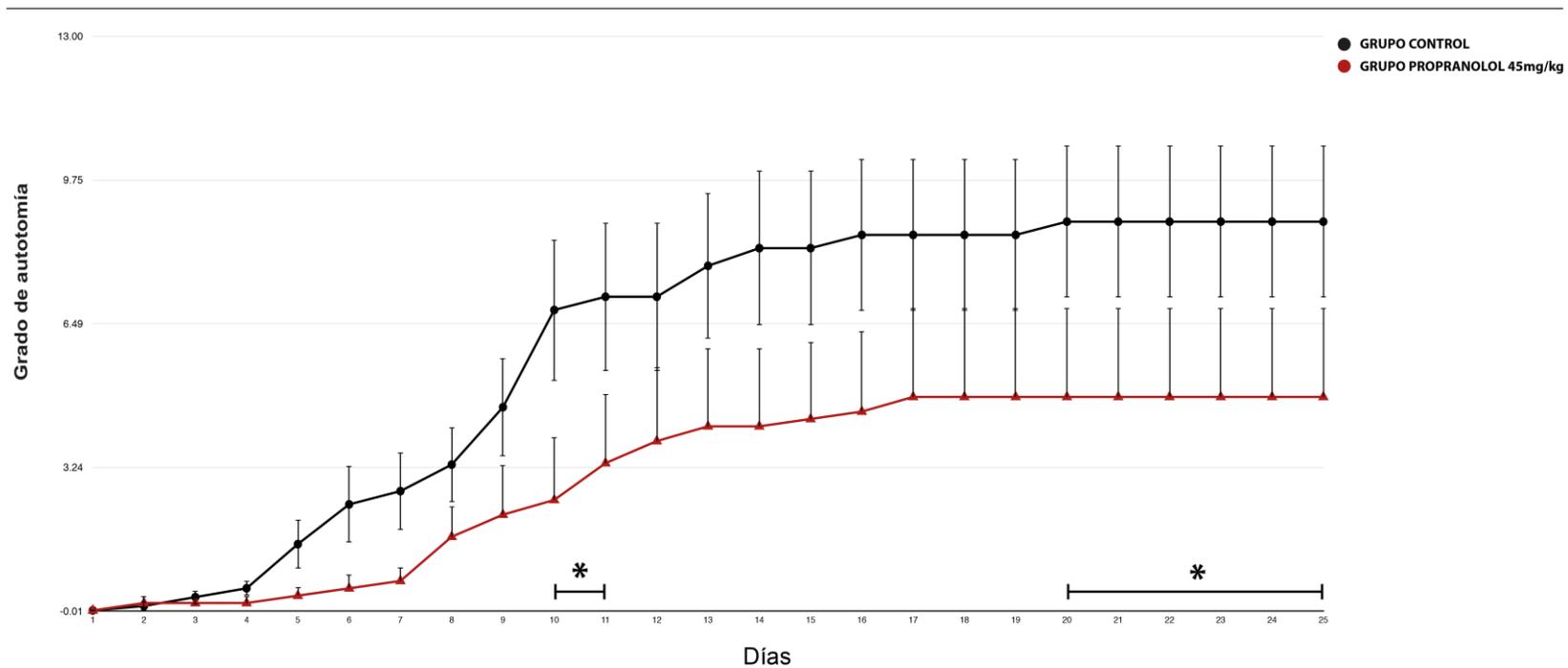
- Grupos de pindolol:
 - Hubo una disminución significativa en la GA en el grupo de dosis alta (8 mg / kg) (prueba de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) (Figura 15). Las dosis bajas (2 mg / kg) y media (4 mg / kg) no mostraron ninguna diferencia significativa en la GA cuando se comparan al control (datos no mostrados).
- Grupos de propranolol:
 - La dosis alta (45 mg / kg) redujo significativamente el GA (Prueba de Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) (figura 16). La dosis media y dosis baja no disminuyen el GA significativamente (datos no mostrados).
- Grupo de metoprolol: No se observó ninguna modificación ni del GA ni del inicio de la autotomía. (Datos no mostrados).

Figura 15 . Efecto de la administración sistémica de pindolol en la conducta de autotomía.



La figura muestra la respuesta nociceptiva conductual, medida a través del grado de autotomía durante 25 días. (modelo de Coderre et al.) Se observa que la administración sistémica de pindolol (antagonista no selectivo de los receptores β_1 & β_2 y antagonista 5HT1A) disminuye significativamente la conducta de autotomía del día 6 al 19 (*, Kruskal-Wallis Test, $p < 0.05$)

Figura 16. Efecto de la administración sistémica de propranolol en la conducta de autotomía.

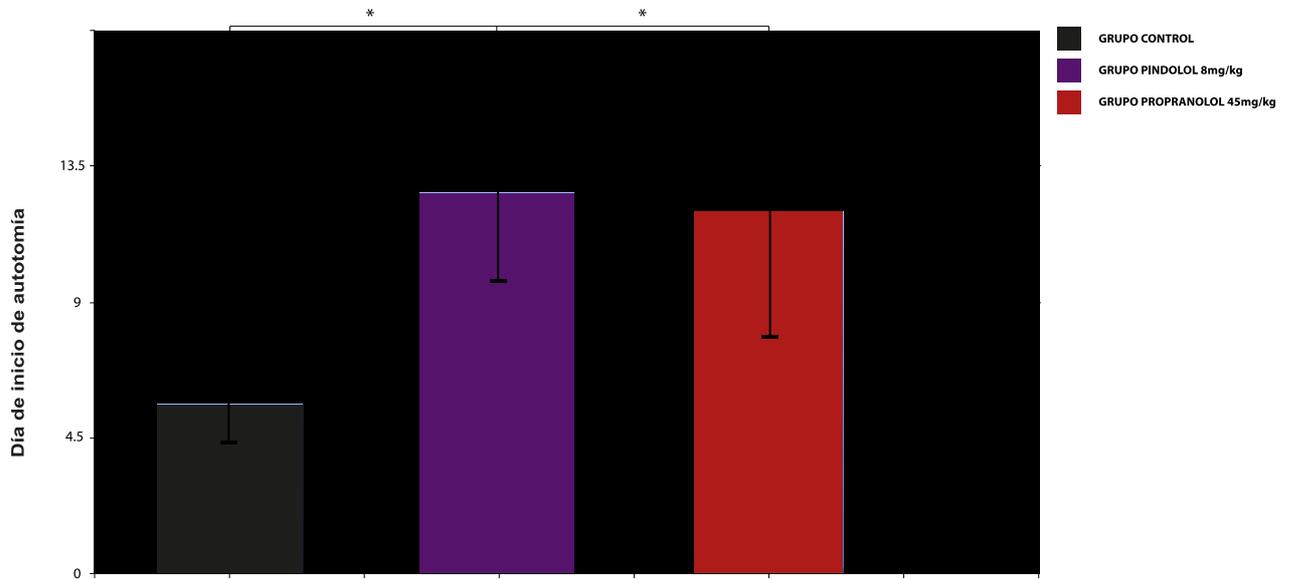


La figura muestra la respuesta nociceptiva conductual, medida a través del grado de autotomía durante 25 días. (modelo deCoderre et al.) Se observa que la administración sistémica de propranolol (antagonista no selectivo de los receptores β_1 & β_2) disminuye significativamente la conducta de autotomía el día 10 y 11 así como del 20 al 25 (*, Kruskal-Wallis Test, $p < 0.05$)

7.7.4.2. Modificación del inicio de la autotomía.

Ambas dosis altas además de disminuir el GA, también se observó un retraso estadísticamente significativo en el día de inicio de la autotomía tal como se muestra en la figura 17.

Figura 17. Efecto de la administración sistémica de pindolol y propranolol sobre el día de inicio de la conducta de autotomía.



Comparación de los promedios del día de inicio de la autotomía. Ambos fármacos pindolol (antagonista no selectivo de los receptores β_1 & β_2 y antagonista 5HT_{1A}) y propranolol (antagonista no selectivo de los receptores β_1 & β_2) mostraron ser efectivos en retrasar el día de inicio de la autotomía. (*T-test, $p < 0.05$)

8. Resumen de resultados.

- El agonismo completo (epinefrina) de los receptores adrenérgicos genera una disminución de la frecuencia de disparo basal así como la frecuencia de disparo evocada por estímulos nociceptivos de las neuronas de amplio rango dinámico de la médula espinal. – **apartado 7.3.1. y 7.3.3**
- El bloqueo del receptor β_1 adrenérgico (metoprolol) disminuye la frecuencia de disparo evocada por estímulos nociceptivos de las neuronas de amplio rango dinámico de la médula espinal. – **apartado 7.3.3.**
- No existe un sinergismo con la co-administración de epinefrina más metoprolol. – **apartado 7.3.4.**
- El grado e inicio de autotomía se ve afectado por la respuesta de estrés sólo en caso de aplicar el estresor inmediatamente antes de la denervación ciática. Si el estresor se presenta posterior a la denervación, éste puede retrasar el inicio más no el grado de autotomía. – **apartado 7.6.3**
- Dos diferentes bloqueadores no selectivos de los receptores β -adrenérgicos (pindolol y propranolol) son efectivos para disminuir tanto el grado como el inicio de la autotomía. – **apartado 7.7.4.1 y apartado 7.7.4.2.**

9. Discusión.

Nuestros resultados en conjunto muestran que la respuesta de estrés modifica la percepción del dolor agudo y neuropático.

En este trabajo, se analizó como la respuesta de estrés, en específico la respuesta hiper-aguda a través de la activación del SNS y por consiguiente la liberación de EPI y NE afecta el dolor. Más detalladamente, se analizó como los receptores beta-adrenérgicos afectan la nocicepción, ya que se evaluó como fármacos que afectan estos receptores, modulan tanto la fisiología de la transmisión nociceptiva así como modulan la conducta en modelos de dolor neuropático.

En la primera fase de experimentos observamos los patrones de disparo de neuronas de ARD en la médula espinal, evaluando la frecuencia de disparo basal así como la frecuencia de disparo evocada por estímulos periféricos dolorosos y no dolorosos.

