



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR  
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑÍZ**

**EVALUACIÓN DE LA SINERGIA ENTRE RECEPTORES D<sub>2</sub> Y  $\mu$ -OPIOIDE EN  
3 MODELOS DE DOLOR**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Doctor en Ciencias Biomédicas**

**PRESENTA:**

Biol. Jonathan Israel Mercado Reyes

**TUTOR PRINCIPAL:**

Dr. Francisco Salvador Mercado Aca  
Instituto De Fisiología Celular, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

Dr. Francisco Pellicer Graham  
Instituto De Fisiología Celular, UNAM

Dr. Francisco Xavier Sotres Bayón  
Instituto De Fisiología Celular, UNAM

Ciudad De México. Junio, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 de contenidos

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>6</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
1.1. DOLOR	14
1.1.1. TRANSDUCCIÓN	16
1.1.2. TRANSMISIÓN	19
1.1.3. INTEGRACIÓN Ó INTERPRETACIÓN	22
1.1.4. MODULACIÓN	26
1.2. SISTEMA DOPAMINÉRGICO (MONOAMINÉRGICO)	26
1.3. SISTEMA OPIOIDÉRGICO	31
1.4. DOLOR PATOLÓGICO: MÁS QUE UNA ALARMA DESCOMPUESTA	34
1.4.1 INTERACCIÓN ENTRE LOS SISTEMAS DOPAMINÉRGICO Y OPIOIDE. RELACIÓN MOLECULAR Y DURANTE EL DOLOR PATOLÓGICO	38
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>39</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>39</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>40</b>
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	40
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>41</b>
5.1 MODELO ANIMAL	41
5.2 ADMINISTRACIÓN POR INYECCIÓN INTRATECAL (I.T.)	41

<b>5.3 ADMINISTRACIÓN POR INYECCIÓN SUBCUTÁNEA (S.C.)</b>	<b>41</b>
<b>5.4 FÁRMACOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>42</b>
<b>5.5 PRUEBAS CONDUCTUALES</b>	<b>42</b>
<b>5.6 MODELO DE DOLOR INFLAMATORIO</b>	<b>43</b>
<b>5.7 MODELO DE DOLOR NEUROPÁTICO</b>	<b>43</b>
<b>5.8 PARADIGMA DE CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA DE LUGAR</b>	<b>44</b>
<b>5.9 ANÁLISIS DE DATOS</b>	<b>44</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
<b>6.1 EFECTO DE DAMGO I.T. SOBRE LAS LATENCIAS DE RETIRADA FRENTE A ESTÍMULOS TÉRMICOS NOCIVOS EN EL MODELO DE DOLOR NOCICEPTIVO</b>	<b>46</b>
<b>EFFECTO DEL QUINPIROL ADMINISTRADO DE MANERA I.T. SOBRE LAS LATENCIAS DE RETIRADA FRENTE A ESTÍMULOS TÉRMICOS NOCIVOS</b>	<b>48</b>
<b>6.2 EFECTO DE DAMGO ADMINISTRADO DE MANERA I.T. SOBRE LAS LATENCIAS DE RETIRADA FRENTE A ESTÍMULOS MECÁNICOS NOCIVOS</b>	<b>50</b>
<b>EFFECTO DE QUINPIROL ADMINISTRADO DE MANERA I.T. SOBRE LAS LATENCIAS DE RETIRADA FRENTE A ESTÍMULOS MECÁNICOS NOCIVOS</b>	<b>52</b>
<b>6.3 EFECTO DE AGONISTAS D<sub>1</sub> Y D<sub>3</sub> ADMINISTRADOS DE MANERA I.T. SOBRE LAS LATENCIAS DE RETIRADA FRENTE A ESTÍMULOS TÉRMICOS NOCIVOS</b>	<b>54</b>
<b>6.4 EFECTO DE AGONISTAS D<sub>1</sub> Y D<sub>3</sub> ADMINISTRADOS DE MANERA I.T. SOBRE LAS LATENCIAS DE RETIRADA FRENTE A ESTÍMULOS MECÁNICOS NOCIVOS</b>	<b>56</b>
<b>6.1.1. ABC Y CDR DEL EFECTO MÁXIMO DE DAMGO Y QUINPIROL FRENTE A ESTÍMULOS TÉRMICOS NOCIVOS</b>	<b>58</b>
<b>6.2.1. ABC Y CDR DEL EFECTO MÁXIMO DE DAMGO Y QUINPIROL FRENTE A ESTÍMULOS MECÁNICOS NOCIVOS</b>	<b>60</b>
<b>6.5 EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA COADMINISTRACIÓN DE QUINPIROL, UN AGONISTA D<sub>2</sub>, CON DAMGO, UN AGONISTA DE LOS RECEPTORES <math>\mu</math> SOBRE LA NOCICEPCIÓN TÉRMICA</b>	<b>62</b>
<b>6.5.1 ABC Y CDR DEL EFECTO MÁXIMO DE LA COADMINISTRACIÓN DE DAMGO Y QUINPIROL FRENTE A ESTÍMULOS TÉRMICOS NOCIVOS</b>	<b>64</b>
<b>6.6. LA COADMINISTRACIÓN DE AGONISTAS A RECEPTORES TIPO D<sub>2</sub> AUMENTA EL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LOS AGONISTAS <math>\mu</math>-OPIOIDE DURANTE LA NOCICEPCIÓN MECÁNICA</b>	<b>66</b>
<b>6.6.1. ANÁLISIS DE LAS ABC Y CDR DE LA COADMINISTRACIÓN DE DAMGO Y QUINPIROL FRENTE A ESTÍMULOS TÉRMICOS NOCIVOS</b>	<b>68</b>

<b>6.7 EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO DE LA COADMINISTRACIÓN DE QUINPIROL Y DAMGO FRENTE A ESTÍMULOS TÉRMICOS NOCIVOS EN UN MODELO DE DOLOR INFLAMATORIO</b>	<b>70</b>
<b>EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO DE LA COADMINISTRACIÓN DE QUINPIROL Y DAMGO FRENTE A ESTÍMULOS MECÁNICOS NOCIVOS EN UN MODELO DE DOLOR INFLAMATORIO</b>	<b>73</b>
<b>6.8 EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO DE LA COADMINISTRACIÓN DE QUINPIROL Y DAMGO FRENTE A ESTÍMULOS TÉRMICOS NOCIVOS EN UN MODELO DE DOLOR NEUROPÁTICO</b>	<b>75</b>
<b>EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO DE LA COADMINISTRACIÓN DE QUINPIROL Y DAMGO FRENTE A ESTÍMULOS MECÁNICOS NOCIVOS EN UN MODELO DE DOLOR NEUROPÁTICO</b>	<b>77</b>
<b>6.9 ADMINISTRACIÓN S.C. DE TRAMADOL Y SU EFECTO SOBRE LAS LATENCIAS DE RETIRADA FRENTE A ESTÍMULOS TÉRMICOS NOCIVOS</b>	<b>79</b>
<b>ADMINISTRACIÓN S.C. DE QUINPIROL Y SU EFECTO SOBRE LAS LATENCIAS DE RETIRADA FRENTE A ESTÍMULOS TÉRMICOS NOCIVOS</b>	<b>81</b>
<b>6.10 EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE TRAMADOL (S.C.) FRENTE A ESTÍMULOS MECÁNICOS NOCIVOS</b>	<b>83</b>
<b>6.11 EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE TRAMADOL (S.C.) EN COADMINISTRACIÓN CON QUINPIROL (S.C.) FRENTE A ESTÍMULOS TÉRMICOS NOCIVOS</b>	<b>87</b>
<b>EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE TRAMADOL (S.C.) EN COADMINISTRACIÓN CON QUINPIROL (S.C.) FRENTE A ESTÍMULOS MECÁNICOS NOCIVOS</b>	<b>88</b>
<b>6.12 EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO DE TRAMADOL (S.C.) EN COADMINISTRACIÓN CON QUINPIROL (S.C.) FRENTE A ESTÍMULOS TÉRMICOS NOCIVOS EN UN MODELO DE DOLOR INFLAMATORIO</b>	<b>91</b>
<b>6.13 EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO DE TRAMADOL (S.C.) EN COADMINISTRACIÓN CON QUINPIROL (S.C.) FRENTE A ESTÍMULOS TÉRMICOS NOCIVOS EN UN MODELO DE DOLOR NEUROPÁTICO</b>	<b>95</b>
<b>6.14 CONDICIONAMIENTO PREFERENTE DE LUGAR (CPL) COMO PARADIGMA PARA EL ESTUDIO DEL ALIVIO COMO UN COMPONENTE EMOCIONAL DEL DOLOR</b>	<b>99</b>
<b>6.15 LA TERAPIA DE COADMINISTRACIÓN S.C. DE QUINPIROL Y TRAMADOL PRODUCE PREFERENCIA EN EL MODELO DE DOLOR INFLAMATORIO</b>	<b>101</b>
<b><u>7. DISCUSIÓN</u></b>	<b><u>103</u></b>
<b>7.1 VALIDACIÓN FARMACOLÓGICA Y NUEVOS HALLAZGOS DE LA INTERACCIÓN ENTRE RECEPTORES D<sub>2</sub> Y μ-OPIOIDE</b>	<b>103</b>

<b>7.2 INTERACCIÓN DEL EFECTO DE AGONISTAS A RECEPTOR <math>\mu</math>-OPIOIDE Y RECEPTORES TIPO D<sub>2</sub> SOBRE EL PROCESAMIENTO Y RETROALIMENTACIÓN NOCICEPTIVO EN 2 MODELOS DE DOLOR PATOLÓGICO</b>	<b>107</b>
<b>7.3 NÚCLEO A11 COMO SUSTRATO CLAVE PARA LA ANALGESIA FARMACOLÓGICA, INCLUIDA LA TERAPIA COADYUVANTE, EN 3 MODELOS DE DOLOR</b>	<b>110</b>
<b>7.4 DOLOR CRÓNICO EN LA POBLACIÓN MEXICANA: EL FUTURO DE LA INTERVENCIÓN CLÍNICA Y LOS MODELOS DE INTERVENCIÓN MULTIDISCIPLINARIOS</b>	<b>113</b>
<b><u>8. CONCLUSIONES</u></b>	<b><u>114</u></b>
<b><u>9. REFERENCIAS</u></b>	<b><u>115</u></b>

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, al comité de ética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz por haber aprobado el protocolo y el número mínimo indispensable de animales para la realización del presente trabajo. Es a través de valorar la vida y su manifestación en cualquiera de sus formas, que nos volvemos más humanos. También quiero agradecer a mis sinodales el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo. Sus observaciones complementan y enriquecen mis perspectivas como científico. Agradezco a las personas que, sin intereses de lucro, ponen al alcance de los estudiantes herramientas como acceso gratuito a los artículos de investigación, así como programas para ilustración (Biorender, aplicación con la que se realizaron todas las ilustraciones del presente trabajo).

Así mismo quiero agradecer prontamente al equipo de laboratorio conformado por mi tutor, padre académico y tío perdido Paco Mercado Aca, la Dra. Angélica Almanza, y a “Peter” Pedro Segura-Chama el tiempo que dedicaron, su honestidad y el interés sincero en mi formación como científico. Doc, Dr. Mercado, Paco, muchas gracias por tu paciencia y por no rendirte, se que soy una persona difícil y que necesito que me repitan ciertas cosas muchas veces. Así mismo, he de admitir, pronuncié las palabras “Vaya, tenía razón, doc.” más de las que me gustaría admitir. Con el tiempo entendí porque tomó ciertas decisiones respecto a mi formación y agradezco que haya sido así. Dra. Angélica, Angie. Su preocupación e interés sincero por mi desarrollo personal y académico impactaron profundamente en mis decisiones posteriores y me dio el regalo de concentración más grande que he recibido, la meditación. Peter, nunca un amigo de laboratorio tuvo un nombre mas *ad hoc* en su trabajo: *catedrático* que se traduce a profesor persona que ejerce o enseña una ciencia o arte. Docto en el manejo y composición del instrumental necesario para los registros electrofisiológicos de células únicas y tejido; de palabra sencilla y directa para la explicación. Contribuiste grandemente a mi pasión y admiración por la capacidad biofísica de las neuronas.

A mis padres, Celvia e Ignacio, con su esfuerzo y mi trabajo quiero honrar su naturaleza de lucha. A mis abuelos, Celvia y José Proto, que no pudieron verme titulado. A todas las personas que no he mencionado, pero me acompañaron de alguna manera en este viaje. Gracias.

## **ABREVIATURAS**

- ACF: Adyuvante completo de Freund
- AC: Adenilil ciclasa
- ARN: ácido ribonucleico
- ATP: Adenosín trifosfato
- AVT: Área ventral tegmental
- ASIC: Acid-sensing Ion Channel
- CAC: Corteza Anterior del cíngulo
- cAMP: Adenosín monofosfato cíclico
- CGRP: Calcitonin gene related peptide
- CPL: Condicionamiento preferente de lugar
- CPF: Corteza Prefrontal
- DA: dopamina
- DE<sub>50</sub>: Dosis efectiva 50
- EEG: Electroencefalograma
- GRD Ganglio de la raíz dorsal:
- GPCR's: Receptores acoplados a proteínas G
- GT: ganglio del trigémino
- IASP: International Association for the Study of Pain
- i.t.: inyección intratecal
- LFC: Ligadura floja del ciático
- LTP: Long term potentiation
- MRV: Médula rostro ventral
- NAc: Núcleo accumbens
- NEB: Núcleo espinal bulbocavernoso
- nNOS: sintetaza neuronal de oxido nítrico



NT: neurotransmisor  
PA: Potencial de acción  
PIP3: fosfatidil inositol, fosfato  
PKA: Proteína cinasa A  
PKC: Proteína Cinasa C  
PV: Parvalbumina  
RMO: receptor  $\mu$ -opioide  
s.c.: subcutáneo  
SG: Sustancia gelatinosa  
SGP: Sustancia gris periacueductal  
SNC: Sistema Nervioso Central  
SNP: Sistema Nervioso Peiférico  
SS: Sistema somatosensorial  
WDR: Wide dynamic range

“...cuando muere una lengua,  
Sus palabras de amor,  
Entonación de dolor y querencia,  
Tal vez viejos cantos,  
Relatos, discursos, plegarias,  
Nadie cual fueron  
Alcanzarán a repetir...”

**-Miguel León-Portilla.**

“... hace giros la tristeza  
de los que en su interior viven.  
Meditadlo, señores...”

**-Nezahualcóyotl.**

- *cocolizcui*: Con sufrimiento, enfermedad, dolorosamente. Estar dominado por la enfermedad o el dolor.

- *tlapaliuhca*: Valientemente

- *cocoliztlapaliui*: ser resistente, soportar el mal, la enfermedad o el dolor.

**-Diccionario de la lengua náhuatl.**

La serpiente es cuerpo y el águila espíritu que juntos forman el Quetzalcóatl, un estado de consciencia. A través de la raza, mi casa y cuerpo, hablará el espíritu; uno abierto al tiempo, con mi técnica dispuesta al servicio de mi patria y el mundo.

**-Jonathan Israel M. R.**

## RESUMEN

El dolor es una experiencia compleja que alerta a los individuos de lesiones reales o potenciales. Para su estudio se divide en cuatro fases: transducción, transmisión, interpretación y modulación. La experiencia dolorosa cumple una función protectora primordial, no obstante, dada la característica altamente subjetiva y contextual de esta experiencia el dolor puede resultar incapacitante, además puede producir una profunda alteración de los mecanismos de regulación del Sistema Nervioso Central (SNC).

De los mecanismos de regulación se ha reportado que, específicamente los agonistas a receptores de **dopamina (DA)**, producen un efecto analgésico observado de manera empírica en pacientes y corroborado en modelos animales de dolor. Este efecto es mediado principalmente por receptores dopaminérgicos de la familia D<sub>2</sub>, cuyas vías de señalización y mecanismos de acción son análogos al de los receptores opioides. Los agonistas endógenos y exógenos de los receptores  $\mu$ -opioide producen un efecto antinociceptivo muy eficaz en dolor agudo e inflamatorio, a pesar de ser los analgésicos por excelencia, sus efectos adversos como la tolerancia y adicción limitan su uso por periodos prolongados para condiciones de dolor crónico.

Recientemente se ha sugerido que la tolerancia y la adicción producida por los agonistas a receptores  $\mu$ -opioide es producida, en parte, por interacciones con receptores dopaminérgicos. Aunado a esto, ambos tipos de receptores se expresan en prácticamente los mismos sitios anatómicos involucrados en la modulación de la nocicepción y el dolor a nivel de la médula espinal. De igual manera, se han reportado interacciones entre ambos sistemas durante los procesos de dolor y analgesia a nivel cortical. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antinociceptivo de la coadministración de fármacos agonistas a los receptores tipo D<sub>2</sub> y fármacos agonistas al receptor  $\mu$ -opioide en tres modelos de dolor (nociceptivo, inflamatorio y neuropático), y determinar si la coadministración mejora el efecto antinociceptivo de los mismos fármacos comparado a cuando se administran de manera independiente. Además, evaluamos el proceso de analgesia y la conducta de preferencia producida por la administración sistémica de la terapia de coadministración.

La administración de los fármacos se llevó a cabo por vía intratecal (i.t.) y subcutánea (s.c.); se realizaron pruebas para nocicepción térmica y mecánica, antes y después de la

administración de los fármacos. Como modelo de dolor inflamatorio se realizaron inyecciones intraplantares de adyuvante completo de Freund (ACF) y la ligadura floja del nervio ciático (LFC) como modelo de dolor neuropático. Para la conducta de preferencia utilizamos el paradigma de condicionamiento preferente de lugar (CPL).

En el modelo animal de nocicepción la coadministración i.t. de quinpirol (1 nmol; agonista del receptor D<sub>2</sub>) redujo ~8 veces la dosis requerida de DAMGO (agonista de los receptores  $\mu$ -opioides) para producir antinocicepción mecánica. En el modelo de dolor inflamatorio, la coadministración de 1 nmol de quinpirol y 30 pmol de DAMGO revirtió completamente la hiperalgesia producida por el ACF frente a estímulos térmicos y mecánicos nocivos. Los fármacos administrados por separado no produjeron un alivio completo de la hiperalgesia. Quinpirol 1 nmol y 100 pmol de DAMGO vía i.t. también aliviaron la hiperalgesia mecánica y térmica en el modelo de LFC. En cuanto a la administración sistémica por vía s.c., los grupos de tramadol 10 mg/kg, quinpirol 1 mg/kg y la coadministración, no tuvieron efectos estadísticamente significativos en el modelo de animal de nocicepción, no obstante, la combinación revirtió la hiperalgesia en los modelos de dolor inflamatorio y neuropático. La coadministración de los fármacos agonistas produjo un cambio significativo en la conducta de condicionamiento, solamente en el modelo inflamatorio.

El presente trabajo ofrece nuevas evidencias de una relación sinérgica antinociceptiva entre los agonistas opioidérgicos y dopaminérgicos. Esta combinación, podría ayudar al tratamiento de condiciones dolorosas resistentes a los tratamientos convencionales y podría reducir los efectos adversos presentes en la administración crónica de opioides. Además, presentamos un antecedente conductual de la modulación dopaminérgica diferencial en aferentes primarias periféricas y la modulación que ejercen en el proceso de cronicidad en el dolor patológico.

## ABSTRACT

Pain is a complex experience that alerts individuals from potential or real lesions. Pain has been divided in transduction, transmission, interpretation or integration, and modulation for its study. The pain experience accomplishes a primordial protective function, however due to its characteristic highly subjective and contextual nature, pain may turn incapacitating and moreover produce a profound alteration in the regulatory systems at the Central Nervous System (CNS).

The regulatory mechanisms work with several neurotransmitters and it has been reported that specifically dopamine (DA) receptor agonists produce an analgesic effect; empirically observed in Parkinson's disease patients and then corroborated in animal models of pain. This analgesic effect is principally mediated by D<sub>2</sub>-like family of DA receptors whose signaling pathways and mechanisms of action are analogous to those carried by opioid receptors when activated. Endogenous and exogenous agonists for  $\mu$ -opioid receptors show an efficient antinociceptive effect over hyperalgesia produced by acute and inflammatory pain. Despite being the gold-standard analgesics, opioid adverse effects such as tolerance and addiction hamper their use for prolonged periods of time in chronic pain conditions.

Tolerance and addiction produced by  $\mu$ -opioid receptor agonists is in part, due to the interactions with DA receptors. Coupled with this, both receptors are expressed in practically the same anatomical sites for central modulation of pain and nociception, both at the brain and spinal cord. Furthermore, intertwined interactions between both systems have been reported during the process of pain and analgesia in the CNS. So, the main objective of the present study was to evaluate the antinociceptive effect of coadministration therapy of drug agonists for D<sub>2</sub>-like receptors and  $\mu$ -opioid receptors in 3 animal models of pain (nociceptive, inflammatory and neuropathic). Also, to determine if the coadministration therapy improves the antinociceptive effect of drugs when administered alone. Finally, we also evaluated the potential analgesia and conditioned place preference produced by the systemic administration of our co-adjutant therapy.

Drug administration was carried either locally or systemically by intrathecal (i.t.) or subcutaneous route (s.c.), respectively. Thermal and mechanical nociception tests were carried before and after the administration of drugs. As an inflammatory model of pain, we

used the intraplantar injection of Complete Freund Adjuvant (CFA), and we used the sciatic loose ligature (SLL) as a model of neuropathic pain. To evaluate preference through analgesia, we used the conditioned place preference (CPP) paradigm.

i.t. coadministration of quinpirole (1 nmol; D<sub>2</sub>-like receptor agonist) reduced ~8 times the required dose of DAMGO ( $\mu$ -opioid receptor agonist) to produce mechanical antinociception. In the inflammatory model, coadministration of 1 nano moles of quinpirole and 30 pico moles of DAMGO completely reversed mechanical and thermal hyperalgesia produced by CFA administration. Independently administered drugs did not provide a complete reversal of hyperalgesia. However, 1 nmol of quinpirole and 100 pmol of DAMGO also completely abolished thermal and mechanical hyperalgesia during the SLL neuropathic model of pain. Systemic s.c. administration of 10 mg/kg of tramadol, 1 mg/kg quinpirole, and the coadministration of both doses in different animal groups did not significantly altered nociceptive mechanical and thermal induced reflex latencies in the nociceptive model of pain. In sharp contrast, coadministration therapy did completely abolished hyperalgesia produced by either inflammatory or neuropathic models of pain, particularly thermal hyperalgesia. Systemic coadministration of drug agonists produced a statistically significant change in the preference behavior in the CPP paradigm, only the CFA inflammatory model.

The present study offers new evidence about a synergistic antinociceptive relationship between opioid and dopaminergic agonists. This combination of drugs could aid in the treatment of painful conditions resistant to conventional treatments and also help to ease some of the adverse effects produced by chronic administration of opioids. Furthermore, we show a behavioral background of differential dopaminergic modulation over primary afferents and the modulatory effect they have over the chronicity process in pathological pain.

## 1. Introducción

Los circuitos neuronales intrínsecos existen como resultado de la interacción de: 1) componentes celulares determinados genéticamente al nacer (neuronas, glía, células inmunes, y los circuitos constitutivos resultantes), 2) la *experiencia* sensitivo/motora durante el desarrollo inicial del individuo (postnatal-adulthood temprana, codificación a través de memoria y perfeccionamiento de los circuitos constitutivos) y 3) los componentes autorregulatorios que permiten la plasticidad neuronal, que modifica estos circuitos para adaptarse a las contingencias del medio (a través de *experiencias*) (LaMantia, 2017). La interacción diaria con nuestro ambiente produce cambios entre las fuerzas sinápticas de comunicación en los circuitos neuronales preestablecidos, sin embargo, estos circuitos se mantienen en un estado de homeostasis. Las experiencias extraordinarias o complejas pueden modificar estos circuitos de manera drástica y potencialmente permanente.

### 1.1. Dolor

El dolor es una *experiencia* compleja en la cual, información periférica producida por estímulos potencialmente dañinos se transmite a estructuras superiores, comunicando acciones inmediatas para prevenir el daño. La organización internacional para el estudio del dolor (IASP, por sus siglas en inglés) define al dolor como: “*una experiencia emocional y sensorial desagradable causada por, o parecida a la causada por, una lesión real o potencial de tejidos*”. El dolor tiene dos componentes temporales: el primero de corta duración, pero rápida transmisión y el segundo de mayor duración, pero de transmisión demorada. La *experiencia* del dolor comienza con la transducción del estímulo nocivo en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) por medio de neuronas del especializadas denominadas **nociceptores**, cuyos cuerpos celulares se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) o en los ganglios trigéminos (GT), ubicados anatómicamente de manera lateral a la médula espinal o adyacentes al tallo cerebral, respectivamente. La terminal nerviosa periférica del **nociceptor** inerva la piel, músculos, huesos y órganos internos del cuerpo por medio de terminales libres, denominadas así por la ausencia de un arreglo celular específico, los cuales generalmente están optimizados para la transducción de estímulos de *bajo umbral* en el Sistema Somatosensorial (SS). La porción axónica proximal del nociceptor tiene contacto sináptico con neuronas de la asta dorsal de la médula espinal en el Sistema Nervioso Central (SNC). El cuerpo celular de los nociceptores, así como el de las demás aferentes sensitivas,

se encuentra dentro del GRD. Las proyecciones de los nociceptores son distales/periféricas y proximales/médula espinal.

La distinción y especialización de las neuronas del GRD fue ampliamente reconocida hace más de 100 años por Sherrington (Sherrington, 1903), dos décadas después se segregó, de acuerdo al diámetro de las fibras y su velocidad de conducción, el tipo de conducta que producía la activación de las fibras de distinto diámetro (Gasser & Erlanger, 1927). La identificación irrefutable de las fibras con menor diámetro (**fibras C**) como nociceptores ocurrió después (Bessou & Perl, 1969). El grosor de cada fibra depende, en parte, del porcentaje de mielinización. La fibra A (A $\beta$ ) tienen la velocidad de conducción más rápida debido al mayor grado de recubrimiento de **mielina** conferido por los oligodendrocitos. Las fibras A $\beta$  señalan la *experiencia* diaria de interacción con nuestro alrededor a través del SS; de ahí el requerimiento de alta velocidad de conducción y sensibilidad para el reconocimiento de los estímulos. En contraste, las neuronas con fibras C y A $\delta$  están pobremente mielinizadas, lo que resulta en una velocidad de conducción hasta 100 veces más lenta para la **nocicepción**: transducción de *experiencias* potencialmente dañinas a un lenguaje neural. Los nociceptores A $\delta$  comunican la nocicepción rápida de corta duración y las fibras C (ausencia de recubrimiento de mielina, pero no de oligodendrocitos) comunican una segunda nocicepción, que llega más tarde y además de duración. Gracias a esto, los mecanismos reflejos de retirada aparecen en primer lugar, mientras que la ubicación y sensación de aversión que resulta del estímulo nociceptivo aparece en segundo lugar.

El nociceptor es una neurona pseudounipolar con una sola proyección axónica que se bifurca en la sección más proximal a la médula espinal y transmite el estímulo desde tejidos afectados hacia la asta dorsal de la médula espinal. Posteriormente, estructuras superiores del SNC integran la información nociceptiva. Finalmente, por medio de los bucles de retroalimentación en distintas áreas del tallo cerebral y cortezas, así como modulación en la médula espinal, la *experiencia* del dolor emerge. El estudio del dolor y la división del proceso en 4 fases distintivas ha permitido identificar posibles áreas de intervención farmacológica para las condiciones de dolor patológico, no obstante, no existe una diferencia temporal entre ellas. Las fases del dolor son transducción, transmisión, integración y modulación.



### 1.1.1. Transducción

La transducción sensorial ocurre cuando estímulos de naturaleza mecánica, térmica o química *de alto umbral* activan receptores ubicados en las terminales nerviosas periféricas de los nociceptores. Estos receptores especializados pueden activar vías de señalización intracelular o cambiar la polaridad de la célula a través de la entrada de iones, permitiendo así la generación de **potenciales de acción (PA)**. Los GRD y GT presentan diferencias considerables (Lopes *et al.*, 2017; Megat *et al.*, 2019), no obstante los nociceptores del GRD/GT están especializados para la transducción del estímulo nociceptivo. Este proceso continúa a través de la activación de sistemas de neurotransmisión.

La activación de receptores especializados en la detección de estímulos nocivos produce la entrada directa (**ionotrópicos**) o indirecta (**metabotrópicos**) de iones Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> **extracelulares**. Igualmente, el Ca<sup>2+</sup> puede provenir del medio **intracelular**, dado que los estímulos nociceptivos también activan canales ionotrópicos ubicados en organelos como el retículo endoplásmico (Hagenacker *et al.*, 2008). El *alto umbral* de los estímulos que activan los nociceptores altera el medio intra y extracelular lo que termina por despolarizar a los nociceptores, (generalmente con un potencial de membrana en reposo ~ -60 mV) generando el conocido **potencial de receptor**. Si la despolarización producida por el potencial de receptor es suficiente para activar una cantidad suficiente de canales de sodio activados por voltaje, esto generará un **PA**. El PA se propaga a lo largo del axón, donde también se expresan canales iónicos específicos como el Cav3.2. Posteriormente, el PA producirá la activación de canales de calcio sensibles a voltaje ubicados en la porción del nociceptor que hace contacto sináptico con el asta dorsal de la medula espinal. Esto aumentará la probabilidad de liberación de vesículas sinápticas con neurotransmisores excitadores en las láminas diana del asta dorsal, específicas para las distintas poblaciones de nociceptores.

Utilizando técnicas de expresión genética, inmunohistoquímica y electrofisiología se ha podido caracterizar a las poblaciones de neuronas nociceptivas y sus propiedades electrofisiológicas (Dubin & Patapoutian, 2010; Chiu *et al.*, 2014). Éstas diferencias a nivel molecular permite agrupar a los nociceptores ya sean térmicos, mecánicos o químicos (Le Pichon & Chesler, 2014). La evidencia experimental (Koltzenburg & Handwerker, 1994; Stucky & Lewin, 1999), así como los métodos de análisis bioinformático han permitido

confirmar que detrás de esta segregación poblacional está un marco genético predeterminado durante el desarrollo (Le Pichon & Chesler, 2014; Usoskin *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2019).

La transducción sensorial de estímulos mecánicos nociceptivos es mediada por el canal iónico TACAN (movimiento, en farsi), este canal se expresa en la población de nociceptores mecánicos (**mecanociceptores**) **no peptidérgicos** (que unen a la isolectina B4 (Stucky & Lewin, 1999)). La activación del canal TACAN genera corrientes con cinéticas de activación ultra lentas. Asimismo, se activan **conductas nocifensivas** que se distinguen de los mecanismos de retirada de carácter reflejo. El silenciamiento genético global de TACAN en estado embrionario es letal, por lo que se generaron ratones con silenciamiento condicional por la administración de tamoxifen. El silenciamiento de TACAN disminuye la corrientes de adaptación ultra lenta y la expresión de conductas nocifensivas producidas por estímulos mecánicos nocivos en los ratones transgénicos con receptores para tamoxifen (Beaulieu-Laroche *et al.*, 2020). Los mecanociceptores tienen contacto sináptico en la médula espinal, de manera específica en la lámina II interna de Rexed.

Contrario a los **mecanociceptores**, la transducción de estímulos químicos nocivos se caracteriza por ocurrir en una población de nociceptores que expresan una variedad de canales iónicos, entre ellos miembros de la familia TRP, como por ejemplo el canal catiónico inespecífico TRPV1 y el TRPA1, este último activado por irritantes químicos. La detección y transducción de otros elementos químicos, como los protones ( $H^+$ ) y la consecuente acidificación del medio, es mediada por receptores ASIC (canales iónicos sensibles a ácido por sus siglas en inglés) (Wemmie *et al.*, 2013). Las aferentes primarias espinales y medulares que responden fuertemente a los **pruritógenos** (que causan comezón) expresan receptores como el MrgprD (Liu *et al.*, 2009) (receptor acoplado a proteínas G relacionado con Mass, por sus siglas en inglés) y terminan en neuronas de proyección principalmente en la lámina III y V.

En cuanto a los estímulos térmicos nocivos, existen dos extremos, las temperaturas muy altas (39-50°C) o muy bajas (< 15°C). Las muy altas, activan al receptor TRPV1, el cual transduce el estímulo y permite la entrada de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  (Caterina *et al.*, 1997). Este receptor se expresa en la población de nociceptores térmicos (**termonociceptores**) **peptidérgicos** (expresión de CGRP y sustancia P) que hacen contacto sináptico con neuronas de la lámina

I y II externa. En las temperaturas nocivas bajas (<15°C (Bessou & Perl, 1969)) la percepción de dolor se distingue por ser mucho más duradera (Morin & Bushnell, 1998) y por tener un rango dinámico más amplio (0 - 28°C). El dolor por frío es mediado por el receptor TRPM8, que es expresado por un subgrupo de neuronas que son distintas a las que expresan el TRPV1 (McKemy, 2013). Los nociceptores para el frío nocivo tienen un andamiaje molecular definido donde las corrientes de Na<sup>+</sup> son mediadas principalmente por el canal Nav1.8. Es útil considerar que compuestos naturales como el mentol producen la sensación inocua de frío, activando al TRPM8 (McKemy *et al.*, 2002). De acuerdo con su umbral de activación, las poblaciones sensibles a frío se dividen en *bajo umbral* cuando tienen altos niveles de expresión para TRPM8, mientras que las poblaciones de *alto umbral*, presumiblemente nociceptores polimodales, expresan al canal de potasio con corrientes I<sub>KD</sub> características y una expresión baja de TRPM8 (Madrid *et al.*, 2009).

El PA característico que resulta de la transducción de estímulos en los nociceptores es resultado de la expresión específica de canales de sodio Nav1.7, 1.8 y 1.9, codificados por los genes *SCN9A*, *SCN10A* y *SCN11A* respectivamente. Específicamente el Nav1.7 se expresa en el 85% de nociceptores (Dib-Hajj *et al.*, 2013) y su mutación homocigótica en humanos resulta en la patología de insensibilidad congénita al dolor; generalmente los individuos que padecen esta patología tienen altas tasas de mortalidad debido a infecciones no percibidas y auto mutilación (Axelrod & Hilz, 2003). Existen diferencias en la expresión de canales iónicos entre poblacionales de nociceptores que determinan las corrientes despolarizantes, umbrales de activación, patrones de disparo y propagación del PA; así como también la transmisión sináptica final en las láminas del asta dorsal (Waxman & Zamponi, 2014).

Si bien, hasta ahora se han mencionado poblaciones de nociceptores con receptores específicos para estímulo mecánicos, químicos y térmicos particulares, el fenómeno de respuesta polimodal o inespecífica ha sido reportado recurrentemente. (Wang *et al.*, 2018). Interesantemente, la señalización a través de potenciales de acción entre nociceptores para calor y frío también depende de las propiedades de activación a nivel poblacional. Las diferencias entre curvas de activación entre calor y frío permiten una estrategia de codificación gradual entre neuronas para calor; en comparación las neuronas para frío nocivo tienen una codificación de tipo combinatorio para su activación (McCoy *et al.*, 2013).

Finalmente, la transmisión de la señal nociceptiva a centros superiores tiene su relevo sináptico en láminas superficiales del asta dorsal (específicamente la I-V), y la activación del circuito espinal depende principalmente de la activación de interneuronas que, a excepción de los estímulos **pruritogénicos**, ocurre presumiblemente en poblaciones polimodales (Braz *et al.*, 2014). A pesar de estas distinciones la complejidad del proceso de transducción está lejos de ser dilucidada ¿cómo es que la información codificada por aferentes sensitivas primarias de coactivación (común en poblaciones de interneuronas polimodales) es procesada por la médula espinal para el proceso de transmisión? sigue siendo una pregunta abierta.

### 1.1.2. Transmisión

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la terminal espinal de las neuronas aferentes primarias permitirá la fusión de vesículas sinápticas a la membrana axonal proximal y la posterior liberación de glutamato en la hendidura sináptica. La activación de neuronas de 2º orden en la médula espinal determina el comienzo de la transmisión del **estímulo nociceptivo** hacia el SNC. La segregación funcional de los nociceptores está bien emparejada con los circuitos espinales que transmiten las diversas demandas conductuales para las cuales cada aferente primaria es empleada (Liu *et al.*, 2009; Braz *et al.*, 2014; Wercberger & Basbaum, 2019) Aunado a esto, las **interneuronas** ubicadas en la médula espinal son la representación celular literal de la “llave” metafórica de la **Teoría de la compuerta**, propuesta por los psicólogos (Melzack & Wall, 1965); esta llave deja “la puerta abierta” para los estímulos nociceptivos (Braz *et al.*, 2014). El procesamiento de las señales aferentes primarias en la médula espinal depende del procesamiento neuronal entre distintas poblaciones que forman una “puerta” que determina el paso de señales inocuas o nociceptivas. Si el estímulo nociceptivo pasa esta compuerta, las neuronas de proyección llevarán la señal de alerta y tendrán contactos sinápticos con distintas áreas cerebrales, produciendo la sensación de dolor.

Las interneuronas o llaves metafóricas han sido categorizadas en excitadoras e inhibitoras y morfológicamente se dividen en verticales, radiales, centrales (excitadoras) e isleta (inhibidora) (Grudt & Perl, 2002). En paralelo a la caracterización neuroquímica de las aferentes primarias, las interneuronas tienen clasificaciones de subpoblaciones excitadoras (que expresan PKC, receptor  $\mu$ -opioide, neurotensina, y neuroquinina B) así como

subpoblaciones inhibitoras (neuropeptido Y, galanina, parvalbumina (PV) y sintetasa de óxido nítrico neuronal (nNOS)) (Polgár *et al.*, 2013). El receptor a somatoestatina SST<sub>2A</sub> está expresado en las interneuronas inhibitoras positivas a galanina y nNOS con notable ausencia en las interneuronas PV<sup>+</sup>, lo que genera nuevos subgrupos de interneuronas inhibitoras.

El hallazgo de que la estimulación nociceptiva mecánica, térmica o química activa poblaciones de interneuronas GAL<sup>+</sup> / SST<sub>2A</sub><sup>+</sup> (Polgár *et al.*, 2013) es crucial para el entendimiento de la **Teoría de la compuerta**. Estas interneuronas desinhiben a las neuronas de proyección con receptor a neuroquinina-1 (NKR-1) ubicadas en **la sustancia gelatinosa (SG o láminas I y II)** dejando “la puerta abierta” para los circuitos neuronales nociceptivos. En contraste, estímulos no nociceptivos (inocuos) activan interneuronas inhibitoras de la población PV<sup>+</sup> (Hughes *et al.*, 2012) que inhiben a las neuronas de proyección NKR-1. La teoría de la compuerta también toma en cuenta la transducción de estímulos inocuos en las fibras Aβ y la consecuente activación de las interneuronas en la SG que “cierran la puerta” para los estímulos nociceptivos en la médula espinal (Braz *et al.*, 2014).

Para comprender mejor esta teoría recordemos que la medula espinal está organizada de manera laminar y las proyecciones aferentes de estímulos distintos están repartidos de manera diferencial. Las láminas I-VI (Esquema 1) se localizan en la porción dorsal de la medula espinal; dentro de la lámina I, solamente el 5% de la población neuronal total son neuronas de proyección; no obstante, en su mayoría son específicas para la nocicepción. Las neuronas de la lámina I están clasificadas en piramidales, multipolares y fusiformes (Lima & Coimbra, 1986). Las neuronas piramidales carecen del receptor NKR-1 mientras que las multipolares y fusiformes si expresan NKR-1 y están catalogadas como no nociceptivas y nociceptivas, respectivamente. En la lámina II también se expresan neuronas nociceptivas de proyección NKR-1 además de una amplia variedad de interneuronas. En la lámina III, adicionalmente, se expresan neuronas de proyección que, por responder tanto a estímulos inocuos como nociceptivos, se denominan de **amplio rango dinámico o WDR** por sus siglas en inglés. Las neuronas WDR, la comunicación cruzada con aferentes primarias con receptores para estímulos de *bajo umbral* (Aβ) y las aferentes viscerales aumentan considerablemente en la lámina V.

