



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS SUBTIPOS DE RECEPTORES α_2 -
ADRENÉRGICOS ESPINALES QUE MODULAN LA NOCICEPCIÓN EN LA RATA:
ANÁLISIS CONDUCTUAL Y ELECTROFISIOLÓGICO**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN NEUROBIOLOGÍA**

PRESENTA:

Q.F.B. GUSTAVO LÓPEZ CÓRDOBA

TUTOR PRINCIPAL:

**DR. ABIMAEI GONZÁLEZ HERNÁNDEZ.
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DR. ADÁN HERNÁNDEZ CORTÉS. INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.
DR. ISAAC OBED PÉREZ MARTÍNEZ. FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA, UNAM.**

QUERÉTARO, QRO. SEPTIEMBRE 2019



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio B-16 de Dolor y Epilepsia del Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Abimael González Hernández.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de maestría número 859394.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Gustavo López Córdoba, cuyo título es: **“Caracterización farmacológica de los subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos espinales que modulan la nocicepción en la rata: análisis conductual y electrofisiológico”** Se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente
Dr. Rogelio Arellano Ostoa

Secretario
Dr. Abimael González Hernández

Vocal
Dr. Francisco Salvador Mercado Aca

Suplente
Dr. Isaac Obed Pérez Martínez

Suplente
Dra. Stephanie Colette Thebault

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Maricela Luna Muñoz
Coordinador del Programa
Instituto de Neurobiología

i. RESUMEN

A nivel de las astas dorsales de la médula espinal, el sistema noradrenérgico modula la información nociceptiva proveniente de la periferia. Dicha modulación de carácter antinociceptivo está mediada por la activación de receptores α_2 -adrenérgicos espinales, los cuales, canónicamente están acoplados a proteína G_i , y cuando se activan, promueven una hiperpolarización de las neuronas, modulando a la baja el flujo de información. Estos receptores se clasifican en tres subtipos, α_{2A} -, α_{2B} - y α_{2C} -adrenérgicos, sin embargo; hasta ahora, se desconoce el subtipo o subtipos de receptores que pueden estar mediando esta acción. A través de un abordaje conductual y electrofisiológico, el presente estudio dilucidó el perfil farmacológico de los subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos involucrados en la antinocicepción inducida por clonidina.

Se utilizaron ratas Wistar macho (280-320 g) divididas en dos grupos experimentales. En el primer grupo experimental, se evaluó en un modelo de nocicepción conductual (formalina al 1%) el efecto antinociceptivo de la clonidina (0.1-10 nmol / 10 μ l, intratecal) y/o el pretratamiento con los antagonistas α_2 -adrenérgicos selectivos: BRL 44408 (α_{2A} -; 1, 10 nmol), imiloxan (α_{2B} -; 1, 10 nmol) o el JP-1302 (α_{2C} -; 1, 10 nmol). En el segundo grupo experimental, se analizaron las respuestas extracelulares unitarias de neuronas de amplio rango dinámico (WDR) evocadas por la estimulación de su campo receptivo periférico (20 estímulos, 0.2 Hz, 1-mseg de duración, 0.1-3 mA) antes y después de la administración espinal de clonidina (1, 10 nmol / 10 μ l) y/o el pretratamiento con el antagonista BRL 44408 (1 nmol) o el JP-1302 (1, 10 nmol).

La nocicepción conductual y neuronal fue inhibida por la clonidina (0.1-10 nmol). La antinocicepción conductual y electrofisiológica sólo fue bloqueada por el antagonista BRL 44408 mas no por el imiloxan o el JP-1302. En el caso de los experimentos conductuales, la administración intratecal de JP-1302 inhibió la nocicepción *per se*; este efecto fue bloqueado en los animales pretratados con bicuculina (antagonista de los receptores $GABA_A$). La antinocicepción inducida por el JP 1302 no fue observada en los experimentos electrofisiológicos.

Este estudio muestra que la clonidina inhibe la nocicepción conductual y electrofisiológica a nivel espinal a través de la activación preferencial de los receptores α_{2A} -adrenérgicos. Por otra parte, considerando que la antinocicepción conductual inducida por JP-1302 fue bloqueada por bicuculina, estos datos sugieren que durante un proceso inflamatorio la activación de receptores α_{2C} -adrenérgicos tienen un efecto pronociceptivo posiblemente mediado por una disminución de la actividad $GABA$ érgica.

ii. SUMMARY

The noradrenergic system modulates the incoming nociceptive information at the spinal cord level. This antinociceptive effect is mediated by the spinal α_2 -adrenergic receptors, which are coupled to G_i proteins, and when activated, promote hyperpolarization of neurons, thus avoiding the flow of information. These receptors are classified into three subtypes, α_{2A} -, α_{2B} - and α_{2C} -adrenoceptors, however, until now, the subtype or subtypes of receptors that may be mediating the spinal antinociception are unknown. Through a behavioral and electrophysiological approach, the present study elucidated the pharmacological profile of the α_2 -adrenergic receptor subtypes involved in clonidine-induced antinociception.

Male Wistar rats (280-320 g) were divided into two main experimental groups. In the first group, the antinociceptive effect of clonidine (0.1-10 nmol / 10 μ l, intrathecal) and / or pretreatment with selective α_2 -antagonists was evaluated in a behavioral nociception model (1% formalin). The antagonists used were BRL 44408 (α_{2A} -; 1, 10 nmol), imiloxan (α_{2B} -; 1, 10 nmol) or JP-1302 (α_{2C} ; 1, 10 nmol). In the second experimental group, extracellular unitary recordings of wide dynamic range (WDR) neurons were made. The WDR responses were evoked by the stimulation of their peripheral receptive field (20 stimuli, 0.2 Hz, 1-msec duration, 0.1-3 mA) before and after spinal administration of clonidine (1, 10 nmol / 10 μ l) or JP-1302 (1, 10 nmol).

The behavioral and neuronal nociception was inhibited by clonidine (0.1-10 nmol). This behavioral and electrophysiological antinociception was blocked by BRL 44408 but not by imiloxan or JP-1302. In the case of behavioral nociception, intrathecal administration of JP-1302 inhibited nociception *per se*; this effect was blocked in animals pretreated with bicuculline (GABA_A receptor antagonist). The antinociception induced by JP-1302 was not observed on the electrophysiological experiments.

This study demonstrates that clonidine inhibits behavioral and electrophysiological nociception at the spinal level through the preferential activation of α_{2A} -adrenergic receptors. On the other hand, since the JP-1302-induced antinociception was prevented by bicuculline, these data suggest that during inflammatory process the activation of α_{2C} -adrenergic receptors have a pro-nociceptive effect possibly mediated by a decrease in the GABAergic activity.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a este punto de mi vida han sido demasiadas las personas a las cuales debo agradecer, siendo; mis padres adoptivos (Ovidio López y Lucila Ramos), mi padre biológico (Alejandro López), mis tíos (Ovidio López Ramos, Margarita López), mi prometida (Damaris Gonzáles), quienes me han apoyado desde el comienzo de mi trayectoria académica, social y espiritual. Así mismo, pero no por eso menos importante, quiero agradecer a; mi abuela adoptiva (Doña Carmen), mis segundos padres adoptivos (Arturo González, Irma López), diversos profesores de universidad (Dra. Pacheco, Dra. Bulas, Dr. Cobos, Dra. Barquet). Por último, debo agradecer a; el CONACYT, el Dr. Condés, y el Dr. Abimael González.