Inicialmente nos aseguramos que los resultados observados en el grupo control fueran fiables ya que observamos que existe un incremento de la FDB después de realizar la serie estímulos periféricos. En algunos experimentos *in vivo* se han reportado que después de la estimulación periférica dolorosa, las neuronas de ARD pueden aumentar su FDB^[50, 94-96], aunque también se ha documentado que la estimulación periférica dolorosa puede desencadenar mecanismos descendentes inhibidores resultantes en una disminución de la FDB de estas neuronas.^[54] El aumento en el FDB observado en el grupo de control después de la estimulación dolorosa apoya al primer fenómeno, lo cual apunta a pensar que el estímulo fue suficientemente intenso para iniciar los mecanismos de potenciación a largo plazo (ver apartado 4.5.2.1). Por otro lado, el hecho de que las diferencias en la tasa de disparo evocadas por estímulos no dolorosos y dolorosos observados en el grupo de control fueron estables y no fueron estadísticamente significativos apoya a que los cambios observados en los grupos en donde se usaron fármacos fueron producidos por la interacción de éstos con los receptores y no por un mecanismo descendente inhibidor.

De todos los agentes β -adrenérgicos, metoprolol (antagonista β 1) disminuyó significativamente la respuesta de las neuronas de ARD a la estimulación periférica dolorosa. A nuestro conocimiento, los receptores β 1-adrenérgicos, nunca han estado implicados en la percepción del dolor, sin embargo, algunos estudios muestran que el labetalol (antagonista no selectivo de los receptores β -adrenérgicos) funciona como adyuvante para el manejo del dolor^[82, 97]. En estos estudios, se menciona que mejora el efecto analgésico de la morfina, pero no necesariamente la respuesta fisiológica a la estimulación dolorosa periférica. En seres humanos se ha reportado que el antagonismo no selectivo de los receptores β -adrenérgicos puede tratar^[84, 86] o evitar ^[85] el dolor en las patologías como la migraña y la fibromialgia. Nuestros resultados implican que el receptor β 1-adrenérgico puede estar involucrado en la transmisión del dolor agudo, ya que el bloqueo de este receptor produce una disminución de la respuesta a la estimulación periférica dolorosa.

Dado que metoprolol produce una disminución en la tasa de disparo evocada por estímulos dolorosos, pero no afecta a la FDB, además del hecho de que la dobutamina (un agonista de los receptores adrenérgicos β_1) no aumenta la actividad de cualquiera, sugiere que estos receptores pueden cambiar la actividad de las neuronas nociceptivas específicas y no tanto de las neuronas de ARD. Esta hipótesis está basada en el hecho de que las neuronas de ARD tienen aferencias de las neuronas sensoriales nociceptivas y no nociceptivas.^[48] Sin embargo, se necesitan más estudios inmunohistoquímicos con respecto a la expresión de los receptores adrenérgicos en estas neuronas para apoyar esta evidencia.

En nuestras manos, ni clenbuterol (agonista β_2), ni butoxamina (antagonista β_2) mostraron una diferencia significativa en la actividad de las neuronas de ARD. Es importante mencionar que, a diferencia de lo observado en nuestros experimentos, existen algunas evidencias interesantes en modelos de dolor neuropático en donde el agonismo de los receptores β_2 -adrenérgicos ha demostrado que tienen un papel en el efecto antihiperálgico que tienen los fármacos que inhiben la recaptura de norepinefrina / serotonina.^[81, 87] A pesar de que los antagonistas no-selectivos de los receptores β -adrenérgicos tienen propiedades analgésicas en ciertas condiciones de dolor nuestros resultados apuntan a que este efecto está limitado a los receptores β_1 para la transmisión de dolor agudo.

La falta de efecto de clenbuterol (agonista β_2) en nuestros experimentos puede deberse a que la densidad del subtipo β_2 en las neuronas no es tan abundante como el subtipo β_1 según lo informado por Nicholas y cols. En este trabajo muestran que los receptores β_1 -adrenérgicos se expresan principalmente en las neuronas, mientras que los β_2 -adrenérgicos se expresan principalmente en las células gliales.^[98]

De acuerdo con otros estudios^[2, 10, 57, 78] nuestros resultados concuerdan en que la epinefrina disminuye la respuesta de las neuronas ARD a la estimulación dolorosa. Además, la marcada reducción observada en la tasa de disparo basal (FDB) sugiere que la epinefrina no sólo tiene efectos analgésicos, pero también tiene en cierta medida un efecto anestésico. Asimismo, nuestros resultados apoyan la idea de que la AIS está mediada por las neuronas espinales de ARD, debido a que la administración de epinefrina reduce la tasa de disparos evocada por estímulos dolorosos.

Es de destacar que ni el grupo AGO β_1 ni el grupo AGO β_2 alteraron significativamente la actividad de las neuronas de ARD, lo que implica que la modulación del dolor agudo observado en el grupo EPI puede ser, en su mayoría, debido a la activación de receptores α_2 -adrenérgicos, tal como se describe ampliamente en la literatura^[2, 10]. Otra hipótesis es que este efecto analgésico está mediado por la activación de todos los subtipos de receptores adrenérgicos al mismo tiempo, y no exclusivamente por un subtipo tal como se ve en tejidos no-neuronales.^[21]

Los resultados observados en el grupo ANT β 1-EPI apoyan lo antes mencionado. Por una parte el efecto de la epinefrina no fue potenciada por metoprolol; no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos EPI y ANT β 1-EPI (ANOVA, $p > 0.05$). Por otro lado, en el grupo ANT β 1-EPI, no encontramos una respuesta homogénea en todas las neuronas, sólo el 70% de las neuronas disminuye significativamente su actividad, mientras que el otro 30% de las neuronas aumentó su actividad de manera no significativa. Esto podría indicar que existe una interacción de mayor complejidad que dicta la actividad de las neuronas de ARD en la médula espinal. Un enfoque reduccionista, en el cual se implica que un subtipo de receptor como analgésico o analgésico no describe completamente el sistema e integración de la nocicepción. Por el contrario, enfoques de mayor complejidad, seguramente ayudarán a entender mejor la fisiología y fisiopatología del dolor.

Es necesario expandir esta línea de investigación, incluyendo estudios de patch-clamp, para determinar con más certeza el papel de estos receptores en la modulación del dolor agudo.

En cuanto a los experimentos de dolor crónico, es la primera vez, según nuestro conocimiento que se observa que la respuesta de estrés también modula la percepción del dolor crónico. Observamos que el exponer a los animales a estrés antes de la denervación reduce de manera significativa el grado de autotomía en el grupo que se expuso inmediatamente antes de la denervación. Esto no se observó en los grupos en donde se sometió a sujeción un día antes y tampoco en el grupo en donde se sometió a los animales a sujeción por 5 días. El razonamiento de hacer estos grupos fue analizar el efecto que tiene la respuesta de estrés hiperaguda ya que es aquí en donde la activación del SNS produce un incremento en la secreción de EPI y NE, mientras que el eje HPA apenas empieza a activarse. De esta manera pudimos ver si la modificación del dolor es producida por las fases tempranas de la respuesta de estrés o por las tardías. Recordando que la respuesta de estrés es sumamente compleja y ésta se despliega en diferentes fases (ver apartado 4.4), lo observado en el grupo EPre apunta a pensar que es la respuesta temprana la que genera una AIS. Está comprobado en este modelo que cualquier efecto analgésico al momento de la denervación, disminuye la potenciación a largo plazo y por consiguiente, el dolor^[89]. Pensamos que este es el caso en nuestros experimentos ya que tampoco se observó que la sujeción posterior a la denervación modifica la conducta de autotomía. Conjuntamente, esto apoya a la teoría de que una vez que se genera la potenciación a largo plazo, es muy difícil que los mecanismos analgésicos intrínsecos (top-down, apartado 4.2.2.2), tengan efecto una vez hecha la lesión.^[7]

Los resultados de los experimentos en donde usamos antagonistas de los receptores β -adrenérgicos sugieren que los estos receptores están involucrados en alguna medida en la génesis y mantenimiento del dolor neuropático.

Como mencionamos anteriormente, el grupo de Barron y cols.^[87], demuestran que el agonismo del receptor β -2, tiene propiedades analgésicas. Opuestamente, en nuestros experimentos observamos que el antagonismo de ambos receptores (β 1 y 2) es lo que produce analgesia. Cabe aclarar que el modelo usado por ellos es diferente y en otra especie.

Si comparamos al grupo de pindolol contra el de propranolol, no observamos diferencias estadísticamente significativas, sin embargo podemos ver que el pindolol disminuye el grado de autotomía por más días que el propranolol (13 días contra 7). Esto posiblemente se deba al efecto que tiene el pindolol sobre el receptor 5HT1A, ya que puede comportarse como agonista/antagonista parcial.

Los resultados observados en el grupo EPre, nos hacen reflexionar en la manera en como este modelo puede ser influenciado por efectos externos estresores dependientes de cada laboratorio o grupo de investigación. Creo que es importante enfatizar y comunicar a la comunidad científica para evitar sesgos en futuras investigaciones. Es interesante también que la respuesta de estrés en sí puede modular la conducta de autotomía ya que para el estudio del dolor neuropático este modelo ha sido ampliamente usado y poco se ha considerado el estrés que se presenta antes o durante la evaluación de la autotomía como modificador de la conducta.

10. Conclusiones.

Los receptores β -adrenérgicos modulan tanto el dolor agudo como el neuropático. En nuestros resultados el dolor agudo parece ser modificado solamente por el receptor β_1 mientras que en el dolor neuropático es necesario el bloqueo de ambos.

Debido a que el dolor es una emoción negativa, éste siempre genera en mayor o menor medida activación de la respuesta de estrés. Estos dos fenómenos están más relacionados de lo que se piensa e inclusive se integran en las mismas áreas cerebrales. Nuestros resultados abren la puerta a seguir estudiando la relación que tienen los receptores β -adrenérgicos en la modulación del dolor.