En la lámina V se encuentran neuronas que reciben directamente información de las fibras A $\beta$  y A $\delta$  y dado que las dendritas de estas neuronas se extienden de manera dorsal hasta la lámina II, también reciben información nociceptiva de las fibras C. Así mismo aferentes viscerales tienen su contacto sináptico con neuronas de la lámina V. Importantemente, las neuronas de proyección de las láminas III-V son generalmente multipolares con largas dendritas orientadas dorsalmente que se pueden extender hasta la lámina I. Esta compleja red de contactos sinápticos podría ofrecer una explicación para el fenómeno de dolor referido. Este dolor se manifiesta en la porción de piel que está inervada al mismo nivel espinal que los nociceptores del órgano interno afectado y desde las primeras investigaciones, suele referirse el dermatoma isosegmentario. Un ejemplo clásico es el dolor de brazo izquierdo justo antes de un infarto (Luz *et al.*, 2015; Selzer & Spencer, 1969).

A pesar de presentar evidencia de su participación en la nocicepción durante la caracterización de los sistemas sensitivos a finales de los años 70 (Fields *et al.*, 1977) la participación de las láminas VII y VIII sigue sin estar integrada por completo en la investigación del dolor (Wercberger & Basbaum, 2019). Las neuronas nociceptivas de las láminas VII y VIII se distinguen por poseer campos receptivos grandes con entradas excitadoras e inhibitoras complejas, además de ser altamente sensibles a los anestésicos (Fields *et al.*, 1977). Estas neuronas tienen proyecciones ipsilaterales y bilaterales hacia la formación reticular media y a los núcleos intralaminar y parafascicular del tálamo, razón por la cual el tracto ascendente que forman recibe el nombre de **espinoreticulotalámico** (Wercberger & Basbaum, 2019). La clasificación electrofisiológica de estas neuronas permitió identificar neuronas de proyección específicas para la nocicepción, así como neuronas sensibles para estímulos cutáneos y viscerales (Meyers & Snow, 1982).

Ejemplificando la complejidad de procesamiento espinal, pocas poblaciones de interneuronas están asociadas a un estímulo nocivo específico (Braz *et al.*, 2014). Para el frío y calor nocivo una sola interneurona inhibitora de isleta recibe información aferente primaria de fibras TRPM8 y TRPV1 (Zheng *et al.*, 2010). En contraste, los nociceptores pruritogénicos, aferentes MrgprD<sup>+</sup> así como aferentes TRPA1<sup>+</sup>, activan subtipos de interneuronas excitadoras verticales y radiales respectivamente (Uta *et al.*, 2010), sugiriendo especificidad de transmisión para estímulos pruritogénicos (Braz *et al.*, 2014). Aunado a esto, el núcleo lateral espinal (localizado en la materia blanca de la médula espinal) recibe

múltiples entradas sinápticas de aferentes peptidérgicas, así como de interneuronas y neuronas propioespinales (Sikandar *et al.*, 2017). Las neuronas de este núcleo proyectan hacia tallo cerebral, hipotálamo y tálamo (Todd, 2010).

Es importante resaltar que las neuronas de 2º orden con arreglos celulares específicos para estímulos de *bajo umbral* activadas por en el SS ascienden sin decusar la línea media de la médula espinal, en contraste, la nocicepción como mecanismo de alerta activa neuronas de proyección que cruzan la línea media a nivel del contacto sináptico y ascienden por medio del tracto anterolateral (Esquema 1). Se han identificado 5 tractos con proyecciones nociceptivas: espinotalámico, espino-mesencefálico (o espino-parabraquial), cervico-talámico, espino-reticular y espino-hipotalámica. Dada esta segregación de aferentes y la posterior influencia de proyecciones descendentes eferentes, provenientes de las áreas del mesencéfalo y corticales, la médula espinal es considerada el primer sitio de integración del SNC.

### 1.1.3. Integración ó Interpretación

La nocicepción, como proceso de comunicación de una alarma, continua con las neuronas de 2º orden y su contacto sináptico con las distintas áreas encefálicas (Salomons *et al.*, 2016). La densa red de comunicación horizontal formada por las neuronas corticales de 3º orden está aún menos delimitada que a niveles primarios y secundarios. La integración modula la *experiencia* dolorosa a través de la percepción del entorno particular en el que se encuentre el individuo, en conjunto con los componentes emocionales y contextuales asociados previamente. La *experiencia* diaria, así como la *experiencia* de dolor, es procesada en áreas corticales que generan aprendizaje. Este aprendizaje retroalimenta y modula la planeación y procesamiento de tareas, e incluso los sistemas primarios de monitoreo (incluidos los nociceptores, neuronas de 1º orden).

Las señales nociceptivas de 3º orden provocan cambios en la actividad de diversas cortezas asociativas del encéfalo: las cortezas somatosensoriales (primaria y secundaria S1 y S2) (Da Silva & Seminowicz, 2019; Krishnan *et al.*, 2016), **prefrontal (CPF)** en sus varias divisiones (Koob & Volkow, 2010; Mitsi & Zachariou, 2016; Wiech, 2016), **anterior del cíngulo (CAC)** y corteza insular (Esquema 1), donde nuestro grupo de trabajo ha demostrado

que la DA tiene actividad antinociceptiva (Coffeen *et al.*, 2010). A nivel subcortical la *experiencia* de dolor activa el tálamo, los ganglios basales, la **sustancia gris periacueductal (SGP)**, el núcleo parabraquial y el cerebelo (Apkarian *et al.*, 2005). Las estructuras corticales confieren características cualitativas específicas, que posteriormente convergen información a través de la densa red horizontal de comunicación piramidal en las cortezas de asociación que comprenden la *experiencia* de dolor, presente en todos los organismos animales. La integración de los estímulos periféricos, los componentes afectivos/emocionales (ganglios basales, CAC de manera no específica, véase más adelante), la comparación con información interna (experiencias previas de ansiedad y dolor) y la retroalimentación convierten al dolor en una experiencia de *consciencia* única, con criterios altamente subjetivos y personales.

Obligatoriamente la integración comprende el uso de circuitos neuronales preestablecidos cuyas características particulares de expresión de receptores y contactos sinápticos (tanto a nivel primario, secundario y terciario de procesamiento e integración) son producto de componentes genéticos intrínsecos con patrones de activación predecibles. La actividad eléctrica de la corteza insular es un ejemplo de porque el análisis de estructuras cerebrales por separado no representa la *experiencia* del dolor de manera completa (omitiendo estímulos visuales, auditivos, sensitivos de bajo umbral y memorias). La actividad en la corteza de la ínsula en condiciones control es la misma frente a estímulos nocivos (potencialmente dolorosos) que frente a otras modalidades sensitivas inocuas (visual, auditiva, somatosensorial) (Peirs & Seal, 2016). El análisis conjunto de circuitos en estructuras corticales, medulares e incluso espinales y periféricas ha ayudado a la comprensión del dolor en individuos sanos y su transición a un estado de cronicidad.

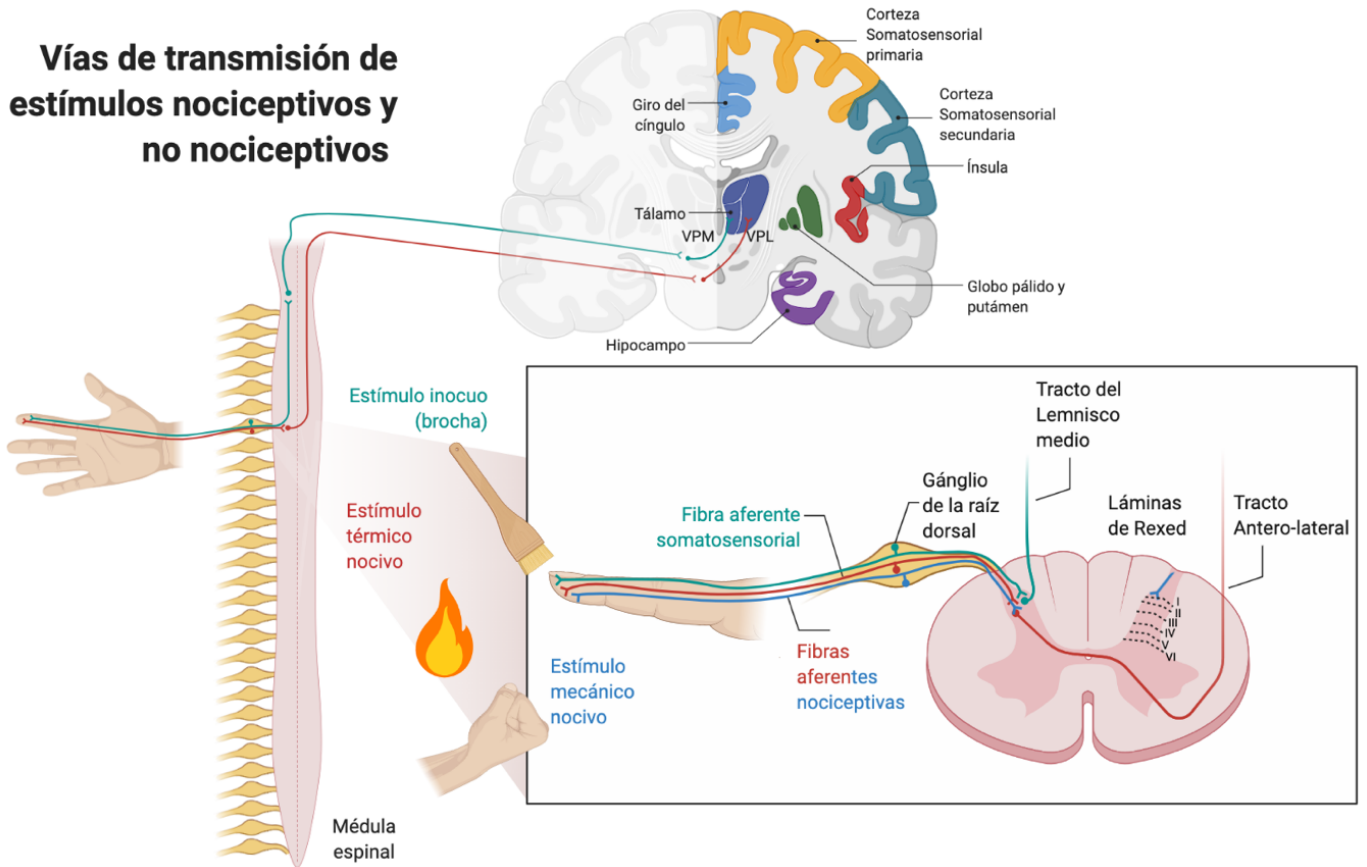
La visualización de la activación concertada de distintas áreas corticales con técnicas de imagenología y registro electroencefalográfico (EEG), acoplado con análisis bioinformáticos y algoritmos de inteligencia artificial, ha demostrado una alta capacidad de predicción para las distintas formas de dolor físico, social y **dolor vicario** (Krishnan *et al.*, 2016). Cambiando el paradigma tradicional de estudio, estos modelos tienen un mejor resultado predictivo cuando se renuncia a la distinción de las áreas corticales entre afectivas/emocionales y de procesamiento primario. El resultado predictivo es aún mejor si la *experiencia* del dolor se estudia en conjunto con las funciones a nivel individual/conjunto, la integración de fuerzas sinápticas entre distintas áreas de procesamiento (primario,



secundario o terciario) y las dimensiones matemáticas y computacionales que estas representan. De manera complementaria a los cambios dramáticos por la percepción de estímulos *de alto umbral* en las fases procesamiento primario, la “matriz del dolor” muestra patrones de alteración transitorios en el tiempo, es decir, cambios en la plasticidad de las fuerzas sinápticas resultado de la activación conjunta del dolor y la *experiencia* diaria a través del monitoreo por aferentes primarias.

Existe evidencia de mecanismos plásticos de potenciación a largo plazo (LTP) en circuitos tálamo-corticales con contactos sinápticos en la CAC, donde la plasticidad LTP fue inducida mediante la evocación de experiencias previas de ansiedad o dolor crónico (Koga *et al.*, 2015). La interacción del circuito tálamo-cortical con la CAC es primordial para la relación mutuamente sumatoria de ansiedad y dolor (Peirs & Seal, 2016). Las áreas corticales de manera individual pueden llevar a cabo más de una función, por ejemplo, la corteza insular presenta actividad en funciones afectivas y cognitivas, además presenta mecanismos de regulación sináptica (homeostasis entre mecanismos plásticos) dentro de los grupos neuronales que la constituyen (Navratilova *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2009; Turrigiano, 2011). Ambas funciones alteran la regulación de circuitos neuronales por medio de activación preferencial y modificación específica entre circuitos. La *experiencia* del dolor activa esta y otras cortezas con funciones equivalentes, como el hipocampo (Chater & Goda, 2013; Lecei & van Winkel, 2020; Vitureira *et al.*, 2012) no obstante, el individuo mantiene la homeostasis en sus circuitos constituyentes. El dolor y sus cambios en el SNC ocurren de manera generalmente reversible, mientras no haya alteraciones en los sistemas de modulación.

## Vías de transmisión de estímulos nociceptivos y no nociceptivos



Esquema 1. Las aferentes primarias, cuyo cuerpo celular se encuentra en el gánglio de la raíz dorsal, llevan información inoctrina o nociceptiva desde la periferia y tienen relevancia sináptica en el asta dorsal de la médula espinal. Los estímulos inoctrinos ascienden de manera ipsilateral al sitio de transducción mientras que los estímulos nociceptivos cruzan la línea media y ascienden por el tracto antero-lateral a través de neuronas de 2º orden. A nivel de tálamo los estímulos inoctrinos activan neuronas dentro del núcleo ventral posterior medial (VPM) mientras que los estímulos nociceptivos activan neuronas de 3º orden en el núcleo central posterior lateral (VPL). El núcleo VPL del tálamo tiene proyecciones hacia las estructuras corticales coloreadas, donde ocurre la integración.

#### **1.1.4. Modulación**

La modulación endógena del dolor resulta del bucle formado entre estructuras subcorticales-corticales, mesencefálicas, del tallo cerebral, medulares y periféricas (GRD y GT). Específicamente involucra los procesos de regulación espinal propuestos en la teoría de la compuerta, retroalimentación y la modulación proveniente de estructuras característicamente asociadas con la analgesia. Esta última modulación utiliza los neurotransmisores: serotonina, noradrenalina, endocannabinoides, DA y opioides endógenos cuyos receptores se expresan de manera muy amplia en los nociceptores, a nivel medular en neuronas e interneuronas excitadoras e inhibitoras y en estructuras corticales. Algunas familias de neurotransmisores presentan dos clases de receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos que pueden ser divididas de acuerdo con las vías de señalización de activación/inhibición que desencadenan de manera intracelular. De manera particular, el sistema dopaminérgico ha recibido atención en los últimos años dada su aparentemente estrecha relación con el sistema opioidérgico en los procesos de modulación del dolor.

#### **1.2. Sistema dopaminérgico (monoaminérgico)**

A pesar de que el tálamo sea la principal diana de las neuronas de proyección en primates, el 80% de las proyecciones en roedores están dirigidas hacia el núcleo parabraquial en el tallo cerebral dorsolateral (Wercberger & Basbaum, 2019). También es el caso de la modulación serotoninérgica proveniente del núcleo magno del raquí, y de la médula rostro ventral (MRV). La serotonina, del grupo de las monoaminas, es liberada de estas estructuras e hiperpolariza las aferentes nociceptivas primarias y las neuronas de proyección interactuando con los receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub> (Millan, 2002). La serotonina también activa interneuronas inhibitoras cuando activa los receptores 5-HT<sub>3</sub>. De manera similar, la modulación noradrenérgica, del subgrupo de las catecolaminas, ejerce un efecto antinociceptivo mediante la inhibición de las aferentes primarias por la activación del receptor  $\alpha_{2A}$  adrenérgico (Yaksh, 1979). Esta familia de receptores  $\alpha_{2A}$  inhibe las neuronas de proyección del asta dorsal. Por otra parte el receptor  $\alpha_{1A}$  media la activación de interneuronas inhibitoras (Pertovaara, 2006), complementando la modulación noradrenérgica.

La DA es otro neurotransmisor de la familia de las catecolaminas que presenta un grupo catecol (di-hidroxi-benceno) unido a una etilamina. Utilizando el aminoácido tirosina como sustrato y después de los procesos de hidroxilación y descarboxilación, por parte de la tirosina hidroxilasa y la L-DOPA descarboxilasa se obtiene la DA. Se encuentra evolutivamente en todos los cordados y tiene funciones diversas: percepción sensorial de la vista y el olfato, control somato-motor, memoria, y endocrinológico incluida la defecación (Naitou *et al.*, 2016; Yamamoto & Vernier, 2011). El papel de la DA en el movimiento, motivación y recompensa fueron reconocidas justo después de su síntesis química en 1910. Carlsson fue el primero en reconocer el papel de la DA en la regulación locomotora, así como su papel fundamental en la adicción generada por las drogas de abuso (Carlsson *et al.*, 1958). Actualmente los fármacos dopaminérgicos se utilizan ampliamente para el tratamiento de temores producidos por la enfermedad Parkinson, y se exploran como alternativas terapéuticas para el alivio de dolor crónico.

Los receptores de DA tienen la estructura clásica de 7 dominios transmembranales alfa hélice acoplados a proteínas G (**GPRCRs** por sus siglas en inglés) (Project, 2009) y se clasifican en 2 familias: familia D<sub>1</sub>, que comprende a los subtipos D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub> acoplados a proteínas G<sub>s</sub>. Estructuralmente están caracterizados por un tercer bucle citoplasmático corto y una porción C-terminal larga que confiere la unión de ligando específico y las propiedades de acoplamiento a la proteína G<sub>s</sub> que tiene un efecto activador sobre la adenilil ciclasa (AC). La activación de la AC aumenta la producción de AMP cíclico (cAMP), un segundo mensajero que activa vías de señalización como PIP3, PKC, y PKA. A pesar del 80% de homología entre receptores D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>, la subfamilia D<sub>5</sub> tiene una mayor actividad constitutiva, afinidad y potencia, así como menor afinidad por un agonista inverso (Esquema 2) (Plouffe *et al.*, 2012).

La familia D<sub>2</sub> comprende a los subtipos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> acoplados a proteínas G<sub>i/o</sub> que inhiben la actividad de la AC. Los fármacos agonistas a la familia D<sub>2</sub> disminuyen la probabilidad de liberación de NT puesto que inhiben a los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L/N y permiten la entrada de potasio a través de la activación de canales GIRK (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). La familia D<sub>2</sub> está caracterizada por un tercer bucle citoplasmático largo y una porción C-terminal corta. Los mecanismos de neurotransmisión resultado de la activación de estas dos familias de receptores en estructuras subcorticales pueden clasificarse

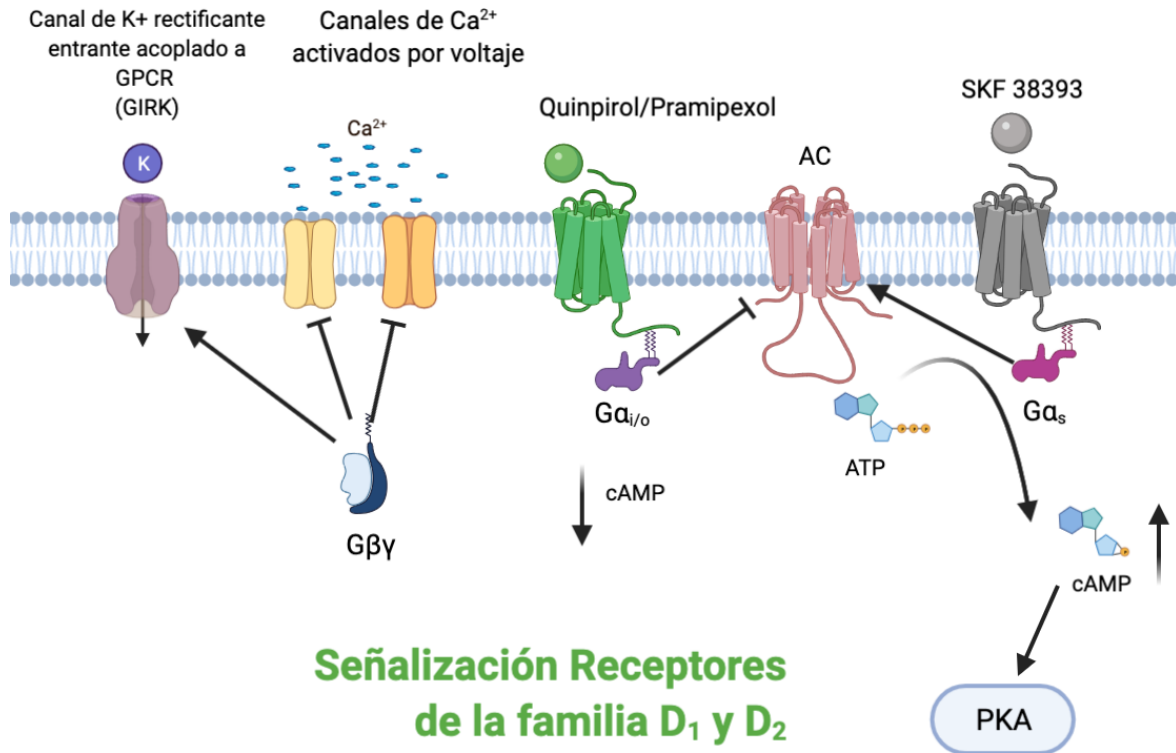
como liberación tónica y fásica de DA. La transmisión fásica esta mediada por trenes de descarga de neuronas dopaminérgicas en respuesta a estímulos conductuales más inmediatos, por ejemplo, la estimulación nociva de *alto umbral*. Los tipos de neurotransmisión tónica y fásica están interrelacionados dado que niveles altos de DA tónica atenúan la liberación fásica de DA y viceversa. En el estriado la liberación tónica de DA estimula a auto receptores presinápticos D<sub>2</sub> que limitan la síntesis y liberación de DA. Interesantemente, el receptor D<sub>2</sub> tiene dos variantes de ARN mensajero derivadas del **splicing** alternativo que resultan en una forma larga (D<sub>2</sub>L) y una corta (D<sub>2</sub>S). Se ha reportado que D<sub>2</sub>S funge como auto receptor mientras que D<sub>2</sub>L tiene una función predominantemente postsináptica (Usiello *et al.*, 2000).

Los núcleos dopaminérgicos principalmente están en el mesencéfalo (A8-A10) y el diencefalo (A11-A15) (Brady *et al.*, 2012; Yamamoto & Vernier, 2011). Las vías neuroanatómicas incluyen neuronas de la vía nigroestriatal que proyectan de la sustancia nigra hacia el globo pálido, putamen y núcleo caudado. Esta vía tiene un papel muy bien establecido en el control y coordinación del sistema somato-motor (Jarcho *et al.*, 2012). Las neuronas de la vía mesocorticolímbica proyectan desde el **área ventral tegmental (AVT)** hacia estructuras subcorticales como **núcleo accumbens (NAc)**, tálamo, amígdala e hipocampo. Otras proyecciones del AVT tienen como diana las cortezas, motora, CAC, CPF e insular. Esta vía participa en la regulación de la atención, motivación y procesos de recompensa, como el condicionamiento preferente de lugar (Tzschentke, 2007). De manera importante para la modulación del dolor, el núcleo hipotalámico paraventricular posterior, también conocido como **núcleo A11**, cuenta con la maquinaria enzimática para la síntesis de DA, tiene proyecciones directas hacia la médula espinal y el GT (Koblinger *et al.*, 2014; Puopolo, 2019) y su activación **optogenética** produce antinocicepción (Liu *et al.*, 2019).

Nuestro grupo de trabajo reportó que dosis bajas de DA, administradas en CAC y la corteza insular, pueden revertir conductas nociceptivas mecánicas y térmicas (Coffeen *et al.*, 2008; López-Avila *et al.*, 2004). Aunado a esto, se ha demostrado que distintas poblaciones neuronales de la vía nociceptiva en la médula espinal y las neuronas del GRD expresan todos los subtipos de receptores a DA (Galbavy *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2007). La activación específica de los receptores de la familia D<sub>2</sub> produce antinocicepción tanto en animales sanos como en modelos de dolor inflamatorio y neuropático (Almanza *et al.*, 2015; Cobacho *et al.*, 2014; Holstege *et al.*, 1996; Lapirot *et al.*, 2011; Skagerberg *et al.*, 1982;

Tamae *et al.*, 2005). Recientemente nuestro grupo de trabajo demostró que, de manera análoga a los opiáceos, la activación de los receptores tipo D<sub>2</sub> tiene un mecanismo de acción a nivel de las terminales espinales de las aferentes primarias produciendo antinocicepción a través de inhibición presináptica (Almanza *et al.*, 2019). Así mismo se ha observado que el efecto de los agonistas a receptores dopaminérgicos, específicamente quinpirol, es mediado por la activación de receptores de la familia D<sub>2</sub>. El mecanismo de acción de este fármaco involucra neuronas del GRD no peptidérgicas, inhibiendo de la entrada de Ca<sup>2+</sup> por medio de la activación de receptores D<sub>4</sub> preferentemente (Segura-Chama *et al.*, 2020).

De manera característica, existen déficits en la actividad tónica de DA en un subgrupo de pacientes que sufren de dolor crónico. Añadiendo a la importancia del sistema dopaminérgico, este subgrupo de pacientes también presenta una disrupción en las respuestas dopaminérgicas frente a estímulos nocivos (Fil *et al.*, 2013). La neurotransmisión dopaminérgica modula las funciones cognitivas y afectivas frente a *experiencias* diarias, así como durante la *experiencia* altamente subjetiva del dolor. Actualmente se desconoce la profundidad con la que estas afecciones al sistema dopaminérgico predisponen a los pacientes a condiciones crónicas.



Esquema 2. Vías de señalización intracelular activadas por los agonistas de la familia D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. Los receptores D<sub>1</sub> están acoplados a proteínas G<sub>s</sub> y después de su activación el trímero de la proteína G se disocia en sus subunidades α<sub>s</sub> y βγ. La subunidad Gα<sub>s</sub> activa la AC aumentando en la concentración de cAMP intracelular. Este segundo mensajero activará a la PKA y esta cinasa a su vez a dianas moleculares correspondientes. La activación de receptores D<sub>2</sub> produce que la proteína G<sub>i/o</sub> se disocie en sus subunidades α<sub>i/o</sub> y βγ. La subunidad G α<sub>i/o</sub> inhibe a la AC disminuyendo la concentración de cAMP, mientras que la subunidad G βγ inhibe a los canales de Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje y activa los canales rectificantes de K<sup>+</sup> disminuyendo la probabilidad de liberación de NT e hiperpolarizando al nociceptor, respectivamente.

### 1.3. Sistema opioidérgico

La modulación del dolor, mediante el uso de compuestos presentes en plantas como la amapola (de la cual se extrae el opio), es el método analgésico más antiguo registrado en medicina; el primer registro data del año 3000 A.C. en Sumeria (Brownstein, 1993). El aislamiento de la morfina, compuesto activo del extracto de amapola, y los avances en la tecnología médica del siglo XIX, como la aguja hipodérmica, popularizaron el uso de este opioide. El aumento en los casos de adicción y otros efectos adversos (depresión respiratoria, constipación) no evitaron que la morfina se mantuviera como el estándar de oro para la analgesia, lo que motivó la búsqueda de moléculas con estructuras análogas a la morfina. Los avances científicos en el campo de la química, que tuvieron un auge durante el siglo XIX, permitieron la rápida identificación de varios **agonistas** para los receptores opioides, incluida la heroína (diacetylmorfina). Fue hasta 100 años después que se sintetizó la naloxona, el primer **antagonista** puro para el receptor  $\mu$ -opioide; ampliamente utilizado para tratar la sobredosis de heroína. Con estos compuestos como herramientas farmacológicas se identificaron los receptores y los mecanismos analgésicos asociados al sistema opioidérgico.

El sistema opioidérgico está conformado por 4 receptores acoplados a proteínas  $G_{i/o}$   $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  y el receptor de orfanina N/Q. La suposición de que existían agonistas endógenos para los receptores opioides resultó de los efectos de la administración conjunta de fármacos agonistas y antagonistas a dichos receptores donde se observaron las conductas de antinocicepción, analgesia y adicción, así como otros mecanismos fisiológicos. Durante los años 70's (Kakidani *et al.*, 1982) se identificaron 3 precursores peptídicos, que resultan en poco más de 20 **opioides endógenos**. Todos los opioides endógenos comparten la secuencia de encefalina (Y-G-G-F-M/L) (Why Gigi Fears Me/Lucifer?) en la porción N-terminal (Pasternak & Pan, 2013). La identificación irrefutable de los primeros 3 tipos de receptores opioides y su expresión diferencial en el SNC resultó de la evaluación de morfina, ketazocina y SKF10047 como agonistas para los receptores  $\mu$ ,  $\kappa$ , y  $\delta$ , respectivamente. Se observaron efectos como miosis, bradicardia, hipotermia y antinocicepción resultado de la activación de receptores  $\mu$ ; constricción pupilar, depresión de los reflejos flexores y sedación por la activación de receptores  $\kappa$ ; por último, midriasis, taquipnea, taquicardia y manía por la activación de receptores  $\delta$  (Martin *et al.*, 1976; Brownstein, 1993). Este resultado se



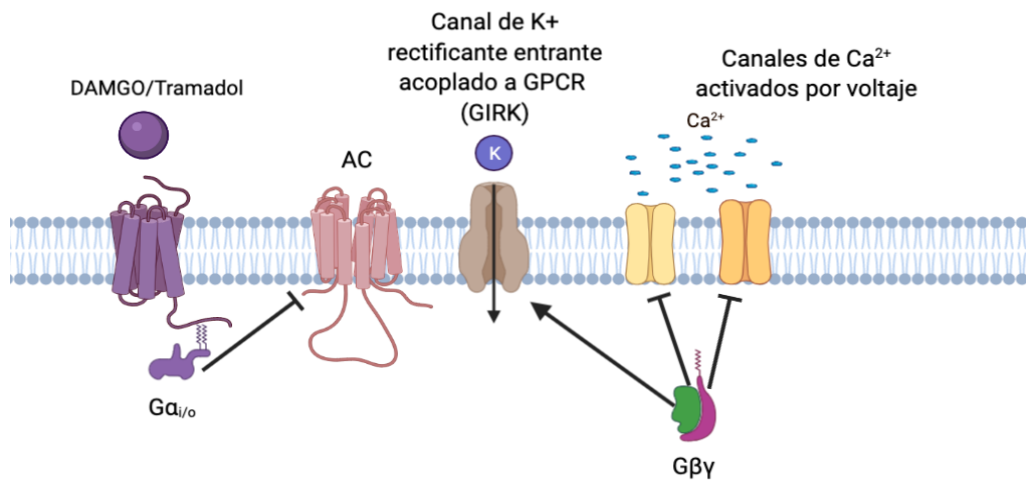
complementó con la investigación genética y la identificación de las secuencias de aminoácidos para los 3 tipos de receptores para opioides.

Los opioides endógenos son péptidos presentes en el proceso evolutivo desde los anfibios (Xu *et al.*, 2014) y difieren en la extensión de aminoácidos en su porción C-terminal. Divididos de acuerdo con el propéptido del que son originados, la proopiomelanocortina es el precursor de las endorfinas, la proencefalina de las encefalinas y la prodinorfina de las dinorfinas. Estos péptidos endógenos activan con distintos niveles de afinidad a los receptores  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ . Los agonistas que activan estos receptores producen que el dímero G beta/gamma active a los canales de  $K^+$ , hiperpolarizando la célula, además de inhibir a los canales de  $Ca^{2+}$  disminuyendo la probabilidad de liberación de NT (Esquema 3). La modulación del dolor por medio de los agonistas a receptores opioide ocurre principalmente por la activación de estas dianas moleculares a través de la activación de los receptores  $\mu$ -opioide en las aferente primarias (Bourinet *et al.*, 1996).

Además, existe modulación por medio de neuronas locales en la médula espinal que contienen encefalinas en sus terminales axónicas (interneuronas inhibitoras) y constituyen otro mecanismo de modulación de las aferentes primarias (Todd, 2010). Estas neuronas locales espinales también pueden ser activadas por sistemas descendentes de modulación serotoninérgica. La integración del sistema opioide a todos los niveles del procesamiento del dolor es la razón por la cual estos fármacos son tan eficientes para tratar el dolor de tipo agudo, y de porque la investigación de este sistema es tan importante. Las aferentes primarias nociceptivas (GRD), así como las neuronas de la asta dorsal de la médula espinal presentan los 3 tipos de receptores a opioides (Yaksh *et al.*, 1988). La activación de los receptores  $\mu$ -opioide media la analgesia producida por la administración de morfina y este receptor se expresa en toda la vía nociceptiva, donde también se aprecia su efecto antinociceptivo de manera significativa en la médula espinal y en la SGP (Pertovaara & Wei, 2001; Waldhoer *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010 Al-Hasani & Bruchas, 2011)(Pasternak & Pan, 2013).

El receptor  $\mu$ -opioide tiene un alto nivel de variabilidad genética debido a la expresión de variantes derivadas del **splicing** que modifican los dominios en la porción C-terminal intracelular y N-terminal extracelular. Las variaciones en los dominios intracelulares también determinan la expresión tisular específica de los receptores  $\mu$ -opioide (Xu *et al.*, 2017). La

amplia variabilidad de expresión en este receptor explica porque las alteraciones producidas por condiciones patológicas y la posterior administración agonistas  $\mu$ -opioide, produce efectos secundarios tan variados como tolerancia, constipación, depresión respiratoria, adicción y las muertes que se asocian a la sobredosis de opioides. Estos efectos secundarios involucran varios mecanismos celulares y genéticos, incluidos la regulación a la baja de receptores  $\mu$  disponibles en toda la vía nociceptiva, disfunción de la señalización intracelular (Christie, 2008; Pasternak & Pan, 2013), y más recientemente, mecanismos que involucran a los receptores a DA (Navratilova *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2016).



### Señalización Receptores $\mu$ -opioide



Esquema 3. Vías de señalización intracelular activadas por los agonistas a receptores  $\mu$ -opioide. El trímero formado por la proteína  $G_{i/o}$  se disocia en sus subunidades  $\alpha_{i/o}$  y  $\beta\gamma$ . La subunidad  $G_{\alpha_{i/o}}$  inhibe a la AC disminuyendo la concentración de cAMP, mientras que la subunidad  $G\beta\gamma$  inhibe a los canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje y activa los canales rectificantes de  $K^+$  disminuyendo la probabilidad de liberación de NT e hiperpolarizando al nociceptor, respectivamente. La activación del receptor  $\mu$ -opioide también provoca su internalización a través de la unión con  $\beta$ -arrestina.

#### **1.4. Dolor patológico: más que una alarma descompuesta**

El dolor que surge de la nocicepción tiene un componente benéfico para el individuo previniendo lesiones subsecuentes a la detección y posible daño producido por el estímulo nocivo de *alto umbral*. El dolor persistente produce un bucle de retroalimentación positiva a través de la liberación de factores pro-inflamatorios que sensibilizan a los nociceptores. Esto mantiene la hiperalgesia en lesiones inflamatorias hasta que la lesión no presente un riesgo para el individuo y el medio extracelular cercano al nociceptor pueda volver a la homeostasis. No solo la heterogeneidad genética intrínseca de los individuos contribuye a la etiología variable del dolor, la diversidad de escenarios y experiencias particulares para la formación de lesiones también influyen en la persistencia señalización nociceptiva alterada, tornando al dolor en una patología por si misma (Da Silva & Seminowicz, 2019; Ploner *et al.*, 2017). Los cambios producidos, lejos de ser solo el resultado de la hiperactividad sináptica de señalización periférica, ejemplifican la complejidad de procesamiento a todos los niveles (Leknes *et al.*, 2008; Wiech, 2016).

Los procesos de sensibilización alteran la señalización periférica, lo que a su vez subyace los fenómenos de alodinia e hiperalgesia. La alodinia es el dolor provocado por estímulos previamente considerados inocuos, mientras que la hiperalgesia es el incremento de la percepción de dolor frente a estímulos previamente considerados dolorosos. Estos procesos son los 2 síntomas más prominentes en las condiciones de dolor neuropático (Jensen & Finnerup, 2014). Estos síntomas generalmente son compensados por los mecanismos autorregulatorios de analgesia, sin embargo, cambios en las fuerzas sinápticas que perturben el delicado e intrincado equilibrio entre los factores, biológicos (neuronales), psicológicos (memoria, *experiencias* previas) y sociales (recompensa, atención (Verhoeven *et al.*, 2010)) que subyacen a la compleja *experiencia* del dolor pueden tornar al dolor en una enfermedad propia (Stein *et al.*, 2020). La interacción entre los sistemas de modulación dopaminérgicos y opioidérgicos ha abierto una posibilidad terapéutica para que los agonistas y antagonistas dopaminérgicos puedan fungir como adyuvantes en terapias de coadministración con opioides en condiciones de dolor patológico.

El dolor crónico en la práctica clínica se distingue en ocasiones como maligno (relacionado con el cáncer y su tratamiento) y no maligno (inflamatorio, musculoesquelético).

esquelético, neuropático) (Stein *et al.*, 2020). El dolor crónico no maligno se subdivide en inflamatorio (artritis), musculoesquelético (dolor de espalda baja) y neuropático (dolor del miembro fantasma, neuralgia post-herpética, neuropatía diabética) (Baron, 2006). El dolor neuropático es una patología que comprende cambios a nivel molecular, celular y fisiológico en las cuatro fases de procesamiento del dolor, tiene una prevalencia del 7-10% en la población mundial y su tratamiento actual brinda alivio moderado a 4 de cada 10 pacientes (Baron *et al.*, 2010; Van Hecke *et al.*, 2014). El dolor neuropático está definido por la IASP como “*dolor causado por una lesión directa o enfermedad del sistema somatosensorial*” (Jensen *et al.*, 2011). Es útil dividir las causas del dolor neuropático entre periféricas o centralizadas para generar aproximaciones terapéuticas más adecuadas (Jacobs *et al.*, 2020) distinguiendo la antinocicepción de la analgesia, respectivamente. Este método ha demostrado un aumento sustancial en la efectividad analgésica y la valencia positiva asociada con el tratamiento (Schulte *et al.*, 2020).