Quiero aprovechar la oportunidad para expresar cuanto han significado en mi vida todas las personas aquí mencionadas, así como las personas que ya no pude incluir. Todos y cada uno de ustedes me han ayudado a través de este largo camino, y por eso se han ganado un lugar especial en mi corazón.

C'EST FINI, MERCI BEAUCOUP

Podrán morir la Luna una y mil veces
o perder el Sol su brillo incandescente,
llegar las tinieblas por mi senda, mi camino,
reclamando mi alma a los Infiernos.

Y aunque descienda a los Abismos
o me atormenten los Demonios,
su luz habrá siempre de guiarme
guardaré su nombre eternamente.

Puesto y no podré pagarles
a su gloria pondré yo mis victorias,
en sus aras tocaré yo mil cantares,
les enviaré un millón de Estrellas.

Gustavo López Córdoba 

ÍNDICE

	Página
<i>i. Resumen</i>	
<i>ii. Summary</i>	
<i>iii. Índice de tablas y figuras</i>	
<i>iv. Lista de abreviaturas</i>	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Vías que transmiten la información nociceptiva	3
2.1.1. Fibras aferentes primarias	3
2.1.2. Vía ascendente espinal	4
2.1.3. Vías descendentes	5
2.2. Modulación espinal endógena de la información nociceptiva	7
2.2.1. Sistema opioidérgico	7
2.2.2. Sistema serotoninérgico	8
2.2.3. Sistema noradrenérgico	8
2.2.3.1. Vía moduladora descendente noradrenérgica	9
2.2.3.2. Noradrenalina y receptores noradrenérgicos	10
2.2.4. Sistema GABAérgico	12
2.2.5. Modulación exógena de la información nociceptiva	12
2.2.5.1. Uso de la clonidina como analgésico	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
4. JUSTIFICACIÓN	14
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
5.1. Hipótesis	14
5.2. Objetivo general	14
5.2.1. Objetivos particulares	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS	15
6.1. Animales	15

6.2. Experimentos conductuales (prueba de la formalina)	15
6.2.1. Procedimiento general	15
6.2.2. Canulación intratecal	16
6.2.3. Caracterización farmacológica del efecto de la administración intratecal de clonidina o los antagonistas α_2 -adrenérgicos sobre la nocicepción inducida por formalina al 1%	17
6.2.3.1. <i>Protocolo para evaluar el efecto del vehículo sobre la nocicepción inducida por formalina</i>	17
6.2.3.2. <i>Protocolo para evaluar el efecto de la clonidina sobre la nocicepción inducida por formalina</i>	18
6.2.3.3. <i>Protocolo para evaluar el efecto per se de la administración intratecal de los antagonistas BRL 44408, imiloxan, JP-1302 o bicuculina sobre la nocicepción inducida por formalina</i>	18
6.2.3.4. <i>Protocolo para evaluar el efecto de la administración intratecal de los antagonistas BRL 44408, imiloxan o JP-1302 sobre la antinocicepción inducida por clonidina</i>	18
6.2.3.5. <i>Protocolo para evaluar el efecto de la administración intratecal de bicuculina sobre la antinocicepción inducida por el JP-1302</i>	18
6.2.4. Tratamiento estadístico de los datos	19
6.3. Experimentos electrofisiológicos	19
6.3.1. Preparación experimental	19
6.3.2. Registro extracelular unitario y estimulación	20
6.3.3. Caracterización farmacológica del efecto de la administración espinal de clonidina sobre las respuestas nociceptivas de neuronas de amplio rango dinámico (WDR)	21
6.3.3.1. <i>Protocolo experimental para evaluar el efecto del vehículo sobre las respuestas nociceptivas de neuronas WDR</i>	22
6.3.3.2. <i>Protocolo experimental para evaluar el efecto de la clonidina sobre las respuestas nociceptivas de neuronas WDR</i>	22

6.3.3.3. <i>Protocolo experimental para evaluar el efecto del BRL 44408 sobre la antinocicepción inducida por la clonidina en las respuestas nociceptivas de neuronas WDR</i>	22
6.3.3.4. <i>Protocolo experimental para evaluar el efecto del JP-1302 sobre las respuestas nociceptivas de neuronas WDR</i>	22
6.3.4. Tratamiento estadístico de los datos	22
6.4. Fármacos	23
7. RESULTADOS	24
7.1. Análisis conductual	24
7.1.1. Efecto de la administración intratecal de clonidina sobre la nocicepción inducida por formalina	24
7.1.2. Efecto <i>per se</i> de la administración intratecal de los antagonistas BRL 44408, imiloxan, y JP-1302 sobre la nocicepción inducida por formalina	25
7.1.3. Efecto de la administración intratecal de los antagonistas BRL 44408, imiloxan o JP-1302 sobre la antinocicepción inducida por clonidina en la prueba de la formalina	25
7.1.4. Efecto de la administración intratecal de bicuculina sobre la antinocicepción inducida por el JP-1302	26
7.2. Análisis electrofisiológico	27
7.2.1. Estabilidad de los registros electrofisiológicos	27
7.2.2. Efecto de la administración espinal de clonidina sobre la actividad de neuronas WDR	28
7.2.3. Efecto de la administración espinal del JP-1302 sobre la actividad de neuronas WDR	30
7.2.4. Efecto de la administración espinal de BRL 44408 sobre la inhibición inducida por clonidina en la actividad nociceptiva de neuronas WDR	30
8. DISCUSIÓN	32
8.1. General	32

8.2.	La administración espinal de clonidina inhibe la nocicepción conductual y electrofisiológica	32
8.3.	Papel de los receptores α_{2A}-adrenérgicos en la antinocicepción inducida por clonidina	33
8.4.	El bloqueo de receptores α_{2C}-adrenérgicos produce un efecto antinociceptivo en la prueba de la formalina	34
9.	CONCLUSIONES	37
10.	REFERENCIAS	38

iii. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS		
		Páginas
Tabla 1. Clasificación de aferentes primarias por diámetro y velocidad de conducción		4
Tabla 2. Perfil de afinidad de la clonidina a los diferentes receptores α_2 -adrenérgicos		13
Tabla 3. Perfil de afinidad de los antagonistas selectivos a los diferentes receptores α_2 -adrenérgicos.		33
Figura 1. Fibras aferentes nociceptivas que terminan en neuronas de proyección del asta dorsal de la médula espinal		4
Figura 2. Tracto espinotalámico lateral que conduce información sensorial nociceptiva de receptores periféricos a la corteza somatosensorial		5
Figura 3. Vías descendentes que inhiben la transmisión de la información sensorial en las astas dorsales de la médula espinal		6
Figura 4. Vías descendentes de la sustancia gris periacueductal		7
Figura 5. Esquema del sistema descendente serotoninérgico en la médula espinal		8
Figura 6. Mecanismo de modulación descendente noradrenérgica		9
Figura 7. Inhibición noradrenérgica de la nocicepción en las astas dorsales de la médula espinal		10
Figura 8. Biosíntesis de noradrenalina		11
Figura 9. Protocolos experimentales utilizados en la prueba de la formalina		16
Figura 10. Diseño de grupos experimentales usados en la prueba de la formalina		17
Figura 11. Diseño de grupos experimentales para el análisis electrofisiológico		20
Figura 12. Efecto de la clonidina intratecal (i.t.) sobre el número de sacudidas de la pata inducida por la administración subcutánea (s.c.) de formalina (1%)		24
Figura 13. Efecto <i>per se</i> de los antagonistas selectivos α_2 -adrenérgicos selectivos sobre el número de sacudidas de la pata inducida por formalina al 1%		25