11. Referencias.

1. Akil, H., et al., *The many possible roles of opioids and related peptides in stress-induced analgesia*. Ann N Y Acad Sci, 1986. **467**: p. 140-53.
2. Butler, R.K. and D.P. Finn, *Stress-induced analgesia*. Prog Neurobiol, 2009. **88**(3): p. 184-202.
3. Maletic, V. and C.L. Raison, *Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain*. Front Biosci (Landmark Ed), 2009. **14**: p. 5291-338.
4. Jennings, E.M., et al., *Stress-induced hyperalgesia*. Prog Neurobiol, 2014. **121**: p. 1-18.
5. Iannetti, G.D. and A. Mouraux, *From the neuromatrix to the pain matrix (and back)*. Exp Brain Res, 2010. **205**(1): p. 1-12.
6. Melzack, R. and P.D. Wall, *Pain mechanisms: a new theory*. Science, 1965. **150**(3699): p. 971-9.
7. Moayed, M. and K.D. Davis, *Theories of pain: from specificity to gate control*. J Neurophysiol, 2013. **109**(1): p. 5-12.
8. Shibasaki, H., *Central mechanisms of pain perception*. Suppl Clin Neurophysiol, 2004. **57**: p. 39-49.
9. Olango, W.M. and D.P. Finn, *Neurobiology of stress-induced hyperalgesia*. Curr Top Behav Neurosci, 2014. **20**: p. 251-80.
10. Pertovaara, A., *Noradrenergic pain modulation*. Prog Neurobiol, 2006. **80**(2): p. 53-83.
11. Dahlström, A. and K. Fuxe, *Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system*. Acta physiologica Scandinavica, v 62 Supplementum. 1964, Uppsala,.
12. Kwiat, G.C. and A.I. Basbaum, *Organization of tyrosine hydroxylase- and serotonin-immunoreactive brainstem neurons with axon collaterals to the periaqueductal gray and the spinal cord in the rat*. Brain Res, 1990. **528**(1): p. 83-94.
13. Proudfit, H.K., *Pharmacologic evidence for the modulation of nociception by noradrenergic neurons*. Prog Brain Res, 1988. **77**: p. 357-70.
14. Tohyama, M., K. Takatsuji, and S.S. Kantha, *Atlas of neuroactive substances and their receptors in the rat*. 1998, Oxford New York: Oxford University Press. xvii, 337 p.
15. Bylund, D.B., et al., *International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 121-36.
16. Siegel, G.J., *Basic neurochemistry : molecular, cellular, and medical aspects*. 7th ed. 2006, Amsterdam ; Boston: Elsevier. xxiv, 992 p.
17. Bylund, D.B., *Subtypes of alpha 2-adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge*. Trends Pharmacol Sci, 1988. **9**(10): p. 356-61.
18. Bylund, D.B., *Pharmacological characteristics of alpha-2 adrenergic receptor subtypes*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **763**: p. 1-7.
19. Hieble, J.P., et al., *International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update*. Pharmacol Rev, 1995. **47**(2): p. 267-70.
20. Pupo, A.S. and K.P. Minneman, *Adrenergic pharmacology: focus on the central nervous system*. CNS Spectr, 2001. **6**(8): p. 656-62.

21. Kobilka, B.K., *Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology*. Trends Pharmacol Sci, 2011. **32**(4): p. 213-8.
22. Boron, W.F. and E.L. Boulpaep, *Medical physiology : a cellular and molecular approach*. Updated second edition. ed. 2012, Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier. xiii, 1337 pages.
23. Wachter, S.B. and E.M. Gilbert, *Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application*. Cardiology, 2012. **122**(2): p. 104-12.
24. Hamalainen, M.M. and A. Pertovaara, *The antinociceptive action of an alpha 2-adrenoceptor agonist in the spinal dorsal horn is due to a direct spinal action and not to activation of descending inhibition*. Brain Res Bull, 1995. **37**(6): p. 581-7.
25. Birder, L.A. and E.R. Perl, *Expression of alpha2-adrenergic receptors in rat primary afferent neurones after peripheral nerve injury or inflammation*. J Physiol, 1999. **515 (Pt 2)**: p. 533-42.
26. Maruo, K., et al., *Modulation of P2X receptors via adrenergic pathways in rat dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury*. Pain, 2006. **120**(1-2): p. 106-12.
27. Xie, J., et al., *Differential expression of alpha1-adrenoceptor subtype mRNAs in the dorsal root ganglion after spinal nerve ligation*. Brain Res Mol Brain Res, 2001. **93**(2): p. 164-72.
28. Baker, J.G., *The selectivity of beta-adrenoceptor antagonists at the human beta1, beta2 and beta3 adrenoceptors*. Br J Pharmacol, 2005. **144**(3): p. 317-22.
29. Von Bertalanffy, L., *The theory of open systems in physics and biology*. Science, 1950. **111**(2872): p. 23-9.
30. Maturana, H.R. and F.J. Varela, *Autopoiesis and cognition : the realization of the living*. Boston studies in the philosophy of science. 1980, Dordrecht, Holland ; Boston: D. Reidel Pub. Co. xxx, 141 p.
31. Cannon, W.B., *The wisdom of the body*. 1939, New York,: W.W. Norton & Company. xviii, 19-333 p.
32. Shapiro, J.A. and M. Dworkin, *Bacteria as multicellular organisms*. 1997, New York: Oxford University Press. xiii, 466 p.
33. Lyon, P.L., *The agent in the organism: Toward a biogenic theory of cognition*. . 2006, The Australian National University: Camberra.
34. Selye, H., *The stress of life*. Rev. ed. McGraw-Hill paperbacks. 1978, New York: McGraw-Hill. xxvii, 515 p.
35. McEwen, B.S., *Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain*. Physiol Rev, 2007. **87**(3): p. 873-904.
36. McFarlane, A.C., *The long-term costs of traumatic stress: intertwined physical and psychological consequences*. World Psychiatry, 2010. **9**(1): p. 3-10.
37. Sterling P, E.J., *Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology*. In: Handbook of Life Stress, Cognition and Health, ed. R.J. Fisher S. 1988, New York: Wiley.
38. Cannon, P., W. Raule, and H. Schaefer, *[Physiology of a sympathetic ganglion and the problem of vasodilators and sympathetic tonus]*. Pflugers Arch, 1954. **260**(2): p. 116-36.

39. von, E.U., *Hormones of the sympathetic nervous system and the adrenal medulla*. Br Med J, 1951. **1**(4698): p. 105-8.
40. Engelman, K., B. Portnoy, and W. Lovenberg, *A sensitive and specific double-isotope derivative method for the determination of catecholamines in biological specimens*. Am J Med Sci, 1968. **255**: p. 259-68.
41. Habib, K.E., P.W. Gold, and G.P. Chrousos, *Neuroendocrinology of stress*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2001. **30**(3): p. 695-728; vii-viii.
42. Vale, W., et al., *Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin*. Science, 1981. **213**(4514): p. 1394-7.
43. Smith, S.M. and W.W. Vale, *The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress*. Dialogues Clin Neurosci, 2006. **8**(4): p. 383-95.
44. Munck, A., P.M. Guyre, and N.J. Holbrook, *Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions*. Endocr Rev, 1984. **5**(1): p. 25-44.
45. Rivier, C. and W. Vale, *Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin*. Nature, 1983. **305**(5932): p. 325-7.
46. Masson, S., *Anatomía y fisiología del dolor*. , in *Medicina del dolor*. , T.L. (eds), Editor. 1997. p. 53-65.
47. *Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy*. Pain, 1979. **6**(3): p. 249.
48. Allan I. Basbaum, T.M.J., *The Perception of Pain*, in *Kandel: Principles Of Neurosciences*. 2000. p. 473-476.
49. Dubin, A.E. and A. Patapoutian, *Nociceptors: the sensors of the pain pathway*. J Clin Invest, 2010. **120**(11): p. 3760-72.
50. Dickenson, A., et al., *Antinociception produced by capsaicin: spinal or peripheral mechanism?* Eur J Pharmacol, 1990. **187**(2): p. 225-33.
51. Melzack, R. and P.D. Wall, *On the nature of cutaneous sensory mechanisms*. Brain, 1962. **85**: p. 331-56.
52. Millan, M.J., *Descending control of pain*. Prog Neurobiol, 2002. **66**(6): p. 355-474.
53. Maeda, M., et al., *Descending pathways from activated locus coeruleus/subcoeruleus following unilateral hindpaw inflammation in the rat*. Brain Res Bull, 2009. **78**(4-5): p. 170-4.
54. Bouhassira, D., Z. Bing, and D. Le Bars, *Studies of brain structures involved in diffuse noxious inhibitory controls in the rat: the rostral ventromedial medulla*. J Physiol, 1993. **463**: p. 667-87.
55. Helmstetter, F.J. and S.A. Tershner, *Lesions of the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla disrupt antinociceptive but not cardiovascular aversive conditional responses*. J Neurosci, 1994. **14**(11 Pt 2): p. 7099-108.
56. Killian, P., et al., *Cold water swim stress- and delta-2 opioid-induced analgesia are modulated by spinal gamma-aminobutyric acidA receptors*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. **274**(2): p. 730-4.
57. Kuraishi, Y., et al., *Antinociceptive effects of intrathecal opioids, noradrenaline and serotonin in rats: mechanical and thermal algesic tests*. Brain Res, 1985. **326**(1): p. 168-71.