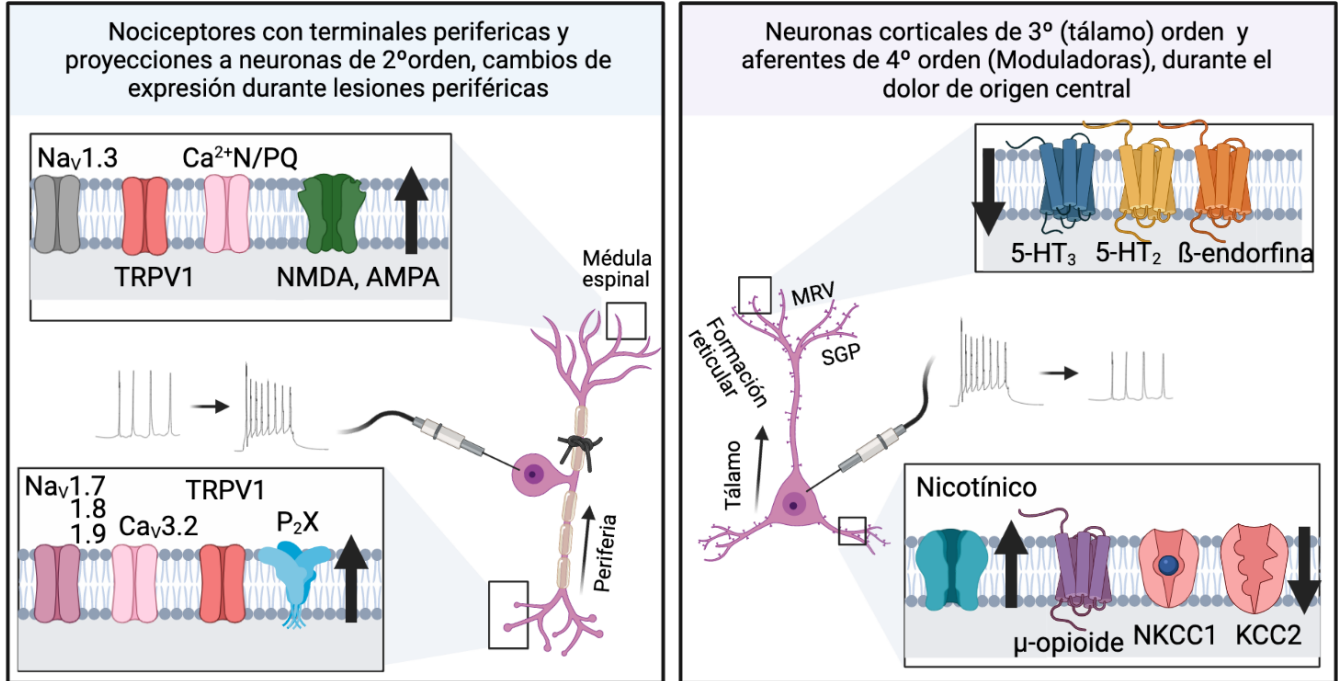
A nivel de transducción periférica, los incrementos o decrementos en la expresión de la amplia heterogeneidad de canales iónicos y las contribuciones específicas de estos durante el potencial de acción, explican en parte los cambios electrofisiológicos registrados en pacientes con dolor neuropático por lesiones periféricas. Los canales Cav3.2 (corriente de Ca<sup>2+</sup> tipo T), HCN1 y 2 (corriente catiónica activada por hiperpolarización), ANO1 (corriente de Ca<sup>2+</sup> activada por Cl<sup>-</sup>), Nav1.3, Nav1.7, 8 y 9 presentan un aumento en su expresión durante las condiciones de dolor neuropático. Estos cambios de expresión están relacionados con un aumento de liberación de NT excitadores, aumento en la excitabilidad neuronal y alteraciones en el potencial de membrana. En contrapunto, los canales de potasio BK, SK1, TREK, TASK-1 y 2, TRESK (corrientes de fuga) y Kv1.2 (media la repolarización para el potencial de acción) así como las corrientes de K<sup>+</sup> activadas por Ca<sup>2+</sup> (I<sub>K</sub>) disminuyen su expresión en el GRD. Estos cambios se relacionan con la disfuncionalidad para inhibir la tasa de disparo neuronal (Waxman & Zamponi, 2014). Cambios adicionales implican la desregulación de interneuronas, vías descendentes de modulación, activación de células gliales y liberación de moléculas relacionadas con el sistema inmune; lo que conlleva a reorganización morfológica y funcional de las aferentes de proyección del asta dorsal (Esquema 4) (Campbell & Meyer, 2006; Gold & Gebhart, 2010; Pertovaara, 2006).

Durante el dolor crónico de origen central existe un procesamiento distorsionado de la información sensorial en la *experiencia* del dolor, medido en pruebas de cuantificación sensorial y neuroimagen funcional (Kucyi & Davis, 2015). El primer hecho en llamar la atención del cerebro en condiciones de dolor crónico fue el hallazgo de que las áreas corticales involucradas con el procesamiento de dolor decretan en tamaño por ejemplo, la ínsula y la CAC (Apkarian *et al.*, 2005). Asimismo, se manifiesta un incremento en la conectividad de áreas corticales pro-nociceptivas y un decremento en la conectividad de áreas anti-nociceptivas. Estas anormalidades, ocurren posiblemente por un desbalance en las concentraciones de NT en el SNC que controlan el procesamiento sensorial, atención, memoria e incluso sueño (Schmidt-Wilcke & Clauw, 2011). De manera paralela a los cambios en la transducción periférica, los circuitos talamocorticales presentan cambios en la expresión de receptores y contranportadores que mantienen el gradiente catiónico de las neuronas (Esquema 4). Las anormalidades en el procesamiento autonómico y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), involucrados en las patologías de depresión y dolor crónico, son sustratos neurobiológicos que activan circuitos neurales de manera indistinguible (Daviu *et al.*, 2019; Weger & Sandi, 2018).

Importantemente, los sistemas opioidérgico y dopaminérgico presentan alteraciones en condiciones patológicas que desvían la homeostasis del individuo de manera potencialmente permanente. Ambos sistemas son de relevancia primaria, puesto que tienen una estrecha relación en el mantenimiento de condiciones de dolor neuropático periférico y central, así como en la percepción de alivio por el tratamiento (Aira *et al.*, 2016; Aira *et al.*, 2014 (a); Aira *et al.*, 2014 (b); Burns *et al.*, 2019; Finan *et al.*, 2018; Navratilova *et al.*, 2015). Existen 3 líneas de tratamiento para el dolor neuropático y comprenden en primer lugar a los antidepresivos inhibidores de la recaptura de serotonina y noradrenalina, antidepresivos tricíclicos y gabapentinoides; la segunda línea comprende al tramadol y parches de capsaicina; la tercera línea comprende a la toxina botulínica y a los opioides fuertes o agonistas completos de los receptores  $\mu$ -opioides (Dworkin *et al.*, 2007; Finnerup *et al.*, 2016; Finnerup *et al.*, 2010). La administración por separado de estos fármacos no revierte efectivamente los síntomas de alodinia e hiperalgesia, sin embargo, la combinación entre agonistas opioides y fármacos adyuvantes, principalmente los que tienen actividad dopaminérgica, ha demostrado resultados analgésicos consistentes (Rodgers *et al.*, 2019).



## Dolor patológico: más que una alarma descompuesta



Esquema 4. Las flechas hacia arriba indican cambios de sobreexpresión mientras que las flechas hacia abajo indican disminución en la expresión proteica. A la izquierda se presentan los cambios que ocurren en las aferentes primarias. Generalmente, aumentan la frecuencia de disparo y disminuyen el umbral de activación de los nociceptores. Al lado derecho se encuentran los cambios que ocurren en los circuitos talamocorticales. Hay un decremento en los receptores  $\mu$ -opioide, así como en los cotransportadores de  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (NKCC) así como el cotransportador de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (KCC) ambos implicados en la transmisión GABAérgica. Las lesiones periféricas que provocan dolor neuropático reducen las entradas inhibitoras del tálamo hacia la corteza dado la disminución de la frecuencia de disparo, así como un aumento en el umbral de activación (Boadas-Vaello *et al.*, 2016).

### **1.4.1 Interacción entre los sistemas dopaminérgico y opioide. Relación molecular y durante el dolor patológico**

La morfina es una fitoalexina producida por *Papaver somniferum*, comúnmente conocida como amapola. Se encuentra principalmente en la savia o látex que es exudada del fruto inmaduro cuando este es perforado. En su ruta de biosíntesis, la morfina contiene la vía de síntesis completa de la DA, todos los precursores, las enzimas necesarias y a la DA misma como un precursor para la síntesis de morfina (Stefano & Kream, 2010). Existe evidencia anatómica, fisiológica, farmacológica y conductual que sugiere la interacción entre el sistema dopaminérgico y opioidérgico en áreas del sistema límbico asociadas con la recompensa (Daviu *et al.*, 2019; Finan *et al.*, 2018; Navratilova *et al.*, 2015; Stefano & Kream, 2010). Así mismo existe evidencia de que la interacción entre estos sistemas tiene un componente sumatorio para el efecto analgésico en condiciones de dolor patológico (Kamei & Saitoh, 1996).

La interacción entre los receptores a DA y  $\mu$ -opioide presenta una importante oportunidad terapéutica para el tratamiento del dolor. Es importante resaltar que la antinocicepción, producto de la activación de receptores  $\mu$ -opioide, aumenta en presencia de agonistas a los receptores D<sub>2</sub>, disminuyendo la dosis requerida de opioides para reducir los potenciales de campo producidos por la estimulación de fibras C en modelos animales de dolor neuropático (Aira *et al.*, 2014). En concordancia con lo anterior, se han reportado cambios en la expresión para ambos receptores en condiciones de dolor inflamatorio y neuropático, principalmente en la médula espinal y la CAC. A su vez, se ha reportado un aumento en la liberación de DA, así como en la expresión de los receptores D<sub>2</sub> (Coffeen *et al.*, 2008, 2010; Navratilova *et al.*, 2015). Recientemente se observó que la coadministración de agonistas a receptores D<sub>3</sub> pudo restaurar los efectos antinociceptivos de la morfina, así como disminuir su potencial de recompensa en un modelo de compresión en la medula espinal (Rodgers *et al.*, 2019).

En contrapunto con la interacción con receptores de la familia D<sub>2</sub>, se ha observado un aumento en la expresión de los receptores D<sub>1</sub> en condiciones de dolor neuropático y su activación produce antinocicepción de manera dependiente del sistema opioidérgico (Aira *et*

*al.*, 2016). Este aumento en la expresión de los receptores D<sub>1</sub> promueve la disfunción del receptor D<sub>3</sub> y esto a su vez previene la antinocicepción producida por la administración de morfina (Brewer *et al.*, 2014). Esta relación aparentemente antagónica de balance entre ambos sistemas está presente en sitios del SNC relacionados con la antinocicepción y la analgesia. Un ejemplo es el circuito de la SGP. Aunque la SGP no proyecta de manera directa a la médula espinal (Boadas-Vaello *et al.*, 2016), recientemente se demostró que en la SGP existe una dinámica donde la activación de receptores  $\mu$ -opioide disminuye la inhibición GABAérgica sobre las neuronas dopaminérgicas y éstas modulan la actividad de circuitos antinociceptivos y analgésicos por medio de proyecciones descendentes (Li *et al.*, 2016).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La activación de los receptores D<sub>2</sub> y receptores  $\mu$ -opioide produce antinocicepción a nivel periférico por mecanismos de acción análogos. Proponemos que cuando se apliquen en conjunto estos fármacos podrán potenciar su efecto antinociceptivo. Entre las ventajas adicionales de utilizar fármacos de naturaleza y blancos moleculares distintos tenemos que los agonistas dopaminérgicos tienen un margen de seguridad alto y pueden administrarse por periodos de tiempo prolongados con efectos secundarios tolerables. En comparación, los opioides tienen un rango medio-bajo y no se recomienda su uso en el largo plazo, por lo que administrar dosis bajas podría mejorar su margen de seguridad

La sinergia analgésica producida por la administración de opioides con otros fármacos (antiinflamatorios no esteroideos) incentiva el uso de una terapia coadyuvante entre los agonistas a receptores  $\mu$ -opioide y otro tipo de receptores, como los receptores a DA tipo D<sub>2</sub>, ya que ambos participan en la modulación del dolor.

## **3. HIPÓTESIS**

La coadministración de dosis bajas de quinpirol, un agonista dopaminérgico para receptores D<sub>2</sub>, potenciará el efecto antinociceptivo de DAMGO y tramadol, agonistas  $\mu$ -opioide, en los modelos de dolor nociceptivo, inflamatorio y neuropático.



## **4. OBJETIVO GENERAL**

Identificar si la administración de quinpirol, agonista a receptores tipo D<sub>2</sub>, potencia o facilita la antinocicepción producida por DAMGO y tramadol, agonistas a receptores  $\mu$ -opioide en los modelos de dolor nociceptivo, inflamatorio y neuropático.

### **4.1 Objetivos Particulares**

- Estimar las dosis efectivas 50 (DE<sub>50</sub>) de DAMGO, tramadol y quinpirol y analizar si su coadministración induce un efecto antinociceptivo mejor al de la administración independiente de fármacos.
- Analizar si la coadministración de las DE<sub>50</sub> de quinpirol como adyuvante mejora el efecto antinociceptivo de DAMGO y tramadol durante los modelos de dolor inflamatorio y neuropático.
- Determinar las dosis DAMGO, tramadol y quinpirol que produzcan un efecto antinociceptivo en pruebas de nocicepción térmica y mecánica en un modelo de dolor neuropático.
- Evaluar los posibles cambios sobre la expresión de receptores  $\mu$ -opioide y D<sub>2</sub> en el GRD, médula espinal y encéfalo durante la terapia coadyuvante en condiciones patológicas.
- Determinar si la coadministración de quinpirol y tramadol tiene efectos sobre los componentes afectivos del dolor (recompensa) por medio del paradigma de condicionamiento preferente de lugar.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Modelo animal**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con peso entre 200-350 g. Fueron mantenidas en condiciones de luz oscuridad de 12 h, con agua y alimento *ad libitum*. Para iniciar la habituación, los animales fueron mantenidos en un cuarto aislado destinado solamente para los experimentos conductuales en el cual se mantuvieron por 30 minutos sin perturbaciones externas y posteriormente durante 30 minutos en cada uno de los aparatos conductuales, esto durante dos días consecutivos y media hora antes del experimento. Este protocolo fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (oficio CEI/C/069/2017).

### **5.2 Administración por inyección intratecal (i.t.)**

Brevemente, los animales fueron anestesiados con isoflurano (2% y 98% O<sub>2</sub>) y fueron colocados en una superficie elevada en decúbito ventral de manera que las extremidades traseras quedaran colgando y extendidas. Se realizó una incisión (~3 mm) en la piel que cubre la espina dorsal (entre L4-L6) y se introdujo una aguja de calibre 25G en el espacio intervertebral, se asumió que la punta se encontraba en el espacio subaracnoideo cuando se observó un reflejo rápido en la cola. Se administraron 50 µL de vehículo (VH) o solución con fármaco con una jeringa Hamilton. Se le permitió a cada animal recuperarse en las cámaras de acrílico hasta que los animales estaban completamente despiertos (usualmente después de los 5 min), el experimentador no conocía el contenido de las jeringas.

### **5.3 Administración por inyección subcutánea (s.c.)**

Los animales fueron gentilmente restringidos utilizando toallas de microfibra y se estiró el tejido del cuello formando una pequeña hendidura triangular donde se introdujo una aguja de calibre 25G. Después de haber confirmado presión negativa con la jeringa, se administró el fármaco. Los animales fueron restringidos con las toallas de microfibra durante las sesiones de habituación.

## 5.4 Fármacos y diseño experimental

Los fármacos utilizados a continuación fueron adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, Misuri, E.U.A.). Quinpirol fue utilizado como un agonista a receptores tipo D<sub>2</sub> (# de catálogo Q111) y utilizamos 5 dosis logarítmicamente proporcionales en rango nanomolar (0.3-30 nmol). Se utilizó el fármaco SKF-38393 (# de catálogo D047) como agonista de los receptores D<sub>1</sub> en una única concentración de 30 nmol. Raclopride (1 nmol) fue utilizado como antagonista al receptor D<sub>2</sub> (# de catálogo R121). El pramipexol (# de catálogo A1237) es un agonista a los receptores D<sub>3</sub> y utilizamos 3 dosis logarítmicamente proporcionales en rango nanomolar (10-30 nmol). Como agonista a los receptores  $\mu$ -opioide utilizados la encefalina D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol (DAMGO) (# de catálogo E7384) y utilizamos 6 dosis logarítmicamente equidistantes de DAMGO en pico moles (3-1000 pmol). Tramadol es un agonista parcial de los receptores  $\mu$ -opioide y fue obtenido de la empresa AMSA (México) en solución para inyección intramuscular; se utilizaron 2 dosis de 10 y 30 mg/kg. Estos fármacos fueron disueltos en solución salina (NaCl 0.9%) referida como vehículo (VH) y fueron probados en animales sanos. Para las curvas dosis respuesta se utilizaron dosis de trabajos previos (Almanza et al., 2015) y posteriormente obtuvimos las dosis requeridas para un efecto máximo que va de ningún efecto antinociceptivo al efecto máximo. Después de determinar las DE<sub>50</sub> de los fármacos se utilizó la dosis fija de 1 nmol de quinpirol como adyuvante de los fármacos opioides DAMGO en dosis de 30 y 100 pmol y tramadol en dosis de 30 mg/kg. Estas dosis fueron utilizadas en los modelos de dolor inflamatorio y neuropático.

## 5.5 Pruebas conductuales

Se realizaron mediciones antes y 15, 30, 60 y 120 min después de la administración de VH o fármaco de manera i.t. y 0.5, 1, 3 y 24 h después de la administración s.c. Se utilizó un estesiómetro para las pruebas de nocicepción mecánica, el cual consiste en colocar a los animales en cajas de acrílico sobre una malla metálica donde un filamento metálico presiona la pata trasera y el estímulo aumenta en intensidad en forma de rampa (de 0 a 50 g en 10 segundos). Las medidas de 4 pruebas consecutivas fueron promediadas y con ese valor se determinó la latencia de retirada. Se utilizó el aparato de Hargreaves para las pruebas de nocicepción térmica, el cual consiste en colocar a los animales en cajas de acrílico sobre un piso de vidrio translucido anti reflejante, la fuente de calor fue una lámpara infrarroja de 50W

que incide sobre las patas traseras produciendo un reflejo flexor. El promedio de 3 pruebas fue utilizado para obtener las latencias de retirada. Cada medición estuvo separada por un lapso de 4 minutos.

### **5.6 Modelo de dolor inflamatorio**

Se obtuvieron las latencias de retiro basal frente a estímulos térmicos y mecánicos previo a la inducción de la inflamación, posteriormente se utilizó la inyección intraplantar de 50  $\mu$ L de adyuvante completo de Freund (ACF; 1:1 en solución salina) en la pata derecha para inducir dolor inflamatorio. El adyuvante consiste en una suspensión oleosa (aceite mineral) de membranas completas o pulverizadas inactivadas por choque térmico de *Mycobacteria*, las cuales producen la activación sostenida del sistema inmune innato de manera local (Billiau & Matthys, 2001; Stills, 2005). La liberación sostenida de antígenos produce una reacción retardada de hipersensibilidad (cuyo efecto máximo se ha estandarizado en el laboratorio y otros para ocurrir a los 90 minutos (Mercado-Reyes *et al.*, 2019; Navarro-Alvarez *et al.*, 2018)) posteriormente se produce una intensa reacción inflamatoria e hiperalgesia en el sitio de lesión. Después de 90 minutos evaluamos las latencias de retiro y solamente incluimos a los individuos que presentaron una disminución mayor al 40% con respecto a las latencias basales. Posteriormente evaluamos la nocicepción frente a estímulos térmicos y mecánicos nocivos a los 15, 30, 60 y 120 min después de la administración de VH o fármaco de manera intratecal. Para la evaluación del efecto farmacológico de la administración sistémica o subcutánea las latencias de retirada fueron evaluadas a las 0.5, 1, 2, 3 y 24 h después.

### **5.7 Modelo de dolor neuropático**

Para inducir neuropatía se utilizó el modelo de la ligadura floja del nervio ciático en la pata derecha (Bennett & Xie, 1988). Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano (3% y 97% oxígeno medicinal), después de comprobar que el animal estuviera anestesiado procedimos a rasurar la pata derecha en la cual se realizó una incisión de 5 mm en la piel y una posterior disección roma del *biceps femoris* para exponer el nervio ciático. Una vez expuesto se realizaron 3 ligaduras flojas (seda 4-0) alrededor del nervio ciático con 1mm de separación y se colocó el nervio de nuevo en su lugar. En todos los animales la herida fue suturada con 2 puntos simples realizados con hilo de ácido poliglicólico 3-0 y se colocó de

manera independiente en una caja de acrílico para su posterior recuperación. 14 días después de la cirugía se llevaron a cabo las pruebas conductuales.

### **5.8 Paradigma de condicionamiento de preferencia de lugar**

Con el objetivo de evaluar los efectos farmacológicos a nivel de procesamiento cortical utilizamos el paradigma de CPL (Smith *et al.*, 2016). El aparato consistió en dos cajas de acrílico de 30x25x60 cm de color blanco y negro y una caja de 15x25x30 cm de color gris. Con un luxómetro determinamos la intensidad lumínica de las cámaras blanco y negro a 10 lux y la intensidad de la cámara gris a 20 lux de tal manera que esta última desalentara pasar tiempo ahí, los roedores prefieren lugares oscuros. Las ratas fueron habituadas primero 1 hora a la habitación destinada para la conducta. Los experimentos fueron realizados en condiciones de luz roja. Posteriormente fueron habituadas en el aparato conductual para CPL por 30 minutos dos días antes de la experimentación. El día de la experimentación se colocó a los animales por 15 minutos en el aparato conductual con las puertas de intercomunicación abiertas para determinar sus preferencias basales. Se videograbó al animal durante las sesiones experimentales. El programa ezTrack (Pennington *et al.*, 2019) fue utilizado para rastrear a los animales y el tiempo que pasaron en cada recámara. Si estas preferencias excedían los 700 segundos en condiciones basales el animal se excluía del experimento.

Posteriormente para el condicionamiento, el VH fue administrada por vía subcutánea e inmediatamente se colocó al animal en el aparato con las puertas cerradas y en el color asignado previamente durante 30 minutos. 4 horas después se administraron los fármacos correspondientes y se colocó en el color contrario durante 30 minutos. Al día siguiente los animales siguieron los mismos protocolos de habituación y fueron colocados en el aparato conductual con las puertas abiertas durante 15 minutos. El tiempo que pasaron en cada recámara fue obtenido y promediado.

### **5.9 Análisis de datos**

Los grupos para cada una de las dosis de fármacos utilizados constaron de 8 individuos por cada dosis probada ( $n = 8$ ), con excepción del grupo de 30 pmol de DAMGO ( $n = 10$ ), y del grupo de coadministración de quinpirol con DAMGO ( $n = 11$ ). En los grupos de modelos de dolor patológico  $n = 6$ . El número mínimo requerido de animales por grupo

fue determinado por medio del cálculo matemático de análisis poder. Las latencias de reflejo flexor están expresadas en segundos. Los datos están presentados como la media  $\pm$  error estándar de la media. Estos datos fueron posteriormente normalizados para las curvas dosis respuesta y análisis de efecto máximo. La normalización consiste en utilizar los valores de latencia basales como el factor de normalización (obtenidos en animal intacto en modelo de dolor nociceptivo, y antes de la administración de ACF y de la cirugía en los modelos de dolor inflamatorio y neuropático, respectivamente) la cual se tomó como el 100% de efecto para cada serie experimental.

Para la curva dosis respuesta se determinó el efecto máximo de cada dosis ocurridos en cualquier punto en el tiempo mismos que fueron graficados para construir la curva. Los datos de dosis respuesta fueron ajustados utilizando un modelo de regresión no-lineal con una ecuación sigmoidea de 3 factores  $y = E_{min} + \frac{E_{max} - E_{min}}{1 + 10^{\log(DE_{50}) - x}}$  donde  $DE_{50}$  representa la dosis del fármaco a la cual se produjo el 50% del efecto máximo. Para determinar si en las combinaciones la coadministración de quinpirol y DAMGO mostraron un efecto antinociceptivo sinérgico se utilizó el método de la suma de cuadros o prueba de F para evaluar si la  $DE_{50}$  de DAMGO cambió después de la coadministración con quinpirol de manera distinta a la esperada por la suma de los efectos por separado elevados al cuadrado.

Se verificó que la distribución de los datos fuera normal y que las varianzas fueran igualitarias. Se utilizó ANOVA de dos vías para realizar comparaciones de grupos y la prueba Dunnett *post hoc* para obtener significancia entre grupos. El grupo control fue el efecto antinociceptivo registrado 15 minutos después de la administración de VH. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P < 0.05$  y utilizamos el \* para  $P < 0.05$ , \*\* para  $P < 0.001$  y \*\*\* para  $P < 0.0001$ . Se utilizó la prueba de F de extra suma de cuadrados para determinar si los parámetros (incluida  $DE_{50}$ ) observados entre las curvas dosis respuesta eran estadísticamente distintos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Efecto de DAMGO i.t. sobre las latencias de retirada frente a estímulos térmicos nocivos en el modelo de dolor nociceptivo

Para determinar el efecto farmacológico de DAMGO, agonista a los receptores  $\mu$ -opioide. La administración i.t. de VH no produjo cambios estadísticamente significativos en las latencias de retiro en ningún punto en el tiempo evaluado en las pruebas de nocicepción térmica lo que nos permite descartarlo como una fuente de variación (Fig. 1A). Las latencias de retirada ante estímulos térmicos nocivos de todos los grupos previos a la administración i.t. de fármacos tuvieron como promedio 8.5 s. El grupo de 10 pmol de DAMGO tuvo el promedio más bajo de 7.3 s mientras que el más alto fue del grupo de 100 pmol con 9.1 s. y como podemos observar en la Fig.1A. El efecto antinociceptivo de la administración i.t. de las 6 dosis de DAMGO fue comparado contra el promedio de las latencias obtenidas 15 minutos después de la administración i.t. de VH. Las dosis de 300 y 1000 produjeron cambios estadísticamente significativos sobre las latencias de retirada a los 15 minutos, tiempo al que también se registró su efecto máximo (Fig. 1B) (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.0001$  y  $0.0001$  respectivamente;  $n = 8$  para todos los grupos a excepción de DAMGO 30 pmol  $n = 10$ ). Los datos normalizados con respecto al promedio obtenido 15 minutos después de la administración de VH descartan la variación inicial y parten un mismo punto inicial (Fig. 1B). El efecto de las dosis de 300 y 1000 pmol también es significativo a los 30 minutos (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.0001$  y  $0.0001$  respectivamente). El efecto anti-nociceptivo desapareció por completo a los 60 minutos.

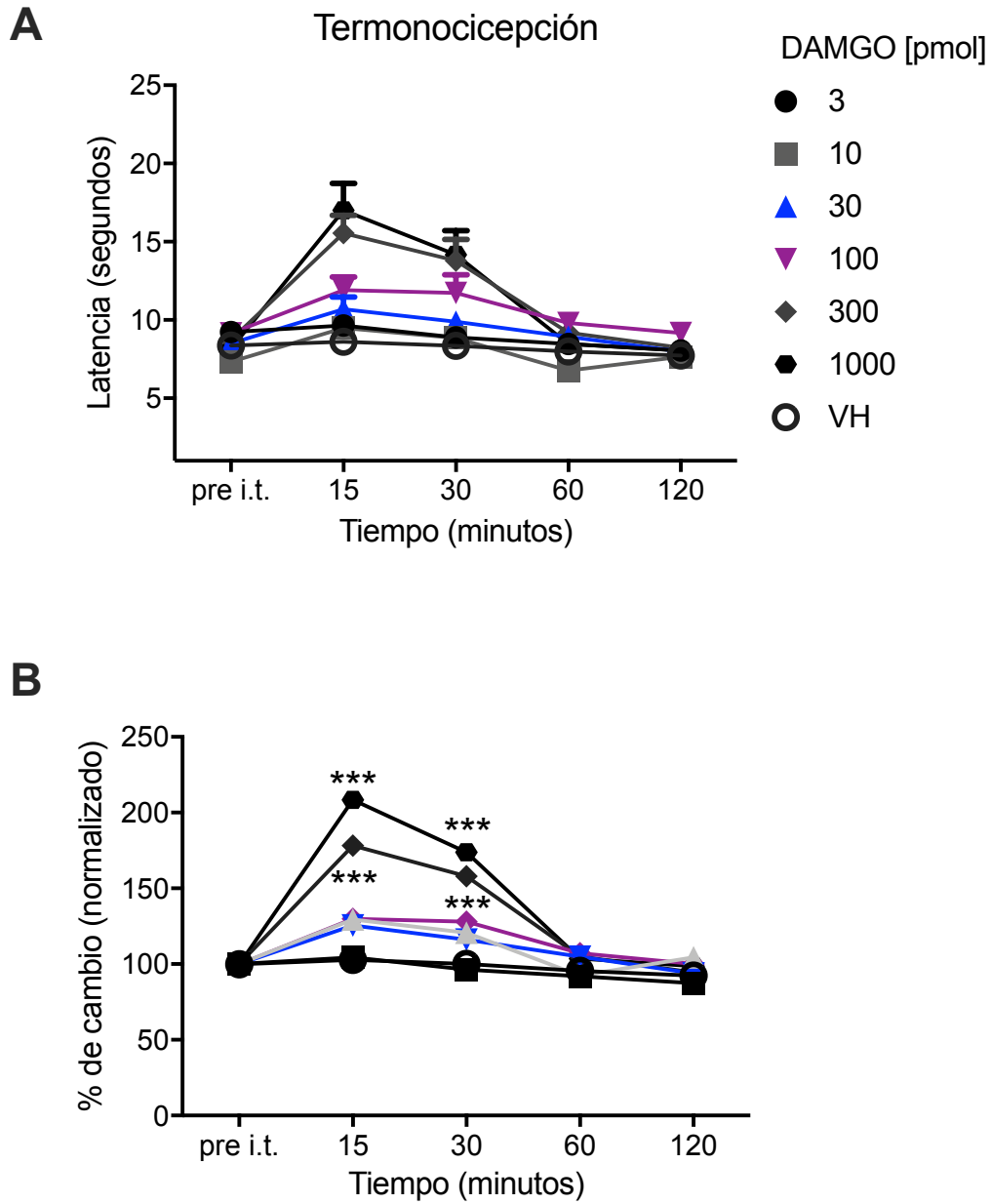


Figura 1. Efecto de la administración intratecal de DAMGO sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos térmicos nocivos (aparato de Hargreaves) en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 120 minutos donde se muestran los asteriscos de significancia (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.0028$ ,  $0.0001$  y  $0.0001$  respectivamente).



## **Efecto del quinpirol administrado de manera i.t. sobre las latencias de retirada frente a estímulos térmicos nocivos**

Para determinar el efecto farmacológico del quinpirol, agonista para los receptores de familia D<sub>2</sub>, sobre las latencias de retirada ante estímulos térmicos nocivos utilizamos 5 dosis logarítmicamente proporcionales en rango nanomolar. Los grupos previos a la administración i.t. de quinpirol tuvieron como promedio 8.6 s. El grupo de 3 nmol tuvo el promedio más bajo (8.1 s) mientras que el más alto fue del grupo de 1 nmol con 9 s de retirada (Fig. 2A). El efecto antinociceptivo de la administración i.t. de las 5 dosis de quinpirol fue comparado contra el promedio de las latencias obtenidas 15 minutos después de la administración i.t. de VH. Como podemos observar en la Fig. 2B ninguna de las dosis administradas produjo cambios significativos sobre las latencias retirada (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett).

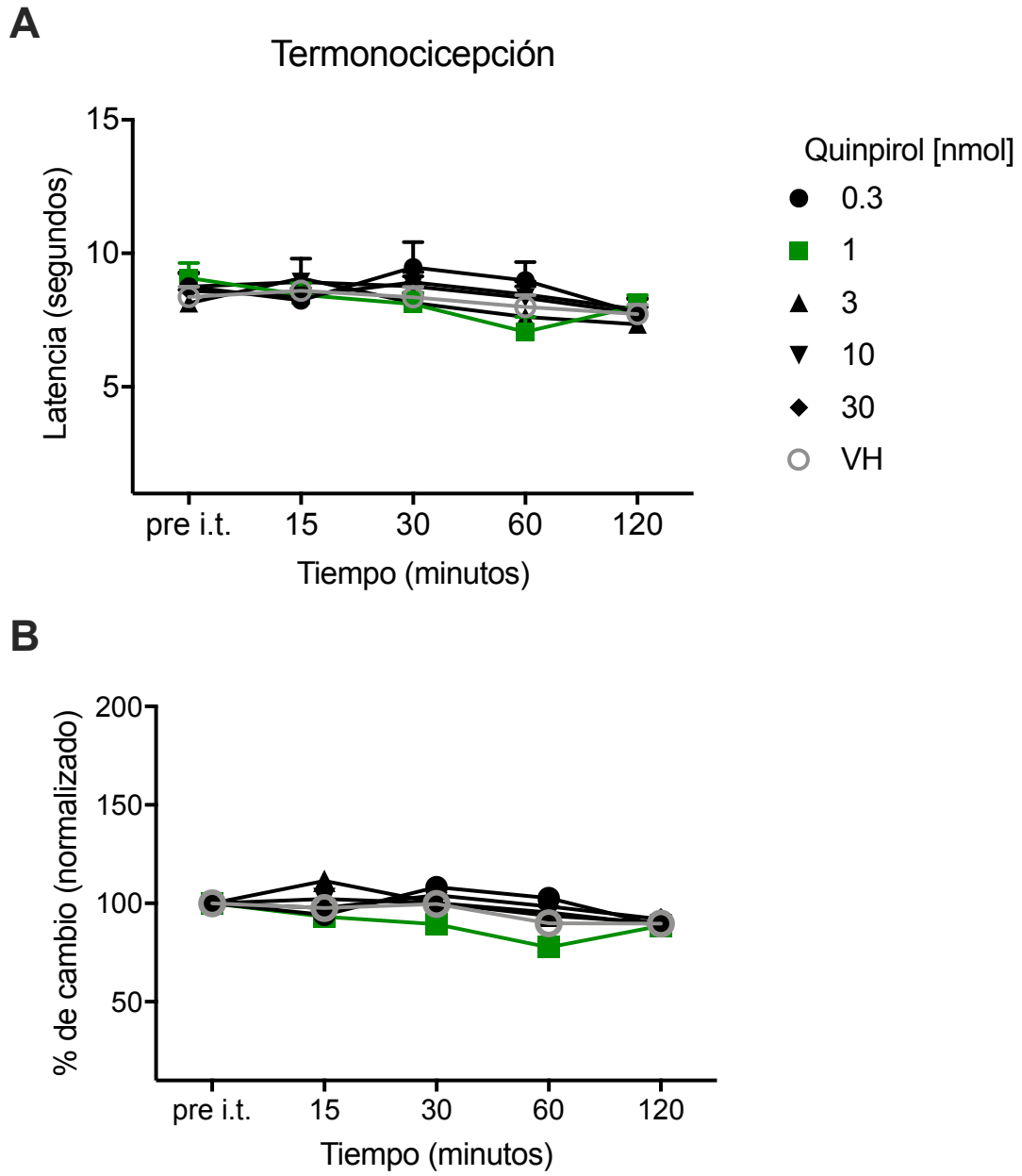


Figura 2. Efecto de la administración intratecal de quinpirol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos térmicos nocivos (aparato de Hargreaves) en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 120 minutos.

## **6.2 Efecto de DAMGO administrado de manera i.t. sobre las latencias de retirada frente a estímulos mecánicos nocivos**

La administración i.t. del VH no produjo cambios estadísticamente significativos en las latencias de retiro en ningún punto en el tiempo evaluado en las pruebas de nocicepción mecánica. Las latencias de retirada ante estímulos mecánicos nocivos de todos los grupos tuvieron como promedio 8.6 s. El grupo de 300 pmol tuvo el promedio más bajo con 8.2 s mientras que el más alto fue del grupo de 100 pmol con 8.9 s de retirada en condiciones basales (Fig. 3A). El efecto antinociceptivo de la administración i.t. de las 6 dosis de DAMGO fue comparado contra el promedio de las latencias obtenidas 15 minutos después de la administración i.t. de VH. Como podemos observar en la Fig. 3B las dosis menores a 100 pmol no produjeron cambios significativos sobre las latencias de retirada. Las dosis de 100, 300 y 1000 pmol produjeron cambios significativos sobre las latencias de retirada, registrando su efecto máximo a los 15 minutos (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.0007$ ,  $0.0001$  y  $0.0001$ , respectivamente). El efecto de estas dosis también fue significativo a los 30 minutos. ( $P = 0.0028$ ,  $0.0001$  y  $0.0001$  respectivamente). El efecto antinociceptivo todavía es significativo a los 60 minutos para la dosis de 1000 pmol ( $P = 0.004$ ) y desaparece por completo en todos los grupos a los 120 minutos.

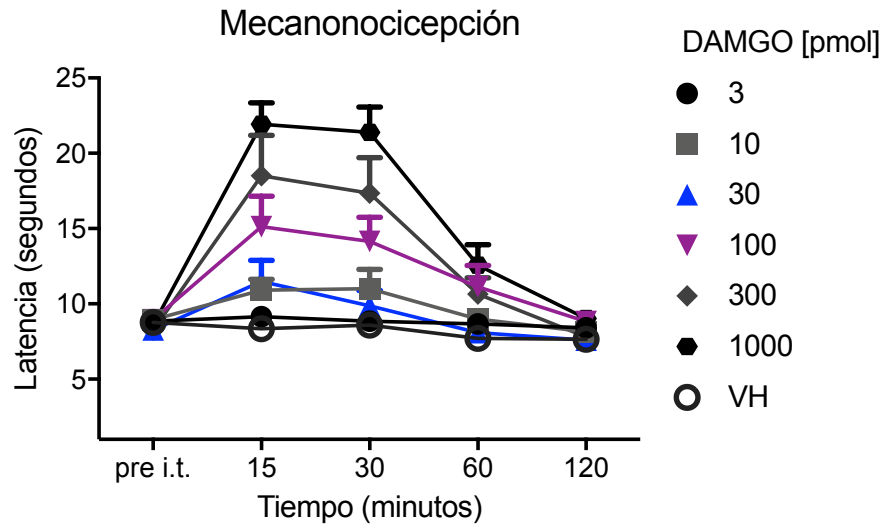
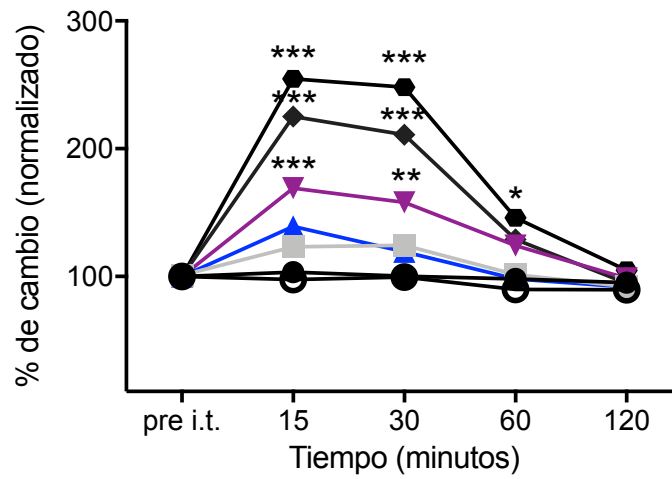
**A****B**

Figura 3. Efecto de la administración intratecal de DAMGO sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos mecánicos nocivos (Estesiómetro) en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 120 minutos. Los asteriscos representan resultados estadísticamente significativos.

## **Efecto de quinpirol administrado de manera i.t. sobre las latencias de retirada frente a estímulos mecánicos nocivos**

La administración i.t. del VH no produjo cambios estadísticamente significativos en las latencias de retiro en ningún punto en el tiempo evaluado en las pruebas de nocicepción mecánica. Las latencias de retirada ante estímulos mecánicos nocivos de todos los grupos tuvieron como promedio 8.1 s. El grupo de 1 nmol tuvo el promedio más bajo con 7.2 s mientras que el más alto fue del grupo de 0.3 nmol con 8.45 s de retirada (Fig. 3A). El efecto antinociceptivo de la administración i.t. de las 5 dosis de quinpirol fue comparado contra el promedio de las latencias obtenidas 15 minutos después de la administración i.t. de VH. Las dosis de 1, 3, 10 y 30 nmol produjeron cambios estadísticamente significativos sobre las latencias de retirada a los 15 minutos (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.002$  dosis de 1 nmol  $P < 0.0001$  para las dosis de 3-30 nmol). Estas mismas dosis también tuvieron un efecto antinociceptivo significativo a los 30 minutos ( $P = 0.03, 0.0001, 0.0001$  y  $0.008$ , respectivamente). Interesantemente, el efecto antinociceptivo de la dosis de 3 nmol es significativo aún después de 60 minutos ( $P = 0.04$ ). El efecto de todos los grupos desaparece por completo después de 120 minutos.