Figura 14. Efecto de los antagonistas α_2 -adrenérgicos selectivos sobre la antinocicepción inducida por clonidina (1 nmol)		26
Figura 15. Efecto del antagonista GABAérgico selectivo bicuculina (0.3 nmol) sobre la antinocicepción inducida por el antagonista α_{2C} -adrenérgico selectivo JP-1302 (1 nmol)		26
Figura 16. Ejemplo de histogramas peri-estímulo de neuronas WDR a partir de la estimulación eléctrica periférica		28
Figura 17. La administración espinal de clonidina inhibe la actividad neuronal de neuronas WDR evocada por la estimulación eléctrica periférica		29
Figura 18. La administración espinal de JP-1302 no inhibe la actividad neuronal de neuronas WDR evocada por la estimulación eléctrica periférica		30
Figura 19. La administración espinal de BRL 44408 bloquea la inhibición de la actividad neuronal inducida por la clonidina		31
Figura 20. Posible mecanismo de acción de los receptores α_{2A} -adrenérgicos y α_{2C} -adrenérgicos sobre la modulación de la nocicepción a nivel espinal		37

iv. LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
ABC	Área bajo la curva
ANOVA	Análisis de varianza
DRG	(<i>Dorsal root ganglion</i>) Ganglio de la raíz dorsal
FAP	Fibra aferente primaria
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GPCR	(<i>G Protein-Coupled Receptor</i>) Receptor acoplado a proteínas G
IASP	(<i>International Association for the Study of Pain</i>) Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
i.t.	Intratecal
NA	Noradrenalina
LC	Locus coeruleus
PAG	(<i>Periaqueductal gray area</i>) Sustancia gris periacueductal
RMV	(<i>Rostroventromedial medulla</i>) Médula rostroventromedial
s.c.	Subcutánea
SNC	Sistema nervioso central
SSI	Solución salina isotónica
WDR	(<i>Wide Dynamic Range neurons</i>) Neuronas de amplio rango dinámico

1. INTRODUCCIÓN

El proceso a través del cual un estímulo dañino es detectado se llama nocicepción, mientras que el dolor, puede definirse como una experiencia angustiante asociada con un daño tisular actual o potencial con componentes sensoriales, emocionales, cognitivos y sociales (Williams y Craig, 2016). En este sentido, se considera que la nocicepción subyace al dolor. De hecho, la nocicepción ha sido descrita en diversos organismos, desde los gusanos nemátodos (*e.g. Caenorhabditis elegans*) hasta los humanos, pero en el caso del dolor, esto es menos claro. De forma general, se considera que los estímulos nociceptivos periféricos son detectados por nociceptores, mientras que el dolor es considerado un proceso cognitivo y que por lo tanto requiere la integración de distintos componentes neuronales a nivel cortical.

En el caso de los nociceptores o neuronas nociceptivas aferentes primarias, estos contienen diversos receptores y canales iónicos de alto umbral que permiten la detección de estímulos dañinos (nociceptivos). Estos estímulos pueden ser de naturaleza térmica, química o mecánica. Si estos estímulos son lo suficientemente intensos para causar un daño tisular (*i.e.* estímulo nocivo o nociceptivo), los nociceptores se activarán, y posteriormente activarán a neuronas del sistema nervioso central (SNC).

Estos nociceptores son neuronas pseudo-unipolares que pueden estar ligeramente mielinizadas como las fibras A δ o sin mielinizar como las fibras C. Dichas neuronas tienen su cuerpo celular en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) o en los ganglios del trigémino y sus proyecciones axonales terminan en la periferia y en las astas dorsales de la médula espinal. Así, un estímulo nociceptivo periférico, activa a los nociceptores, y esto provoca la liberación de neurotransmisores en la médula espinal. A nivel espinal, la activación de neuronas periféricas produce la activación de neuronas de segundo orden que proyectan hacia centros superiores en el SNC donde será integrado y codificado como dolor.

Al ser el dolor una experiencia desagradable, el organismo ha desarrollado sistemas moduladores endógenos (*e.g.* opioidérgico, serotoninérgico, noradrenérgico), los cuales han evolucionado para detectar, integrar y coordinar una respuesta protectora ante estímulos nociceptivos, que van desde los reflejos primitivos de la médula espinal hasta la compleja respuesta emocional consciente y subconsciente que en el caso de los humanos puede referirse como dolor (Bourne et al., 2014; Ossipov, 2012; Smith, 2018; Woller et al., 2017).

Desde esta perspectiva, se ha demostrado que existen proyecciones noradrenérgicas desde el locus coeruleus hacia las astas dorsales de la médula espinal ejerciendo una inhibición descendente sobre la entrada de estímulos nociceptivos que se integran en la médula espinal. Dicha modulación endógena noradrenérgica ha sido explotada clínicamente a través del uso de agonistas a los receptores α_2 -adrenérgicos como agentes analgésicos (Chan et al., 2010; Giovannitti et al., 2015; Smith y Elliot, 2001). El prototipo de estas sustancias con actividad sobre los α_2 -adrenoceptores es la clonidina, la cual ejerce analgesia cuando se aplica a nivel espinal (Ackerman et al., 2003; Pan et al., 1999; Rauck et al., 2015). No obstante, los receptores α_2 -adrenérgicos han sido clasificados en tres subtipos funcionales, denominados receptores α_{2A} -, α_{2B} - y α_{2C} -adrenérgicos y el perfil de afinidad de la clonidina por estos receptores es similar para los tres subtipos.

En este contexto, se desconoce funcionalmente cual es el subtipo de receptor implicado en la acción antinociceptiva de la clonidina. El presente proyecto pretende dilucidar a través de experimentos conductuales y electrofisiológicos el o los subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos (α_{2A} -, α_{2B} - y/o α_{2C} -) implicados en la antinocicepción de la clonidina a nivel de la médula espinal.

2. ANTECEDENTES

El dolor es considerado un fenómeno biopsicosocial complejo, esto debido a que en parte es una experiencia emocional, pues la relación entre dolor y daño es variable. Ciertamente, el dolor es un indicador de un posible daño, o un sistema de alarma ante un evento nocivo. (Garland, 2012; Lumley et al., 2011). Desde el punto de vista fisiológico hay diversos sistemas que transmiten y modulan la información relacionado con eventos potencialmente dañinos. En este sentido, los estímulos nociceptivos son detectados por receptores sensoriales localizados en la periferia y transmitida a través de los ganglios de la raíz dorsal (GRD) hacia las astas dorsales de la médula espinal. En las astas dorsales, se encuentran neuronas de segundo orden y/o neuronas de amplio rango dinámico (WDR, por sus siglas en inglés). Dichas neuronas son responsables de llevar la información hacia centros supraespinales tales como el tálamo y/o hacia la corteza somatosensorial, donde será integrada e interpretada como dolor (D'Mello y Dickenson, 2008). En este sentido, unos de los primeros sitios de modulación de la nocicepción es la médula espinal.