58. Fukuda, T., et al., *Systemic clonidine activates neurons of the dorsal horn, but not the locus ceruleus (A6) or the A7 area, after a formalin test: the importance of the dorsal horn in the antinociceptive effects of clonidine.* J Anesth, 2006. **20**(4): p. 279-83.
59. Eisenach, J.C., et al., *Epidural clonidine analgesia for intractable cancer pain.* The Epidural Clonidine Study Group. Pain, 1995. **61**(3): p. 391-9.
60. Schott, G.D., *Mechanisms of causalgia and related clinical conditions. The role of the central and of the sympathetic nervous systems.* Brain, 1986. **109 (Pt 4)**: p. 717-38.
61. Tahmouh, A.J., *Causalgia: redefinition as a clinical pain syndrome.* Pain, 1981. **10**(2): p. 187-97.
62. Torebjork, E., et al., *Noradrenaline-evoked pain in neuralgia.* Pain, 1995. **63**(1): p. 11-20.
63. Martinez-Lavin, M., *Fibromyalgia as a sympathetically maintained pain syndrome.* Curr Pain Headache Rep, 2004. **8**(5): p. 385-9.
64. Martinez-Lavin, M., *Biology and therapy of fibromyalgia. Stress, the stress response system, and fibromyalgia.* Arthritis Res Ther, 2007. **9**(4): p. 216.
65. Kress, M. and H. Fickenscher, *Infection by human varicella-zoster virus confers norepinephrine sensitivity to sensory neurons from rat dorsal root ganglia.* FASEB J, 2001. **15**(6): p. 1037-43.
66. Schmidt, M., et al., *Varicella-zoster virus isolates, but not the vaccine strain OKA, induce sensitivity to alpha-1 and beta-1 adrenergic stimulation of sensory neurones in culture.* J Med Virol, 2003. **70 Suppl 1**: p. S82-9.
67. Ortiz, J.P., M.M. Heinricher, and N.R. Selden, *Noradrenergic agonist administration into the central nucleus of the amygdala increases the tail-flick latency in lightly anesthetized rats.* Neuroscience, 2007. **148**(3): p. 737-43.
68. Rhodes, D.L. and J.C. Liebeskind, *Analgesia from rostral brain stem stimulation in the rat.* Brain Res, 1978. **143**(3): p. 521-32.
69. Liebeskind, J.C. and D.J. Mayer, *Somatosensory evoked responses in the mesencephalic central gray matter of the rat.* Brain Res, 1971. **27**(1): p. 133-51.
70. Willer, J.C., F. Boureau, and D. Albe-Fessard, *Supraspinal influences on nociceptive flexion reflex and pain sensation in man.* Brain Res, 1979. **179**(1): p. 61-8.
71. Grau, J.W., *The central representation of an aversive event maintains the opioid and nonopioid forms of analgesia.* Behav Neurosci, 1987. **101**(2): p. 272-88.
72. Madden, J.t., et al., *Stress-induced parallel changes in central opioid levels and pain responsiveness in the rat.* Nature, 1977. **265**(5592): p. 358-60.
73. Rhudy, J.L., J.S. Grimes, and M.W. Meagher, *Fear-induced hypoalgesia in humans: effects on low intensity thermal stimulation and finger temperature.* J Pain, 2004. **5**(8): p. 458-68.
74. Hohmann, A.G., et al., *An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia.* Nature, 2005. **435**(7045): p. 1108-12.
75. Lico, M.C., A. Hoffmann, and M.R. Covian, *Influence of some limbic structures upon somatic and autonomic manifestations of pain.* Physiol Behav, 1974. **12**(5): p. 805-11.

76. Collins, J.G., et al., *Spinally administered epinephrine suppresses noxiously evoked activity of WDR neurons in the dorsal horn of the spinal cord*. *Anesthesiology*, 1984. **60**(4): p. 269-75.
77. Takano, Y. and T.L. Yaksh, *Characterization of the pharmacology of intrathecally administered alpha-2 agonists and antagonists in rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992. **261**(2): p. 764-72.
78. Danzebrink, R.M. and G.F. Gebhart, *Antinociceptive effects of intrathecal adrenoceptor agonists in a rat model of visceral nociception*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990. **253**(2): p. 698-705.
79. Sierralta, F., et al., *alpha-Adrenoceptor and opioid receptor modulation of clonidine-induced antinociception*. *Br J Pharmacol*, 1996. **119**(3): p. 551-4.
80. Atlas, D. and E. Melamed, *Direct mapping of beta-adrenergic receptors in the rat central nervous system by a novel fluorescent beta-blocker*. *Brain Res*, 1978. **150**(2): p. 377-85.
81. Choucair-Jaafar, N., et al., *Beta2-adrenoceptor agonists alleviate neuropathic allodynia in mice after chronic treatment*. *Br J Pharmacol*, 2009. **158**(7): p. 1683-94.
82. Khanna, N.K., A.P. Dadhich, and D.S. Vyas, *Modification of morphine analgesia by labetalol*. *Indian J Exp Biol*, 1978. **16**(10): p. 1091-2.
83. Masaki, E., *[Antinociceptive effects of landiolol and esmolol]*. *Masui*, 2006. **55**(7): p. 849-55.
84. Light, K.C., et al., *Adrenergic dysregulation and pain with and without acute beta-blockade in women with fibromyalgia and temporomandibular disorder*. *J Pain*, 2009. **10**(5): p. 542-52.
85. Ashtari, F., V. Shaygannejad, and M. Akbari, *A double-blind, randomized trial of low-dose topiramate vs propranolol in migraine prophylaxis*. *Acta Neurol Scand*, 2008. **118**(5): p. 301-5.
86. Marsland, A.R., et al., *Phantom limb pain: a case for beta blockers?* *Pain*, 1982. **12**(3): p. 295-7.
87. Barrot, M., et al., *From antidepressant drugs to beta-mimetics: preclinical insights on potential new treatments for neuropathic pain*. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2009. **4**(3): p. 182-9.
88. Albe-Fessard, D. and A. Fessard, *Recent advances on the neurophysiological bases of pain sensation*. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 1975. **35**(5-6): p. 715-40.
89. Coderre, T.J. and R. Melzack, *Procedures which increase acute pain sensitivity also increase autotomy*. *Exp Neurol*, 1986. **92**(3): p. 713-22.
90. Levitt, M., *Dysesthesias and self-mutilation in humans and subhumans: a review of clinical and experimental studies*. *Brain Res*, 1985. **357**(3): p. 247-90.
91. Pellicer, F., et al., *Taurine in the anterior cingulate cortex diminishes neuropathic nociception: a possible interaction with the glycine(A) receptor*. *Eur J Pain*, 2007. **11**(4): p. 444-51.
92. Zimmermann, M., *Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals*. *Pain*, 1983. **16**(2): p. 109-10.
93. Lamothe-Molina, P.J., P.A. Lamothe-Molina, and A. Lopez-Avila, *[Beta-1 adrenoceptor blockade decreases the firing rate to painful stimuli in spinal wide-dynamic range neurons in rats]*. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 2014. **52**(5): p. 494-501.

94. Donello, J.E., et al., *A peripheral adrenoceptor-mediated sympathetic mechanism can transform stress-induced analgesia into hyperalgesia.* Anesthesiology, 2011. **114**(6): p. 1403-16.
95. Brightwell, J.J. and B.K. Taylor, *Noradrenergic neurons in the locus coeruleus contribute to neuropathic pain.* Neuroscience, 2009. **160**(1): p. 174-85.
96. Svendsen, F., K. Hole, and A. Tjolsen, *Long-term potentiation in single wide dynamic range neurons induced by noxious stimulation in intact and spinalized rats.* Prog Brain Res, 2000. **129**: p. 153-61.
97. Chou, R.C., et al., *Beta-adrenergic receptor regulation of macrophage-derived tumor necrosis factor-alpha production from rats with experimental arthritis.* J Neuroimmunol, 1996. **67**(1): p. 7-16.
98. Nicholas, A.P., T. Hokfelt, and V.A. Pieribone, *The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization.* Trends Pharmacol Sci, 1996. **17**(7): p. 245-55.

12. Anexos.

12.1 Publicación

Revista: Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social

Título: Beta-1 adrenoceptor blockade decreases the firing rate to painful stimuli in spinal wide-dynamic range neurons in rats.

Aportaciones originales

Beta-1 adrenoceptor blockade decreases the firing rate to painful stimuli in spinal wide-dynamic range neurons in rats

Paul J. Lamothe-Molina,^{a,b,d} Pedro A. Lamothe-Molina,^a
Alberto López-Ávila,^c

Los bloqueadores β -1 adrenérgicos reducen la respuesta a estímulos dolorosos en neuronas de amplio rango dinámico de la médula espinal en ratas

Introducción: La epinefrina/norepinefrina inhibe la transmisión del dolor agudo; empero, no es claro el papel de los receptores β -adrenérgicos. Por tanto, analizamos si los fármacos de estos receptores modulan la transmisión del dolor agudo mediante registro electrofisiológico unitario extracelular *in vivo* durante estimulación periférica dolorosa y no dolorosa en ratas.

Métodos: estudio longitudinal en el que se cotejaron siete grupos de ratas: control ($n = 11$); solución salina (0,9 %); EPI ($n = 8$); 100 mcg epinefrina; AGO β 1 ($n = 8$); 125 mcg dobutamina; ANT β 1 ($n = 9$); 100 mcg metoprolol; AGO β 2 ($n = 7$); 100 mcg clenbuterol; ANT β 2 ($n = 8$); butoxamina 100 mcg; ANT β 1 + EPI ($n = 10$); 100 mcg metoprolol + 100 mcg epinefrina. Se hizo análisis estadístico por medio de ANOVA.

Resultados: La epinefrina redujo significativamente la tasa de disparo basal (RDB) en 34,1 % ($p < 0,05$) y la respuesta evocada por la estimulación dolorosa en 56 % ($p < 0,05$). No hubo cambios en la respuesta provocada por la falta de estimulación dolorosa. El ANT β 1 fue el único fármaco con acción β -adrenérgica que redujo significativamente la respuesta evocada por la estimulación dolorosa en 41 % ($p < 0,05$).

Conclusión: por primera vez un antagonista de los receptores β 1-adrenérgicos (metoprolol) prueba ser eficaz en la reducción de la respuesta a la estimulación dolorosa en las neuronas ARD.