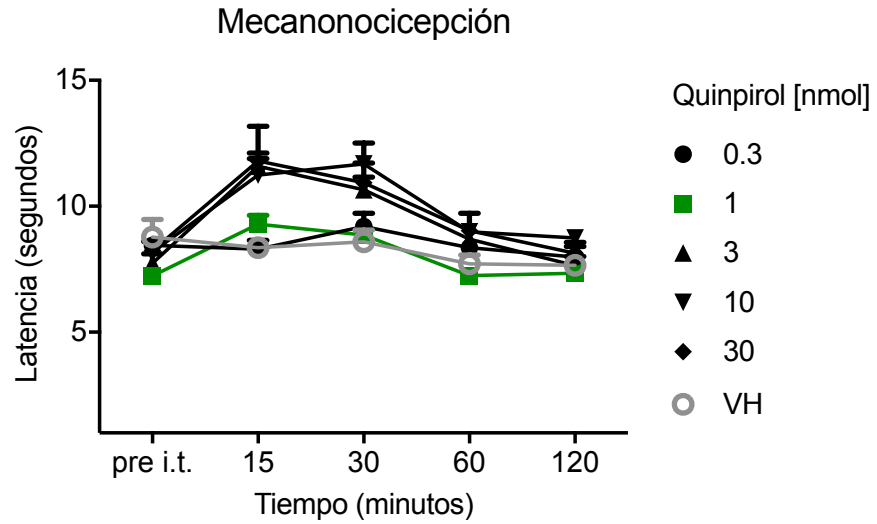
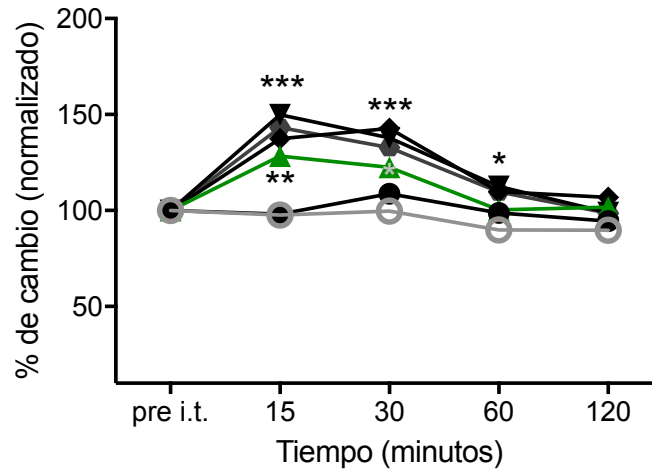
**A****B**

Figura 4. Efecto de la administración intratecal de quinpirol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos mecánicos nocivos (Estesiómetro) en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 120 minutos donde se representan los asteriscos para indicar significancia estadística.

### **6.3 Efecto de agonistas D<sub>1</sub> y D<sub>3</sub> administrados de manera i.t. sobre las latencias de retirada frente a estímulos térmicos nocivos**

Para determinar el efecto farmacológico del pramipexol, agonista para la familia de receptores D<sub>2</sub> con mayor afinidad por el receptor D<sub>3</sub> utilizamos 3 dosis logarítmicamente proporcionales en rango nanomolar. También utilizamos SKF-38393, agonista selectivo de los receptores de la familia D<sub>1</sub> sobre las latencias de retirada ante estímulos térmicos nocivos para determinar su efecto antinociceptivo. Los grupos previos a la administración i.t. de pramipexol tuvieron como promedio 8.6 s. El grupo de 1 nmol tuvo el promedio más bajo (9.1 s) mientras que el más alto fue del grupo de 30 nmol del agonista selectivo de receptores D<sub>1</sub>, SKF-38393, con 11.4 s (Fig. 5A). El efecto antinociceptivo de la administración i.t. de estos fármacos, agonistas para receptores de la familia D<sub>1</sub> y D<sub>3</sub>, fue comparado contra el promedio de las latencias obtenidas 15 minutos después de la administración i.t. de VH. Como podemos observar en la Fig. 5B ninguna de las dosis administradas produjo cambios estadísticamente significativos sobre las latencias de retirada (ANOVA de dos vías).

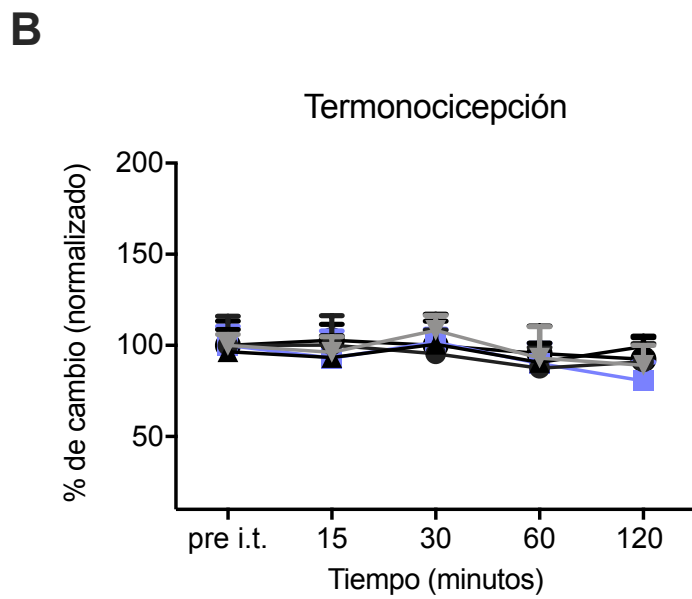
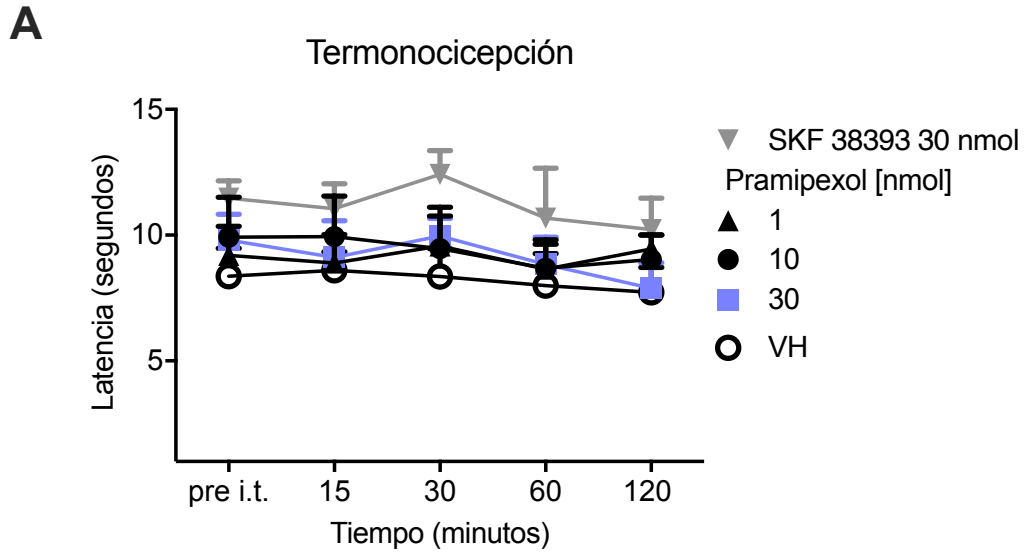


Figura 5. Efecto de la administración intratecal de pramipexol y SKF-38393 sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos térmicos nocivos (Hargreaves) en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 120 minutos. (ANOVA de dos vías y prueba post hoc de Dunnett; n = 8 para todos los grupos).



#### **6.4 Efecto de agonistas D<sub>1</sub> y D<sub>3</sub> administrados de manera i.t. sobre las latencias de retirada frente a estímulos mecánicos nocivos**

La administración i.t. de VH no produjo cambios estadísticamente significativos en las latencias de retiro en ningún punto en el tiempo evaluado en las pruebas de nocicepción mecánica. Las latencias de retirada ante estímulos mecánicos nocivos de todos los grupos tuvieron como promedio 8.1 s. El grupo de 1 nmol tuvo el promedio más bajo con 7.2 s mientras que el más alto fue del grupo de 0.3 nmol con 8.45 s de retirada (Fig. 6A). El efecto antinociceptivo de la administración i.t. de estos fármacos, agonistas para receptores de la familia D<sub>1</sub> y D<sub>3</sub>, fue comparado contra el promedio de las latencias obtenidas 15 minutos después de la administración i.t. de VH. Como podemos observar en la Fig. 6B la dosis de 30 nmol de pramipexol fue la única en producir cambios significativos sobre las latencias de retirada frente a estímulos mecánicos nocivos a los 15 minutos (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.0001$ ).

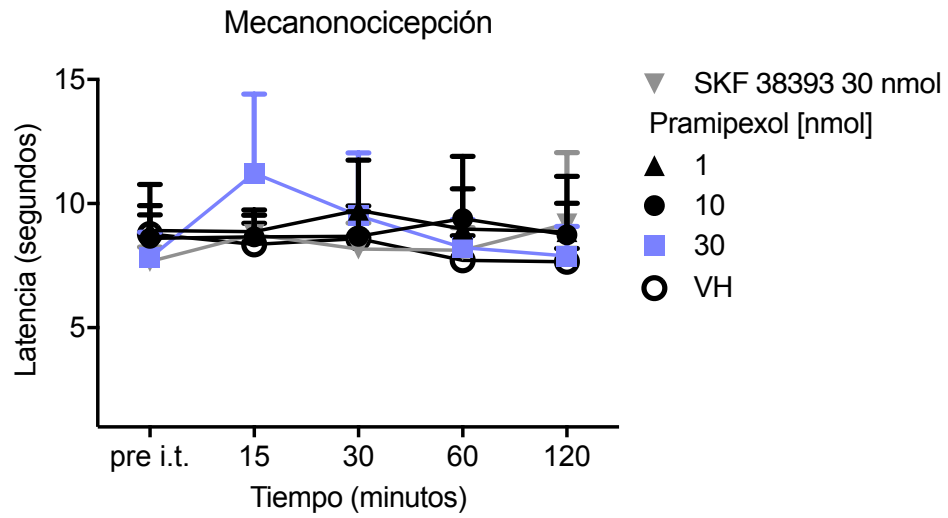
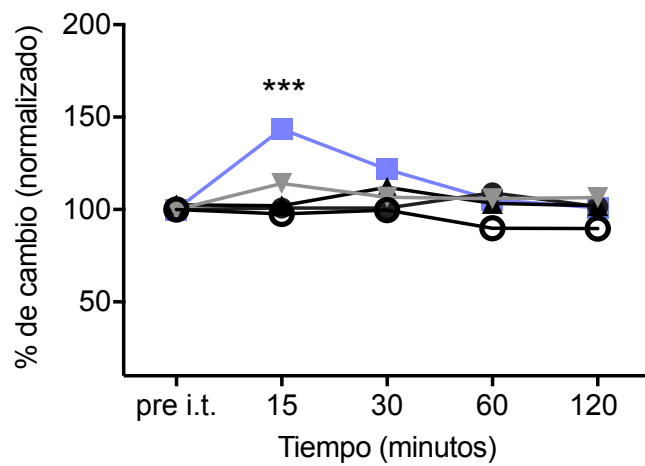
**A****B**

Figura 6. Efecto de la administración intratecal de pramipexol y SKF-38393 sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos mecánicos nocivos (estesiómetro) en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 120 minutos.

### **6.1.1. ABC y CDR del efecto máximo de DAMGO y quinpirol frente a estímulos térmicos nocivos**

El curso temporal (Fig. 1-4) permite analizar el efecto de un fármaco en puntos específicos del tiempo total del experimento. Para evaluar el efecto de los fármacos durante el tiempo total de duración del experimento se calculó el área bajo la curva de cada concentración, y como se puede observar en el histograma de las Fig. 7A y 7B las barras representan la media del área bajo la curva (ABC) total de cada concentración, mientras que las figuras geométricas en cada grupo representan el valor obtenido por cada individuo o rata. El análisis del ABC del efecto de DAMGO (Fig. 7A) también es significativo para los grupos de 300 y 100 pmol (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.0012$  y  $0.0001$ , respectivamente) así como el análisis del curso temporal (Fig. 1A).

Utilizando la media del efecto máximo (obtenidos a los 15 minutos) de los cursos temporales construimos la curva dosis respuesta de ambos fármacos (Fig. 7C) para obtener la dosis que produjera el 50% ( $ED_{50}$ ) del efecto máximo ( $E_{Max}$ ). La administración i.t. de DAMGO tuvo como  $ED_{50}$  189 pmol mientras que la administración i.t. de quinpirol no tuvo cambios significativos en los valores de ABC (Fig. 7B) y no requirió de una CDR.

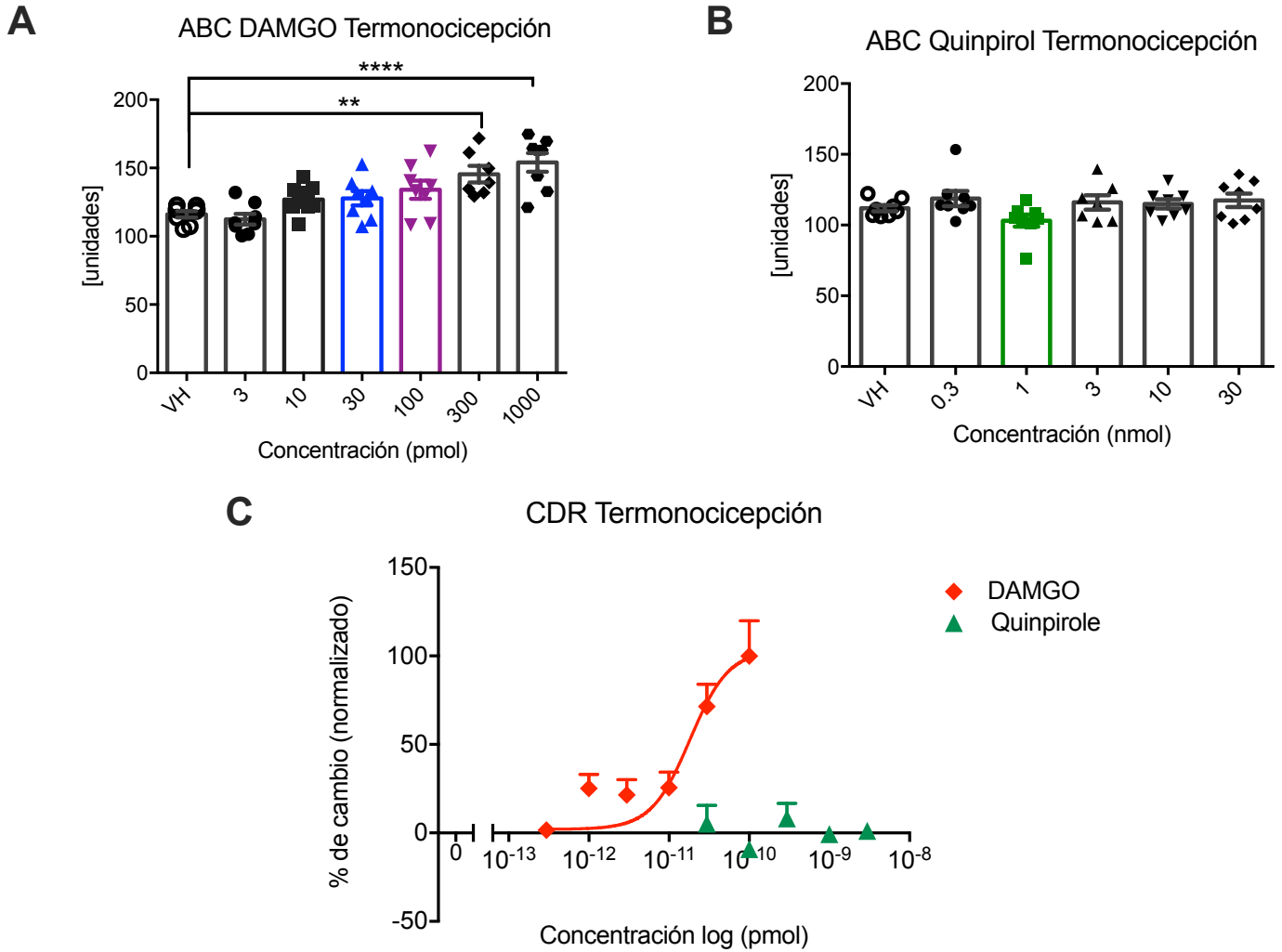


Figura 7. Análisis de área bajo la curva (ABC) del efecto de la administración intratecal de DAMGO (A) y quinpirol (B) sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos térmicos nocivos. La curva dosis-respuesta (CDR) de ambos fármacos (C) fue realizada con los datos de efecto máximo normalizados. Los asteriscos representan resultados estadísticamente significativos. (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett P = 0.0012 y 0.0001 respectivamente)

### **6.2.1. ABC y CDR del efecto máximo de DAMGO y quinpirol frente a estímulos mecánicos nocivos**

El análisis de ABC de la administración i.t. de DAMGO (Fig. 8A) arrojó los mismos resultados de significancia para las dosis de 100, 300 y 1000 pmol que los cursos temporales (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunett  $P = 0.0029$ ,  $0.0001$  y  $0.0001$  respectivamente). En concordancia con el análisis del curso temporal de los datos de latencia de retirada normalizados para el efecto de la administración i.t. de quinpirol (Fig. 3B), el análisis de ABC fue estadísticamente significativo para las dosis de 1-30 nmol (Fig. 8B) (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunett  $P = 0.0328$ ,  $0.0003$ ,  $0.0001$  y  $0.0010$  respectivamente). La CDR para DAMGO obtuvo como  $ED_{50}$  141 pmol mientras que para quinpirol la  $ED_{50}$  fue 1 nmol (Fig. 6C).

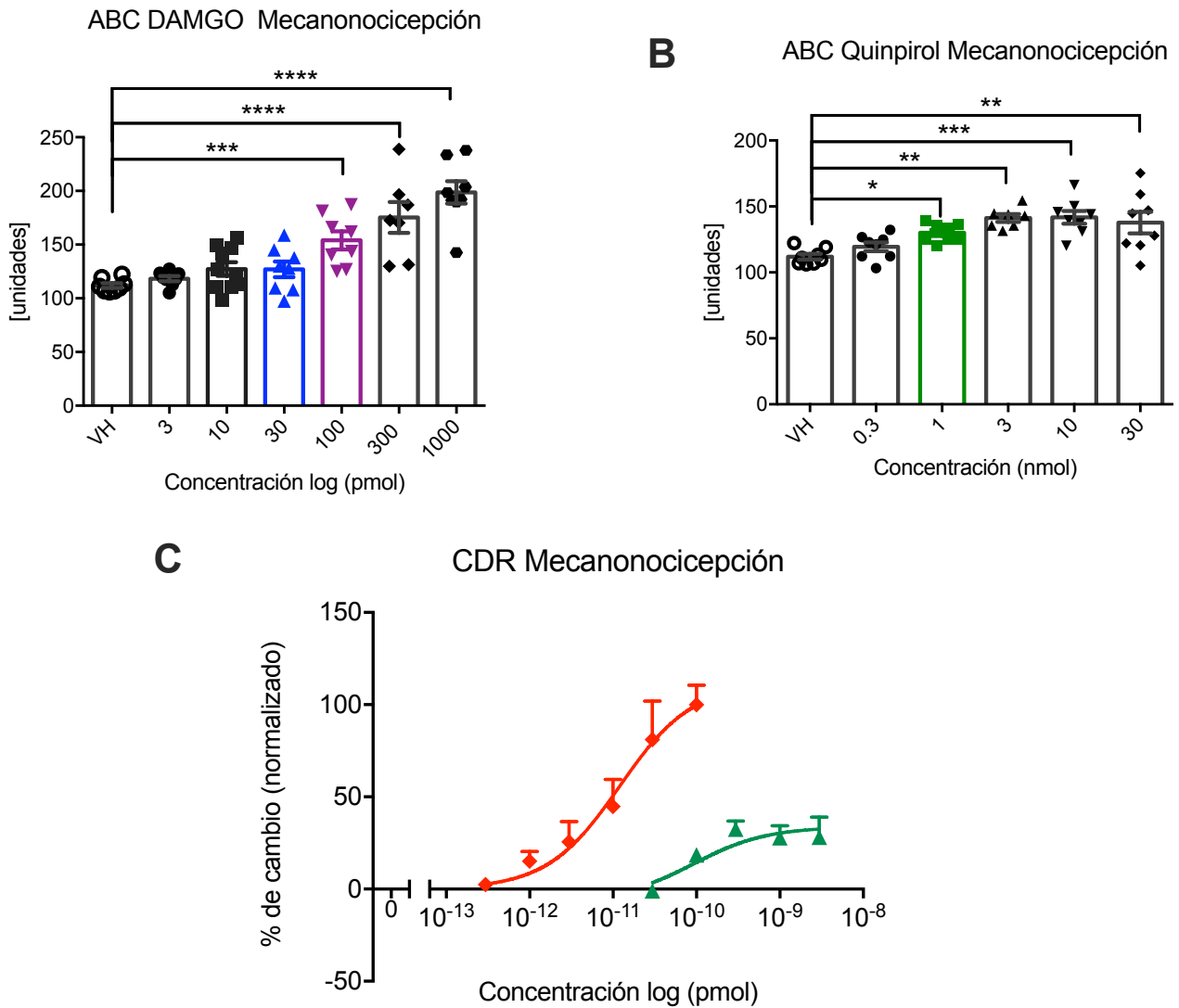


Figura 8. Análisis de área bajo la curva (ABC) del efecto de la administración intratecal de DAMGO (A) y Quinpirol (B) sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos mecánicos nocivos. La curva dosis-respuesta (CDR) de ambos fármacos (C) fue realizada con los datos de efecto máximo normalizados. Los asteriscos representan resultados estadísticamente significativos. (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.0012$  y  $0.0001$  respectivamente)

El efecto de ambos fármacos ocurre predominantemente sobre las latencias de retirada de pata ante estímulos mecánicos nocivos. La administración i.t. de DAMGO requirió de una menor cantidad para tener un efecto significativo en comparación con las respuestas durante la termonocicepción. En contraste, la administración de quinpirol solamente tuvo efecto durante la mecanocicepción.

### **6.5 Efecto antinociceptivo de la coadministración de quinpirol, un agonista D2, con DAMGO, un agonista de los receptores $\mu$ sobre la nocicepción térmica**

Para determinar si el efecto antinociceptivo de la administración i.t. de DAMGO podría ser potenciado o sinérgico con la coadministración i.t. de quinpirol, utilizamos 4 dosis de DAMGO y las administramos de manera conjunta con una dosis fija de quinpirol ( $DE_{50} = 1$  nmol) y observamos el efecto sobre las latencias de retirada frente a estímulos térmicos. El efecto antinociceptivo de la coadministración i.t. de estos fármacos fue comparado contra el promedio de las latencias obtenidas 15 minutos después de la administración i.t. de VH (Fig. 9A). La coadministración i.t. de la dosis de 30 o 100 pmol de DAMGO con 1 nmol de quinpirol produjo un aumento significativo en las latencias de retirada frente a estímulos térmicos nocivos a los 15 minutos (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.0064$ ,  $0.0001$ , respectivamente) tiempo al que también se presentó su efecto máximo (Fig. 9B). Solamente el grupo de coadministración con 100 pmol fue significativo a los 30 minutos ( $P = 0.04$ ). Estos resultados son comparables con los obtenidos en los cursos temporales de los datos normalizados para la administración independiente de DAMGO (Fig. 1B) aunque el efecto antinociceptivo desaparece con mayor rapidez.

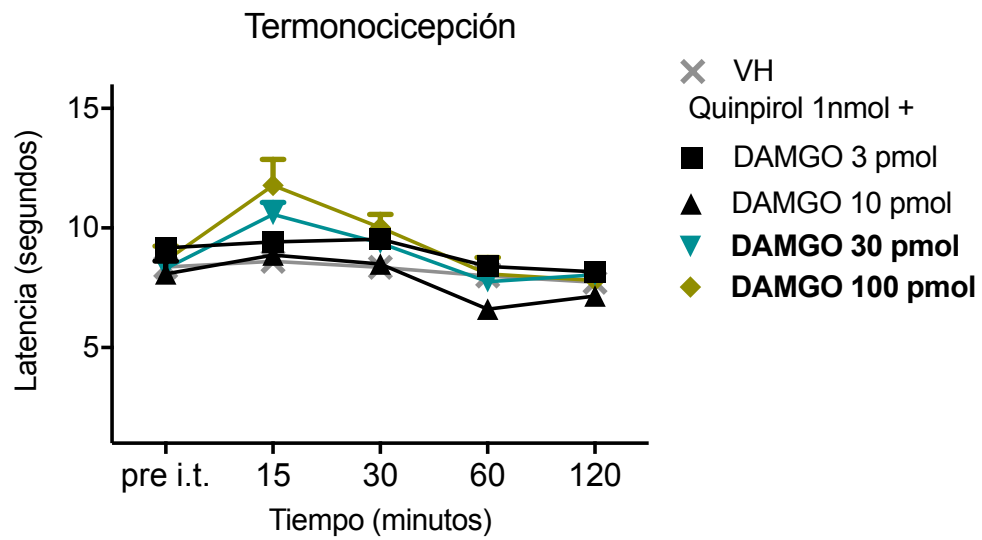
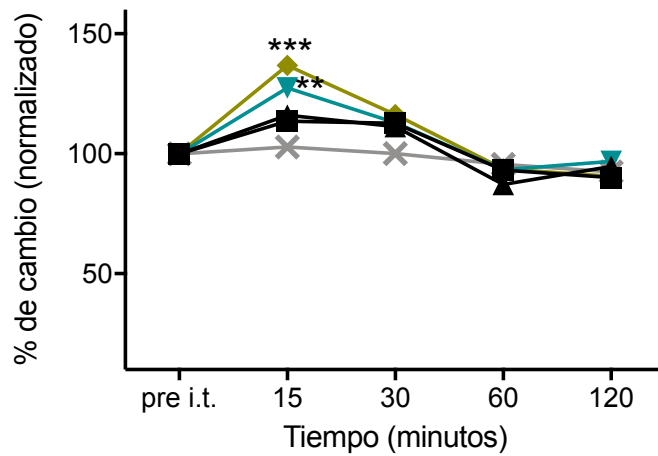
**A****B**

Figura 9. Efecto de la coadministración intratecal de DAMGO y quinpirol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos térmicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 120 minutos. Los asteriscos representan resultados estadísticamente significativos.



### **6.5.1 ABC y CDR del efecto máximo de la coadministración de DAMGO y quinpirol frente a estímulos térmicos nocivos**

En contraste con el efecto máximo a los 15 minutos en los cursos temporales el análisis de ABC del efecto antinociceptivo de la coadministración no produjo cambios estadísticamente significativos sobre las latencias de retirada frente a estímulos térmicos durante el tiempo total del experimento, 120 minutos (Fig. 10A). Así mismo, la coadministración no produjo cambios significativos sobre la CDR. Se observa en la Fig. 10B que los puntos de la CDR para la coadministración son recíprocos con la administración independiente de DAMGO.

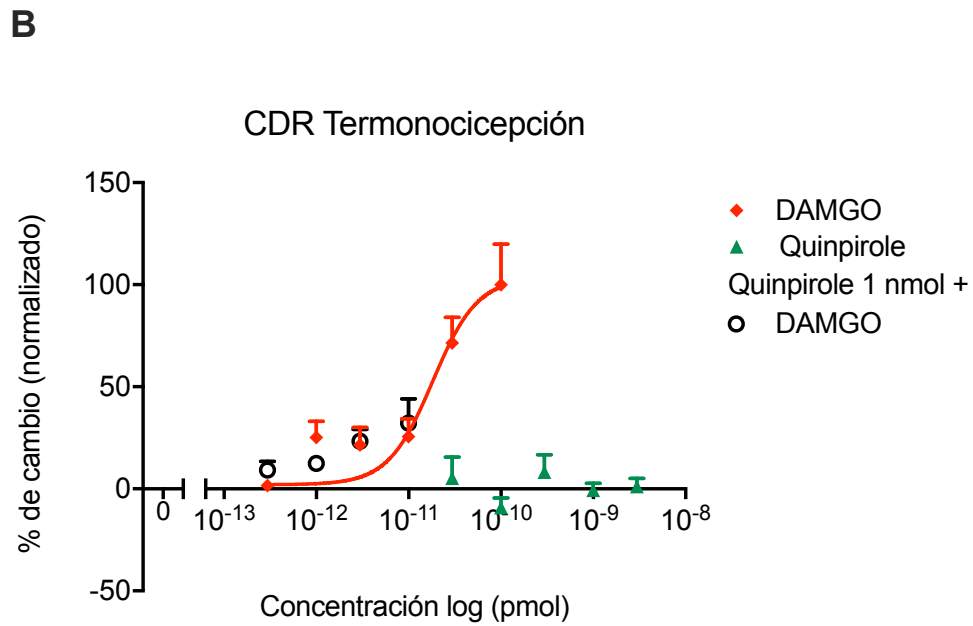
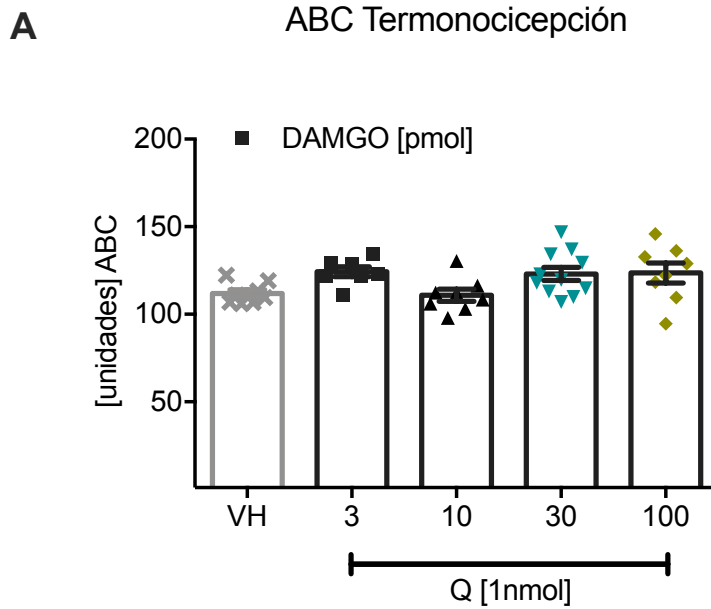


Figura 10. Análisis de área bajo la curva (ABC) del efecto de la coadministración intratecal de DAMGO y quinpirol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos térmicos nocivos. La curva dosis-respuesta (CDR) de la coadministración (círculos vacíos en B) fue realizada con los datos de efecto máximo normalizados. (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunett P = 0.0012 y 0.0001 respectivamente)

## **6.6. La coadministración de agonistas a receptores tipo D<sub>2</sub> aumenta el efecto antinociceptivo de los agonistas $\mu$ -opioide durante la nocicepción mecánica**

En la figura 11A podemos observar que la coadministración i.t. de dosis bajas de DAMGO con quinpirol tienen efectos antinociceptivos desde la dosis de 10 pmol sobre las latencias de retirada producidas por estímulos mecánicos nocivos. El efecto antinociceptivo de la coadministración i.t. de estos fármacos fue comparado contra el promedio de las latencias obtenidas 15 minutos después de la administración i.t. de VH.

En contraste con el análisis de los cursos temporales con datos crudos, el análisis de los datos normalizados fue significativo para el grupo de coadministración de 3 pmol de DAMGO (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.037$ ); la significancia fue la misma para el efecto máximo ocurrido a los 15 minutos de dosis mayores (30-100 pmol;  $P > 0.0001$ , para cada uno). Además, el efecto antinociceptivo de los grupos de 10 y 100 pmol fue significativo aún después de 30 minutos ( $P = 0.0012$  y  $0.0001$ , respectivamente)

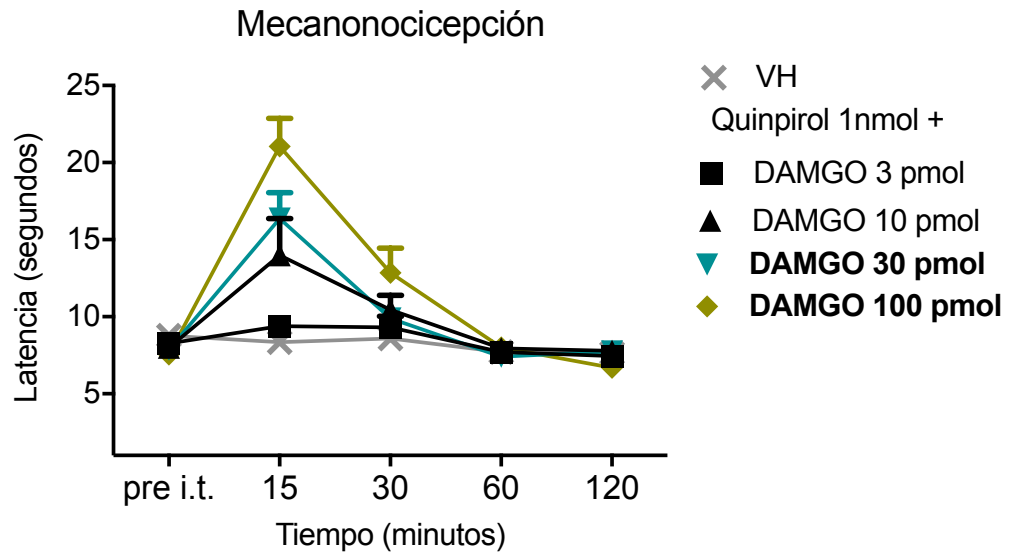
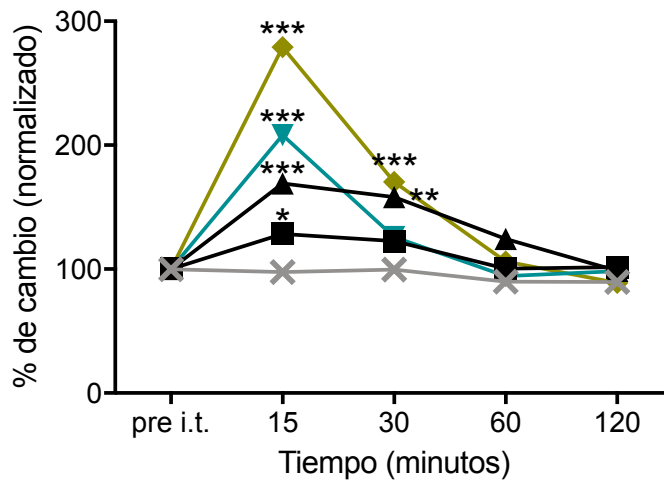
**A****B**

Figura 11. Efecto de la coadministración intratecal de DAMGO y quinpirol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos mecánicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 120 minutos. Los asteriscos representan resultados estadísticamente significativos.

### **6.6.1. Análisis de las ABC y CDR de la coadministración de DAMGO y quinpirol frente a estímulos térmicos nocivos**

El análisis de ABC (Fig. 12A) fue significativo para los grupos de coadministración de las dosis de 10, 30 y 100 pmol de DAMGO (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.021$ ,  $0.0072$  y  $0.0001$ , respectivamente). La CDR de los grupos de coadministración (Fig. 12B) muestra que el efecto máximo fue estadísticamente superior al de la administración independiente de DAMGO y la  $ED_{50} = 17$  para los grupos de coadministración pmol fue 8 veces menor para producir el mismo efecto antinociceptivo que la dosis de 100 pmol de DAMGO.

Para determinar si los cambios del efecto de DAMGO en presencia de quinpirol fue farmacológicamente sinérgico, realizamos una prueba de suma de cuadrados totales (o prueba F) entre la CDR de DAMGO administrado de manera independiente y la CDR de los grupos de coadministración, resultando en una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ). Específicamente el efecto del quinpirol al coadministrarse con DAMGO disminuyó la  $ED_{50}$ , y aumentó el tope del efecto máximo de DAMGO, esto sólo ocurrió en mecanonocicepción y no en la prueba de termonocicepción.

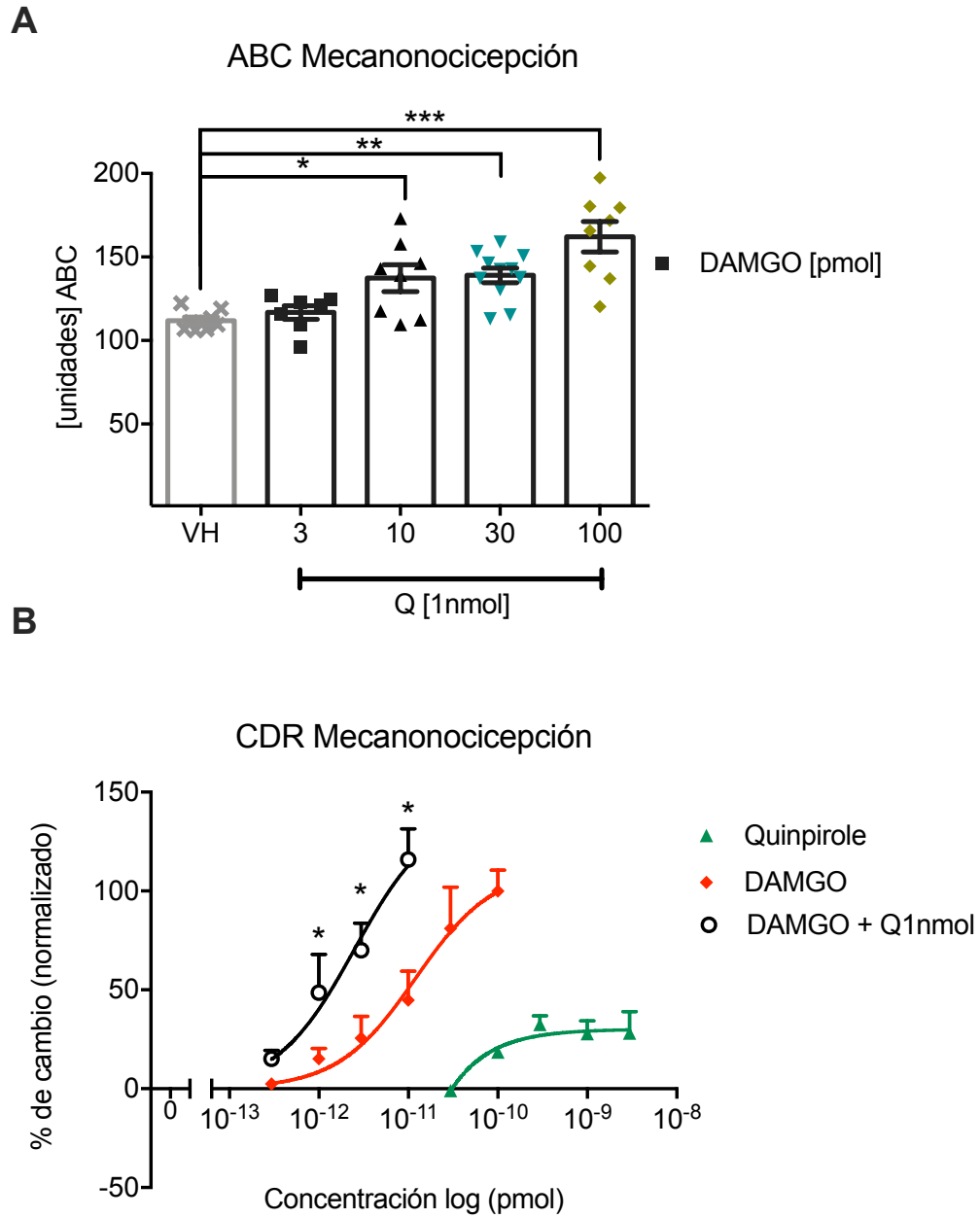


Figura 12. Análisis de área bajo la curva (ABC) del efecto de la coadministración intratecal de DAMGO y quinpirol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos térmicos nocivos. La curva dosis-respuesta (CDR) de la coadministración (B) fue realizada con los datos de efecto máximo normalizados. (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunett  $P = 0.0012$  y  $0.0001$  respectivamente)

Durante las condiciones de dolor patológico, específicamente las que resultan de una afección directa al sistema aferente primario, la alodinia e hiperalgesia son síntomas principales reportados por los pacientes. Con el objetivo de evaluar si la coadministración de DAMGO y quinpirol tiene un efecto antinociceptivo, lo cual podría fungir como un antecedente preclínico de alternativa terapéutica para el dolor crónico, administramos dosis sub-efectivas de DAMGO de manera conjunta con la  $DE_{50}$  de quinpirol y probamos su efecto sobre la hiperalgesia producida por dos modelos de dolor: inflamatorio y neuropático.