2.1. Vías que transmiten la información nociceptiva

2.1.1. Fibras aferentes primarias

La medula espinal recibe información de la periferia mediante la activación de receptores sensoriales llamados nociceptores. Anatómicamente, los cuerpos celulares de los nociceptores están localizados en los DRG adyacentes a la médula espinal o en el ganglio del trigémino (en el caso de la información sensorial proveniente del rostro) (Lumpkin y Caterina, 2007).

Los axones que provienen desde los nociceptores poseen una rama que inerva los tejidos donde los estímulos son transducidos, y una rama central que inerva la médula espinal (Bell, 2018). Estos receptores, los cuales son terminales nerviosas libres, se encuentran distribuidos en la piel, mucosa, membranas, ligamentos y órganos internos (Almeida et al., 2004), transmiten la información sensorial hacia la médula espinal. Estas neuronas de primer orden o neuronas aferentes primarias nociceptivas pueden ser A δ o C (Tabla 1) (Fang X et al., 2005; Fernandes et al., 2016; Le Bars et al., 1979; Mendell, 1966 y Wagman y Price, 1969).

Dichas neuronas de primer orden en conjunto con interneuronas excitadoras espinales convergen en neuronas de proyección o de segundo orden del hasta dorsal de la médula espinal (Fig. 1), las cuales son un relevo para llevar la información nociceptiva hacia centros supraespinales

por diferentes vías ascendentes, tales como la vía espinotalámica (Das, 2015; Treviño et al., 1973; Willis et al., 1979; Willis, 1985).

Clasificación	Diámetro	Mielina	Velocidad de conducción	Función sensorial
A β	Grande (6-12 μm)	Sí	>35 m/s	Tacto
A δ	Mediano (1-5 μm)	Escasa	5-35 m/s	Dolor “rápido”
C	Pequeño (0.2-1.5 μm)	No	<2 m/s	Dolor “lento”

Tabla 1. Clasificación de aferentes primarias por diámetro y velocidad de conducción.

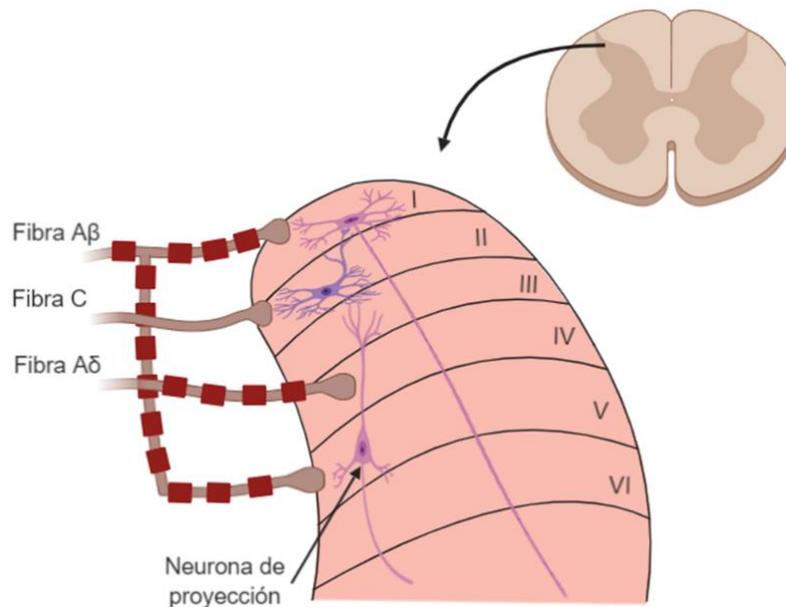


Figura 1. Fibras aferentes nociceptivas que terminan en neuronas de proyección del asta dorsal de la médula espinal.

Neuronas de proyección en la lámina I reciben aferencias directas de fibras nociceptivas mielinizadas (A δ) y aferencias indirectas de fibras nociceptivas amielínicas (C) por medio de interneuronas de la lámina II. Neuronas de la lámina V son predominantemente de amplio rango dinámico (WDR). Estas reciben aferencias de bajo umbral proveniente de fibras mielinizadas (A β), así como también de aferencias directas o indirectas de fibras aferentes nociceptivas (A δ y C). En esta figura las neuronas de la lámina V proyectan sus dendritas a través de la lámina IV, donde hacen contacto con las terminales de las fibras aferentes primarias A β . La dendrita de la lámina III proveniente de la célula de la lámina V está en contacto con el axón terminal de una interneurona de la lámina II.

2.1.2. Vía ascendente espinotalámica

Existen diferentes vías que transmiten la información sensorial de la periferia hacia el SNC. Entre ellas se encuentra la vía del tracto espinotalámico, la cual funciona como el conducto principal de los nervios provenientes del asta dorsal hacia el cerebro, transmitiendo la nocicepción, temperatura (Fig. 2) y señales táctiles profundas hacia el tálamo (Bourne et al., 2014). El tracto espinotalámico está orientado verticalmente a lo largo de la porción ventrolateral de la espina dorsal. Los axones de las neuronas de segundo orden (incluyendo neuronas WDR) que ascienden de la medula espinal hacia el tallo cerebral forman el tracto espinotalámico. Estas fibras, son contralaterales a sus células

de origen y al área corporal que ellas representan (Andersson et al., 1997; Casey et al., 1994; Coghill et al., 1999; Derbyshire et al., 1997; Iadarola et al., 1998; Talbot et al., 1991; Tarkka y Treede, 1992).

El tracto espinotalámico termina en: (i) la formación reticular del tallo cerebral; (ii) la sustancia gris periacueductal (PAG) del mesencéfalo; o continúan hasta (iii) el diencefalo donde terminan en el tálamo, en la región ventral posterolateral o en los núcleos intralaminares. En el tálamo neuronas de tercer orden proyectan hacia la corteza somatosensorial, la ínsula y otras áreas corticales para ser censado, integrado e interpretado como dolor (Dinakar y Stillman, 2016).

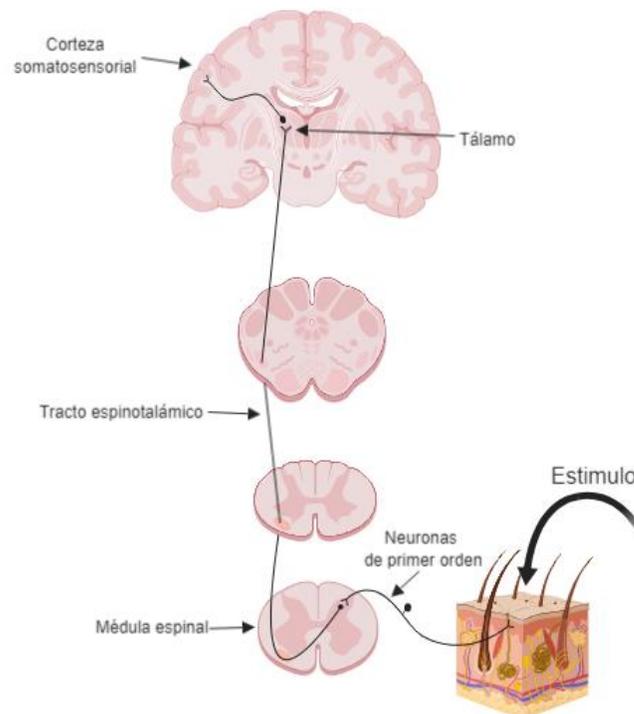


Figura 2. Tracto espinotalámico lateral que conduce la información sensorial nociceptiva de receptores periféricos a la corteza somatosensorial.