One of the most studied phenomena regarding acute pain modulation is stress-induced analgesia (SIA). SIA is an in-built mammalian pain suppression response that occurs following or during exposure to a stressful or fearful stimulus.¹ Many different mechanisms mediate SIA; it mainly occurs through activation of the sympathetic nervous system, and produces a release of norepinephrine (NE) within the central nervous system;¹ besides NE, many other molecules are involved in this process, but in a lesser extent (e.g. endogenous opioid, cannabinoids and γ -aminobutyric acid).^{2,3,4}

Even though many brain areas have been implicated in SIA, e.g. amygdala,⁵ or periaqueductal gray,⁶ the spinal cord is thought to be the first gate to acute pain perception⁷ and, thus, where most of the regulation occurs, particularly at wide dynamic range (WDR) neurons.⁸ These neurons are considered WDR, because they are polymodal, and respond to somatosensory as well as nociceptive inputs.⁸ Moreover, the aforementioned descending inhibitory pathways play a role in SIA by inhibiting these neurons.^{9,10}

It is known that epinephrine and norepinephrine mediate analgesia in the spinal cord.^{11,12,13,14} Adrenoceptors are divided into three families: α 1, α 2 and β . Alpha 1 and β are excitatory receptors whereas α 2 are inhibitory receptors.¹⁵ Since the latter are inhibitory, the majority of studies have focused on the role of these receptors in pain modulation, suggesting that SIA is only mediated by activation of α 2-adrenoceptors expressed in sensory neurons.^{12,13,14} From all the subtypes of β -adrenoceptors, β 1 and β 2 subtypes are the most expressed within the central nervous system (CNS).^{15,16} Even though there is sparse, non-conclusive evidence that β -adrenoceptors are implicated in pain modulation in animal models,^{17,18,19} there is a broad spectrum of clinical pain states (fibromyalgia,²⁰ migraine,²¹ and also in painful phantom limb) which improve after taking β -adrenergic antagonists.²² Furthermore in patients with untreatable oncological pain, labetalol (non-selective β -adrenoceptor antagonist) relieved pain in 40 % of the patients

Keywords	Palabras clave
Receptors, Adrenergic	Receptores adrenérgicos
Acute pain	Dolor agudo
Metoprolol	Metoprolol
Beta-Blockers, Adrenergic	Bloqueadores beta adrenérgicos

^aLaboratorio de Neurofisiología de la Percepción, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz"

^bUniversidad Nacional Autónoma de México

^cDepartamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco

^dCentro Neurológico, American British Cowdray Medical Center, Campus Santa Fe

Distrito Federal, México

Comunicación con: Alberto López-Ávila
Correo electrónico: neuropercepcion@gmail.com

Recibido: 18/06/2014

Aceptado: 03/07/2014

Background: It is known that epinephrine/norepinephrine inhibit acute pain transmission. However, the role of β -adrenoceptors is not clear. Thus, we analyzed if β -1 and/or β -2 adrenoceptors can modulate acute pain transmission by performing *in vivo* single unit recordings during painful and non-painful peripheral stimulation in rats.

Methods: Longitudinal study in which we analyzed seven groups of male rats Wistar: control group ($n = 11$): saline (0.9 %); EPI group ($n = 8$): epinephrine 100 mcg; AGO β 1 group ($n = 8$): dobutamine 125 mcg; ANT β 1 group ($n = 9$): metoprolol 100 mcg; AGO β 2 group ($n = 7$): clenbuterol 100 mcg; ANT β 2 group ($n = 8$): butoxamine 100 mcg; ANT β 1 + EPI group ($n = 10$): metoprolol 100 mcg + epinephrine 100 mcg.

For the statistical analysis we used ANOVA.

Results: Epinephrine significantly reduced the basal firing rate (BFR) in 34.1 % ($p < 0.05$) and also the evoked response by painful stimulation in 56 % ($p < 0.05$). No change was observed in the evoked response by non-painful stimulation. ANT β 1 was the only β -adrenoceptor acting drug that significantly reduced the evoked response by painful stimulation in 41 % ($p < 0.05$). None of the other drugs alone affected either the BFR or the evoked response to non-painful or painful stimulation.

Conclusion: It is the first time that a β 1-adrenoceptor antagonist (metoprolol) probes to be effective in reducing the response to painful stimulation in WDR neurons.

Resumen

treated. More recently, other authors reported that β 2-adrenoceptors are implicated in the antihyperalgesic effect of non-selective serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors as it is shown in a mouse model of neuropathic pain.^{23,17}

To our knowledge the role of β -adrenoceptors in acute pain modulation has not yet been fully studied, so the aim of this work is to address their role by studying the pattern of activity of spinal WDR neurons in response to non-painful and painful stimulation in animals treated with agonists and antagonists of β -adrenoceptors.

Methods

Experiments were performed in male Wistar rats (250-350 g). The Ethics Committee of the Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz" approved all the procedures, and the experiment was under the regulatory guidelines of the International Association for the Study of Pain (IASP) for animal studies.²⁴ Rats were housed and were cared for in the institute's animal facility until the day of the experiment. They were kept in groups of five per cage with food and water *ad libitum*. All surgical procedures and recordings were performed at room temperature (between 25 and 27°C).

Surgical procedures

Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of urethane (1.3 mg/kg), an anteroposterior medial incision was performed on the skin, muscles were retracted and a bilateral dissection was performed under L2-L4 in order to introduce the stereotaxic spinal cord holders and keep the vertebrae fixed (figure 1). Afterwards, we removed the laminae from L2 and L3 as well as the meningeal tissue.

Electrode positioning, receptive field and neuron characterization

Tungsten electrodes (70 mm, 3 M Ω , FHC Inc. Bowdoin, ME) were used to record extracellular *in vivo* single unit responses from WDR neurons from the spinal cord. To place the electrode we used a manual hydraulic positioner (KOPF Instruments, model 640, Tujunga, California). To record sensory neurons of the right hind paw of the animal, the electrode was placed on the right side of the dorsal spinal cord at L3 level. We descended the electrode from the spinal cord surface to a maximum depth of 500 μ m while we applied a non-painful mechanical stimulation until the receptive field was found. WDR neurons were considered to be those responsive to both painful and non-painful stimuli; hence, once the receptive field was found a non-noxious painful stimulus was applied in order to characterize the neuron as wide-dynamic or as a non-painful sensory neuron. Only WDR neurons were included in the study.

Electrophysiological recording and data analysis

For each animal, the same stimuli sequence (SS) was performed twice, separated by a 300 s stimulus-free interval. The complete experiment scheme is depicted in figure 1.

Cerebus system (Cyberkinetics INC, USA) was used for the amplification of the signal. All neurons were characterized as WDR neurons with Spikesorter (version 1.0.0.1). Neuroexplorer (version 4.097) was used to analyze the data. The entire 520 s recording was split into 10 s histograms, which correlate to the duration of each interval. From the complete length of the recording, we only analyzed the first and the last 90 s, corresponding to the SS before drug administration and to the SS after drug administration (figure 1). The number of spikes detected for each kind of

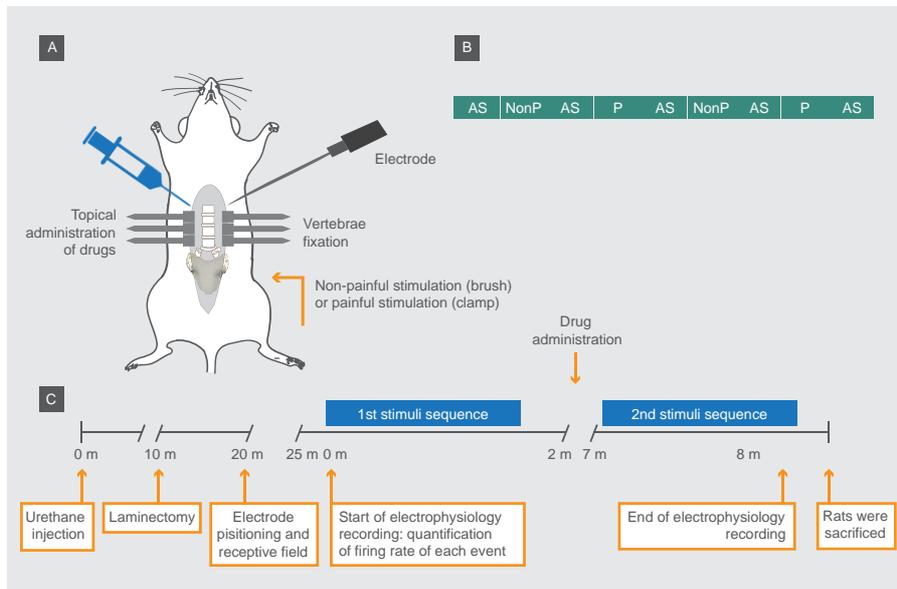


Figure 1 Process to introduce the stereotaxic spinal cord holders in male Wistar rats

interval was averaged, obtaining three different values from each SS: 1) average from five AS-intervals, 2) average from two Non-P-intervals, and 3) average from two P-intervals, *vide supra*. Data obtained for each type of interval were converted to percentage values, where 100 % of response corresponded to the average of spikes in all the AS-intervals during the first SS for each neuron analyzed. We defined this as the basal firing rate (BFR). The effect of the drug on the firing rate was calculated by comparing the firing rate before and after drug administration for each type of stimuli to the BFR, as well as comparing the firing rate evoked by each type of stimuli to its reciprocal in the second SS. Therefore, we observed either an increase or a decrease in the percentage of BFR and in the firing rate evoked P stimuli and Non-P stimuli.

Mechanical stimulation

Two different types of stimuli were applied to the right hind paw during the recording: Non-painful (Non-P) mechanical stimuli with a brush, painful (P) mechanical stimuli with a clamp. The duration of each stimulus was 10 s. Each P and Non-P stimuli were alternated and separated by a 10 s interval where no

stimulus was applied (absence of stimulation, AS) in order to quantify the basal firing rate of each neuron. The SS was divided into intervals as follows: AS – NonP – AS – P – AS – NonP – AS. The duration of the stimuli sequence was 90 s.

Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) followed by a least significant difference (LSD) test were used to analyze the results, and a p value < 0.05 was considered to represent a significant difference.

Groups and drug administration

The vehicle for all drugs was saline at 0.9 %. Drugs were administered topically on the spinal cord (volume: 100 μ l). Experimental details for each group are depicted in table 1.

Results

A total of fifty-three spinal WDR neurons were analyzed in our study. Results will be presented in per-

Table 1 Experimental details for each group of rats

Group	n	Drug	Dose	Mechanism of action
Control	11	Saline at 0.9 %	---	---
EPI	8	Epinephrine	100 mcg	Complete adrenoceptor agonist
AGOβ1	8	Dobutamine	125 mcg	β1-adrenoceptor agonist
ANTβ1	9	Metoprolol	100 mcg	β1-adrenoceptor antagonist
AGOβ2	7	Clenbuterol	100 mcg	B2-adrenoceptor agonist
ANTβ2	8	Butoxamine	100 mcg	B2-adrenoceptor antagonist

centage values, indicating a decrease or increase in either the basal firing rate or the firing rate evoked by Non-P stimuli and P stimuli produced under the adrenoceptor-acting drugs application.