### **6.7 Efecto antihiperalgésico de la coadministración de quinpirol y DAMGO frente a estímulos térmicos nocivos en un modelo de dolor inflamatorio**

Para determinar el efecto antinociceptivo de la coadministración de DAMGO y quinpirol en condiciones de dolor inflamatorio utilizamos el modelo de dolor inflamatorio por administración intraplantar de ACF. Primero obtuvimos las latencias basales de retirada de pata frente a estímulos térmicos, posteriormente administramos ACF de manera intraplantar en la pata derecha y dejamos pasar 90 minutos para el establecimiento del proceso inflamatorio. Después de los 90 minutos obtuvimos las latencias de respuesta en la pata derecha y determinamos si las latencias disminuyeron al 50% de su valor basal. En el modelo de dolor inflamatorio de ACF, las latencias basales de todos los grupos disminuyeron a un promedio de  $41 \pm 9 \%$  durante termonocicepción 90 min después de la aplicación del ACF con respecto a las latencias basales; esta disminución se conservó durante la duración total del experimento (2 horas). La administración i.t. de VH no produjo cambios en las latencias de retirada durante el proceso inflamatorio (Fig. 13A y B). La administración i.t. de quinpirol 1 nmol fue insuficiente para revertir la hiperalgesia de manera significativa frente a estímulos térmicos, en contraste con el modelo de dolor nociceptivo, en donde 1 nmol de quinpirol sí produce cambios en las latencias de retirada.

En los cursos temporales con datos normalizados (Fig. 13B) DAMGO en dosis de 30 pmol revirtió parcialmente las latencias de retirada durante la termonocicepción, el cambio fue estadísticamente significativo ( $n = 6$ ; ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.02$ ). La coadministración de quinpirol 1 nmol y DAMGO 30 pmol revirtió por completo

la hiperalgesia durante la termnocicepción 15 minutos después de la administración i.t. (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P < 0.0001$ ;  $n = 6$ ). Este efecto fue significativo aún después de 30 minutos ( $P = 0.0002$ ). Para determinar si este efecto anti-nociceptivo estaba mediado principalmente por receptores de la familia  $D_2$ , administramos raclopride (antagonista de los receptores a DA de la familia  $D_2$ ) en una dosis equimolar de quinpirol junto con DAMGO. Tanto en los cursos temporales con datos como en los análisis ABC (Fig. 13C) observamos que la terapia de coadministración en conjunto con el antagonista selectivo produjo un efecto similar a la administración independiente de 30 pmol de DAMGO. En el análisis de ABC del curso temporal total observamos que solamente la terapia de coadministración de DAMGO y quinpirol pudo revertir de manera significativa la hiperalgesia producida por el ACF (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P < 0.0061$ ;  $n = 6$ ) (Fig. 13C).



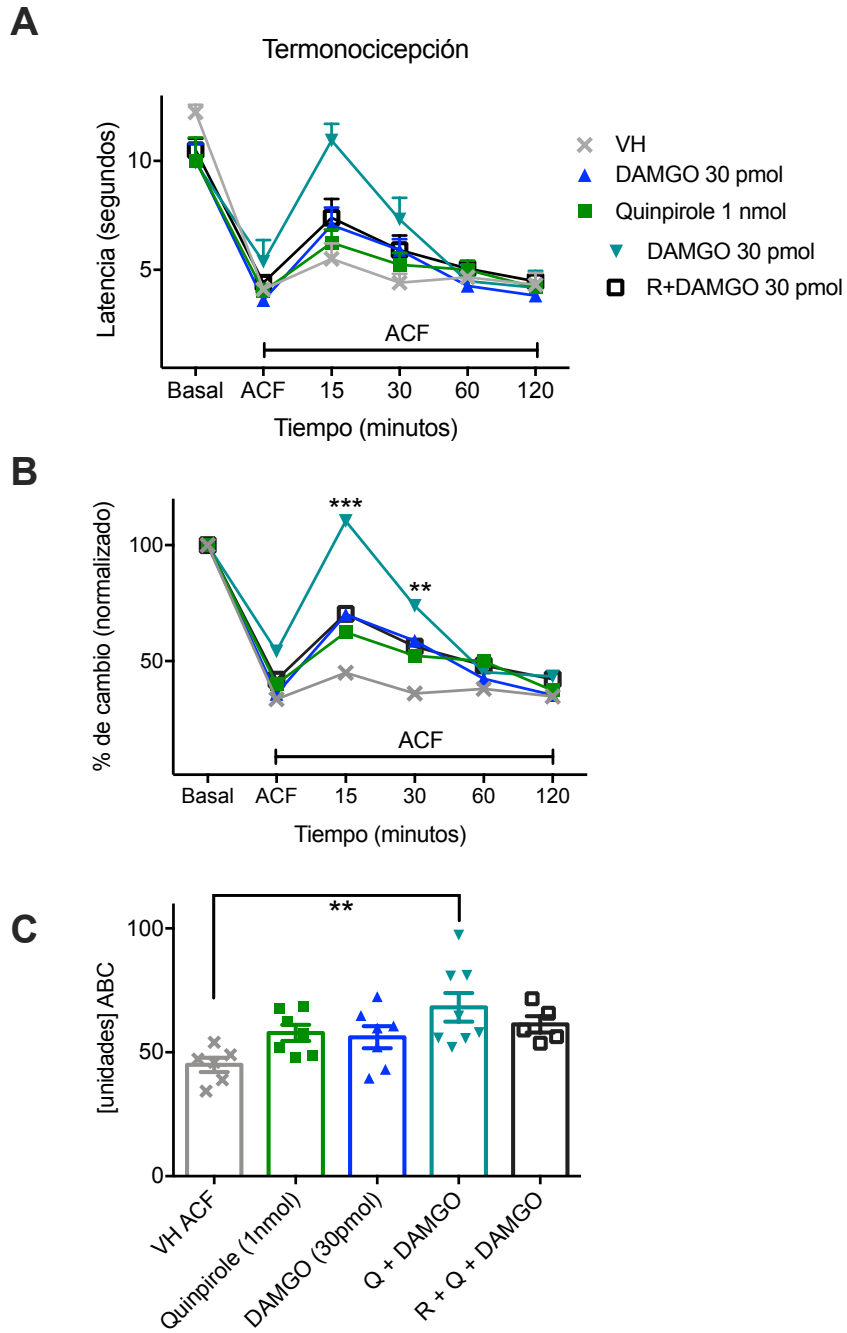


Figura 13. Efecto de la coadministración intratecal de DAMGO y quinpirol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos térmicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 120 minutos después de la inducción de hiperalgesia por el modelo inflamatorio de ACF. Los asteriscos representan cambios estadísticamente significativos.

## **Efecto antihiperalgésico de la coadministración de quinpirol y DAMGO frente a estímulos mecánicos nocivos en un modelo de dolor inflamatorio**

Las latencias basales de todos los grupos disminuyeron a un promedio de  $46 \pm 9 \%$  en la prueba de mecanonocicepción 90 min después de la administración intraplantar de ACF; esta disminución se conservó durante la duración total del experimento (2 horas). La administración i.t. de VH no produjo cambios en las latencias de retirada frente a estímulos mecánicos nocivos durante el proceso inflamatorio (Fig. 14A y B). En los cursos temporales (Fig. 14A) la administración i.t. de DAMGO en dosis de 30 pmol revirtió parcialmente las latencias durante la mecanonocicepción de manera estadísticamente significativa, únicamente 15 minutos después de la administración ( $n = 6$ ; ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.022$ ). En contraste, el curso temporal con datos normalizados no arrojó significancia para este grupo. La coadministración de quinpirol y DAMGO revirtió a un  $98 \pm 7 \%$  las respuestas de retirada frente a estímulos mecánicos nocivos, este efecto fue altamente significativo en ambos cursos temporales ( $P = 0.0001$  y  $P = 0.0006$ ). Cabe resaltar que el efecto anti-nociceptivo fue significativo aún después de 30 minutos ( $P = 0.02$ ) (Fig. 14A). El análisis del curso temporal con datos normalizados solamente fue significativo para el efecto máximo a los 15 minutos. Para saber si este efecto estaba mediado principalmente por los receptores de la familia  $D_2$ , administramos raclopride (antagonista de los receptores a DA de la familia  $D_2$ ) junto con DAMGO y quinpirol, y observamos un efecto similar a la administración independiente de 30 pmol de DAMGO. El análisis de ABC fue significativo solamente para el grupo de coadministración (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P < 0.026$ ;  $n = 6$ ) (Fig. 14C).

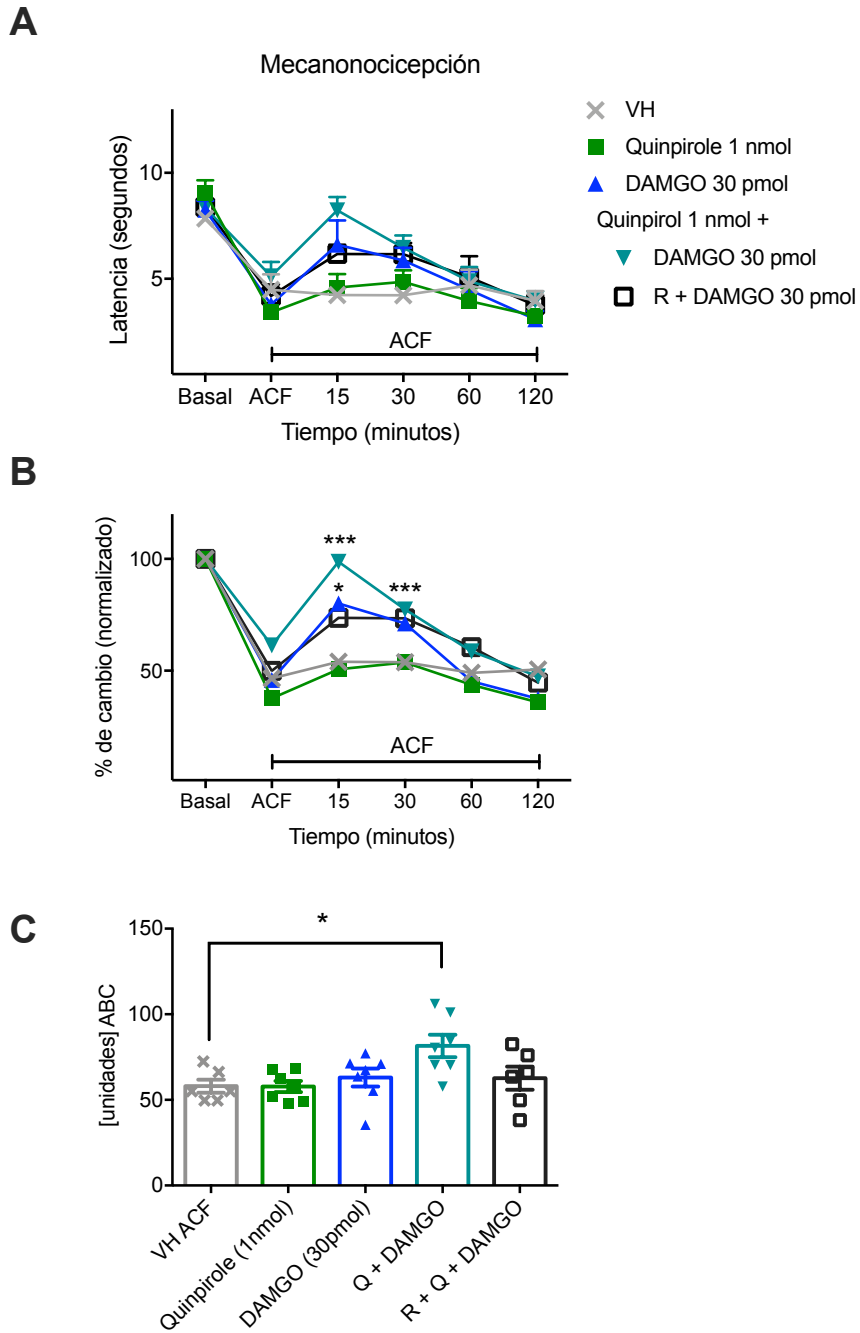


Figura 14. Efecto de la coadministración intratecal de DAMGO y quinpirol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos mecánicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 120 minutos después de la inducción de hiperalgesia por el modelo inflamatorio de ACF. Los asteriscos representan resultados estadísticamente significativos.

## **6.8 Efecto antihiperalgésico de la coadministración de quinpirol y DAMGO frente a estímulos térmicos nocivos en un modelo de dolor neuropático**

Se realizó la ligadura floja del ciático (LFC), y 14 días después se produjo un decremento promedio en las latencias de retirada de todos los grupos a  $45 \pm 1$  % con respecto de las latencias previas a la cirugía. El decremento en las latencias se mantuvo a lo largo del experimento y la administración de VH no modificó este decremento (Fig. 15A y B). La administración i.t. de quinpirol tuvo modesto efecto antihiperalgésico, aunque no fue significativo (Fig. 15A), el análisis de los datos normalizados fue significativo para el efecto de este fármaco a los 30 minutos (Fig. 15B). Para este modelo de dolor la dosis DAMGO fue de 100 pmol debido a que la coadministración de 1 nmol de quinpirol y 30 pmol de DAMGO, previamente efectiva en el modelo inflamatorio, no produjo cambios significativos. La administración i.t. de 100 pmol de DAMGO disminuyó significativamente la hiperalgnesia térmica ( $P = 0.0001$ ;  $n = 6$ ). Este efecto se conservó aún después de los 30 minutos ( $P = 0.0004$ ;  $P = 0.0001$  Fig. 15A y B respectivamente). La coadministración de 1 nmol de quinpirol y 100 pmol de DAMGO pudo revertir por completo la hiperalgnesia térmica, efecto que se conservó significativo aún después de 30 minutos. La disminución de la hiperalgnesia no desapareció por completo después de 2 horas, no obstante, este efecto ya no fue estadísticamente significativo. Para determinar si este efecto antihiperalgésico estaba mediado principalmente por la activación de los receptores  $D_2$ , administramos raclopride en dosis equimolares con quinpirol y observamos un efecto igual al de la administración independiente de DAMGO.

El análisis de ABC fue significativo (Fig. 15C) para los grupos de DAMGO 100 pmol, la coadministración con quinpirol y para el grupo con el antagonista selectivo raclopride (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.0025$ ,  $<0.0001$  y  $0.0021$ , respectivamente;  $n = 6$ ).

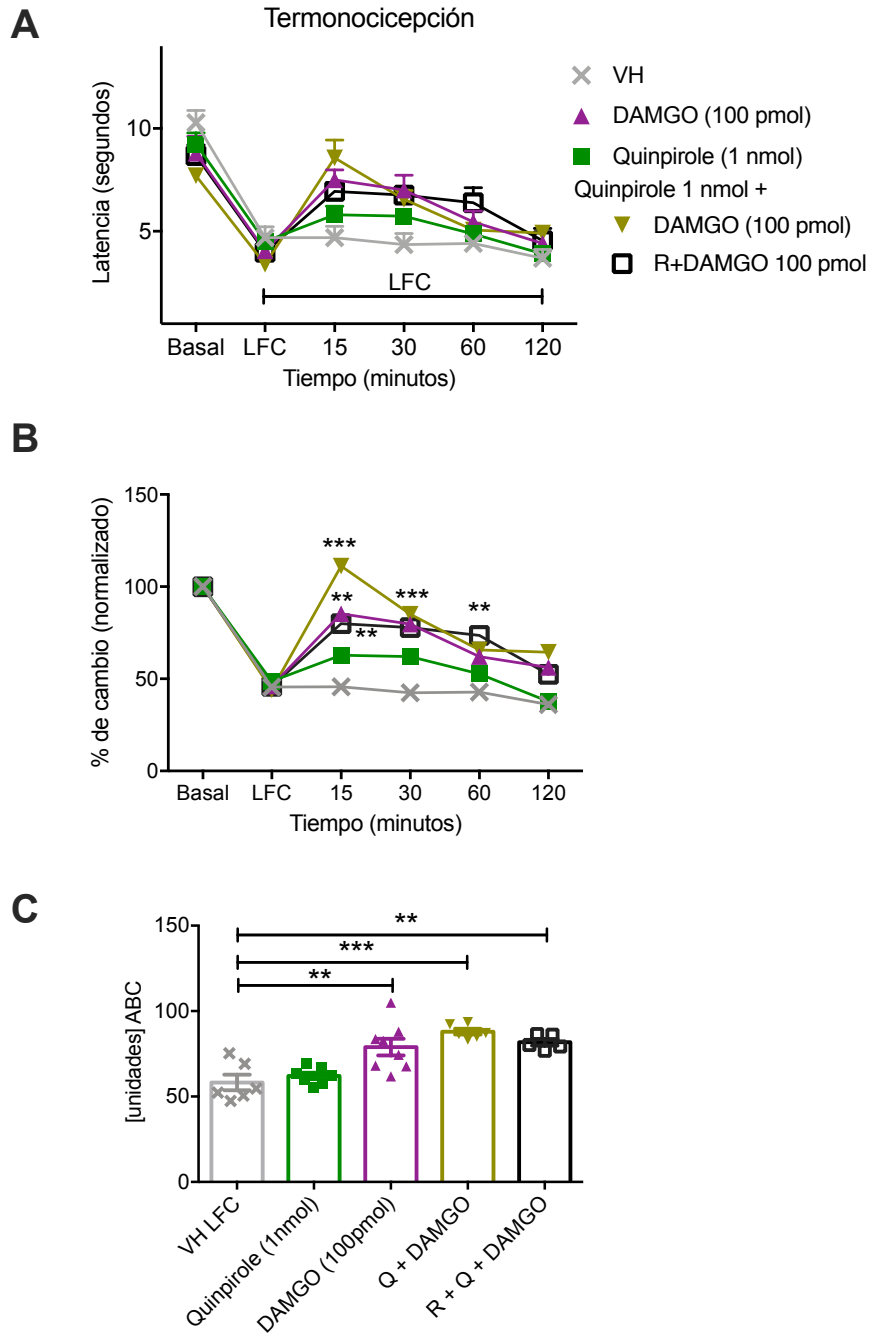


Figura 15. Efecto de la coadministración intratecal de DAMGO y quinpirol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos térmicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 120 minutos después de la inducción de hiperalgesia por el modelo de dolor neuropático de LFC.

## **Efecto antihiperalgésico de la coadministración de quinpirol y DAMGO frente a estímulos mecánicos nocivos en un modelo de dolor neuropático**

Durante la mecanonocicepción la LFC produjo un decremento en las latencias de retirada al  $50 \pm 3$  % con respecto a las latencias basales. El decremento se mantuvo a lo largo del experimento y la administración i.t. de VH no alteró esta hiperalgnesia mecánica (Fig. 16A y B). La administración i.t. de quinpirol no produjo cambios significativos en ninguno de los dos cursos temporales. DAMGO en dosis de 100 pmol pudo revertir significativamente la hiperalgnesia mecánica solamente en su efecto máximo a los 15 minutos (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.007$ ;  $n = 6$ ). En contraste, la coadministración i.t. de 1 nmol de quinpirol y 100 pmol de DAMGO pudo aliviar por completo la hiperalgnesia mecánica y su efecto fue aún significativo después de 30 minutos ( $P = 0.0001$  y  $0.01$  respectivamente, mismos resultados en ambos cursos temporales Fig. 16A y B). Para determinar si este efecto antihiperalgésico estaba siendo mediado principalmente por la actividad de los receptores  $D_2$  se utilizó raclopride en dosis equimolares con quinpirol y en conjunto con la aplicación de DAMGO observamos que el efecto fue similar al de la administración independiente de DAMGO, cabe resaltar que el efecto fue significativo aún después de 30 minutos ( $P = 0.0002$  y  $0.009$  y  $P = 0.001$  y  $0.03$  Fig. 16A y B respectivamente). El análisis de ABC fue significativo solamente para el grupo de (Fig. 16C) (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.046$ )

Es claro que la terapia de coadministración tiene un efecto anti-nociceptivo eficaz tanto en el modelo de dolor inflamatorio (ACF) como en el modelo de dolor neuropático (LFC). Vale la pena resaltar que, si bien el efecto fue menor dadas las condiciones de alteración funcional en el sistema aferente primario, la nocicepción térmica se vuelve sensible tanto al efecto de la administración i.t. de quinpirol como a la terapia de coadministración.

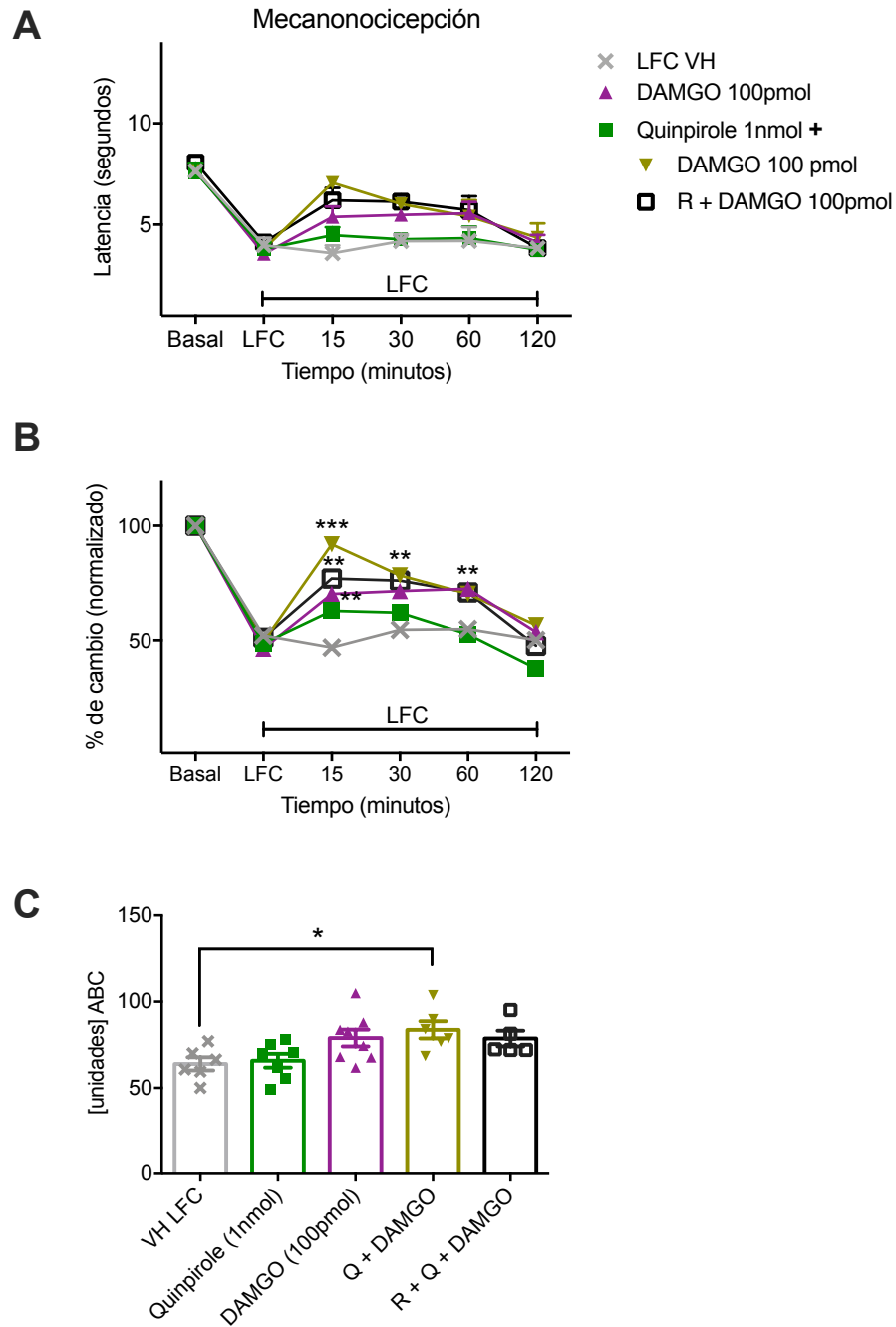


Figura 16. Efecto de la coadministración intratecal de DAMGO y quinpirol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos mecánicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 120 minutos después de la inducción de hiperalgesia por el modelo de dolor neuropático de LFC.

La vía de administración intratecal no es la opción preferida para pacientes con dolor crónico; por ello decidimos probar la eficacia de la terapia coadyuvante, pero administrada de manera sistémica mediante una inyección subcutánea (s.c.). DAMGO no cruza la barrera hemato-encefálica, entonces decidimos probar la eficacia de la terapia coadyuvante utilizando agonistas débiles de los receptores  $\mu$ -opioide. Utilizamos tramadol, fármaco de segunda línea para el tratamiento del dolor neuropático, y comparamos su efecto contra el de la administración s.c. de quinpirol en pruebas de nocicepción térmica y mecánica.

### **6.9 Administración s.c. de tramadol y su efecto sobre las latencias de retirada frente a estímulos térmicos nocivos**

La administración s.c. de VH no produjo cambios estadísticamente significativos en las latencias de retiro en ningún punto en el tiempo evaluado en las pruebas de nocicepción térmica. Las latencias de retirada ante estímulos térmicos nocivos de todos los grupos previo a la administración s.c. de fármacos tuvieron como promedio 10.4 s. Las 2 dosis de tramadol (10 y 30 mg/kg) produjeron cambios significativos sobre las latencias de retirada cuyo efecto máximo se presentó a los 30 minutos (Fig. 17A) (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett,  $P = 0.02$  y  $0.0001$  respectivamente;  $n = 6$ ), y se mantuvo después de 1 hora ( $P = 0.03$  y  $0.007$  respectivamente). En contraste el análisis con datos normalizados fue significativo solamente para la dosis de 30mg/kg a los 30 minutos ( $P = 0.0004$ ). El análisis de ABC (Fig. 17C) fue significativo para ambas dosis (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.03$  y  $0.002$  respectivamente).



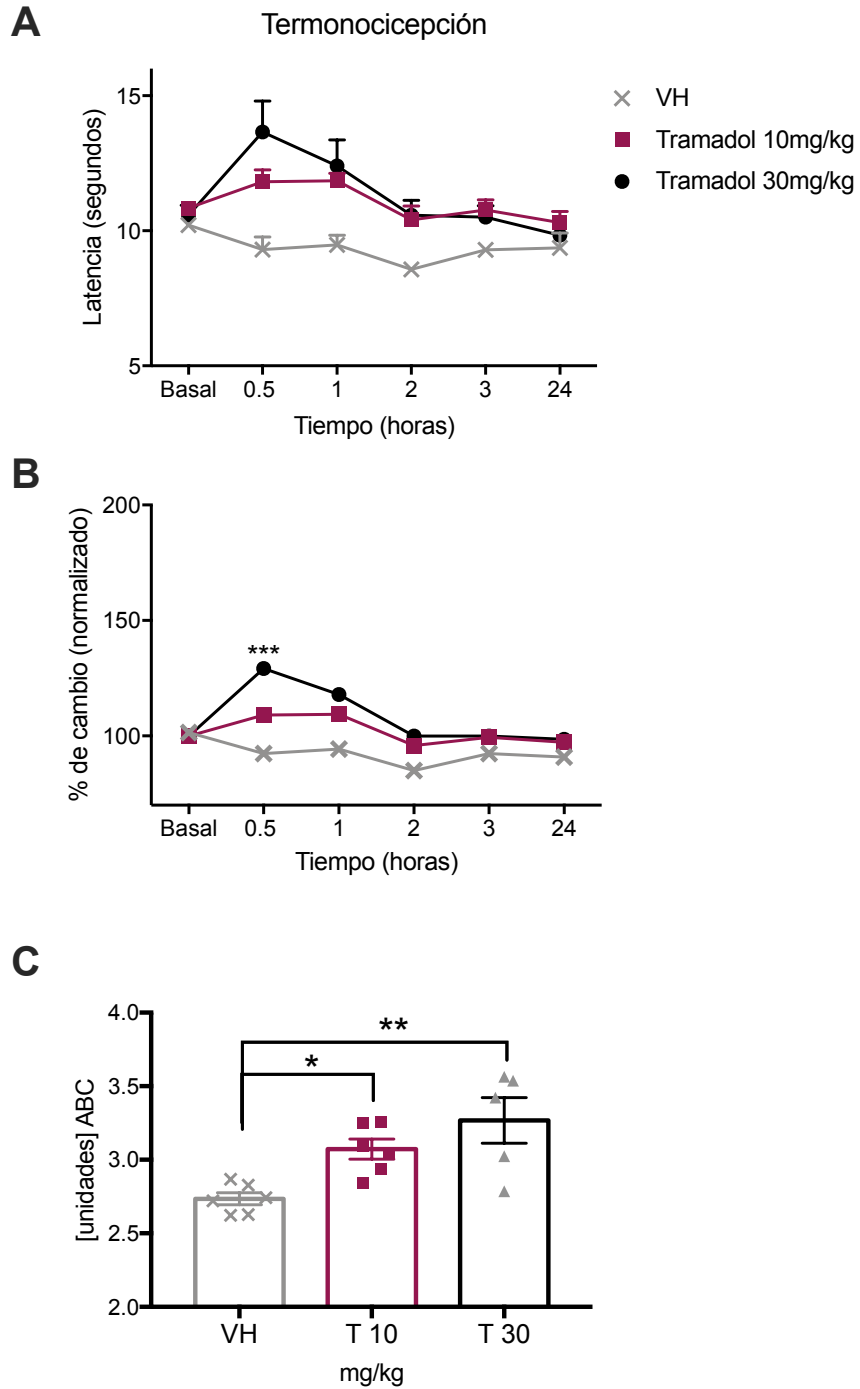


Figura 17. Efecto de la administración subcutánea de tramadol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos térmicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 24 horas. (C) análisis de área bajo la curva, cada símbolo representa el valor único del análisis geométrico del curso temporal de cada individuo.

## **Administración s.c. de quinpirol y su efecto sobre las latencias de retirada frente a estímulos térmicos nocivos**

Para determinar el efecto de la administración sistémica de quinpirol durante la termonocicepción utilizamos 4 dosis logarítmicamente equidistantes (0.3-3mg/kg) y en concordancia con la administración local (i.t.) el curso temporal de los datos normalizados (Fig. 18B) muestra que la dosis 3 mg/kg aumentó el efecto antinociceptivo (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett,  $P = 0.01$ ;  $n = 6$ ).

En concordancia el análisis de ABC (Fig. 18C) muestra que las dosis de 0.3 y 3 mg/Kg de quinpirol produjeron aumento en las latencias de retirada mismas que fueron estadísticamente significativas (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.047$  y 0.044 respectivamente).

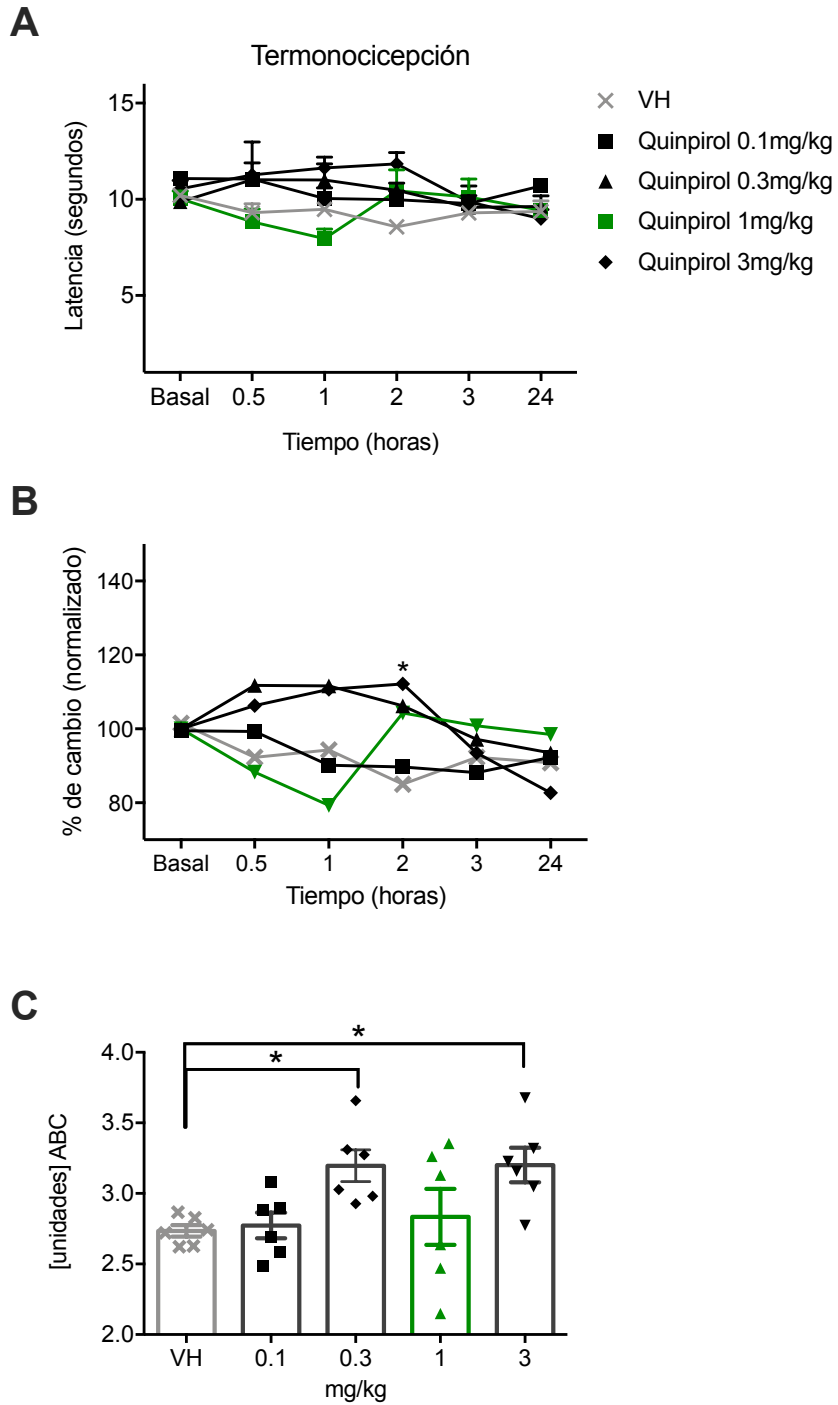


Figura 18. Efecto de la administración subcutánea de quinpirol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos térmicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 24 horas. (C) Análisis de área bajo la curva, cada símbolo representa el valor único del análisis geométrico del curso temporal de cada individuo representado en unidades arbitrarias.

## **6.10 Efecto antinociceptivo de tramadol (s.c.) frente a estímulos mecánicos nocivos**

La administración s.c. de solución salina (VH) no produjo cambios estadísticamente significativos en las latencias de retirada en ningún punto en el tiempo evaluado en las pruebas de nocicepción mecánica. Las latencias de retirada ante estímulos mecánicos nocivos de todos los grupos previo a la administración s.c. de fármacos tuvieron como promedio 8 s. La dosis de 30 mg/kg fue la única en aumentar significativamente las latencias de retirada durante la mecanonocicepción (Fig. 19A y B) (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett,  $P = 0.0001$ ;  $n = 6$ ). Este aumento tuvo su efecto máximo a los 30 minutos y mantuvo su significancia a la hora ( $P = 0.0001$ ) y a las 2 horas posteriores a su administración s.c. ( $P = 0.002$ ) (Fig. 19A).

Así mismo el análisis de ABC fue significativo para la dosis de 30 mg/kg (Fig. 17C) (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.002$ ).

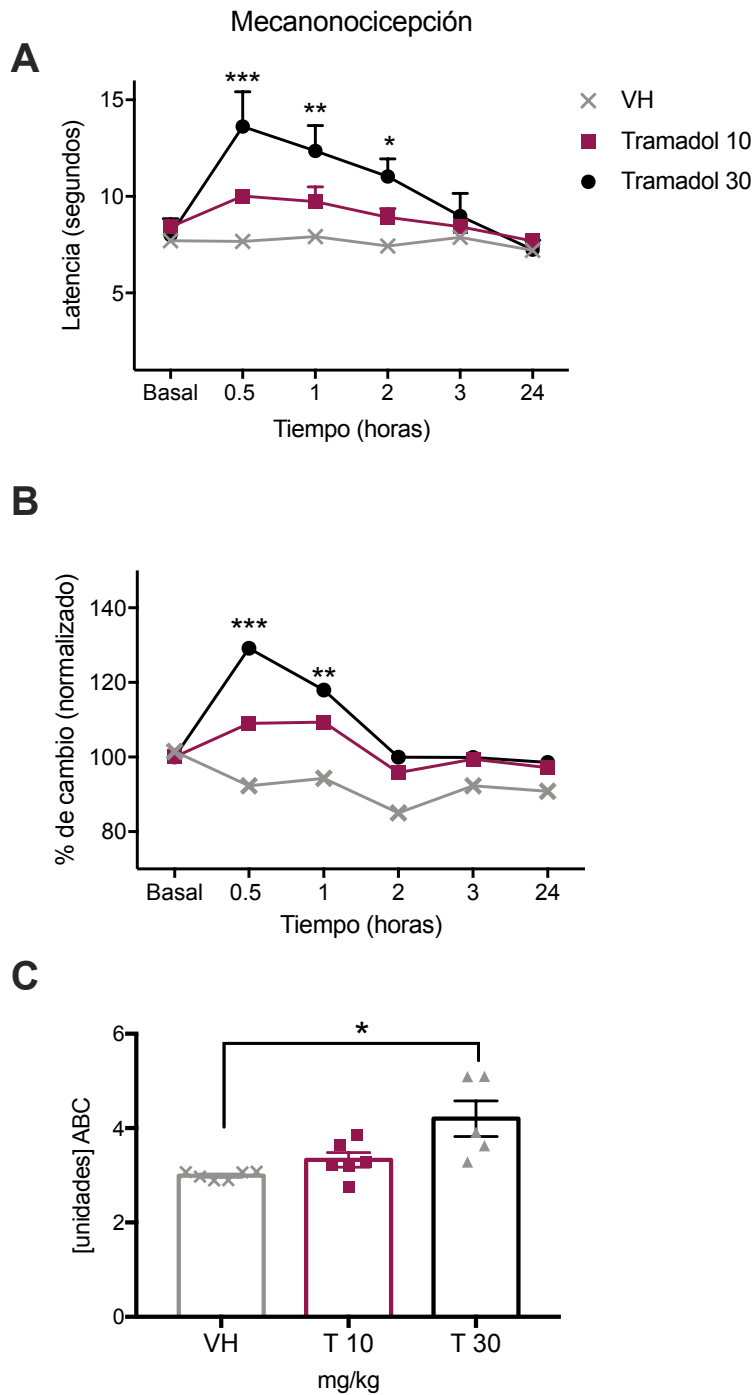


Figura 19. Efecto de la administración subcutánea de tramadol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos mecánicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 24 horas. (C) Análisis de área bajo la curva, cada símbolo representa el valor único del análisis geométrico del curso temporal de cada individuo representado en unidades arbitrarias.