La transducción y transmisión de los estímulos nocivos desde los receptores de la piel asciende en la médula espinal hacia la circunvolución poscentral a través del tracto espinotalámico lateral. Las neuronas de primer orden transmiten la información sensorial por medio de neuronas pseudounipolares que ingresan a la médula espinal mediante el tracto de Lissauer, donde harán sinapsis con neuronas de segundo orden. Estas neuronas localizadas en las astas dorsales decusan por la comisura ventral y asciende por el tracto espinotalámico lateral antes de terminar en el núcleo posterolateral del tálamo. A este nivel, neuronas de tercer orden proyectan hacia la corteza somatosensorial.

2.1.3. Vías descendentes

Las vías descendentes se originan en o a través del relevo de núcleos del cerebro (Fig. 3) tales como la PAG en el cerebro medio, los núcleos del rafé posterior (rafé magnus, obscurus, pallidus) a nivel del bulbo en la zona rostroventromedial (RVM, por sus siglas en inglés) o el locus coeruleus (LC) en la protuberancia (Fields, 2004; Gebhart, 2004; Millan, 2002; Sandkühler y Gebhart, 1984). Dichos núcleos envían proyecciones descendentes hacia la médula espinal por la vía dorsolateral

y ventrolateral funicular. De forma general, estos núcleos que proyectan hacia la médula espinal pueden modular la nocicepción, interactuando con diversos elementos neuronales en el asta dorsal, tales como: (i) las terminales de fibras aferentes primarias; (ii) las neuronas de proyección; (iii) las interneuronas excitadoras intrínsecas y las interneuronas inhibitoras; así como (iv) las terminales de otras vías descendentes (Millan, 2002).

Cada una de las vías tiene una neuroquímica y conexiones neuroanatómicas diferentes. En este sentido, de forma clásica se considera que existen tres sistemas relevantes en la modulación descendente de la nocicepción: (i) el sistema opioidérgico; (ii) el serotoninérgico; y (iii) el noradrenérgico. Debe acotarse que algunos de estos núcleos están involucrados no sólo en una respuesta descendente inhibitoria sino también en una respuesta ascendente inhibitoria de la nocicepción (Pertovaara y Almeida, 2006).

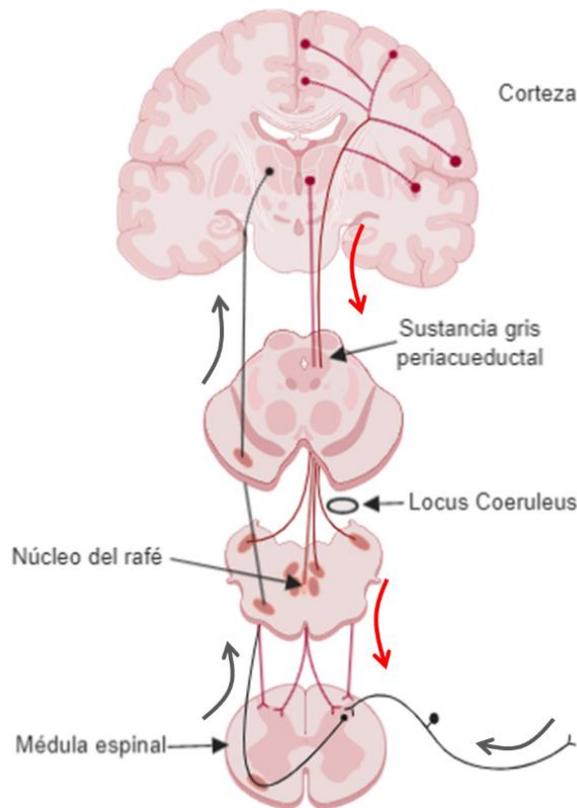


Figura 3. Vías descendentes que inhiben la transmisión de la información sensorial en las astas dorsales de la médula espinal. El sistema descendente regula la entrada de señales nociceptivas a nivel de las neuronas localizadas en las astas dorsales de la médula espinal. Las señales dentro del sistema inhibitorio descendente son codificadas en diferentes sitios del tallo cerebral incluyendo la sustancia gris periacueductal (PAG), el núcleo del raquídeo magno o el locus coeruleus (LC).

2.2. Modulación espinal endógena de la información nociceptiva

2.2.1. Sistema opioidérgico

El sistema opioidérgico es uno de los principales sistemas de analgesia endógena del organismo, dicho sistema es activado por la sustancia gris periacueductal (PAG) (fig. 4), la cual es una estructura involucrada en una gran variedad de conductas, tales como el miedo, la ansiedad, la vocalización, lordosis, el control cardiovascular, y la modulación de la nocicepción (Behbehani, 1995; Schoo et al., 2018).

Ante la presencia de un dolor agudo o persistente, la PAG se activa liberando opioides endógenos hacia la zona rostroventromedial del bulbo raquídeo (RVM), la cual envía señales descendentes hacia las astas dorsales de la médula espinal. En la médula espinal, inhibe la transmisión nociceptiva proveniente de la periferia (Tobaldini et al., 2018). Estas proyecciones descendentes hacia la médula espinal son parte de un circuito neuronal esencial para la analgesia endógena y exógena mediada por opioides. De forma clínica, dicha analgesia se puede inducir por medio de estimulaciones eléctricas en el PAG, o por la administración de agonistas opioides en la PAG (Levy et al., 2010; Loyd y Murphy, 2014).

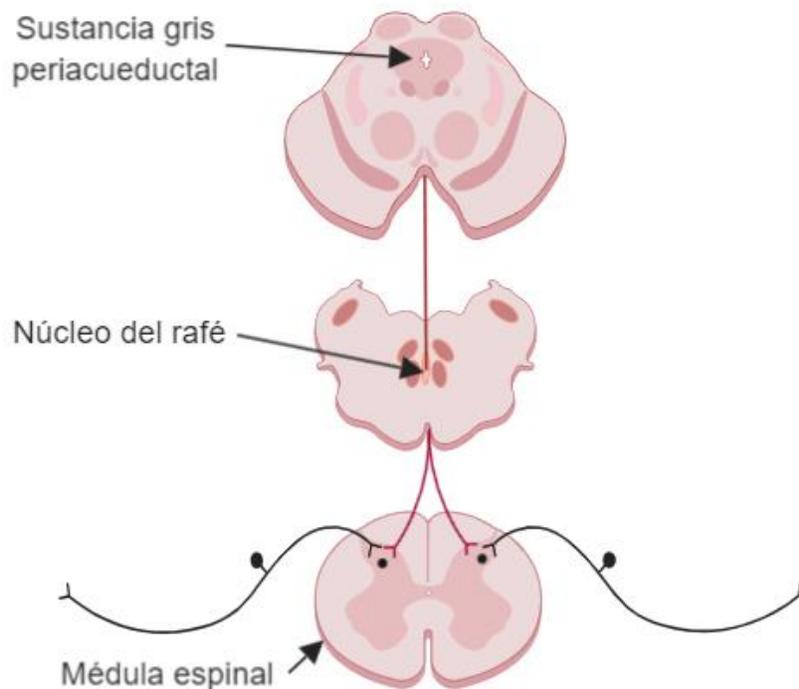


Figura 4. Vías descendentes de la sustancia gris periacueductal.

Vía descendente por la cual la PAG proyecta hacia el núcleo del rafe y ésta hacia las astas dorsales de la médula espinal.