Effects of adrenoceptor-acting drugs on the BFR

Figure 2 shows changes in BFR obtained by the comparison of the average of all the AS-intervals from first SS with all the AS-intervals from the second SS. In the control group ($n = 11$) we observed that the BFR was higher (an increase of 27.49 %) during the second SS without any drug present; however, this increase was non-significant. Thus, we decided to compare data from all the drug-tested groups with this difference.

Complete adrenergic agonist administration (epinephrine, EPI group) produced a significant decrease ($p < 0.05$) in the BFR of -34.1 %. None of the beta-adrenoceptor drugs significantly changed the BFR ($p > 0.05$); the results were the following: β1-adrenoceptor agonist (dobutamine, AGOβ1 group) produced a decrease in the BFR of -0.05 %, β2-adrenoceptor agonist (clenbuterol, AGOβ2 group) produced a minimum change of 0.52 %, β1-adrenoceptor antagonist (metoprolol, ANTβ1 group) produced an increase of 10.56 % whereas β2-adrenoceptor antagonist (butoxamine, ANTβ2 group) produced an increase of 4 %.

Adrenoceptor-acting drugs and the evoked response to non-painful stimulation

Changes in the firing rate evoked by non-painful stimuli were obtained by comparison of the average of the two Non-P intervals from the first SS with the average of the two Non-P intervals from the second SS.

In the control group ($n = 11$) we observed a reduction (-5.97 %) in the firing rate evoked by non-painful stimulation; however, it was non-significant. All drug-tested groups were compared to this group. No significant change was observed in the control group or any of the drug-tested groups (ANOVA $p > 0.05$). Results were as following: In the EPI group we

observed a change of -0.05 %, in the AGOβ1 group a change of 8.73 %, in the ANTβ1 group a change of -23 %, in the AGOβ2 group a change of 9.63 %, and, finally, in the ANTβ2 group we observed a change of 20.62 % (figure 3).

Adrenoceptor-acting drugs and the evoked response to painful stimulation

Changes in the firing rate evoked by painful stimuli were obtained by the comparison of the average of the two P intervals from the first SS with the average of the two P intervals from the second SS. They are shown in figure 3.

In the control group we observed a reduction (-1.18 %) in the firing rate evoked by painful stimulation; however, it was non-significant. All drug-tested

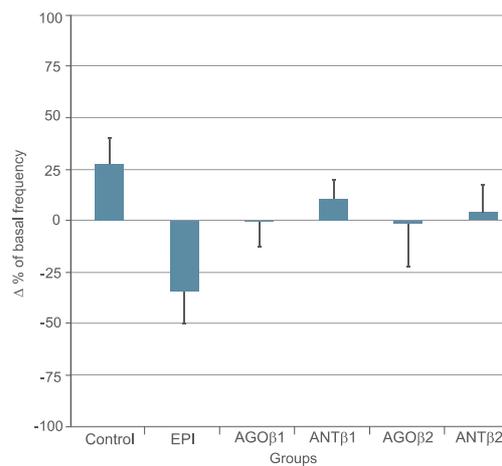


Figure 2 Changes in basal firing rate (BFR) by comparing all the AS-intervals from the second stimuli sequence

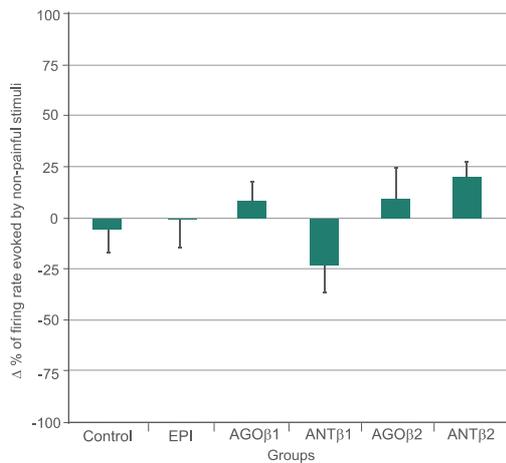


Figure 3 Changes in the firing rate evoked by non-painful stimuli

groups were compared to this group. We observed reduction in the firing rate evoked by painful stimulation of -56.6% . This difference was significantly different when compared to the control group (ANOVA, post-hoc LSD, $p < 0.05$). In the ANTβ1 group we observed a significant reduction in the firing rate of -41% (ANOVA, post-hoc LSD, $p < 0.05$). None of the

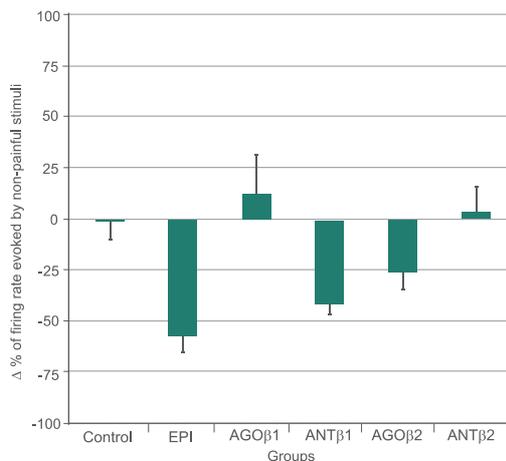


Figure 4 Changes in the firing rate evoked by painful stimuli

other β -adrenoceptor agents significantly changed the firing rate evoked by painful stimulation (ANOVA, post-hoc LSD, $p > 0.05$). In the AGOβ2 we observed a change of -26% , in the AGOβ1 group a change of 12% , and, finally, in the ANTβ2 group a change of 3.5% (figure 4).

Effects on BFR and firing rate evoked by non-painful and painful stimuli after EPI+ANTβ1 co-administration

From the 10 neurons analyzed, seven neurons (70%) showed a significant decrease in either, the BFR and in the evoked response to painful stimulation, whereas three of the neurons did not change significantly their BFR or the evoked response to any type of stimuli. Changes in the firing rate were obtained in the same manner than the rest of the groups. Here we show the results of the responsive neurons. Figure 5 shows the changes in the BFR as well as the changes in the firing rate evoked by non-painful and painful stimulation in presence of co-administration of EPI + ANTβ1 and compared to the control group. EPI + ANTβ1 reduced the BFR in -37.9% and the firing rate evoked by painful stimuli in -47.81% . Both changes were significant when compared to the control group (ANOVA < 0.05 , post-hoc LSD, $p < 0.05$). This combination of drugs did not change significantly (-19% , $p > 0.05$) the evoked response to non-painful stimulation.

Discussion

In the present study we evaluated the role of adrenoceptors in acute pain modulation by observing the effect that different adrenoceptor-acting agents have on the firing rate evoked by painful/non-painful stimulation, as well as analyzing the basal firing rate (BFR) of spinal WDR neurons.

Some *in vivo* experiments have reported that after painful peripheral stimulation spinal WDR neurons increase their BFR,²⁵ but it has also been documented that painful peripheral stimulation can trigger inhibitory descending mechanisms resulting in a decrease of the BFR of these neurons.^{26,27} The increase in the BFR observed in the control group after painful stimulation supports the former phenomenon. Also, the fact that the differences in the firing rate evoked by non-painful and painful stimuli observed in the control group were stable and non-significant may imply that the changes seen in the drug-tested groups were produced by the drugs and not by descending inhibitory mechanisms.

From all the β -adrenergic-acting agents, metoprolol (β_1 -antagonist) significantly diminished the

response of spinal WDR neurons to painful peripheral stimulation whereas β_2 -adrenoceptor antagonist did not affect in any way the firing rate of these neurons.

To our knowledge, β_1 -adrenoceptors have never been implicated in pain perception; nevertheless, labetalol (non-selective β -adrenoceptor antagonist) enhances the effect of morphine but not necessarily the physiological response to peripheral painful stimulation.¹⁸ In humans there are reports of non-selective β -adrenoceptor antagonist to treat^{28,20,22} or prevent²¹ pain in these conditions. Our results imply that β_1 -adrenoceptor may be involved in normal acute pain transmission, since the blockade of this receptor produces a decreased response to painful peripheral stimulation.

Given that metoprolol produces a decrease in the firing rate evoked by painful stimuli, but does not affect the BFR, in addition to the fact that dobutamine (a β_1 -adrenoceptor agonist) does not increase the activity of either, these receptors may be changing the activity of nociceptive-specific neurons and not that of WDR neurons. The fact that spinal WDR neurons have inputs from non-nociceptive and nociceptive sensory neurons supports these hypothesis, although more immunohistochemical studies regarding the expression of adrenoceptors in these neurons are needed to support this evidence.

In our hands, neither clenbuterol (β_2 -adrenoceptor-agonist) nor butoxamine (β_2 -adrenoceptor-antagonist) showed a significant difference in the activity of WDR neurons, although there are some interesting results in neuropathic pain models that the activation of β_2 -adrenoceptors has shown to play a role in the mechanisms underlying the antihyperalgesic effect of norepinephrine/serotonin reuptake.^{17,23} Even though non-selective β -adrenoceptor antagonists have analgesic properties in certain pain conditions,^{20,19,21} our results point that this effect may be limited to β_1 -adrenoceptors.

The lack of effect of clenbuterol may be to the fact that the density of the β_2 subtype in neurons is not as abundant as the β_1 subtype as reported by Nicholas *et al.*²⁹ In this work they show that β_1 -adrenoceptors are expressed mainly in neurons whereas β_2 -adrenoceptors are expressed mainly in glial cells.

In agreement with other studies,^{1,9,11,32,10,34,30} our results show that epinephrine decreased the response of WDR neurons to painful stimulation. Moreover, the marked reduction in the basal firing rate (BFR) seen in the EPI-tested group suggests that epinephrine has not only analgesic effects, but also has in some extent an anesthetic effect. Also, our results support the idea that stress-induced analgesia is mediated by spinal WDR neurons, given by the fact that epinephrine administration reduced the firing rate evoked by painful stimuli.