## **Efecto antinociceptivo de quinpirol (s.c.) frente a estímulos mecánicos nocivos**

Los cursos temporales de datos en segundos y con datos normalizados (Fig. 20A y B) muestran un claro efecto dosis respuesta para la administración s.c. de quinpirol. La primera dosis en producir un aumento significativo de las latencias de retirada durante la mecanonocicepción fue la dosis de 1 mg/kg (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett,  $P = 0.019$ ;  $n = 6$ ). Interesantemente, el efecto máximo se presentó 1 hora después de la administración ( $P = 0.005$ ). Este efecto se presentó de igual manera para la dosis de 3 mg/kg tanto para los cursos temporales con datos en segundos ( $P = 0.0001$  y  $0.0007$ , para el efecto a las 0.5 y 1 h respectivamente) como para los datos con datos normalizados ( $P = 0.0001$  y  $0.002$ , respectivamente). En análisis de ABC también fue significativo para las dosis de 1 y 3 mg/kg (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.002$  y  $0.004$  respectivamente).

El quinpirol administrado de manera sistémica tiene un efecto anti-nociceptivo consistente frente a estímulos mecánicos nocivos al igual que la administración local (i.t.) de quinpirol y pramipexol como agonistas a receptores de la familia D<sub>2</sub> (Fig. 4 y 6).

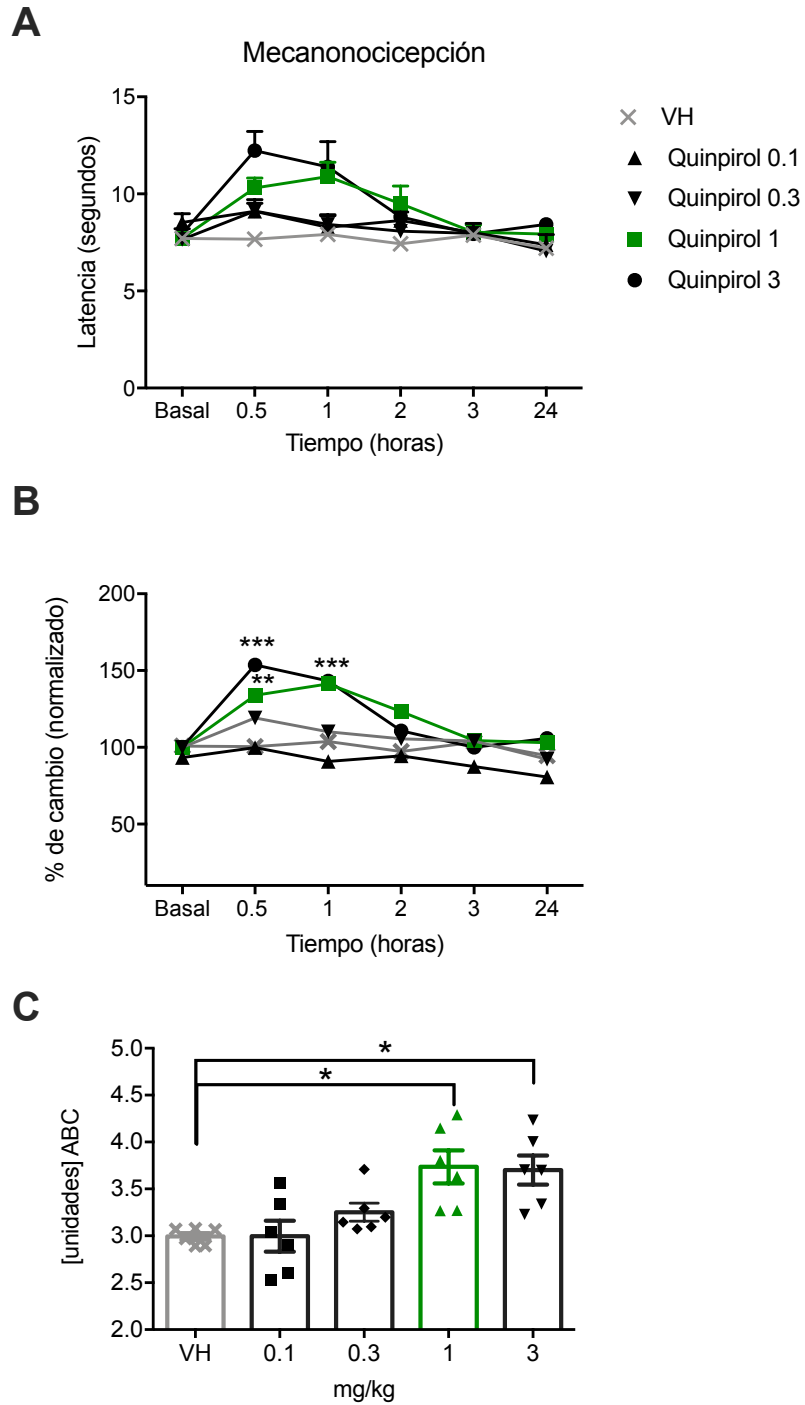


Figura 20. Efecto de la administración subcutánea de quinpirol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos mecánicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 24 horas. (C) Análisis de área bajo la curva, cada símbolo representa el valor único del análisis geométrico del curso temporal de cada individuo representado en unidades arbitrarias.

## 6.11 Efecto antinociceptivo de tramadol (s.c.) en coadministración con quinpirol (s.c.) frente a estímulos térmicos nocivos

Utilizamos la primera dosis de tramadol en aumentar significativamente las latencias de retirada durante estímulos térmicos (10 mg/kg) y la administramos de manera conjunta con la primera dosis sistémica de quinpirol en producir un efecto antinociceptivo consistente y observamos el efecto de esta coadministración sobre latencias de retirada durante la nocicepción térmica y mecánica en condiciones fisiológicas de nocicepción normales. Así mismo comparamos el efecto de la dosis de 30 mg/kg de tramadol que consistentemente fue antinociceptiva frente a estímulos térmicos y mecánicos coadministradas con la dosis fija de 1 mg/kg de quinpirol. La coadministración de tramadol (10 mg/kg) y quinpirol (1 mg/kg) disminuyó la termonocicepción significativamente. Interesantemente el efecto fue solamente significativo 2 h después de la administración s.c. (Fig. 21A y B) (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.0001$  para ambos cursos temporales;  $n = 6$ ).

El análisis de ABC (Fig. 19C) muestra que además de ser el único grupo que presentó cambios estadísticamente significativos en comparación con las latencias de retirada por administración s.c. de VH, la anti-nocicepción térmica producida por la coadministración fue también significativa contra el efecto de la administración independiente de ambos fármacos (tramadol y quinpirol Fig. 16C y 18C respectivamente) (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P < 0.0001$  coadministración vs. VH; Q y T vs. Q  $P < 0.0001$ , coadministración vs T  $P = 0.001$ ).



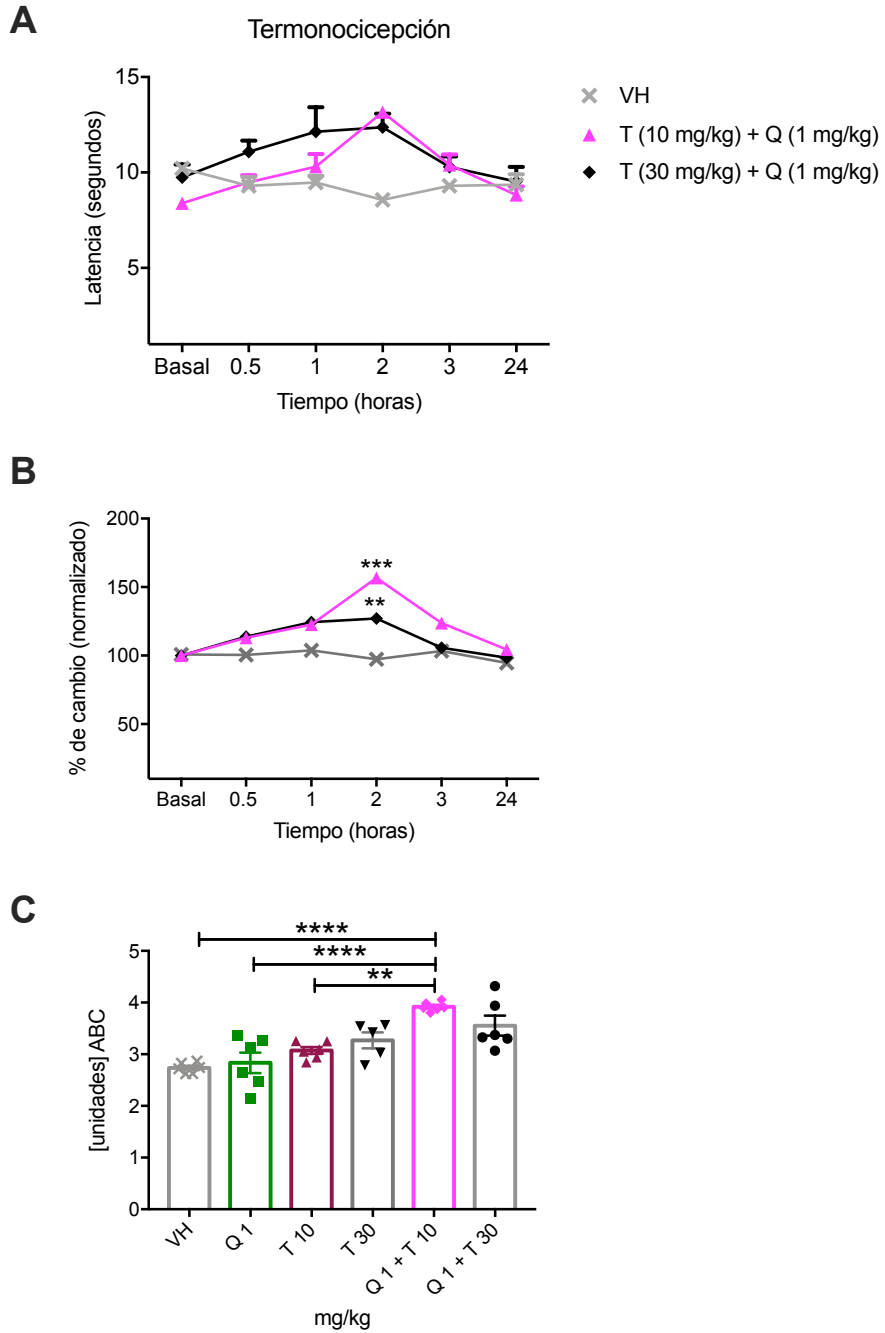


Figura 21. Efecto de la administración subcutánea de quinpirol y tramadol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos térmicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 24 horas. (C) Análisis de área bajo la curva, cada símbolo representa el valor único del análisis geométrico del curso temporal de cada individuo representado en unidades arbitrarias.

## **Efecto antinociceptivo de tramadol (s.c.) en coadministración con quinpirol (s.c.) frente a estímulos mecánicos nocivos**

Ambas dosis de tramadol (10 y 30 mg/kg) coadministradas con quinpirol produjeron un aumento significativo de las latencias de retirada durante la mecanonocicepción a los 30 minutos (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.0006$  y  $0.0001$  para ambos cursos temporales;  $n = 6$ ). Al igual que el efecto antinociceptivo durante la termonocicepción la coadministración s.c. no tuvo un efecto dosis respuesta consistente. El grupo de coadministración con 30 mg/kg de tramadol tuvo su efecto máximo a las 2 horas (Fig. 22A y B) ( $P = 0.0001$  para ambos cursos temporales). Vale la pena resaltar que este efecto fue aún significativo después de 3 h ( $P = 0.03$ ). El análisis de ABC (Fig. 22C) fue significativo solamente para el efecto el grupo de coadministración con 30 mg/kg de tramadol en comparación con las latencias basales en respuesta a la administración s.c. de VH. El efecto de los fármacos por separado no fue significativo e incluso no fue diferente del observado contra la administración independiente de 30 mg/kg de tramadol.

En contraste con la administración local (i.t.) de la terapia coadyuvante con agonistas dopaminérgicos de la familia  $D_2$  (quinpirol) cuyo efecto ocurrió predominantemente durante la mecanonocicepción (en ausencia de condiciones que puedan exacerbar la percepción nociceptiva), el efecto antinociceptivo de la coadministración con tramadol (agonista débil de los receptores  $\mu$ -opioide) y quinpirol fue altamente significativo en la prueba de termonocicepción en condiciones no patológicas. Además, el efecto máximo en general, ocurrió 2 horas después de la administración sistémica (s.c.). Para determinar si la coadministración con tramadol también podría ser considerada como una alternativa terapéutica en condiciones de dolor patológico, utilizamos la primera dosis (tramadol 10mg/kg y quinpirol 1mg/kg) en producir efectos antinociceptivos consistentes y la administramos en los 2 modelos de dolor patológico previamente estudiados (inflamatorio y neuropático).

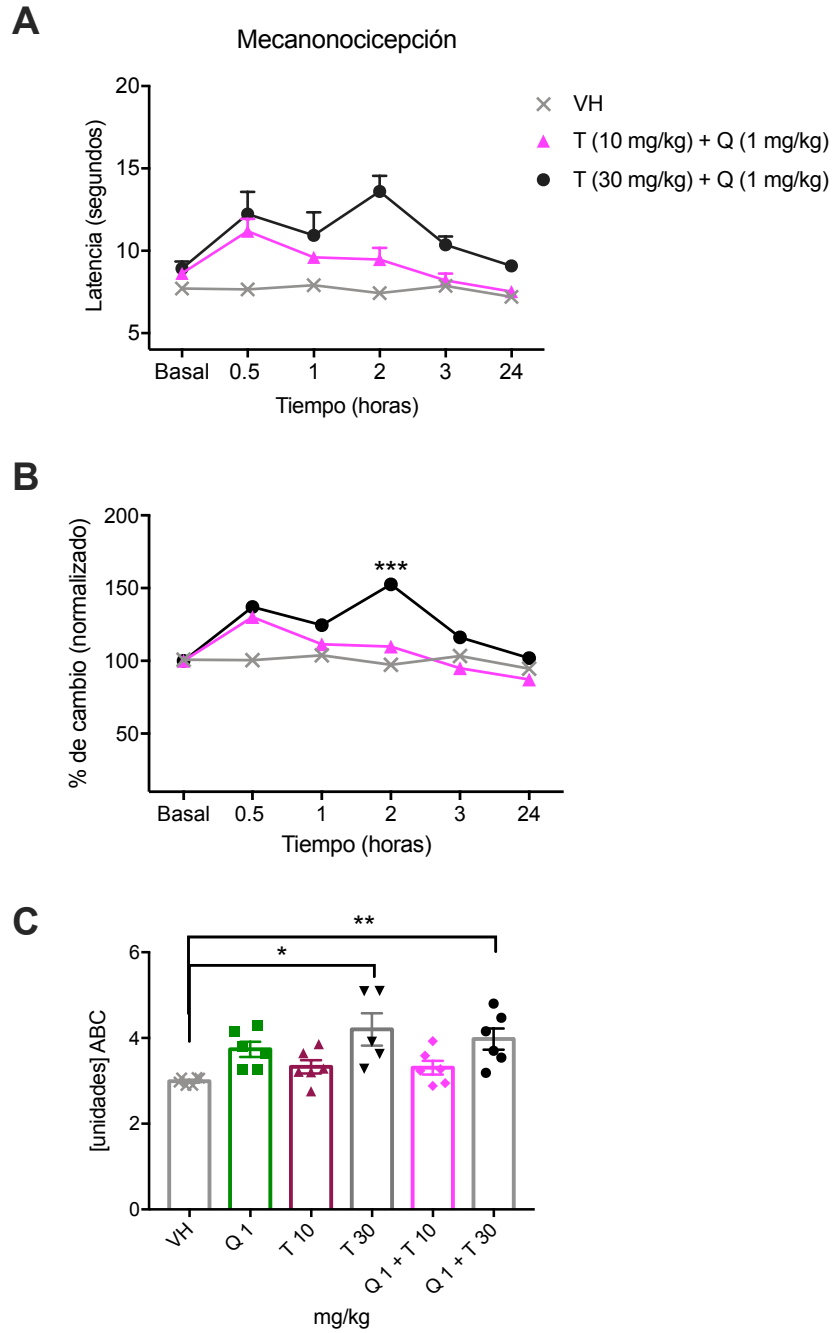


Figura 22. Efecto de la administración subcutánea de quinpirol y tramadol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos mecánicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 24 horas. (C) Análisis de área bajo la curva, cada símbolo representa el valor único del análisis geométrico del curso temporal de cada individuo representado en unidades arbitrarias.

## **6.12 Efecto antihiperalgésico de tramadol (s.c.) en coadministración con quinpirol (s.c.) frente a estímulos térmicos nocivos en un modelo de dolor inflamatorio**

Utilizando el modelo de dolor inflamatorio por inyección intraplantar de ACF observamos un decremento de las latencias de retirada de todos los grupos a 43% con respecto de las latencias basales durante la termnocicepción. Este decremento se mantuvo con la duración total del experimento (24 h) y la administración de VH no produjo cambios significativos sobre las mismas (Fig. 23A y B). La administración s.c. de 1 mg/kg de quinpirol disminuyó significativamente la hiperalgnesia térmica una hora después de su administración (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.01$ ). Este efecto antinociceptivo se mantuvo significativo después de 2 h ( $P = 0.02$ ). La administración s.c. de 10 mg/kg de tramadol disminuyó la hiperalgnesia apenas después de 30 minutos de su aplicación ( $P = 0.020$ ) y este efecto presentó su máximo 1 h después ( $P = 0.005$ ) y se mantuvo significativo aún después de 2 h ( $P = 0.017$ ). La coadministración s.c. de tramadol y quinpirol disminuyó significativamente la hiperalgnesia térmica consistentemente a las 0.5, 1 ( $P = 0.0001$  para ambos puntos en el tiempo), y 2 h después ( $P < 0.0001$ ), momento en el cual pudo aliviar por completo la disminución de las latencias basales producidas por el modelo inflamatorio. Importantemente el efecto antinociceptivo fue significativo no solo después de 3 h ( $P = 0.0002$ ), sino hasta 24 h después de la administración s.c. ( $P = 0.028$ ) (Fig. 23A y B).

Al igual que en condiciones nociceptivas normales el análisis de ABC para los cursos temporales con datos normalizados (Fig. 21C) durante la hiperalgnesia producida por el ACF no solo fue significativo en comparación con la administración de VH sino también contra la administración independiente de los fármacos (Fig. 23C) (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P < 0.0001$  vs. VH, 0.0018 vs. Q, 0.003 vs. T;  $n = 6$  c/u).

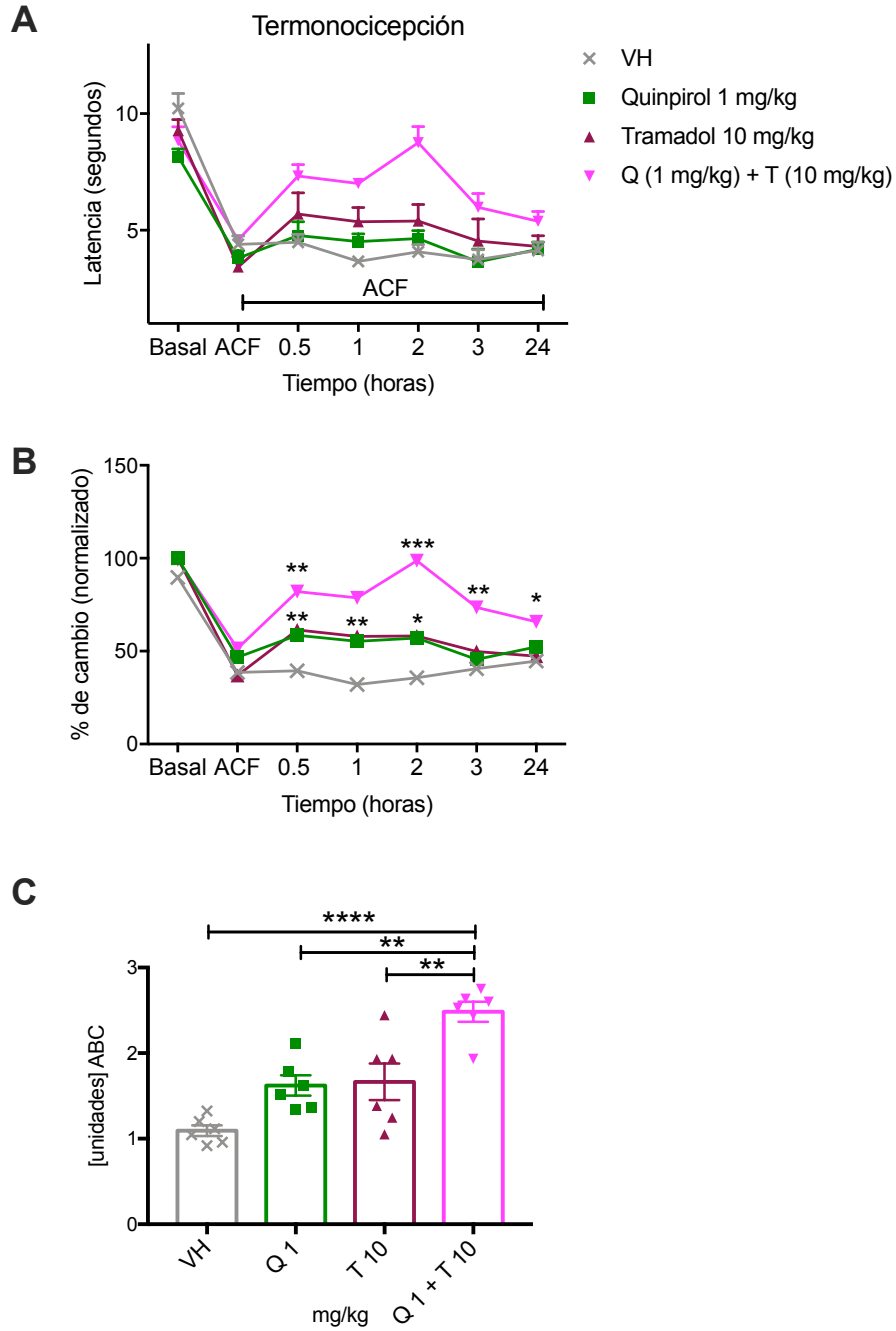


Figura 23. Efecto de la administración subcutánea de quinpirol y tramadol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos mecánicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 24 horas después de la inducción del modelo inflamatorio con ACF. (C) Análisis de área bajo la curva, cada símbolo representa el valor único del análisis geométrico del curso temporal de cada individuo representado en unidades arbitrarias.

### **Efecto antihiperalgésico de tramadol (s.c.) en coadministración con quinpirol (s.c.) frente a estímulos mecánicos nocivos en un modelo de dolor inflamatorio**

El modelo de dolor inflamatorio por inyección intraplantar de ACF produjo un decremento de las latencias de retirada de todos los grupos a 58% con respecto de las latencias basales durante la mecanonocicepción. Este decremento se mantuvo con la duración total del experimento (24 h) y la administración de VH no produjo cambios significativos sobre las mismas (Fig. 24A y B). A pesar de que la disminución de las latencias de respuesta frente a estímulos mecánicos no fue tan exacerbada como en experimentos previos (Fig. 14) la administración s.c. independiente de tramadol o quinpirol no disminuyó la hiperalgesia de manera significativa en ningún punto en el tiempo durante el total de los cursos temporales (Fig. 24A y B). En amplio contraste, el grupo de coadministración de ambos fármacos revirtió la hiperalgesia mecánica de manera significativa a los 30 minutos, punto en el cual se presentó también su efecto máximo (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P < 0.0001$ , misma significancia para el registro 1 h post administración s.c.). El efecto antinociceptivo fue significativo a las 2 y 3 h ( $P = 0.002$  para ambos puntos del curso temporal) y desapareció por completo después de 24 h.

De manera notable y en comparación con el efecto en condiciones no patológicas (Fig. 22C) el análisis de ABC no solo fue significativo en comparación con el VH sino también contra la administración independiente de ambos fármacos (Fig. 24C) (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P < 0.0001$  vs. VH, 0.0018 vs. Q, 0.003 vs. T;  $n = 6$  c/u).

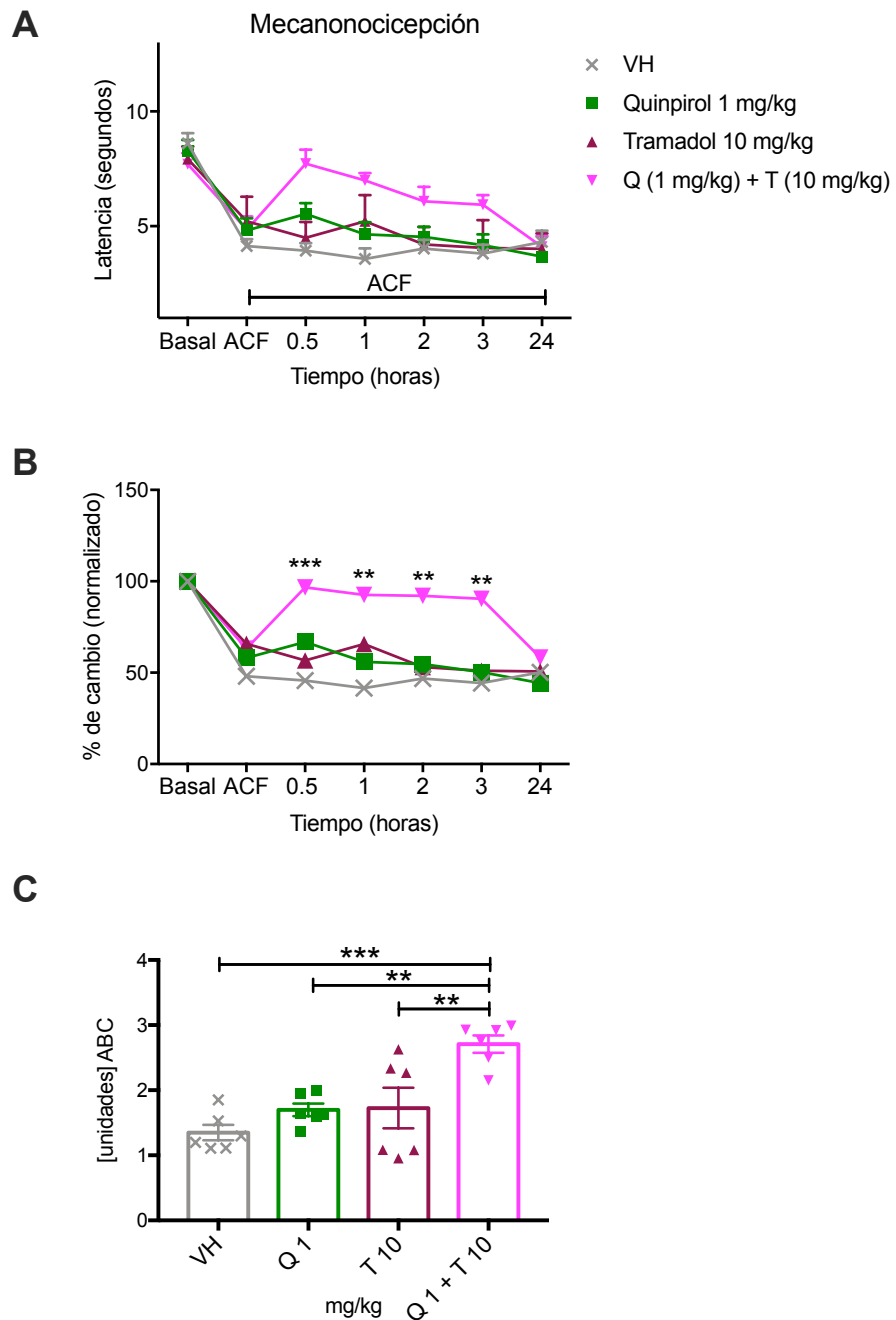


Figura 24. Efecto de la administración subcutánea de quinpirol y tramadol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos mecánicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 24 horas después de la inducción del modelo inflamatorio con ACF. (C) Análisis de área bajo la curva, cada símbolo representa el valor único del análisis geométrico del curso temporal de cada individuo representado en unidades arbitrarias.

### **6.13 Efecto antihiperalgésico de tramadol (s.c.) en coadministración con quinpirol (s.c.) frente a estímulos térmicos nocivos en un modelo de dolor neuropático**

Durante el modelo de dolor neuropático por compresión del ciático, LFC, observamos un decremento de las latencias de retirada ante estímulos térmicos nocivos de 46% con respecto de las latencias basales mismo que se mantuvo hasta el final experimento (24 h). La administración s.c. de VH no produjo cambios en ningún punto en el tiempo a lo largo de los cursos temporales. De igual manera la administración s.c. independiente de tramadol o quinpirol no revirtió la hiperalgesia de manera significativa en ningún punto en el tiempo en los cursos temporales con datos normalizados (Fig. 25B). La coadministración de ambos fármacos disminuyó significativamente las latencias de retirada durante la termonocicepción y de manera consistente con los experimentos previos (Fig. 21 y Fig. 23) el efecto máximo antinociceptivo se presentó a las 2 horas (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.0004$ ); este efecto fue significativo hasta las 3 h ( $P = 0.024$ ). Contrario a estos resultados los cursos temporales con datos en segundos (Fig. 25A) fueron significativos para el efecto antinociceptivo de la administración s.c. de Tramadol después de 30 min (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.02$ ), presentó su efecto máximo a las 2 h ( $P = 0.0018$ ) y mantuvo su significancia aún después de 3 h ( $P = 0.02$ ). De manera importante, la administración de quinpirol también disminuyó la hiperalgesia significativamente ( $P = 0.003$ ), este efecto antinociceptivo ocurrió específicamente 2 h posteriores a la administración de quinpirol (Fig. 25A).

En concordancia con este último análisis de cursos temporales con datos normalizados, el análisis de ABC (Fig. 25C) fue significativo para el efecto antinociceptivo de Tramadol (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.01$ ) y para el grupo de coadministración de ambos fármacos ( $P = 0.002$ ).



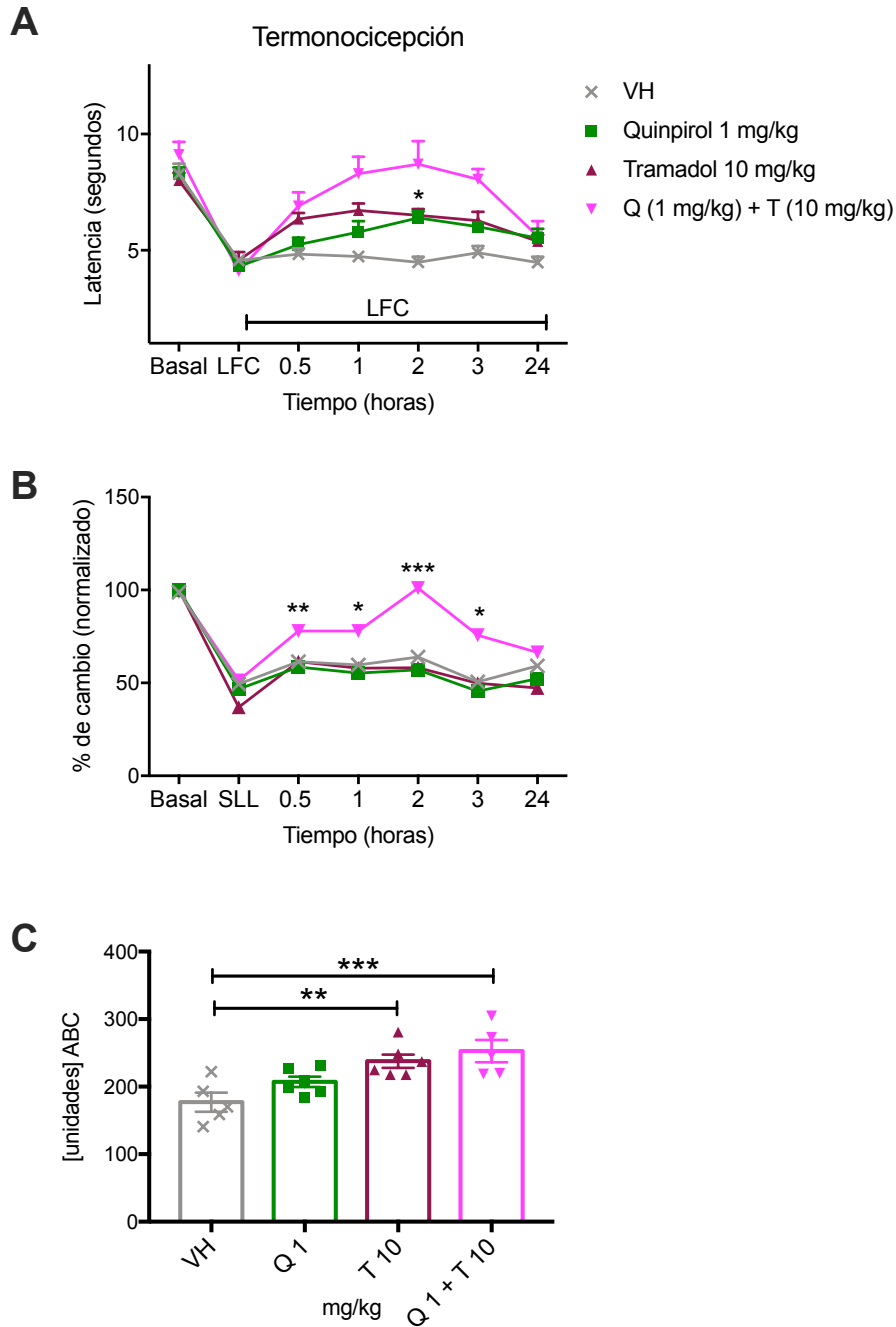


Figura 25. Efecto de la administración subcutánea de quinpirol y tramadol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos térmicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 24 horas después de la inducción del modelo de dolor neuropático con la LFC. (C) Análisis de área bajo la curva, cada símbolo representa el valor único del análisis geométrico del curso temporal de cada individuo representado en unidades arbitrarias.

## **Efecto antihiperálgico de tramadol (s.c.) en coadministración con quinpirol (s.c.) frente a estímulos mecánicos nocivos en un modelo de dolor neuropático**

El modelo de dolor neuropático con LFC resulta en un decremento de las latencias de retirada ante estímulos mecánicos de un 59% con respecto de las latencias basales mismo que se mantuvo hasta el final experimento (24 h). La administración de VH no produjo cambios en las latencias. Así mismo, la administración s.c. de tramadol o quinpirol de manera independiente no revirtió la hiperálgia de manera significativa en ningún punto en el tiempo (Fig. 26A). De manera consistente con la administración local (i.t.) de agonistas con alta afinidad por los receptores  $\mu$ , la coadministración de tramadol como agonista débil con quinpirol como adyuvante para el efecto antinociceptivo revirtió la hiperálgia mecánica de manera significativa apenas 0.5 h después de su administración sistémica s.c. (ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.0001$ ) el efecto mantuvo su significancia hasta después de 3 horas ( $P = 0.02$ ) (Fig. 26A)

Consistente con el análisis de los cursos temporales, el análisis de ABC fue significativo solamente para el efecto antinociceptivo del grupo de coadministración a lo largo de todo el curso temporal de los datos normalizados (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.022$ ).

A lo largo del análisis previo de los cursos temporales para el efecto antinociceptivo de la coadministración s.c. de tramadol (agonista débil de los receptores  $\mu$ -opioide) y quinpirol, que incluye el punto en el tiempo de 24h a diferencia de los experimentos con administración local de quinpirol y DAMGO (agonista completo de los receptores  $\mu$ -opioide), es claro que existe una potenciación del efecto antinociceptivo; especialmente termonociceptivos. También vale la pena distinguir que 120 minutos después de la administración s.c. se presentó el efecto máximo, en comparación con la administración i.t. de quinpirol y DAMGO, donde el efecto máximo ocurrió a los 15 minutos.

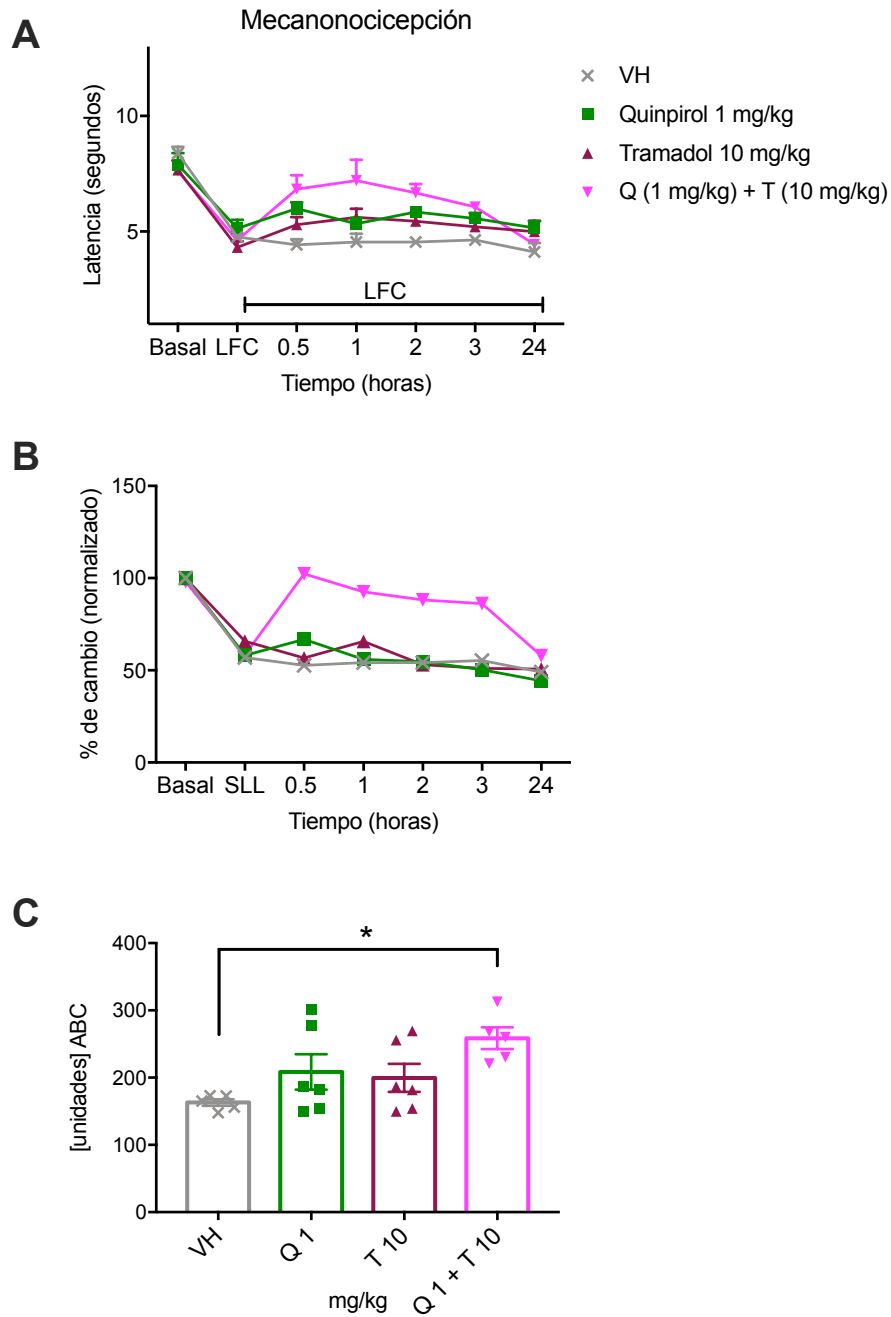


Figura 26. Efecto de la administración subcutánea de quinpirol y tramadol sobre las latencias de retirada en respuesta a estímulos mecánicos nocivos en segundos (A) y con datos normalizados (B) registradas a lo largo de 24 horas después de la inducción del modelo de dolor neuropático con la LFC. (C) Análisis de área bajo la curva, cada símbolo representa el valor único del análisis geométrico del curso temporal de cada individuo representado en unidades arbitrarias.