2.2.2. Sistema serotoninérgico

Como se mencionó en la sección anterior, la RVM ejerce un efecto antinociceptivo a nivel espinal. Dicho efecto antinociceptivo de la RVM es debido a la activación de los diferentes núcleos que la conforman, tales como el núcleo reticular *gigantocelularis lateralis*, el *pars alfa*, y el núcleo del rafé magno (NRM), siendo este último uno de los mayores núcleos serotoninérgicos (Vanegas y Schaible, 2003). La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) es uno de los principales neurotransmisores que participan en la transmisión, procesamiento y control de la nocicepción espinal mediante la activación de receptores a 5-HT (Fig. 5). Estos receptores se clasifican en 7 familias (5-HT₁ a 5-HT₇) y, exceptuando a los receptores 5-HT₃ que son canales iónicos, todos se encuentran acoplados a proteínas G (Brenchat et al., 2010; Viguiet et al., 2013). En condiciones fisiológicas, se considera que a nivel espinal el efecto antinociceptivo de la serotonina está mediado por la activación de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT_{5A} y/o 5-HT₇ (Bannister y Dickenson, 2016; Lin et al., 2015; Muñoz-Islas et al., 2014; Sommer, 2009).

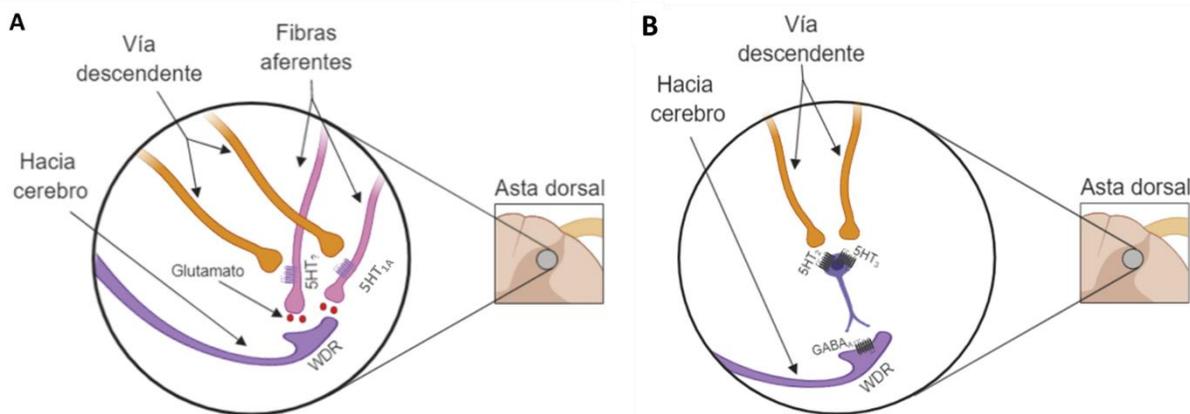


Figura 5. Esquema del sistema descendente serotoninérgico en la médula espinal.

Posibles mecanismos por el cual la serotonina ejerce su efecto antinociceptivo sobre las neuronas WDR en las astas dorsales de la médula espinal. A) Mediante una acción directa sobre los receptores 5HT_{1A} localizados en las fibras aferentes primarias, inhibiendo el flujo de información hacia las neuronas de WDR, o B) mediante una acción indirecta por medio de la activación de receptores 5HT₂ o 5HT₃ que se encuentran en interneuronas GABAérgicas, las cuales a su vez inhibirán la transmisión nociceptiva en neuronas WDR. Abreviaturas: WDR; neuronas de amplio rango dinámico (por sus siglas en inglés), 5-HT; serotonina.

2.2.3. Sistema noradrenérgico

El sistema noradrenérgico es considerado uno de los sistemas fundamentales del cerebro, esto debido a su participación en diversos procesos, como la atención, el sueño y la vigilia, el aprendizaje y la memoria, la emoción, la reproducción, la ansiedad y las respuestas centrales al estrés (Berridge et al., 2012; Itoi y Sugimoto, 2010; Sullivan et al., 1999). Numerosas investigaciones a lo largo de la mitad del siglo pasado han establecido que la activación del sistema

noradrenérgico ejerce un control sobre la nocicepción a nivel espinal (Archer et al., 1986; Gomes et al., 1999; Kuraishi et al., 1985; Minor et al., 1988; Nickel et al., 1988; Ramana-Reddy y Yaksh, 1980; Reigle, 1985).

A nivel supraespinal, existen distintos grupos de células noradrenérgicas que han sido clasificados en distintos subnúcleos, desde el A1 hasta el A7. De forma particular, los subnúcleos A5, A6 y A7 tienen proyecciones noradrenérgicas descendentes hacia la médula espinal. En este sentido, diversos estudios sugieren que el locus coeruleus (LC) (subnúcleo A6) es relevante en la modulación de la nocicepción, ya que las proyecciones descendentes hacia la médula espinal establecen contactos sinápticos con fibras aferentes primarias, así como con neuronas de proyección del asta dorsal de la médula espinal (Fig. 6) (Carbone, 2017; Fan et al., 2014; Ossipov et al., 2014; Pertovaara, 2006).

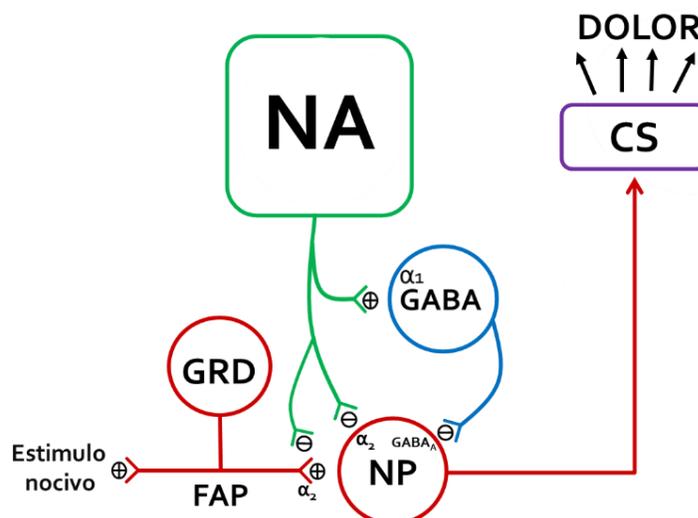


Figura 6. Mecanismo de modulación descendente noradrenérgica.

Se ha propuesto que dicha acción puede estar mediada por 1) Proyecciones directas provenientes de núcleos supraespinales y cuyos axones terminan en neuronas de 1° (neuronas aferentes primarias) o de 2° orden (neuronas de proyección), induciendo antinocicepción por medio de receptores espinales α_2 -adrenérgicos. 2) Proyecciones provenientes de núcleos supraespinales cuyos axones activan interneuronas GABAérgicas por medio de receptores α_1 -adrenérgicos, esto a su vez inhiben a neuronas de 1° o 2° orden por medio de liberación de GABA. Abreviaturas: CS, centros supraespinales; FAP, fibra aferente primaria; GABA, ácido γ -aminobutírico; GRD, ganglio de la raíz dorsal; NA, noradrenalina; NP, neurona de proyección. (Modificado de Millan 2002).