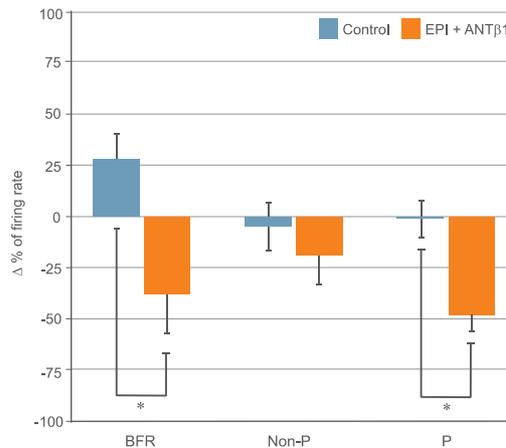


Figure 5 Changes in the basal firing rate and in the rate evoked by non-painful and painful stimuli

It is noteworthy that neither AGO β_1 nor AGO β_2 alone altered significantly the activity of WDR neurons, which implies that the acute pain modulation of epinephrine could be, as it is widely reported in the literature, due to the activation of an α_2 -adrenoceptor. Another hypothesis is that this analgesic effect is mediated by activation of all the subtypes of adrenoceptors and not exclusively by one subtype, as it is seen in other non-neural tissues.³¹

The results observed in the ANT β_1 -EPI support the latter hypothesis; on the one hand, the effect of epinephrine was not enhanced by metoprolol, as seen by the fact that the decrease in the activity of WDR neurons seen in this group was not significantly different than the one observed in the EPI-tested group or the one observed in the ANT β_1 group.

On the other hand, we did not find a homogeneous response in all neurons, only 70 % of the neurons significantly decreased their activity while the other 30 % of the neurons increased their activity in a non-significant manner. This indicates that interactions of greater complexity dictate the activity of WDR neurons in the spinal cord. As a result of this a reductionist approach such as this one is insufficient to fully describe the effects of the adrenergic system in pain transmission; systemic approaches will surely shed more light upon the matter. Further research, including patch-clamp studies, may be needed to understand the role of these receptors on acute pain modulation.

Limitations of the study

Even though we only registered spinal WDR neurons, the drugs were administered topically on the spinal cord, hence the drugs tested may have also affected other types of neurons (e.g. nociceptive-specific, GABAergic interneurons, etcetera) involved in pain modulation.

Conclusions

WDR neurons are an important site of pain regulation^{22,27} because of the diverse modulatory and sensitive inputs they receive, making them a more attractive site for pain modulation study than nociceptive-specific neurons.

Collectively, our results show that adrenoceptors modulate acute pain transmission by affecting the activity of spinal WDR neurons, but they do not modify non-painful sensory transmission. The analgesic effects seen with some non-selective β -adrenoceptor antagonists may be mainly due to β 1-adrenoceptors expressed in nociceptive-specific neurons, but not in spinal WDR. Although α 2-adrenoceptors are an actual target for pain treatment, our results suggest that β 1-adrenoceptors could be a new pharmacological target for acute pain.

Funding

Funding for this study was provided by the Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", projects: NC093530.0, NC093530.1 and NC113530. CONACYT funding projects NC093530 and CONACYT scholarship: 257530/215716. The Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", and CONACYT had no further role neither in study design, nor in the collection, analysis and interpretation of data or in the writing of the report.

Acknowledgements

We thank Pedro A. Lamothe Molina for helping in the writing process of this manuscript. We also thank Arturo Castillo Tovar, Francisco Merari Aguirre Barrios and Agustín Melo-Carrillo for their invaluable support during the course of this project as well as the program: Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Conflicts of interest: All of the authors have filled and sent the translated-to-Spanish form of the declaration of potential conflicts of interest of the International Committee of Medical Journal Editors, and it was not reported any conflict with regards to this article.

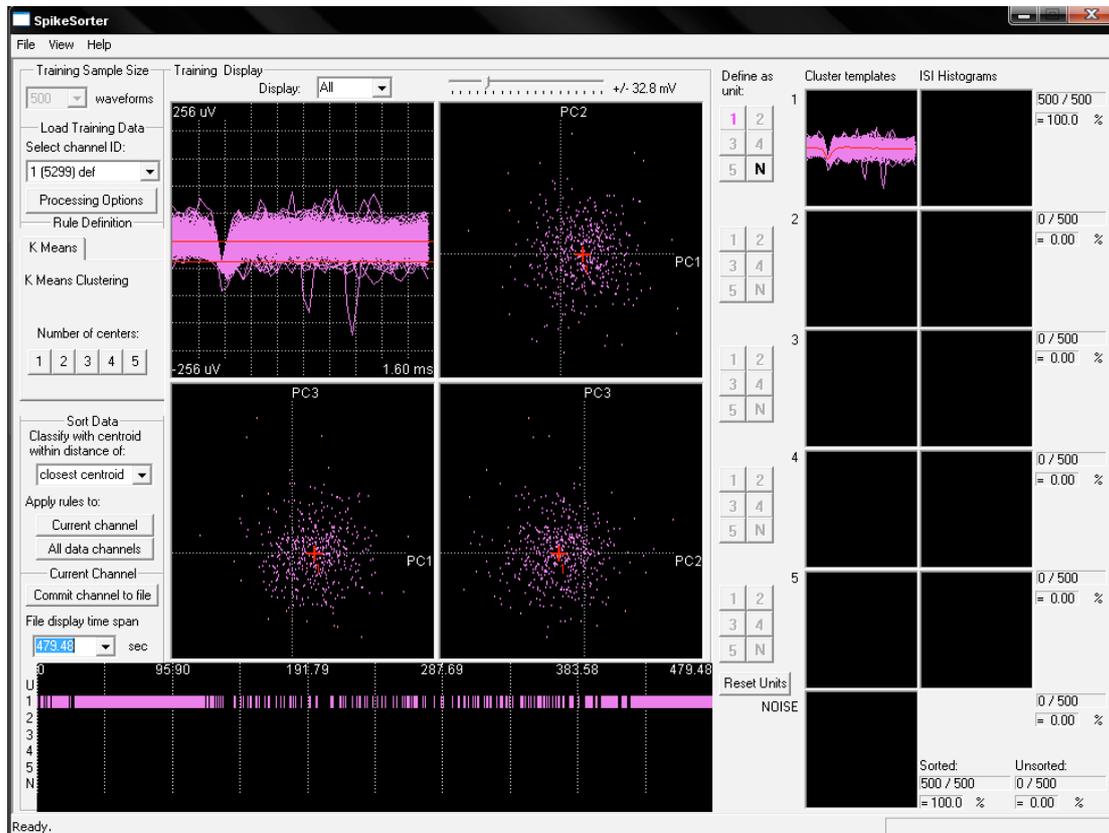
References

- Butler RK, Finn DP. Stress-induced analgesia. *Prog Neurobiol.* 2009;88(3):184-202.
- Akil H, Young E, Walker JM, Watson SJ. The many possible roles of opioids and related peptides in stress-induced analgesia. *Ann NY Acad Sci.* 1986;467:140-53.
- Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, et al. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature.* 2005 Jun 23;435(7045):1108-12.
- Killian P, Holmes BB, Takemori AE, Portoghesi PS, Fujimoto JM. Cold water swim stress- and delta-2 opioid-induced analgesia are modulated by spinal gamma-aminobutyric acidA receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995 Aug;274(2):730-4.
- Lico MC, Hoffmann A, Covian MR. Influence of some limbic structures upon somatic and autonomic manifestations of pain. *Physiol Behav.* 1974 May;12(5):805-11.
- Helmstetter FJ, Tereshner SA. Lesions of the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla disrupt antinociceptive but not cardiovascular aversive conditional responses. *J Neurosci.* 1994. 14(11):7099-108.
- Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science.* 1965(150):971-9.
- Moayedi M, Davis KD. Theories of pain: from specificity to gate control. *J Neurophysiol.* 2013 Jan;109(1):5-12. doi: 10.1152/jn.00457.2012. Epub 2012 Oct 3.
- Collins JG, Kitahata LM, Matsumoto M, Homma E, Suzukawa M. Spinally administered epinephrine suppresses noxiously evoked activity of WDR neurons in the dorsal horn of the spinal cord. *Anesthesiology.* 1984 Apr;60(4):269-275.
- Maeda M, Tsuruoka M, Hayashi B, Nagasawa I, Inoue T. Descending pathways from activated locus coeruleus/subcoeruleus following unilateral hindpaw inflammation in the rat. *Brain Res Bull.* 2009 Mar 16;78(4-5):170-4. doi: 10.1016/j.brainresbull.2008.09.005.
- Danzebrink RM, Gebhart GF. Antinociceptive effects of intrathecal adrenoceptor agonists in a rat model of visceral nociception. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990 May;253(2):698-705.
- Fukuda T, Furukawa H, Hisano S, Toyooka H. Systemic clonidine activates neurons of the dorsal horn, but not the locus coeruleus (A6) or the A7 area, after a formalin test: the importance of the dorsal horn in the antinociceptive effects of clonidine. *J Anesth.* 2006;20(4):279-83.
- Takano Y, Yaksh TL. Characterization of the pharmacology of intrathecally administered alpha-2 agonists and antagonists in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992 May;261(2):764-72.
- Sierralta F, Naquira D, Pinardi G, Miranda HF. alpha-Adrenoceptor and opioid receptor modulation of