## **6.14 Condicionamiento preferente de lugar (CPL) como paradigma para el estudio del alivio como un componente emocional del dolor**

La evaluación de conductas nociceptivas, como los reflejos de retirada y la latencia de estos frente a estímulos térmicos y mecánicos nocivos, implica los niveles de transducción y transmisión a nivel medular/pontino y es útil para el tratamiento de dolor crónico producido por daño directo al SNC o condiciones inflamatorias crónicas. No obstante, el dolor crónico también puede resultar en alteraciones a la integración y modulación a nivel cortical (Da Silva & Seminowicz, 2019; LeBlanc et al., 2016; Parisien et al., 2019; Ploner et al., 2017). Por ello decidimos evaluar el efecto de la terapia de coadministración s.c. de agonistas dopaminérgicos  $D_2$  y  $\mu$ -opioidérgicos sobre uno de los aspectos centrales de los fármacos analgésicos, la sensación de alivio y la preferencia que genera condicionamiento medida en segundos (Leknes et al., 2008). Evaluamos la preferencia 30 minutos después de la administración s.c. de quinpirol, tramadol y su coadministración en condiciones control, con animales sin ninguna lesión, evaluando si nuestros tratamientos no producen por ellos mismos condicionamiento. En el paradigma de condicionamiento preferente de lugar (CPL) en condiciones control (Fig. 27), se muestra que el efecto de la terapia de coadministración no fue estadísticamente diferente con respecto a los puntajes de preferencia (seg) obtenidos por la administración independiente de quinpirol (1mg/kg) y tramadol (10mg/kg).

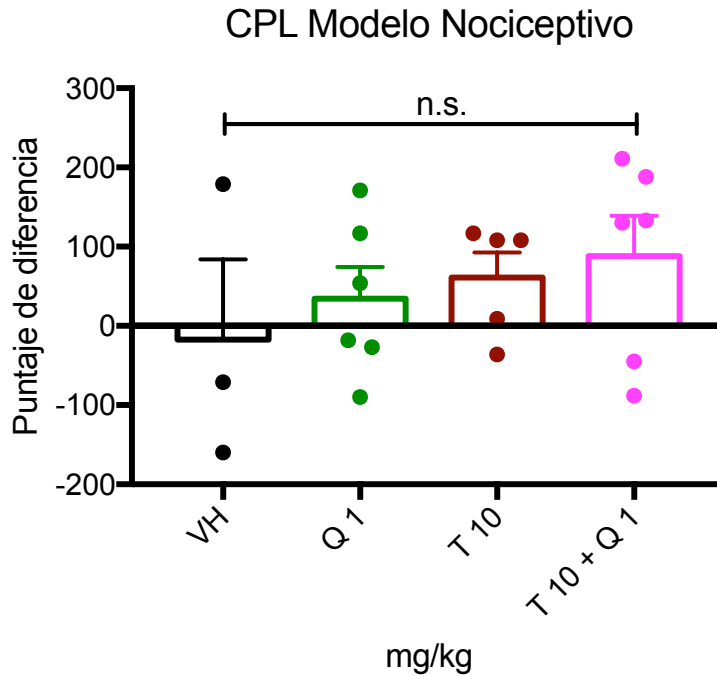


Figura 27. Efecto de la administración subcutánea de quinpirol, tramadol y su coadministración sobre la conducta de preferencia expresada en segundos registradas 1 día después de la habituación durante 30 minutos en la recámara contraria a la de preferencia basal. Resultados obtenidos mediante la resta de la preferencia basal en la recámara contraria a la de preferencia y las obtenidas 1 día después del paradigma de condicionamiento.

### **6.15 La terapia de coadministración s.c. de quinpirol y tramadol produce preferencia en el modelo de dolor inflamatorio**

10 mg/kg de Tramadol tuvo un efecto marcado sobre la preferencia 30 minutos después de su administración s.c. no obstante este efecto se observó en la mitad de los individuos registrados y la media del grupo no fue significativa. La coadministración de tramadol con quinpirol produjo una diferencia estadísticamente significativa en la preferencia con respecto a la obtenida por la administración de VH, así como frente a la administración independiente de ambos fármacos durante el modelo de dolor inflamatorio (DI) (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett  $P = 0.031$ ). Durante el modelo de dolor neuropático (DN) no se observó este efecto de la coadministración

### CPL de los 3 modelos

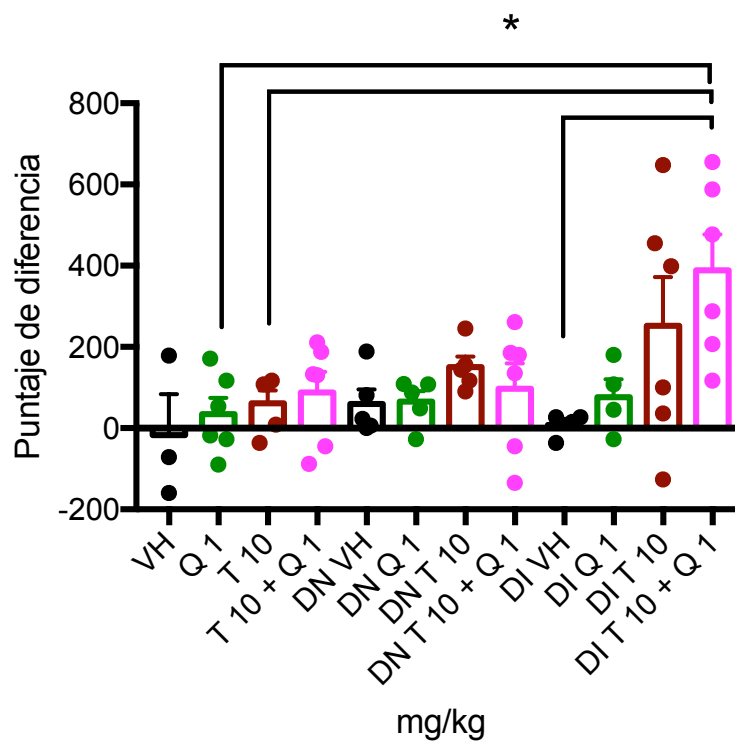


Figura 28. Efecto de la administración subcutánea de quinpirol, tramadol y su coadministración sobre la conducta de preferencia expresada en segundos registradas 1 día después de la habituación durante 30 minutos en la recámara contraria a la de preferencia basal. Resultados obtenidos mediante la resta de la preferencia basal en la recámara contraria a la de preferencia y las obtenidas 1 día después del paradigma de condicionamiento.

## 7. DISCUSIÓN

El presente trabajo ofrece nueva evidencia acerca de la interacción farmacológica entre la activación de receptores dopaminérgicos como adyuvantes de la antinocicepción producida por agonistas de los receptores  $\mu$ -opioide, utilizando dosis menores a las que producen antinocicepción por sí mismas (subclínicas). Dosis bajas de DAMGO administradas con agonistas de los receptores  $D_2$  son suficientes para aumentar la antinocicepción mecánica en el modelo de dolor nociceptivo cuando se administran por vía i.t., lo que sugiere una interacción sinérgica del efecto antinociceptivo de ambos fármacos a nivel de aferentes primarias y sus proyecciones a nivel de medula espinal, principalmente. En los modelos de dolor inflamatorio y neuropático el efecto de la coadministración local (vía i.t.) de estos fármacos también fue efectivo al revertir la hiperalgesia térmica y mecánica, lo que refuerza la hipótesis del efecto periférico. En los experimentos de administración sistémica, el efecto máximo de quinpirol se observó 1 hora después, mientras que la coadministración de este fármaco con tramadol ejerció su efecto máximo 2 horas después. Lo anterior apunta a que la dinámica de expresión y activación de los receptores  $D_2$  y los receptores  $\mu$ -opioide cambia durante condiciones patológicas; lo que puede aprovecharse de manera terapéutica. Adicionalmente, la evaluación de CPL mostró que esta coadministración también modificó la conducta de preferencia, exclusivamente en el modelo inflamatorio. Esto sugiere que los efectos analgésicos dependientes de la señalización opioidérgica y dopaminérgica disminuyen en condiciones de dolor crónico.

### 7.1 Validación farmacológica y nuevos hallazgos de la interacción entre receptores $D_2$ y $\mu$ -opioide

Los fármacos administrados de manera local (i.t.) en el modelo de dolor fisiológico corroboran la eficacia farmacológica de las dosis utilizadas y están en concordancia con la literatura reportada. La administración i.t. de quinpirol y pramipexol tuvo efecto antinociceptivo frente a estímulos mecánicos nocivos como previamente reportaron otros grupos de trabajo con agonistas de receptores tipo  $D_2$  (Almanza *et al.*, 2015; Segura-Chama *et al.*, 2020; Tamae *et al.*, 2005). Frente a estímulos térmicos nocivos solamente DAMGO tuvo un efecto significativo. Es importante resaltar que este efecto no alcanzó el máximo posible (25 s), en comparación con el efecto frente a estímulos mecánicos. No obstante, nuestros resultados de antinocicepción térmica con DAMGO i.t. concuerdan con la magnitud



del efecto utilizando dosis similares en trabajos previos (Ossipov *et al.*, 1995; Shimoyama *et al.*, 1997). Particularmente, el efecto del quinpirol, al menos en los sistemas aferentes primarios ocurre en las terminales centrales de los nociceptores del GRD que expresan marcadores para una de las poblaciones neuronales clave que codifica estímulos mecánicos los **mecanonociceptores**) El mecanismo de acción del quinpirol parece ocurrir mediante la inhibición de corrientes de  $Ca^{2+}$  mediadas por los canales  $Cav$  2.2 posterior a la activación de receptores  $D_4$  en el mismo grupo celular, debido a que bloqueadores específicos (conotoxina) para estos canales inhibieron el efecto del quinpirol (Almanza *et al.*, 2019; Segura-Chama *et al.*, 2020).

El análisis de los componentes celulares determinados genéticamente a través de bioinformática y técnicas de secuenciación de siguiente generación (NGS por sus siglas en inglés) han podido determinar poblaciones celulares clave de meconociceptores en el GRD, dentro de las cuales, además de los nociceptores no peptidérgicos ( $IB4^+$ ) se encuentran neuronas del GRD que expresan la enzima tirosina hidroxilasa ( $TH^+$ ) (Lallemend & Ernfors, 2012; Usoskin *et al.*, 2015). Curiosamente, además de transducir estímulos mecánicos, esta población presenta al transportador vesicular de glutamato VGLUT-2, esencial para la nocicepción térmica. La depleción específica en la población  $TH^+$  disminuye la respuesta a estímulos térmicos nocivos (Lagerström *et al.*, 2010) sugiriendo que esta población podría participar en la transducción de estímulos térmicos (**termonociceptores**). Estos resultados deben interpretarse con precaución ya que existe evidencia de que la población  $TH^+$  carece de los transportadores de DA (Barraud *et al.*, 2010). A pesar de esta carencia, una vía alternativa para apoyar la transducción térmica en esta población sería la síntesis extracelular de DA, a partir de la liberación de L-DOPA (Brumovsky *et al.*, 2006).

Las porciones neuronales  $TH^+$  observadas en la médula espinal también pertenecen a proyecciones descendentes provenientes del **núcleo A11**. La liberación de DA en la médula espinal parece ejercer una modulación tónica inhibiendo neuronas WDR (Laprot *et al.*, 2011). El pramipexol es un fármaco agonista a receptores  $D_2$  y  $D_3$ , ampliamente utilizado para el tratamiento de problemas motores producidos por la enfermedad de Parkinson (EP) (Antonini *et al.*, 2010). Existen reportes en pacientes con EP tratados con pramipexol, donde se observó un efecto analgésico; efecto secundario que también disminuyó efectivamente los dolores asociados con fibromialgia (Edinoff *et al.*, 2020). El pramipexol produce un efecto

antinociceptivo en pruebas de mecanonocicepción (Fig. 6) y estos resultados forman parte del segundo artículo en el que se publicaron resultados (Almanza *et al.*, 2019); además es parte de la evidencia que presentamos para postular que los agonistas a receptores tipo D<sub>2</sub> pueden fungir como agentes analgésicos (Liu *et al.*, 2019; Puopolo, 2019; Tang *et al.*, 2021) Recientemente se publicó una revisión acerca del potencial analgésico de los receptores a DA que postula a los receptores tipo D<sub>2</sub> como agentes adyuvantes (Wang *et al.*, 2021).

Los agonistas D<sub>2</sub> utilizados en el presente trabajo son específicos para receptores acoplados a proteínas G que tienen el mismo tipo de interacción con mecanismos de acción intracelulares que los receptores  $\mu$ -opioide: inhibición (disminución de la actividad de la AC), inhibición de la corriente de Ca<sup>2+</sup> de canales Cav2.2 (acoplada a la liberación del neurotransmisor), así como la hiperpolarización por activación de canales GIRK. Aunado a estos mecanismos presinápticos, en la **sustancia gelatinosa** se ha reportado que la activación del receptor D<sub>2</sub> y el receptor  $\mu$ -opioide tienen efecto sobre neuronas postsinápticas (Aira *et al.*, 2014).

En farmacología, una interacción sinérgica ocurre por la presencia de efectos farmacológicos análogos, en este caso antinociceptivos, obtenidos por mecanismos de acción diversos y complementarios. Basado en la heterodimerización entre receptores D<sub>1</sub> y receptores  $\mu$ -opioide (Juhász *et al.*, 2008), así como la activación de vías de señalización alternas por parte de los heterodímeros entre el receptor adrenérgico  $\alpha_2$  y los receptores  $\mu$ -opioide (Chabot-Doré *et al.*, 2015), propusimos que los receptores D<sub>2</sub> podrían también formar heterodímeros con los receptores  $\mu$ -opioide y explicar el efecto sinérgico observado (Fig. 10 y 12) (Mercado-Reyes *et al.*, 2019). Posteriormente, utilizando dos líneas celulares y una variedad de receptores quiméricos unidos a al menos 3 marcadores distintos para el estudio de interacciones entre proteínas, Vasudevan y cols. proveyeron evidencia robusta de la existencia de heterodímeros D<sub>2</sub>/receptores  $\mu$ -opioide (Vasudevan *et al.*, 2019).

La sinergia farmacológica entre receptores D<sub>2</sub> y el receptor  $\mu$ -opioide en la antinocicepción mecánica, en animales sanos, podría deberse a una segregación funcional del efecto de la terapia coadyuvante. Específicamente el heterodímero D<sub>2</sub>/receptores  $\mu$ -opioide parece alterar el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina al receptor  $\mu$ -opioide por lo que se mantiene más tiempo en la membrana; este hetero-complejo fue estudiado con la isoforma larga del

receptor D<sub>2</sub> (Vasudevan *et al.*, 2019). De igual manera la activación del receptor  $\mu$ -opioide activa una isoforma de la cinasa PKC (PKC  $\alpha$ ) que fosforila al receptor y lo mantiene desensibilizado en la membrana celular disminuyendo así el efecto antinociceptivo (Nandi *et al.*, 2004). La farmacodinamia de los agonistas modifica la actividad del sistema dopaminérgico. En el caso de la administración sistémica, la morfina produce liberación de DA, desinhibiendo las proyecciones descendentes del núcleo A11 y quizá aumentando la concentración de DA endógena a nivel de la médula espinal. Este mecanismo funge como adyuvante a la antinocicepción de estos fármacos cuando se coadministran (Pappas *et al.*, 2011).

Con lo expuesto hasta ahora, podemos razonar que, la activación de vías de señalización intracelular alternativas dada la presencia de heterodímeros a nivel de la médula espinal y probablemente en el SNC, así como la activación de la única proyección espinal descendente de DA, proveniente del núcleo A11, son los posibles mecanismos de acción del efecto sinérgico de la coadministración.

Es importante, no olvidar que estos mecanismos están presentes en animales sanos en el modelo de dolor no patológico. Las dosis utilizadas en animales sanos no tienen efecto a nivel de circuitos neuronales de recompensa y motricidad debido a que evidencia conductual demuestran ausencia de efecto para la dosis de  $\leq 1$  mg/kg s.c. de quinpirol (Paíno, 2014). La actividad coordinada de los receptores D<sub>2</sub> y los receptores  $\mu$ -opioide ubicados de manera pre- y postsináptica en áreas centrales y periféricas así como otros neurotransmisores, cambia en condiciones patológicas (Boadas-Vaello *et al.*, 2016). El nuevo hallazgo del quinpirol como adyuvante en la terapia de coadministración podría tener efectos terapéuticos adicionales, dados los cambios en el sistema opioidérgico y dopaminérgico.

## **7.2 Interacción del efecto de DAMGO y tramadol, agonistas al receptor $\mu$ -opioide y quinpirol, agonista al receptor tipo D<sub>2</sub>, sobre el procesamiento y retroalimentación nociceptivo en 2 modelos de dolor patológico**

Los modelos de dolor patológico producen alteraciones sobre la expresión de receptores para opioides y DA en sustratos neuronales necesarios para la analgesia, cuya integridad de funcionamiento se pierde si la patología persiste (Dai *et al.*, 2016). A nivel periférico y central la temporalidad de estos cambios proteómicos y genéticos tiene diferencias que pueden aprovecharse para la intervención farmacológica. El modelo de dolor inflamatorio inducido por inyección intraplantar de ACF, produce la disminución de ARN mensajero y expresión proteica del receptor  $\mu$ -opioide en los GRD y en la médula espinal (Aoki *et al.*, 2014); cambios que también ocurren durante modelos de dolor neuropático (Zhang *et al.*, 1997). Así mismo, se ha reportado una disminución en la expresión de los receptores D<sub>2</sub> espinales (Brumovsky *et al.*, 2006). Las entidades neuronales y los circuitos genéticamente predeterminados involucrados en los efectos de la terapia coadyuvante pueden ser clasificados de acuerdo con las respuestas observadas en las conductas de retirada y condicionamiento preferente de lugar (CPL), a través de los circuitos corticales de integración y modulación.

A nivel cortical, la inflamación inducida por carragenina disminuye la liberación de DA en la corteza de la ínsula, mientras que el nivel de ARN mensajero codificante para el receptor D<sub>2</sub> aumenta. Los cambios en la expresión así como la antinocicepción producida por la activación de este receptor son notorios 3 h después del establecimiento del modelo inflamatorio (Coffeen *et al.*, 2010). En el modelo de dolor neuropático por denervación del ciático, la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de agonistas a receptores D<sub>2</sub> en la parte rostral de la ínsula disminuye los puntajes de nocicepción crónica; de manera inesperada, estos agonistas son inefectivos durante la inflamación articular aguda (Coffeen *et al.*, 2008). Estos efectos, aparentemente contradictorios, se explican por la temporalidad de los diversos mecanismos de acción.

A nivel espinal y electrofisiológicamente, el mecanismo de acción del quinpirol en condiciones inflamatorias inhibe el disparo de potenciales de acción provocados por la activación de **fibras C WDR**; esta subpoblación neuronal tiene las propiedades de

**facilitación** y control difuso inhibitor de lo nocivo (DNIC por sus siglas en inglés). La administración de quinpirol rápidamente atenúa la facilitación (5 minutos); bloquear los receptores D<sub>2</sub> inhibe el DNIC en la médula espinal (Lapirot *et al.*, 2011). Estos mecanismos de inhibición están presentes en ambos modelos de dolor patológico ya que la inhibición fue altamente significativa (Fig. 13 y 15) y ocurrió preferentemente sobre estímulos térmicos. La segregación funcional del efecto de la terapia coadyuvante apoya la hipótesis de que las modalidades conductualmente relevantes pueden ser moduladas selectivamente, específicamente los **termonociceptores** del GRD (Scherrer *et al.*, 2009). Lo anterior tiene un potencial terapéutico sustancial, dada la amplia diversidad de síntomas periféricos (como la alodinia e hiperalgesia) que acompañan el dolor crónico (Jensen & Finnerup, 2014).

Con la excepción de la antinocicepción térmica en el grupo de 100 pmol de DAMGO, la cual también tuvo un mayor efecto en las condiciones del modelo LFC (29 vs 40% en el modelo LFC Fig. 1B y 15B), el efecto antinociceptivo de los fármacos administrados se mantiene intacto en condiciones de dolor patológico. p.ej. DAMGO frente a estímulos mecánicos tuvo el mismo efecto antinociceptivo, a pesar del establecimiento del modelo inflamatorio (Fig. 3B y 16B). Por igual, la dosis subclínica de 100 pmol i.t. de DAMGO en los modelos de LFC tuvo su efecto máximo a los 15 minutos (Fig. 13 y 14). Estos resultados no concuerdan con lo reportado previamente para los opioides, donde carecen de efecto antinociceptivo en modelos de dolor neuropático. De manera llamativa, la administración i.t. DAMGO en el modelo de dolor neuropático ejerce su efecto máximo una hora después de su administración (Fig. 16A). Paradójicamente, los receptores  $\mu$ -opioides ubicados exclusivamente los nociceptores del GRD median tanto los efectos secundarios de los opioides como la inhibición efectiva de la transmisión primaria aferente exacerbada. La diferencia radica en el sitio anatómico de su efecto y la dosis utilizada (Corder *et al.*, 2017).

Lo anterior sugiere que los mecanismos espinales a nivel presináptico y las diversas proyecciones descendentes de modulación parecen no verse afectadas por el establecimiento de los modelos de dolor patológico. La administración de quinpirol i.t. tiene su efecto máximo a los 15 minutos, mientras que en la administración s.c. se observa 1 hora después (Fig. 20A). Con la misma tendencia, la terapia de coadministración s.c. con tramadol presentó su efecto máximo 2 h después de su administración, tanto en animales sanos (Fig. 21) como

durante los modelos de dolor patológico (Fig. 23 y 25), por lo que es importante analizar los posibles sustratos neuronales y la temporalidad de los efectos que están mediando.

Los fármacos opioides tienen efecto sobre los aspectos emotivos/afectivos del dolor y la terapia coadyuvante podría tener efecto sobre estos aspectos de integración. Se ha demostrado una correlación positiva entre la liberación de opioides endógenos, producto de la *experiencia* dolorosa, en la CAC y un decremento en las conductas afectivo-emocionales del dolor. La CAC está implicada en la codificación de las características aversivas del dolor y las lesiones en la porción rostral del CAC tienen efecto sobre los aspectos aversivos de la inyección de formalina en la pata trasera de las ratas, sin afectar las respuestas de retirada. De manera similar, el tratamiento con morfina directa en el CAC fue suficiente para producir CPL y provocar una liberación de DA en el NAc, solamente en las ratas con lesión de nervio ciático. Estos hallazgos proponen una base neural para los efectos de recompensa producidos por la actividad de los opioides endógenos y el alivio de dolor (Navratilova *et al.*, 2015).

En el modelo de dolor fisiológico los estímulos térmicos y mecánicos nocivos producen un reflejo de retirada que a veces está acompañado de gesticulaciones en el rostro de nuestro organismo de estudio, la rata Wistar (Langford *et al.*, 2010). La interpretación neuropsicológica ha sido base del conocimiento biológico del dolor aún antes de la mencionada **Teoría de la Compuerta**. Las conductas de reflejo de retirada por un estímulo nocivo siguen presentes en animales descerebrados (Woolf, 1984); más aún, estas conductas no requieren de aprendizaje, una característica fundamental del dolor fisiológico (Porreca & Navratilova, 2017; Vierck *et al.*, 2008). En comparación, las gesticulaciones del rostro y la modulación de los circuitos neuronales que representan el estado actual de los circuitos pueden ser evaluados conductualmente. Aunado a esto, los modelos clásicos de dolor patológico parecen no afectar la calidad de vida de los individuos durante el total de tiempo evaluado (2 semanas promedio) (Urban *et al.*, 2011; Yalcin *et al.*, 2011) por lo que estudiar el efecto antinociceptivo y analgésico través de estudios conductuales complementarios es primordial.

### **7.3 Núcleo A11 como sustrato clave para la analgesia farmacológica, incluida la terapia coadyuvante, en 3 modelos de dolor**

La investigación de los circuitos neurales que median el efecto placebo, la activación del sistema de recompensa por alivio de dolor y el aprendizaje aversivo por dolor se encuentra en sus estadios iniciales; no obstante, se han establecido relaciones funcionales entre los sistemas dopaminérgico y opioidérgico mediante la interacción de sustratos neuronales específicos. El condicionamiento y la antinocicepción producidos por la administración sistémica de la terapia farmacológica de coadministración se explican por la posible acción sináptica entre áreas de *integración* y *modulación* del dolor, mismas que presentan cambios en los modelos de dolor patológico.

Las intervenciones farmacológicas que pretendan aliviar el dolor crónico no sólo deben enfocarse en reestablecer eficazmente la modulación y disminuir la transmisión sináptica aberrante de las aferentes primarias, también deben de poder activar y modular el ánimo, sentimientos y la percepción positiva de la terapia a través de la activación de sustratos neuronales, tales como CAC, NAc, SGP, y AVT (Mitsi & Zachariou, 2016). El efecto placebo es bien conocido en la práctica médica y marcó un parteaguas en la comprensión de los procesos neurobiológicos relacionados con la analgesia efectiva. La manipulación experimental de los receptores  $\mu$ -opioide y receptores  $D_2$  en animales y humanos ha demostrado que ambos sistemas de receptores son clave para el efecto placebo (Scott *et al.*, 2008). Estos sistemas de NT también están presentes en las áreas corticales clave CAC, NAc, SGP, y AVT. El efecto placebo, y percepción del alivio del dolor tienen sustratos neuronales análogos, los cuales presentan desequilibrios sinápticos durante el dolor crónico en pacientes con lesión directa del SNP. Estos desequilibrios también afectan los circuitos neuronales de recompensa, mismos que activan el circuito NAc, CAC y AVT.

Los modelos conductuales que estudian la preferencia están relacionados con el circuito mesocorticolímbico de recompensa (Porreca & Navratilova, 2017) y nuestros resultados sugieren que la terapia de coadministración fue efectiva en producir CPL en el modelo de dolor inflamatorio. La señalización glutamatérgica excitatoria, dependiente de la vía indirecta (receptores  $D_2$ ) en neuronas medianas espinosas (MSN neurons) del NAc media

la recompensa. Esta vía presentó cambios en trabajos previos que utilizaron nuestro mismo modelo de dolor inflamatorio (CFA) en su variante crónica. Importantemente, solo la variable aguda del modelo CFA presentó alteraciones sinápticas mediadas por receptores NMDA con una marcada ausencia de la LTD mediada por receptores AMPA (Schwartz *et al.*, 2014). Esta depresión sináptica está en parte mediada por los receptores D<sub>2</sub>S. Los receptores D<sub>2</sub>, en general, tienen mayor afinidad por la DA. Se ha observado un decremento en la liberación de DA en el NAc de humanos durante el dolor crónico, lo que se traduce en un aumento en la transmisión excitatoria, dados los mecanismos de inhibición por activación de autoreceptores presinápticos (Taylor *et al.*, 2016). En comparación, la recompensa repentina no esperada produce liberación fásica de DA tanto en ratas como humanos, mientras que la ausencia de alivio o recompensa produce un decremento en la misma. Si un fármaco es ineficaz en producir la analgesia esperada esto se traducirá en cambios de la señalización dopaminérgica.

El resultado de la diferencia entre liberación de DA por presencia o ausencia de alivio es análogo con el proceso computacional de predicción de errores, el cual tiene como sustrato neuronal candidato a la SGP (Roy *et al.*, 2014). La SGP integra señales nociceptivas de entrada y modula el dolor a través de proyecciones descendentes opioidérgicas. Los efectos máximos, registrados en los cursos temporales de los modelos de dolor, presentes hasta 2 horas después de su administración, muestran que la terapia de coadministración podría tener efecto antinociceptivo por medio del circuito AVT-NAc-SGP. La liberación de DA en el NAc por activación tónica del AVT, produce condicionamiento en un modelo de analgesia por bloqueo nervioso, 1, pero no 4 días después del establecimiento de una lesión por incisión (Navratilova *et al.*, 2012). La actividad de las neuronas del circuito AVT-NAc y la manipulación farmacológica de la vía nigroestriatal (Rivera *et al.*, 2017) sugiere que la inhibición tónica se pierde en situaciones de desviación homeostática crónica como el dolor neuropático, pero se mantiene en condiciones de dolor inflamatorio agudo. El dolor de relevancia clínica tienen un componente tónico que no es visible con los métodos de estudio actuales (Porreca & Navratilova, 2017). Será necesario complementar los resultados de nuestro estudio con experimentos que aborden es componente en ambos modelos de dolor patológico. Otros sitios anatómicos intervienen en la antinocicepción y CPL observados por la terapia de coadministración.



La activación eléctrica del núcleo A11 produce antinocicepción por medio de la activación de receptores D<sub>2</sub> (Fleetwood-Walker *et al.*, 1988; Wei *et al.*, 2009). Esta activación parece depender de la desinhibición de neuronas GABAérgicas (Wei *et al.*, 2009) además de ser específica para estímulos nociceptivos (Charbit *et al.*, 2009) El núcleo A11 cuenta con aproximadamente 450 neuronas que carecen del efecto protector de los autoreceptores presinápticos D<sub>2</sub>. Las neuronas dopaminérgicas generalmente presentan ambas **isoformas** o variaciones genéticas de los receptores D<sub>2</sub>, donde se distingue la isoforma D<sub>2</sub>L, que se expresa preferentemente de manera postsináptica y los receptores D<sub>2</sub>S presinápticos, que inhiben de liberación subsecuente de DA por medio de actividad autócrina (Usiello *et al.*, 2000) (Pappas *et al.*, 2008). Este mecanismo también controla la síntesis y liberación de DA en los circuitos neuronales que median el efecto placebo y la recompensa, mencionados previamente. El transportador de DA, DAT (por sus siglas en inglés, también VMAT2), esencial para la recaptura de DA, aparentemente tampoco está presente en el núcleo A11.

Importantemente, el núcleo A11 y sus proyecciones espinales tienen un claro dimorfismo sexual que está ligado a una de las diferencias sexuales mejor caracterizadas en las ratas. El núcleo de neuronas motoras denominado núcleo espinal bulbocavernoso (NEB) está presente en los segmentos L5 y L6 controla los músculos sexualmente dimórficos bulbocavernoso y elevador en los machos. Los machos además presentan hasta 4 veces más cuerpos celulares TH<sup>+</sup> así como hasta 3 veces más fibras de inervación dopaminérgica. Esto se debe a la inervación del NEB y explica parte de los resultados aquí obtenidos (Pappas *et al.*, 2010). Será menesteroso determinar si los efectos de la terapia coadyuvante también se presentan en ratas hembra. Relevantemente, se reportó este año que el núcleo A11 presenta cambios transitorios en su transmisión tónica, mismos que se reestablecen aún en la cronicidad de modelos de dolor neuropático (Zhao *et al.*, 2021).

En el modelo de seccionamiento de la médula espinal se estudió el perfil proteómico para la síntesis y liberación de DA, así como la expresión de las dos familias de receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en el núcleo A11. Interesantemente, el seccionamiento a nivel torácico produjo una disminución transitoria en las enzimas TH<sup>+</sup>, dopamina descarboxilasa y en el receptor D<sub>2</sub>. La ausencia de condicionamiento presente en nuestros resultados (Fig. 28) concuerda con la disminución presente 3 semanas después del establecimiento del modelo. Aunado a esto, los investigadores mantuvieron a los animales hasta dos meses después y observaron que el

decremento en las enzimas dopamina descarboxilasa se recuperaba después de este tiempo, con la excepción la expresión del receptor D<sub>2</sub> y la enzima TH. Una característica de la síntesis de proteínas axonales es que el ARN mensajero de los axones permite una regulación espacio-temporal precisa en respuesta al ambiente extracelular (Zhao *et al.*, 2021). La inhibición tónica total del núcleo A11, así como su resiliencia ante modelos de dolor patológico crónico lo sitúa como un blanco farmacológico que podría ser activado por la terapia coadyuvante de manera específica.

Por lo anterior, resta por establecer las dosis de opioides fuertes, como la morfina, que coadministrados con adyuvantes dopaminérgicos D<sub>2</sub> produzcan condicionamiento en el modelo de dolor neuropático, así como establecer si también hay condicionamiento en la variante crónica de los modelos de dolor inflamatorio y neuropático.

#### **7.4 Dolor crónico en la población mexicana: el futuro de la intervención clínica y los modelos de intervención multidisciplinarios**

Brevemente para concluir el impacto del presente estudio en México, la situación actual referente al uso de opioides apunta a que podría presentarse un aumento en los casos de adicción y muertes fatales relacionados con el uso de opioides debido a la promoción del actual gobierno para la legalización y despenalización del uso de marihuana con fines medicinales, el aumento en la prescripción de opioides, así como la ubicación geográfica y su proximidad con los Estados Unidos de América, nación que reporta hasta 70 mil muertes al año, situación que ha sido descrita como *Opioid epidemic* (Boslett *et al.*, 2020).

Por presión de varias organizaciones, principalmente la Fundación Mexicana para la Salud, se relajaron las medidas de restricción lo que derivó en un aumento del uso y la prescripción de opioides hasta en un 200%. En el mismo estudio se sugiere una serie de medidas que podrían mitigar el impacto de este aumento, siendo una de las principales, el uso de medicamentos no opioides como adyuvantes (Goodman-Meza *et al.*, 2019). De esta manera el presente trabajo asienta antecedentes preclínicos que satisfacen esta medida. Además, presenta la importante distinción entre los procesos de antinocicepción y analgesia, misma que estos autores también sugieren como medida preventiva que debe ser incluida en las rotaciones y escuelas médicas del país.

La comunicación estrecha entre investigadores y médicos, así como la población mexicana, permitirá que la prescripción de opioides y la investigación de terapias coadyuvantes resulten en un mejor manejo clínico del dolor crónico, mismo que también ha presentado un aumento en su incidencia en la población mexicana (Hollingshead *et al.*, 2017).

## **8. CONCLUSIONES**

- El efecto de la administración i.t. de quinpirol, pramipexol DAMGO y tramadol en individuos sanos ocurre a través de mecanismos análogos en poblaciones neuronales de aferentes primarias y circuitos espinales dada la rápida aparición del efecto antinociceptivo y corto tiempo de duración del efecto máximo.
- La terapia coadyuvante de quinpirol y DAMGO i.t. así como quinpirol y tramadol s.c. fue efectiva en revertir la hiperalgesia producida por los modelos de dolor patológico. Específicamente, la hiperalgesia mecánica en el modelo de dolor neuropático, refractaria para tratamientos convencionales, pudo ser revertida por la terapia coadyuvante en su administración local y sistémica.
- La terapia coadyuvante es capaz de producir un aumento en el condicionamiento de preferencia producido por la administración de tramadol en condiciones de dolor patológico, particularmente en el modelo de dolor inflamatorio.

## 9. REFERENCIAS

- Aira, Z., Barrenetxea, T., Buesa, I., Garcia del Cano, G., & Azkue, J. J. (2016). Dopamine D1-like Receptors Regulate Constitutive,  $\mu$ -Opioid Receptor-Mediated Repression of Use-Dependent Synaptic Plasticity in Dorsal Horn Neurons: More Harm than Good? *Journal of Neuroscience*, *36*(20), 5661–5673.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2469-15.2016>
- Aira, Zigor, Barrenetxea, T., Buesa, I., Gómez-Esteban, J. C., & Azkue, J. J. (2014). Synaptic upregulation and superadditive interaction of dopamine D2- and  $\mu$ -opioid receptors after peripheral nerve injury. *Pain*, *155*(12), 2526–2533.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.012>
- Aira, Zigor, Barrenetxea, T., Buesa, I., Gómez-esteban, J. C., & Jatsu, J. (2014). Synaptic upregulation and superadditive interaction of dopamine D2- and  $\mu$ -opioid receptors after peripheral nerve injury, *155*, 2526–2533.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.012>
- Al-Hasani, R., & Bruchas, M. R. (2011). Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*, *115*(6), 1363–1381.  
<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318238bba6>
- Almanza, A., Segura-Chama, P., León-Olea, M., Luis, E., Garduño-Gutiérrez, R., Mercado-Reyes, J., ... Mercado, F. (2019). Cellular Mechanism for Specific Mechanical Antinociception by D2-like Receptor at the Spinal Cord Level. *Neuroscience*, *417*, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.019>
- Almanza, A., Simón-Arceo, K., Coffeen, U., Fuentes-García, R., Contreras, B., Pellicer, F., & Mercado, F. (2015). A D2-like receptor family agonist produces analgesia in mechanonociception but not in thermonociception at the spinal cord level in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *137*, 119–125.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.08.013>
- Antonini, A., Barone, P., Ceravolo, R., Fabbrini, G., Tinazzi, M., & Abbruzzese, G. (2010). Role of pramipexole in the management of Parkinsons disease. *CNS Drugs*, *24*(10), 829–841. <https://doi.org/10.2165/11585090-000000000-00000>

- Aoki, Y., Mizoguchi, H., Watanabe, C., Takeda, K., Sakurada, T., & Sakurada, S. (2014). Potential involvement of  $\mu$ -opioid receptor dysregulation on the reduced antinociception of morphine in the inflammatory pain state in mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, *124*(2), 258–266. <https://doi.org/10.1254/jphs.13242FP>
- Apkarian, A. V., Bushnell, M. C., Treede, R. D., & Zubieta, J. K. (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *European Journal of Pain*, *9*(4), 463. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2004.11.001>
- Axelrod, F. B., & Hilz, M. J. (2003). Inherited Autonomic Neuropathies. *Seminars in Neurology*, *23*(4), 381–390. <https://doi.org/10.1055/s-2004-817722>
- Baron, R. (2006). Mechanisms of disease: Neuropathic pain - A clinical perspective. *Nature Clinical Practice Neurology*, *2*(2), 95–106. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0113>
- Baron, R., Binder, A., & Wasner, G. (2010). Neuropathic pain: Diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *The Lancet Neurology*, *9*(8), 807–819. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70143-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70143-5)
- Barraud, Q., Obeid, I., Aubert, I., Barrière, G., Contamin, H., McGuire, S., ... Ghorayeb, I. (2010). Neuroanatomical study of the A11 diencephalospinal pathway in the non-human primate. *PLoS ONE*, *5*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013306>
- Beaulieu-Laroche, L., Christin, M., Donoghue, A., Agosti, F., Yousefpour, N., Petitjean, H., ... Sharif-Naeini, R. (2020). TACAN Is an Ion Channel Involved in Sensing Mechanical Pain. *Cell*, *180*(5), 956-967.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.033>
- Beaulieu, J.-M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacological Reviews*, *63*(1), 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
- Bennett, G. J., & Xie, Y. K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces d... [Pain. 1988] - PubMed result. *Pain*, *33*, 87–107. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6)
- Bessou, P., & Perl, E. R. (1969). Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *Journal of Neurophysiology*, *32*(6), 1025–1043.

<https://doi.org/10.1152/jn.1969.32.6.1025>

Billiau, A., & Matthys, P. (2001). Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(6), 849–860.