2.2.3.1. Vía moduladora descendente noradrenérgica

Aun cuando las fibras noradrenérgicas provenientes del LC establecen contactos sinápticos axo-somáticos y axo-dendríticos con neuronas de proyección del asta dorsal de la médula espinal (Millan, 2002), la inervación noradrenérgica a este nivel es predominantemente no sináptica. Esto sugiere que la noradrenalina (NA) difunde desde los sitios de liberación hacia zonas distantes

(acción extra-sináptica) (Cliffer et al., 1988; Petkó y Antal, 2000; Sugiura et al., 1989; Suzuki et al., 2002). Ciertamente, la NA liberada por fibras descendentes puede actuar post- y pre-sinápticamente por medio de la activación de receptores α_2 -adrenérgicos (Fig. 7) (Carbone, 2017; y Fan et al., 2014).

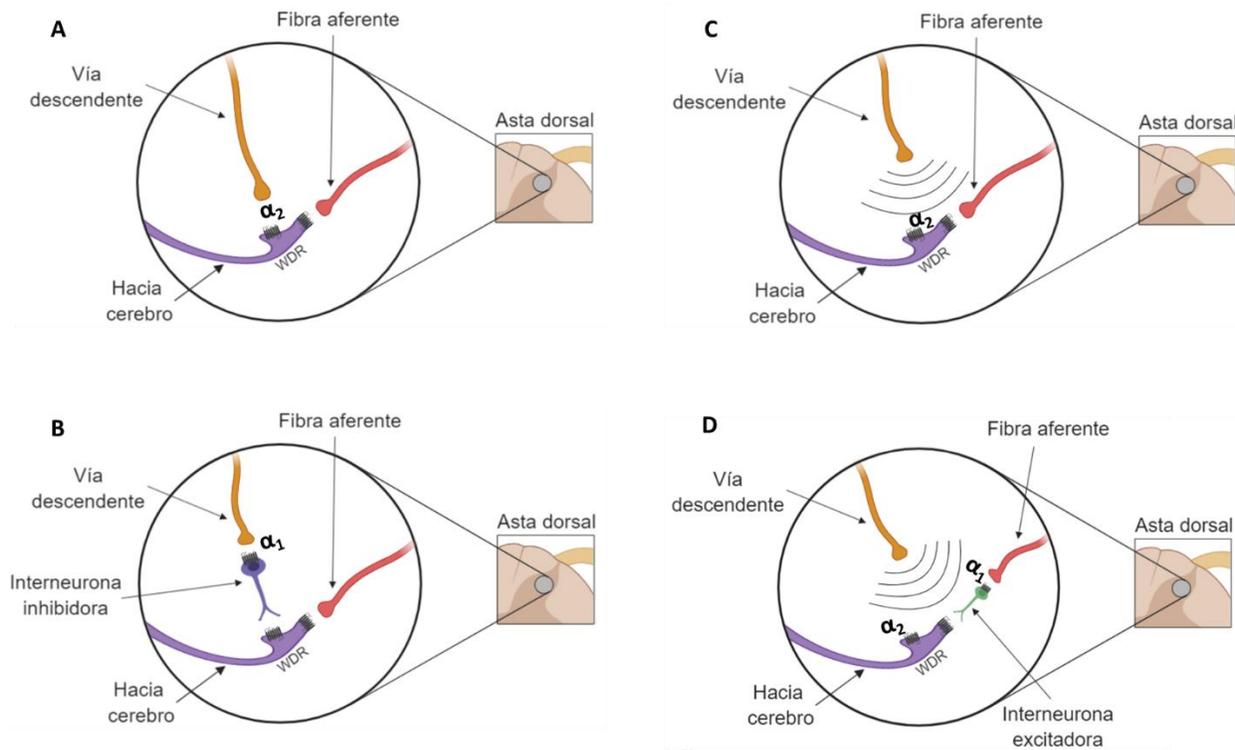


Figura 7. Inhibición noradrenérgica de la nocicepción en las astas dorsales de la medula espinal.

Se ha propuesto que dicha acción puede estar mediada por A) proyecciones directas cuyos axones terminan en neuronas de 2º orden, B) proyecciones descendentes cuyos axones activan interneuronas inhibitorias, y esto a su vez inhibe a neuronas de 2º orden, C) proyecciones descendentes distantes de la sinapsis, y cuyo efecto es mediado por neurotransmisores que difunden por medio de volumen de transmisión hacia neuronas de 2º orden, o por D) proyecciones descendentes distantes de la sinapsis, y cuyo efecto es mediado por neurotransmisores que difunden por medio de volumen de transmisión hacia interneuronas inhibitorias (las cuales expresan receptores α_1 -adrenérgicos) o neuronas de proyección (que expresan receptores α_2 -adrenérgicos) inhibiendo el flujo de información neuronal de manera indirecta o directa sobre neuronas de 2º orden. Símbolos abiertos; sinapsis excitadora, símbolos cerrados; sinapsis inhibitoria.

2.2.3.2. Noradrenalina y receptores noradrenérgicos

La noradrenalina es un neurotransmisor sintetizado a partir del aminoácido tirosina a través de una secuencia de reacciones enzimáticas (Fig. 8), teniendo como producto intermedio la dopamina, la cual posteriormente será hidrolizada a su producto final, la NA (Llorca-Torralba et al., 2016).

La NA ejerce su acción sobre receptores noradrenérgicos. En la actualidad se considera que existen tres familias de receptores noradrenérgicos, todos ellos pertenecientes al grupo de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés), los cuales se clasifican como: receptores α_1 -, α_2 -, y β -adrenérgicos (Millan, 2002). Estructural, funcional y farmacológicamente

los receptores α_1 -adrenérgicos se subdividen en α_{1A} , α_{1B} y α_{1C} , los receptores α_2 -adrenérgicos en α_{2A} (Petrosh y Bylund, 1986; Bylund et al., 1988), α_{2B} (Bylund et al., 1988; Uhlén y Wikberg, 1991) y α_{2C} (Blaxall et al., 1999; Bylund, 1988) mientras que los receptores β -adrenérgicos se clasifican en β_1 , β_2 y β_3 . De forma breve, se considera que, a nivel del SNC, la activación de receptores α_2 -adrenérgicos ejerce una acción predominantemente inhibitoria (sin embargo, esto podría no tener que ver con inhibición neuronal en términos de excitabilidad), esto debido a que se encuentran acoplados a una proteína G inhibitoria (G_i) (Bylund, 1995; Kukkonen et al., 2001; Ruffolo et al., 93; Ruffolo y Hieble, 1994; Summers y McMartins, 1993).

Los receptores adrenérgicos están involucrados en diversas funciones, desde cardiovasculares y respiratorias hasta nociceptivas. Estos receptores se encuentran distribuidos a niveles supraespinales, espinales y periféricos, (Giovannitti et al., 2014; Gyires et al., 2009; Millan 2002; Pertovaara 2006). En el caso de la nocicepción, los receptores α_2 -adrenérgicos juegan un rol crítico en el sistema modulador descendente de la nocicepción a nivel espinal. Como se mencionó anteriormente, la activación del LC inhibe la entrada de información nociceptiva a las astas dorsales de la médula espinal a través de la liberación de noradrenalina y la activación de receptores α_2 -adrenérgicos (Fairbanks et al., 2009; Millan 2002; Paqueron et al., 2003; Pertovaara y Wei, 2000; Pertovaara, 2004; Svokos et al., 2001; Yoon et al., 2011). Sin embargo, aún se desconoce la participación específica de un subtipo o subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos.