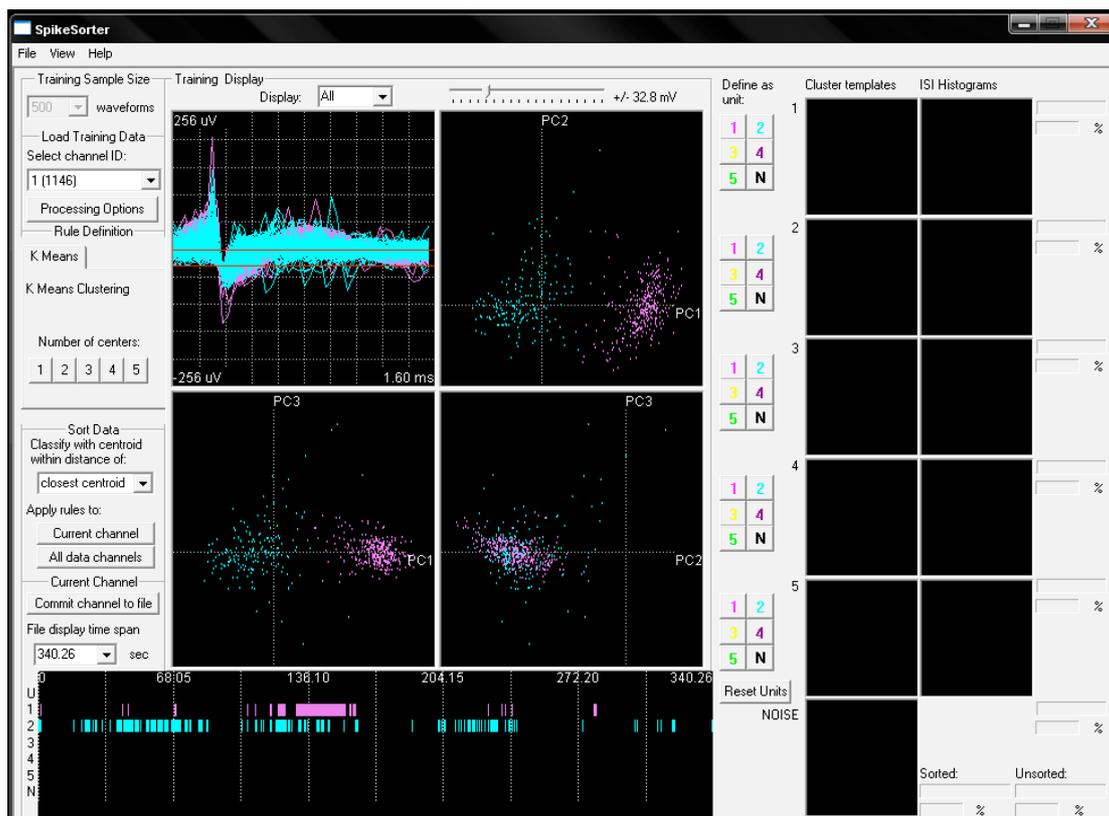
- clonidine-induced antinociception. *Br J Pharmacol.* Oct 1996; 119(3):551-4
15. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Sixth ed. Lippincott-Raven: Philadelphia; 1999.
 16. Atlas D, Melamed E. Direct mapping of beta-adrenergic receptors in the rat central nervous system by a novel fluorescent beta-blocker. *Brain Res.* 1978 Jul 14;150(2):377-85.
 17. Choucair-Jaafar N, Yalcin I, Rodeau JL, Waltisperger E, Freund-Mercier MJ, Barrot M. Beta2-adrenoceptor agonists alleviate neuropathic allodynia in mice after chronic treatment. *Br J Pharmacol.* 2009 Dec;158(7):1683-94. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00510.x.
 18. Khanna NK, Dadhich AP, Vyas DS. Modification of morphine analgesia by labetalol. *Indian J Exp Biol.* 1978 Oct;16(10):1091-2.
 19. Masaki E. Antinociceptive effects of landomolol and esmolol. *Masui.* 2006 Jul;55(7):849-55. Review. Japanese.
 20. Light KC, Bragdon EE, Grewen KM, Brownley KA, Girdler SS, Maixner W. Adrenergic dysregulation and pain with and without acute beta-blockade in women with fibromyalgia and temporomandibular disorder. *J Pain.* 2009 May;10(5):542-52. doi: 10.1016/j.jpain.2008.12.006.
 21. Ashtari F, Shaygannejad V, Akbari M. A double-blind, randomized trial of low-dose topiramate vs propranolol in migraine prophylaxis. *Acta Neurol Scand.* 2008 Nov;118(5):301-5. doi: 10.1111/j.1600-0404.2008.01087.x.
 22. Marsland AR, Weekes JW, Atkinson RL, Leong MG. Phantom limb pain: a case for beta blockers? *Pain.* 1982 Mar;12(3):295-7.
 23. Barrot M, Yalcin I, Choucair-Jaafar N, Benbouzid M, Freund-Mercier MJ. From antidepressant drugs to beta-mimetics: preclinical insights on potential new treatments for neuropathic pain. *Recent Pat CNS Drug Discov.* 2009 Nov;4(3):182-9.
 24. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. (Guest Editorial). *Pain.* 1983 Jun;16(2):109-10.
 25. Svendsen F, Hole K, Tjølsen A. Long-term potentiation in single wide dynamic range neurons induced by noxious stimulation in intact and spinalized rats. *Prog Brain Res.* 2000;129:153-61.
 26. Bouhassira D, Bing Z, Le Bars D. Studies of brain structures involved in diffuse noxious inhibitory controls in the rat: the rostral ventromedial medulla. *J Physiol.* 1993 Apr;463:667-87.
 27. Dickenson A, Ashwood N, Sullivan AF, James I, Dray A. Antinociception produced by capsaicin: spinal or peripheral mechanism? *Eur J Pharmacol.* 1990 Oct 9;187(2):225-33.
 28. Eisenach JC, DuPen S, Dubois M, Miguel R, Allin D. The epidural clonidine study group. Epidural clonidine analgesia for intractable cancer pain. *Pain.* 1995 Jun;61(3):391-9.
 29. Nicholas AP, Hokfelt T, Pieribone VA. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol Sci* 17:245-55.
 30. Pertovaara A, Almeida A. Endogenous pain modulation: descending inhibitory systems, in *Handbook of Clinical Neurology, Pain*. 3rd series, vol. 3, 2006, pp. 179-192.
 31. Kobilka BK. Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* Apr 2011; 32(4): 213-8.
 32. Melzack R, Wall PD. On the nature of cutaneous sensory mechanisms. *Brain.* 1962;85(2):331-56 doi:10.1093/brain/85.2.331.

12.2. Registro electrofisiológico.

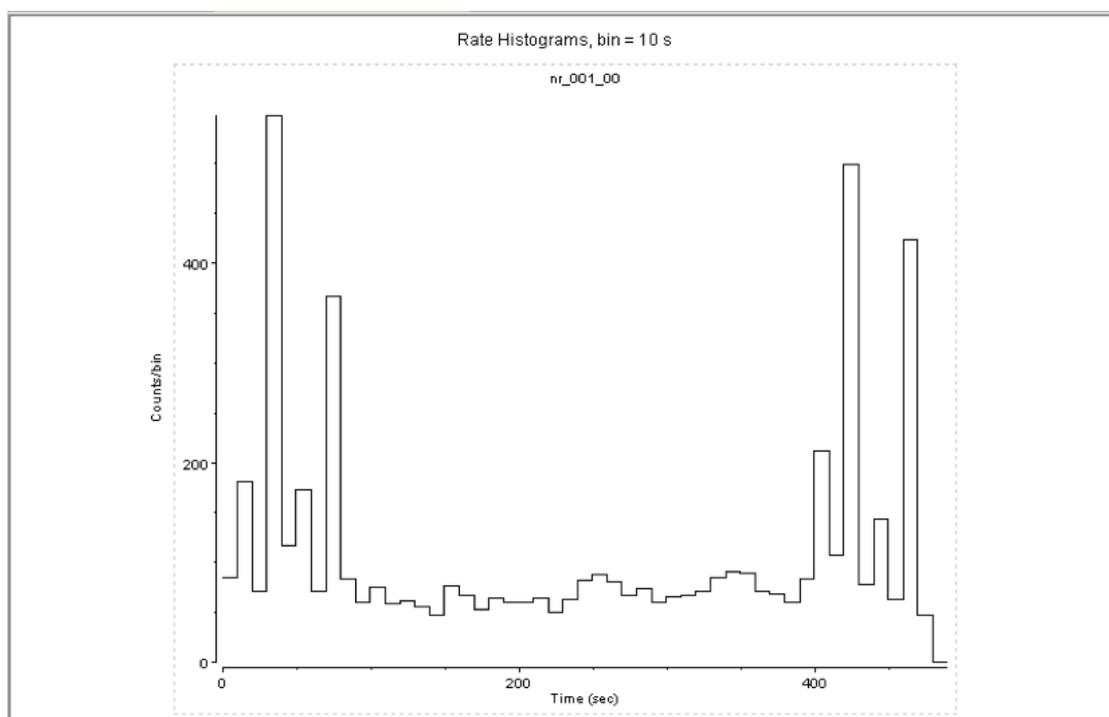
12.2.1 Neuronas nociceptivo-específicas.



12.2.2 Neuronas de amplio rango dinámico.



12.2.3 Histograma del registro electrofisiológico.



12.3. Plantilla de medición de la conducta de autotomía.

PLANTILLA AUTOTOMIA

RATA _____

Grupo: Estrés crónico (5 días) + denervación post 2 sem.

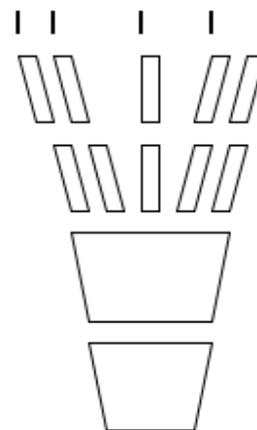
Hora de Termonocicepción _____

Denervada por: _____

Fecha de Denervación _____

Observaciones Quirúrgicas: _____ **Peso:** _____

FECHA	DIA	AUTOTOMIA	OBSERVACIONES
/	1		
/	2		
/	3		
/	4		
/	5		
/	6		
/	7		
/	8		
/	9		
/	10		
/	11		
/	12		
/	13		
/	14		
/	15		
/	16		
/	17		
/	18		
/	19		
/	20		
/	21		
/	22		
/	23		
/	24		
/	25		



	Fecha
Uñas	_____
1er P	_____
1er D	_____
2do P	_____
2do D	_____
3er P	_____
3er D	_____
4to P	_____
4to D	_____
5to P	_____
5to D	_____
Pata P	_____
Pata D	_____