<https://doi.org/10.1189/jlb.70.6.849>

Boadas-Vaello, P., Castany, S., Homs, J., Álvarez-Pérez, B., Deulofeu, M., & Verdú, E. (2016). Neuroplasticity of ascending and descending pathways after somatosensory system injury: Reviewing knowledge to identify neuropathic pain therapeutic targets. *Spinal Cord*, 54(5), 330–340.

<https://doi.org/10.1038/sc.2015.225>

Boslett, A. J., Denham, A., & Hill, E. L. (2020). Using contributing causes of death improves prediction of opioid involvement in unclassified drug overdoses in US death records. *Addiction*, 115(7), 1308–1317.

<https://doi.org/10.1111/add.14943>

Bourinet, E., Soong, T. W., Stea, A., & Snutch, T. P. (1996). Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(4), 1486–1491.

<https://doi.org/10.1073/pnas.93.4.1486>

Brady, S. T., Siegel, G. J., Albers, R. W., & Price, D. L. (2012). *Basic Neurochemistry. Basic Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-00066-X>

Braz, J., Solorzano, C., Wang, X., & Basbaum, A. I. (2014). Transmitting Pain and Itch Messages: A Contemporary View of the Spinal Cord Circuits that Generate Gate Control. *Neuron*, 82(3), 522–536.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.018>

Brewer, K. L., Baran, C. A., Whitfield, B. R., Jensen, A. M., & Clemens, S. (2014). Dopamine D3 receptor dysfunction prevents anti-nociceptive effects of morphine in the spinal cord. *Frontiers in Neural Circuits*, 8(June), 1–10.

<https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00062>

Brumovsky, P., Villar, M. J., & Hökfelt, T. (2006). Tyrosine hydroxylase is expressed in a subpopulation of small dorsal root ganglion neurons in the adult mouse. *Experimental Neurology*, 200(1), 153–165.

<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.01.023>

Burns, J. A., Kroll, D. S., Feldman, D. E., Kure Liu, C., Manza, P., Wiers, C. E., ... Wang,

- G. J. (2019). Molecular Imaging of Opioid and Dopamine Systems: Insights Into the Pharmacogenetics of Opioid Use Disorders. *Frontiers in Psychiatry*, *10*(September), 1–31. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2019.00626>
- Campbell, J. N., & Meyer, R. A. (2006). Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*, *52*(1), 77–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.021>
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, *389*(6653), 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- Chabot-Doré, A. J., Schuster, D. J., Stone, L. S., & Wilcox, G. L. (2015). Analgesic synergy between opioid and  $\alpha$ 2-adrenoceptors. *British Journal of Pharmacology*, *172*(2), 388–402. <https://doi.org/10.1111/bph.12695>
- Charbit, A. R., Akerman, S., Holland, P. R., & Goadsby, P. J. (2009). Neurons of the dopaminergic/calcitonin gene-related peptide A11 cell group modulate neuronal firing in the trigeminocervical complex: an electrophysiological and immunohistochemical study. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(40), 12532–12541. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2887-09.2009>
- Chater, T. E., & Goda, Y. (2013). CA3 Mossy Fiber Connections: Giant Synapses that Gain Control. *Neuron*, *77*(1), 4–6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.024>
- Chiu, I. M., Barrett, L. B., Williams, E. K., Strohlic, D. E., Lee, S., Weyer, A. D., ... Woolf, C. J. (2014). Transcriptional profiling at whole population and single cell levels reveals somatosensory neuron molecular diversity. *ELife*, *3*, 1–32. <https://doi.org/10.7554/eLife.04660>
- Christie, M. J. (2008). Cellular neuroadaptations to chronic opioids: Tolerance, withdrawal and addiction. *British Journal of Pharmacology*, *154*(2), 384–396. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.100>
- Cobacho, N., de la Calle, J. L., & Paíno, C. L. (2014). Dopaminergic modulation of neuropathic pain: Analgesia in rats by a D2-type receptor agonist. *Brain Research*

*Bulletin*, 106, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.06.003>

- Coffeen, U., López-Avila, A., Ortega-Legaspi, J. M., Ángel, R., López-Muñoz, F. J., & Pellicer, F. (2008). Dopamine receptors in the anterior insular cortex modulate long-term nociception in the rat. *European Journal of Pain*, 12(5), 535–543. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2007.08.008>
- Coffeen, U., Ortega-Legaspi, J. M., de Gortari, P., Simón-Arceo, K., Jaimes, O., Amaya, M. I., & Pellicer, F. (2010). Inflammatory nociception diminishes dopamine release and increases dopamine D2 receptor mRNA in the rat's insular cortex. *Molecular Pain*, 6(1), 75. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-75>
- Corder, G., Tawfik, V. L., Wang, D., Sypek, E. I., Low, S. A., Dickinson, J. R., ... Scherrer, G. (2017). Loss of  $\mu$  opioid receptor signaling in nociceptors, but not microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesia. *Nature Medicine*, 23(2), 164–173. <https://doi.org/10.1038/nm.4262>
- Da Silva, J. T., & Seminowicz, D. A. (2019). Neuroimaging of pain in animal models. *PAIN Reports*, 4(4), e732. <https://doi.org/10.1097/pr9.0000000000000732>
- Dai, W. L., Xiong, F., Yan, B., Cao, Z. Y., Liu, W. T., Liu, J. H., & Yu, B. Y. (2016). Blockade of neuronal dopamine D2 receptor attenuates morphine tolerance in mice spinal cord. *Scientific Reports*, 6(December), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep38746>
- Daviu, N., Bruchas, M. R., Moghaddam, B., Sandi, C., & Beyeler, A. (2019). Neurobiological links between stress and anxiety. *Neurobiology of Stress*, 11(April), 100191. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100191>
- Dib-Hajj, S. D., Yang, Y., Black, J. A., & Waxman, S. G. (2013). The Na<sup>v</sup> 1.7 sodium channel: From molecule to man. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrn3404>
- Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors : the sensors of the pain pathway Find the latest version : Review series Nociceptors : the sensors of the pain pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760–3772. <https://doi.org/10.1172/JCI42843.3760>



- Dworkin, R. H., O'Connor, A. B., Backonja, M., Farrar, J. T., Finnerup, N. B., Jensen, T. S., ... Wallace, M. S. (2007). Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. *Pain, 132*(3), 237–251.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.033>
- Edinoff, A., Sathivadivel, N., McBride, T., Parker, A., Okeagu, C., Kaye, A. D., ... Urits, I. (2020). Chronic pain treatment strategies in Parkinson's disease. *Neurology International, 12*(3), 61–76. <https://doi.org/10.3390/neurolint12030014>
- Fields, H. L., Clanton, C. H., & Anderson, S. D. (1977). Somatosensory properties of spinoreticular neurons in the cat. *Brain Research, 120*(1), 49–66.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90497-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90497-8)
- Fil, A., Cano-de-la-Cuerda, R., Muñoz-Hellín, E., Vela, L., Ramiro-González, M., & Fernández-de-las-Peñas, C. (2013). Pain in Parkinson disease: A review of the literature. *Parkinsonism and Related Disorders, 19*(3), 285–294.  
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.11.009>
- Finan, P. H., Remeniuk, B., & Dunn, K. E. (2018). The risk for problematic opioid use in chronic pain: What can we learn from studies of pain and reward? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 87*(July 2017), 255–262.  
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.07.029>
- Finnerup, Nanna B, Attal, N., Haroutounian, S., Moore, A., Raja, S. N., & Rice, A. S. C. (2016). Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: systematic review, meta-analysis and updated NeuPSIG recommendations, *14*(2), 162–173.  
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70251-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70251-0).Pharmacotherapy
- Finnerup, Nanna Brix, Sindrup, S. H., & Jensen, T. S. (2010). The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain, 150*(3), 573–581.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.06.019>
- Fleetwood-Walker, S. M., Hope, P. J., & Mitchell, R. (1988). Antinociceptive actions of descending dopaminergic tracts on cat and rat dorsal horn somatosensory neurones. *The Journal of Physiology, 399*(1), 335–348.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017084>

- Galbavy, W., Safaie, E., Rebecchi, M. J., & Puopolo, M. (2013). Inhibition of tetrodotoxin-resistant sodium current in dorsal root ganglia neurons mediated by D1/D5 dopamine receptors. *Molecular Pain*, *9*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-9-60>
- Gasser, H. S., & Erlanger, J. (1927). THE RÔLE PLAYED BY THE SIZES OF THE CONSTITUENT FIBERS OF A NERVE TRUNK IN DETERMINING THE FORM OF ITS ACTION POTENTIAL WAVE. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *80*(3), 522–547. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1927.80.3.522>
- Gold, M. S., & Gebhart, G. F. (2010). Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nature Medicine*, *16*(11), 1248–1257. <https://doi.org/10.1038/nm.2235>
- Goodman-Meza, D., Medina-Mora, M. E., Magis-Rodríguez, C., Landovitz, R. J., Shoptaw, S., & Werb, D. (2019). Where is the opioid use epidemic in Mexico? A cautionary tale for policymakers south of the US–Mexico border. *American Journal of Public Health*, *109*(1), 73–82. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2018.304767>
- Grudt, T. J., & Perl, E. R. (2002). Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *Journal of Physiology*, *540*(1), 189–207. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.012890>
- Hagenacker, T., Ledwig, D., & Büsselberg, D. (2008). Feedback mechanisms in the regulation of intracellular calcium ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) in the peripheral nociceptive system: Role of TRPV-1 and pain related receptors. *Cell Calcium*, *43*(3), 215–227. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.05.019>
- Hollingshead, N., Vransy, E., Hsueh, L., Stewart, J., & Hirsh, A. (2017). (441) Differences in the experience and management of chronic pain across first-, second-, and third-generation Mexican Americans: Results from NHANES 1999-2004. *The Journal of Pain*, *18*(4), S84. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2017.02.291>
- Holstege, J. C., Dijken, H. V. A. N., Buijs, R. M., Goedknecht, H., & Gosens, T. (1996). Distribution of Dopamine Immunoreactivity in the Rat, Cat, and Monkey Spinal Cord, *652*, 631–652.
- Hughes, D. I., Sikander, S., Kinnon, C. M., Boyle, K. A., Watanabe, M., Callister, R. J., &

- Graham, B. A. (2012). Morphological, neurochemical and electrophysiological features of parvalbumin-expressing cells: A likely source of axo-axonic inputs in the mouse spinal dorsal horn. *Journal of Physiology*, *590*(16), 3927–3951.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.235655>
- Jacobs, K., Smith, A., Heathcote, L. C., & Caes, L. (2020). Which passengers are on your bus? A taxonomy of the barriers adolescents with chronic pain face in achieving functional recovery. *European Journal of Pain (United Kingdom)*, (June), 1–11.  
<https://doi.org/10.1002/ejp.1673>
- Jarcho, J. M., Mayer, E. A., Jiang, Z. K., Feier, N. A., & London, E. D. (2012). Pain, affective symptoms, and cognitive deficits in patients with cerebral dopamine dysfunction. *Pain*, *153*(4), 744–754. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.01.002>
- Jensen, T. S., Baron, R., Haanpää, M., Kalso, E., Loeser, J. D., Rice, A. S. C., & Treede, R. D. (2011). A new definition of neuropathic pain. *Pain*, *152*(10), 2204–2205.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.06.017>
- Jensen, T. S., & Finnerup, N. B. (2014). Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: Clinical manifestations and mechanisms. *The Lancet Neurology*, *13*(9), 924–935.  
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70102-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70102-4)
- Juhasz, J. R., Hasbi, A., Rashid, A. J., So, C. H., George, S. R., & O'Dowd, B. F. (2008). Mu-opioid receptor heterooligomer formation with the dopamine D1 receptor as directly visualized in living cells. *European Journal of Pharmacology*, *581*(3), 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.060>
- Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y., Hirose, T., ... Numa, S. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine  $\beta$ -neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature*, *298*(5871), 245–249. <https://doi.org/10.1038/298245a0>
- Kamei, J., & Saitoh, A. (1996). Involvement of dopamine D2 receptor-mediated functions in the modulation of morphine-induced antinociception in diabetic mouse. *Neuropharmacology*, *35*(3), 273–278. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(95\)00189-1](https://doi.org/10.1016/0028-3908(95)00189-1)
- Koblinger, K., Füzesi, T., Ejdrygiewicz, J., Krajacic, A., Bains, J. S., & Whelan, P. J.

- (2014). Characterization of A11 neurons projecting to the spinal cord of mice. *PLoS ONE*, 9(10), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109636>
- Koga, K., Descalzi, G., Chen, T., Ko, H. G., Lu, J., Li, S., ... Zhuo, M. (2015). Coexistence of two forms of LTP in ACC provides a synaptic mechanism for the interactions between anxiety and chronic pain. *Neuron*, 85(2), 377–389. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.021>
- Koltzenburg, M., & Handwerker, H. O. (1994). Differential ability of human cutaneous nociceptors to signal mechanical pain and to produce vasodilatation. *Journal of Neuroscience*, 14(3 II), 1756–1765. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-03-01756.1994>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217–238. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>
- Krishnan, A., Woo, C. W., Chang, L. J., Ruzic, L., Gu, X., López-Solà, M., ... Wager, T. D. (2016). Somatic and vicarious pain are represented by dissociable multivariate brain patterns. *eLife*, 5(JUN2016), 1–42. <https://doi.org/10.7554/eLife.15166>
- Kucyi, A., & Davis, K. D. (2015). The dynamic pain connectome. *Trends in Neurosciences*, 38(2), 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.11.006>
- Lagerström, M. C., Rogoz, K., Abrahamsen, B., Persson, E., Reinius, B., Nordenankar, K., ... Kullander, K. (2010). VGLUT2-Dependent Sensory Neurons in the TRPV1 Population Regulate Pain and Itch. *Neuron*, 68(3), 529–542. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.016>
- Lallemend, F., & Ernfors, P. (2012). Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends in Neurosciences*, 35(6), 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.03.006>
- LaMantia, A.-S. (2017). *Neuroscience 6th Edition. Unit IV: The Changing Brain*. (W. et al. Purves, Dale; Augustine, George; Fitzpatrick, David; Hall, Ed.) (Sixth Edit). Sinauer Associates.
- Langford, D. J., Bailey, A. L., Chanda, M. L., Clarke, S. E., Drummond, T. E., Echols, S.,

- ... Mogil, J. S. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, 7(6), 447–449. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1455>
- Lapirot, O., Melin, C., Modolo, A., Nicolas, C., Messaoudi, Y., Monconduit, L., ... Dallel, R. (2011). Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn. *Pain*, 152(8), 1821–1831. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.03.030>
- Le Pichon, C. E., & Chesler, A. T. (2014). The functional and anatomical dissection of somatosensory subpopulations using mouse genetics. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(APR), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00021>
- LeBlanc, B. W., Bowary, P. M., Chao, Y. C., Lii, T. R., & Saab, C. Y. (2016). Electroencephalographic signatures of pain and analgesia in rats. *Pain*, 157(10), 2330–2340. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000652>
- Lecei, A., & van Winkel, R. (2020). Hippocampal pattern separation of emotional information determining risk or resilience in individuals exposed to childhood trauma: Linking exposure to neurodevelopmental alterations and threat anticipation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 108(April 2019), 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.11.010>
- Leknes, S., Brooks, J. C. W., Wiech, K., & Tracey, I. (2008). Pain relief as an opponent process: A psychophysical investigation. *European Journal of Neuroscience*, 28(4), 794–801. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06380.x>
- Li, C., Sugam, J. A., Lowery-Gionta, E. G., McElligott, Z. A., McCall, N. M., Lopez, A. J., ... Kash, T. L. (2016). Mu Opioid Receptor Modulation of Dopamine Neurons in the Periaqueductal Gray/Dorsal Raphe: A Role in Regulation of Pain. *Neuropsychopharmacology*, 41(8), 2122–2132. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.12>
- Lima, D., & Coimbra, A. (1986). A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*, 244(1), 53–71. <https://doi.org/10.1002/cne.902440105>
- Liu, Q., Tang, Z., Surdenikova, L., Kim, S., Patel, K. N., Kim, A., ... Dong, X. (2009).

- Sensory Neuron-Specific GPCR Mrgprs Are Itch Receptors Mediating Chloroquine-Induced Pruritus. *Cell*, *139*(7), 1353–1365. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.034>
- Liu, S., Tang, Y., Shu, H., Tatum, D., Bai, Q., Crawford, J., ... Tao, F. (2019). Dopamine receptor D2, but not D1, mediates descending dopaminergic pathway–produced analgesic effect in a trigeminal neuropathic pain mouse model. *PAIN*, *160*(2), 334–344. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001414>
- Lopes, D. M., Denk, F., & McMahon, S. B. (2017). The molecular fingerprint of dorsal root and trigeminal ganglion neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*(September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00304>
- López-Avila, A., Coffeen, U., Ortega-Legaspi, J. M., Del Ángel, R., & Pellicer, F. (2004). Dopamine and NMDA systems modulate long-term nociception in the rat anterior cingulate cortex. *Pain*, *111*(1–2), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.06.010>
- Luz, L. L., Fernandes, E. C., Sivado, M., Kokai, E., Szucs, P., & Safronov, B. V. (2015). Monosynaptic convergence of somatic and visceral C-fiber afferents on projection and local circuit neurons in lamina I: A substrate for referred pain. *Pain*, *156*(10), 2042–2051. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000267>
- Madrid, R., De La Peña, E., Donovan-Rodriguez, T., Belmonte, C., & Viana, F. (2009). Variable threshold of trigeminal cold-thermosensitive neurons is determined by a balance between TRPM8 and Kv1 potassium channels. *Journal of Neuroscience*, *29*(10), 3120–3131. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4778-08.2009>
- Martin, W. R., Eades, C. G., Thompson, J. A., Huppler, R. E., & Gilbert, P. E. (1976). The effects of morphine and nalorphine like drugs in the nondependent and morphine dependent chronic spinal dog. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *197*(3), 517–532.
- McCoy, E. S., Taylor-Blake, B., Street, S. E., Pribisko, A. L., Zheng, J., & Zylka, M. J. (2013). Peptidergic CGRP $\alpha$  Primary Sensory Neurons Encode Heat and Itch and Tonicly Suppress Sensitivity to Cold. *Neuron*, *78*(1), 138–151. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.030>

- McKemy, D. D. (2013). The molecular and cellular basis of cold sensation. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(2), 238–247. <https://doi.org/10.1021/cn300193h>
- McKemy, D. D., Neuhausser, W. M., & Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416(6876), 52–58. <https://doi.org/10.1038/nature719>
- Megat, S., Ray, P. R., Tavares-Ferreira, D., Moy, J. K., Sankaranarayanan, I., Wangzhou, A., ... Price, T. J. (2019). Differences between Dorsal Root and Trigeminal Ganglion Nociceptors in Mice Revealed by Translational Profiling. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 39(35), 6829–6847. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2663-18.2019>
- Melzack, R., & Wall, P. D. (1965). Pain mechanisms: A new theory. *Pain Clinic*, 7(1), 57–72. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511759048.009>
- Mercado-Reyes, J., Almanza, A., Segura-Chama, P., Pellicer, F., & Mercado, F. (2019). D2-like receptor agonist synergizes the  $\mu$ -opioid agonist spinal antinociception in nociceptive, inflammatory and neuropathic models of pain in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 853(March), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.03.020>
- Meyers, D. E. R., & Snow, P. J. (1982). The responses to somatic stimuli of deep spinothalamic tract cells in the lumbar spinal cord of the cat. *The Journal of Physiology*, 329(1), 355–371. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014307>
- Michael J. Brownstein. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(12), 5391–5393. Retrieved from <https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=2748b363-305f-4311-6a3c-171b74a43332&documentId=6b4dc5ca-8403-3307-9265-ceb50db3e6ec>
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, 66(6), 355–474. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00009-6)
- Mitsi, V., & Zachariou, V. (2016). Modulation of pain, nociception, and analgesia by the

brain reward center. *Neuroscience*, 338, 81–92.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.017>

Morin, C., & Bushnell, M. C. (1998). Temporal and qualitative properties of cold pain and heat pain: A psychophysical study. *Pain*, 74(1), 67–73. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(97\)00152-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(97)00152-8)

Nandi, R., Beacham, D., Middleton, J., Koltzenburg, M., Howard, R. F., & Fitzgerald, M. (2004). The functional expression of mu opioid receptors on sensory neurons is developmentally regulated; morphine analgesia is less selective in the neonate. *Pain*, 111(1–2), 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.05.025>

Navarro-Alvarez, N., Gonçalves, B. M. M., Andrews, A. R., Sachs, D. H., & Huang, C. A. (2018). A CFA-Induced model of inflammatory skin disease in miniature swine. *International Journal of Inflammation*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6916920>

Navratilova, E., Xie, J. Y., Meske, D., Qu, C., Morimura, K., Okun, A., ... Porreca, F. (2015). Endogenous Opioid Activity in the Anterior Cingulate Cortex Is Required for Relief of Pain. *Journal of Neuroscience*, 35(18), 7264–7271. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3862-14.2015>

Navratilova, Edita, Atcherley, C. W., & Porreca, F. (2015). Brain Circuits Encoding Reward from Pain Relief. *Trends in Neurosciences*, 38(11), 741–750. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.09.003>

Navratilova, Edita, Xie, J. Y., Okun, A., Qu, C., Eyde, N., Ci, S., ... Porreca, F. (2012). Pain relief produces negative reinforcement through activation of mesolimbic reward-valuation circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50), 20709–20713. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214605109>

Ossipov, M. H., Lopez, Y., Nichols, M. L., Bian, D., & Porreca, F. (1995). The loss of antinociceptive efficacy of spinal morphine in rats with nerve ligation injury is prevented by reducing spinal afferent drive. *Neuroscience Letters*, 199(2), 87–90. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)12022-V](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12022-V)

Paíno, C. L. (2014). Evaluation of Activity Patterns in Quinpirole-Treated Rats. *Journal of*



*Behavioral and Brain Science*, 04(07), 291–296.

<https://doi.org/10.4236/jbbs.2014.47030>

Pappas, S. S., Behrouz, B., Janis, K. L., Goudreau, J. L., & Lookingland, K. J. (2008). Lack of D2 receptor mediated regulation of dopamine synthesis in A11 diencephalospinal neurons in male and female mice. *Brain Research*, 1214, 1–10.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.03.010>

Pappas, S. S., Kennedy, T., Goudreau, J. L., & Lookingland, K. J. (2011). Opioid-mediated regulation of A11 diencephalospinal dopamine neurons: Pharmacological evidence of activation by morphine. *Neuropharmacology*, 61(4), 614–621.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.05.002>

Pappas, S. S., Tiernan, C. T., Behrouz, B., Jordan, C. L., Marc Breedlove, S., Goudreau, J. L., & Lookingland, K. J. (2010). Neonatal androgen-dependent sex differences in lumbar spinal cord dopamine concentrations and the number of A11 diencephalospinal dopamine neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 518(13), 2423–2436.

<https://doi.org/10.1002/cne.22340>

Parisien, M., Samoshkin, A., Tansley, S. N., Piltonen, M. H., Martin, L. J., El-Hachem, N., ... Diatchenko, L. (2019). Genetic pathway analysis reveals a major role for extracellular matrix organization in inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, 160(4), 932–944.

<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001471>

Pasternak, G. W., & Pan, Y.-X. (2013). Mu Opioids and Their Receptors: Evolution of a Concept. *Pharmacological Reviews*, 65(4), 1257–1317.

<https://doi.org/10.1124/pr.112.007138>

Peirs, C., & Seal, R. P. (2016). Recent advances and current views. *Science*, 354(6312),

578–584. <https://doi.org/10.7554/eLife.22866>

Pennington, Z. T., Dong, Z., Feng, Y., Vetere, L. M., Page-Harley, L., Shuman, T., & Cai, D. J. (2019). ezTrack: An open-source video analysis pipeline for the investigation of animal behavior. *Scientific Reports*, 9(1), 19979. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56408-9>

- Pertovaara, A. (2006). Noradrenergic pain modulation. *Progress in Neurobiology*, *80*(2), 53–83. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.08.001>
- Pertovaara, A., & Wei, H. (2001). Peripheral effects of morphine in neuropathic rats: Role of sympathetic postganglionic nerve fibers. *European Journal of Pharmacology*, *429*(1–3), 139–145. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01315-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01315-2)
- Ploner, M., Sorg, C., & Gross, J. (2017). Brain Rhythms of Pain. *Trends in Cognitive Sciences*, *21*(2), 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2016.12.001>
- Plouffe, B., Yang, X., & Tiberi, M. (2012). The third intracellular loop of D1 and D5 dopaminergic receptors dictates their subtype-specific PKC-induced sensitization and desensitization in a receptor conformation-dependent manner. *Cellular Signalling*, *24*(1), 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.08.008>
- Polgár, E., Sardella, T. C. P., Tiong, S. Y. X., Locke, S., Watanabe, M., & Todd, A. J. (2013). Functional differences between neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the rat spinal dorsal horn. *Pain*, *154*(12), 2606–2615. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.05.001>
- Porreca, F., & Navratilova, E. (2017). Reward, motivation, and emotion of pain and its relief. *Pain*, *158*(1), S43–S49. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000798>
- Project, H. G. (2009). *Orphan 7TM receptors*. *British Journal of Pharmacology* (Vol. 158). [https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00501\\_2.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00501_2.x)
- Puopolo, M. (2019). The hypothalamic-spinal dopaminergic system: A target for pain modulation. *Neural Regeneration Research*, *14*(6), 925–930. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.250567>
- Rivera, A., Gago, B., Suárez-Boomgaard, D., Yoshitake, T., Roales-Buján, R., Valderrama-Carvajal, A., ... Fuxe, K. (2017). Dopamine D4 receptor stimulation prevents nigrostriatal dopamine pathway activation by morphine: relevance for drug addiction. *Addiction Biology*, *22*(5), 1232–1245. <https://doi.org/10.1111/adb.12407>
- Rodgers, H. M., Yow, J., Evans, E., Clemens, S., & Brewer, K. L. (2019). Dopamine D1 and D3 receptor modulators restore morphine analgesia and prevent opioid preference

in a model of neuropathic pain. *Neuroscience*, 406, 376–388.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.034>

- Roy, M., Piche, M., Chen, J.-I., Peretz, I., & Rainville, P. (2009). Cerebral and spinal modulation of pain by emotions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(49), 20900–20905. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904706106>
- Roy, Mathieu, Shohamy, D., Daw, N., Jepma, M., Wimmer, G. E., & Wager, T. D. (2014). Representation of aversive prediction errors in the human periaqueductal gray. *Nature Neuroscience*, 17(11), 1607–1612. <https://doi.org/10.1038/nn.3832>
- Salomons, T. V., Iannetti, G. D., Liang, M., & Wood, J. N. (2016). The “pain matrix” in pain-free individuals. *JAMA Neurology*, 73(6), 755–756. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.0653>
- Scherrer, G., Imamachi, N., Cao, Y. Q., Contet, C., Mennicken, F., O’Donnell, D., ... Basbaum, A. I. (2009). Dissociation of the Opioid Receptor Mechanisms that Control Mechanical and Heat Pain. *Cell*, 137(6), 1148–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.019>
- Schmidt-Wilcke, T., & Clauw, D. J. (2011). Fibromyalgia: From pathophysiology to therapy. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(9), 518–527. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.98>
- Schulte, F. S. M., Patton, M., Alberts, N. M., Kunin-Batson, A., Olson-Bullis, B. A., Forbes, C., ... Krull, K. R. (2020). Pain in long-term survivors of childhood cancer: A systematic review of the current state of knowledge and a call to action from the Children’s Oncology Group. *Cancer*, 127(1), 35–44. <https://doi.org/10.1002/cncr.33289>
- Schwartz, N., Temkin, P., Jurado, S., Lim, B. K., Heifets, B. D., Polepalli, J. S., & Malenka, R. C. (2014). Decreased motivation during chronic pain requires long-term depression in the nucleus accumbens. *Science*, 345(6196), 535–542. <https://doi.org/10.1126/science.1253994>
- Scott, D. J., Stohler, C. S., Egnatuk, C. M., Wang, H., Koeppe, R. A., & Zubieta, J. K.

- (2008). Placebo and nocebo effects are defined by opposite opioid and dopaminergic responses. *Archives of General Psychiatry*, *65*(2), 220–231.  
<https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2007.34>
- Segura-Chama, P., Luis, E., Almanza, A., Pellicer, F., Hernández-Cruz, A., & Mercado, F. (2020). Modulation of intracellular calcium concentration by D2-like DA receptor agonists in non-peptidergic DRG neurons is mediated mainly by D4 receptor activation. *Neuroscience Letters*, *736*(July), 135267.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135267>
- Selzer, M., & Alden Spencer, W. (1969). Convergence of visceral and cutaneous afferent pathways in the lumbar spinal cord. *Brain Research*, *14*(2), 331–348.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(69\)90114-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(69)90114-0)
- Sherrington, C. S. (1903). Qualitative difference of spinal reflex corresponding with qualitative difference of cutaneous stimulus. *The Journal of Physiology*, *30*(1), 39–46.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1903.sp000980>
- Shimoyama, M., Shimoyama, N., Inturrisi, C. E., & Elliott, K. J. (1997). Gabapentin enhances the antinociceptive effects of spinal morphine in the rat tail-flick test. *Pain*, *72*(3), 375–382. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(97\)00065-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(97)00065-1)
- Sikandar, S., West, S. J., McMahon, S. B., Bennett, D. L., & Dickenson, A. H. (2017). Sensory processing of deep tissue nociception in the rat spinal cord and thalamic ventrobasal complex. *Physiological Reports*, *5*(14).  
<https://doi.org/10.14814/phy2.13323>
- Skagerberg, G., Björklund, A., Lindvall, O., & Schmidt, R. H. (1982). Origin and termination of the diencephalo-spinal dopamine system in the rat. *Brain Research Bulletin*, *9*(1–6), 237–244. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(82\)90136-8](https://doi.org/10.1016/0361-9230(82)90136-8)
- Smith, L. N., Penrod, R. D., Taniguchi, M., & Cowan, C. W. (2016). Assessment of cocaine-induced behavioral sensitization and conditioned place preference in mice. *Journal of Visualized Experiments*, *2016*(108), 1–13. <https://doi.org/10.3791/53107>
- Stefano, G. B., & Kream, R. M. (2010). Dopamine, morphine, and nitric oxide: An

- evolutionary signaling triad. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, *16*(3), 124–137.  
<https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2009.00114.x>
- Stein, C., Gaveriaux-Ruff, C., Stein, C., & Gaveriaux-Ruff, C. (2020). *Opioids and Pain. The Oxford Handbook of the Neurobiology of Pain*.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780190860509.013.9>
- Stills, H. F. (2005). Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR Journal*, *46*(3), 280–293.  
<https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>
- Stucky, C. L., & Lewin, G. R. (1999). Isolectin B4-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *Journal of Neuroscience*, *19*(15), 6497–6505.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-15-06497.1999>
- Tamae, A., Nakatsuka, T., Koga, K., Kato, G., Furue, H., Katafuchi, T., & Yoshimura, M. (2005). Direct inhibition of substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord by activation of dopamine D2-like receptors. *Journal of Physiology*, *568*(1), 243–253.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.091843>
- Tang, D. liang, Luan, Y. wen, Zhou, C. yi, & Xiao, C. (2021). D2 receptor activation relieves pain hypersensitivity by inhibiting superficial dorsal horn neurons in parkinsonian mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, *42*(2), 189–198.  
<https://doi.org/10.1038/s41401-020-0433-3>
- Taylor, A. M. W., Becker, S., Schweinhardt, P., & Cahill, C. (2016). Mesolimbic dopamine signaling in acute and chronic pain: Implications for motivation, analgesia, and addiction. *Pain*, *157*(6), 1194–1198. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000494>
- Todd, A. J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(12), 823–836. <https://doi.org/10.1038/nrn2947>
- Turrigiano, G. (2011). Too Many Cooks? Intrinsic and Synaptic Homeostatic Mechanisms in Cortical Circuit Refinement. *Annual Review of Neuroscience*, *34*(1), 89–103.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153238>
- Tzschentke, T. M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP)

- paradigm: Update of the last decade. *Addiction Biology*, *12*(3–4), 227–462.  
<https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x>
- Urban, R., Scherrer, G., Goulding, E. H., Tecott, L. H., & Basbaum, A. I. (2011). Behavioral indices of ongoing pain are largely unchanged in male mice with tissue or nerve injury-induced mechanical hypersensitivity. *Pain*, *152*(5), 990–1000.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.12.003>
- Usiello, A., Baik, J. H., Rougé-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., ... Borrelli, E. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*, *408*(6809), 199–203. <https://doi.org/10.1038/35041572>
- Usoskin, D., Furlan, A., Islam, S., Abdo, H., Lönnnerberg, P., Lou, D., ... Ernfors, P. (2015). Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, *18*(1), 145–153. <https://doi.org/10.1038/nn.3881>
- Uta, D., Furue, H., Pickering, A. E., Harunor Rashid, M., Mizuguchi-Takase, H., Katafuchi, T., ... Yoshimura, M. (2010). TRPA1-expressing primary afferents synapse with a morphologically identified subclass of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, *31*(11), 1960–1973.  
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07255.x>
- Van Hecke, O., Austin, S. K., Khan, R. A., Smith, B. H., & Torrance, N. (2014). Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. *Pain*, *155*(4), 654–662. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.11.013>
- Vasudevan, Borroto-Escuela, Huysentruyt, Fuxe, Saini, & Stove. (2019). Heterodimerization of Mu Opioid Receptor Protomer with Dopamine D2 Receptor Modulates Agonist-Induced Internalization of Mu Opioid Receptor. *Biomolecules*, *9*(8), 368. <https://doi.org/10.3390/biom9080368>
- Verhoeven, K., Crombez, G., Eccleston, C., Van Ryckeghem, D. M. L., Morley, S., & Van Damme, S. (2010). The role of motivation in distracting attention away from pain: An experimental study. *Pain*, *149*(2), 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.01.019>
- Vierck, C. J., Hansson, P. T., & Yeziarski, R. P. (2008). Clinical and pre-clinical pain

- assessment: Are we measuring the same thing? *Pain*, 135(1–2), 7–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.12.008>
- Vitureira, N., Letellier, M., & Goda, Y. (2012). Homeostatic synaptic plasticity: From single synapses to neural circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 516–521.  
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.006>
- Waldhoer, M., Bartlett, S. E., & Whistler, J. L. (2004). Opioid receptors. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 953–990.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073940>
- Wang, F., Bélanger, E., Côté, S. L., Desrosiers, P., Prescott, S. A., Côté, D. C., & Koninck, Y. (2018). Sensory Afferents Use Different Coding Strategies for Heat and Cold. *Cell Reports*, 23(7), 2001–2013. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.065>
- Wang, H.-B., Zhao, B., Zhong, Y.-Q., Li, K.-C., Li, Z.-Y., Wang, Q., ... Zhang, X. (2010). Coexpression of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors in nociceptive sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(29), 13117–13122.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1008382107>
- Wang, X. Q., Mokhtari, T., Zeng, Y. X., Yue, L. P., & Hu, L. (2021). The Distinct Functions of Dopaminergic Receptors on Pain Modulation: A Narrative Review. *Neural Plasticity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6682275>
- Waxman, S. G., & Zamponi, G. W. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: Emerging ion channel targets. *Nature Neuroscience*, 17(2), 153–163.  
<https://doi.org/10.1038/nn.3602>
- Weger, M., & Sandi, C. (2018). High anxiety trait: A vulnerable phenotype for stress-induced depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 87(February), 27–37.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.01.012>
- Wei, H., Viisanen, H., & Pertovaara, A. (2009). Descending modulation of neuropathic hypersensitivity by dopamine D2 receptors in or adjacent to the hypothalamic A11 cell group. *Pharmacological Research*, 59(5), 355–363.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.01.001>

- Wemmie, J. A., Tauger, R. J., & Kreple, C. J. (2013). Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(7), 461–471.  
<https://doi.org/10.1038/nrn3529>
- Wercberger, R., & Basbaum, A. I. (2019). Spinal cord projection neurons: a superficial, and also deep analysis. *Current Opinion in Physiology*, *11*, 109–115.  
<https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.10.002>
- Wiech, K. (2016). Cognitive processes and pain perception . *ENeuro*, *354*(6312).
- Woolf, C. J. (1984). Long term alterations in the excitability of the flexion reflex produced by peripheral tissue injury in the chronic decerebrate rat. *Pain*, *18*(4), 325–343.  
[https://doi.org/10.1016/0304-3959\(84\)90045-9](https://doi.org/10.1016/0304-3959(84)90045-9)
- Xie, G. X., Jones, K., Peroutka, S. J., & Palmer, P. P. (1998). Detection of mRNAs and alternatively spliced transcripts of dopamine receptors in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia. *Brain Research*, *785*(1), 129–135. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01394-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01394-2)
- Xu, J., Lu, Z., Narayan, A., Le Rouzic, V. P., Xu, M., Hunkele, A., ... Pan, Y. X. (2017). Alternatively spliced mu opioid receptor C termini impact the diverse actions of morphine. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(4), 1561–1573.  
<https://doi.org/10.1172/JCI88760>
- Xu, J., Lu, Z., Xu, M., Rossi, G. C., Kest, B., Waxman, A. R., ... Pan, Y. X. (2014). Differential expressions of the alternatively spliced variant mrnas of the  $\mu$  opioid receptor gene, *oprm1*, in brain regions of four inbred mouse strains. *PLoS ONE*, *9*(10).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111267>
- Yaksh, T. L., Al-Rodhan, N. R. F., & Jensen, T. S. (1988). Sites of action of opiates in production of analgesia. *Progress in Brain Research*, *77*(C), 371–394.  
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)62803-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)62803-4)
- Yaksh, Tony L. (1979). Direct evidence that spinal serotonin and noradrenaline terminals mediate the spinal antinociceptive effects of morphine in the periaqueductal gray. *Brain Research*, *160*(1), 180–185. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90616-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90616-4)



- Yalcin, I., Bohren, Y., Waltisperger, E., Sage-Ciocca, D., Yin, J. C., Freund-Mercier, M. J., & Barrot, M. (2011). A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. *Biological Psychiatry*, *70*(10), 946–953.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.07.017>
- Yamamoto, K., & Vernier, P. (2011). The evolution of dopamine systems in chordates. *Frontiers in Neuroanatomy*, *5*(MARCH), 1. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00021>
- Zhang, X., Bao, L., Shi, T. J., Ju, G., Elde, R., & Hökfelt, T. (1997). Down-regulation of  $\mu$ -opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. *Neuroscience*, *82*(1), 223–240. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00240-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00240-6)
- Zhao, S., Definis, J. H., & Hou, S. (2021). Alterations of Dopamine-Related Transcripts in A11 Diencephalospinal Pathways after Spinal Cord Injury. *Neural Plasticity*, *2021*.  
<https://doi.org/10.1155/2021/8838932>
- Zheng, J., Lu, Y., & Perl, E. R. (2010). Inhibitory neurones of the spinal substantia gelatinosa mediate interaction of signals from primary afferents. *Journal of Physiology*, *588*(12), 2065–2075. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.188052>
- Zheng, Y., Liu, P., Bai, L., Trimmer, J. S., Bean, B. P., & Ginty, D. D. (2019). Deep Sequencing of Somatosensory Neurons Reveals Molecular Determinants of Intrinsic Physiological Properties. *Neuron*, *103*(4), 598-616.e7.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.039>
- Zhu, H., Clemens, S., Sawchuk, M., & Hochman, S. (2007). Expression and distribution of all dopamine receptor subtypes (D1–D5) in the mouse lumbar spinal cord: A real-time polymerase chain reaction and non-autoradiographic in situ hybridization study. *Neuroscience*, *149*(4), 885–897. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.052>