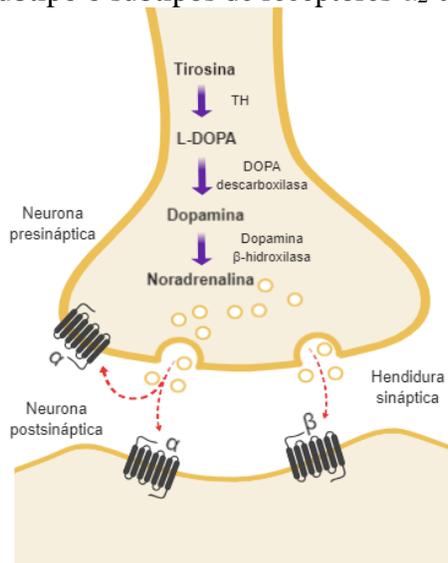


Figura 8. Biosíntesis de noradrenalina.

La NA es sintetizada a partir del aminoácido tirosina. El primer paso de esta síntesis es la conversión de la tirosina en L-di-hidroxi-fenilalanina (L-DOPA) a través de la acción enzimática de la tirosina hidroxilasa (TH). Subsecuentemente, la L-DOPA es convertida en dopamina a través de la acción de la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos, y sólo en las neuronas noradrenérgicas la dopamina es convertida a NA por la enzima dopamina β -hidroxilasa (DBH). La TH es el paso limitante, y afecta directamente la síntesis de la dopamina y NA en el cuerpo. Después de la síntesis, la NA es almacenada en vesículas en los axones terminales, para su posterior liberación ante una entrada eléctrica específica, para su posterior unión con sus receptores.

2.2.4. Sistema GABAérgico

Dentro del sistema nervioso, el ácido γ -Aminobutírico (GABA), es el principal neurotransmisor inhibitorio y se encuentra ampliamente distribuido a través del cerebro y médula espinal (Enna y McCarson, 2006; McCarson y Enna, 2014). Las dos familias principales de receptores GABAérgicos son; los receptores inotrópicos GABA_A (canales iónicos de cloro dependientes de ligando, conformados por 5 subunidades de proteínas) (McCarson y Enna 2014), y los receptores metabotrópicos GABA_B (heterodímeros acoplados a una proteína G_i) (Pinard et al., 2010).

Como se mencionó en secciones anteriores (sección 2.2.2. Sistema serotoninérgico y 2.2.3. Sistema noradrenérgico), a nivel de la médula espinal, interneuronas GABAérgicas localizadas en las astas dorsales se encuentran involucradas en la modulación de la información nociceptiva (Hori y Hoshino, 2012; Rudomin y Schmidt, 1999). Dicho efecto antinociceptivo puede ser activado por la 5HT (Bannister y Dickenson, 2016; Lin et al., 2015; Sommer, 2009), o la NA (Gassner et al., 2009; McCarson y Enna, 2014). En el caso de la NA, investigaciones realizadas en el 2000 por el grupo de Baba y colaboradores, reportaron que la NA es capaz de promover la actividad de interneuronas GABAérgicas, por medio de la activación de receptores α_1 -adrenérgicos presentes en dichas interneuronas.

2.2.5. Modulación exógena de la información nociceptiva

El análisis farmacológico usando agonistas y antagonistas α_2 -adrenérgicos no selectivos apoya la hipótesis de la actividad antinociceptiva ejercida por los receptores α_2 -adrenérgicos (Fairbanks et al., 2002; Fan et al., 2014; Khodayar 2006; Skovos et al., 2001; Yoon et al., 2011). Este conocimiento básico ha sido extrapolado a un uso clínico a través del uso de agonistas α_2 -adrenérgicos no selectivos, como la clonidina (Adegboye et al., 2018; Eisenach et al., 1995, 1996, 2000; Fairbanks et al., 2009; Filos et al., 1992; Rauck et al., 2015; Shaikh et al., 2017).

2.2.5.1. Uso de la clonidina como analgésico

La clonidina sintetizada por primera vez en 1965 por Boehringer-Ingelheim es un agonista parcial no selectivo de los receptores α_2 -adrenérgicos (Tabla 2) (Pihlavisto et al., 1998), el cual es conocido por ser usado como un agente antihipertensivo. Sin embargo, este fármaco tiene efectos analgésicos por medio de la activación de los receptores espinales α_2 -adrenérgicos (Ackerman et al., 2003; Giovannoni et al., 2009; Nguyen et al., 2017; Pan et al., 1999; Rauck et al., 2015).

De forma breve, en 1985 Butelman y colegas demostraron en experimentos de nocicepción en monos *Rhesus* que la clonidina por vía subcutánea tiene efectos antinociceptivos. Así mismo, un estudio en humanos demostró que la administración intratecal de clonidina ejerce un efecto analgésico (Filos et al., 1994). A pesar de su uso clínico como analgésico, la clonidina produce diversos efectos secundarios como sedación, bradicardia y depresión respiratoria. Estos efectos adversos están asociados a la activación inespecífica de subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos, produciendo efectos cardiovasculares mediados por la activación del subtipo α_{2B} -adrenérgico (Giovannitti et al., 2015; Gyres et al., 2009 y Nguyen et al., 2017), como efectos centrales supraespinales induciendo anestesia y sedación por activación de los subtipos α_{2A} - y α_{2C} -adrenérgicos (Fairbanks et al., 2002; Stone et al., 2007 y Nguyen et al., 2017). Por lo tanto, el determinar el subtipo de receptor α_2 -adrenérgico, a nivel espinal, que media la acción antinociceptiva de la clonidina es de interés científico tanto básico como clínico.

Receptores adrenérgicos

	α_{2A} -	α_{2B} -	α_{2C} -
<i>Clonidina</i>	7.7 pKi	7.1 pKi	7.5 pKi

Tabla 2. Perfil de afinidad de la clonidina a los diferentes receptores α_2 -adrenérgicos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El efecto antinociceptivo del sistema noradrenérgico descendente a nivel espinal ha sido ampliamente demostrado. En la clínica la clonidina es utilizada como un agente analgésico; este efecto a nivel espinal es mediado por la activación de receptores α_2 -adrenérgicos, sin que hasta el momento se haya determinado funcionalmente el subtipo de receptor involucrado (α_{2A} -, α_{2B} - y/o α_{2C} -). Este proyecto de investigación buscará caracterizar a través de experimentos conductuales y electrofisiológicos el subtipo de receptor α_2 -adrenérgico que media la modulación de la nocicepción a nivel de la médula espinal.

4. JUSTIFICACIÓN

El uso clínico de agonistas α_2 -adrenérgicos no específicos en la analgesia espinal induce diversos efectos adversos. Determinar el o los subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos que median la acción antinociceptiva es de interés tanto básico como aplicado. De esta forma, el conocimiento del subtipo(s) de receptores α_2 -adrenérgicos que modulan la nocicepción espinal puede dar una pauta al uso de nuevos agonistas selectivos, que sean más eficaces como analgésicos y produzcan menos efectos secundarios.

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1. Hipótesis

Si el efecto antinociceptivo de la clonidina es debido a la activación de uno o más de los subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos, entonces el bloqueo farmacológico específico de cada uno de ellos discriminará su nivel de participación en dicho efecto antinociceptivo.

5.2. Objetivo general

Identificar farmacológicamente los subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos involucrados en la modulación de la transmisión nociceptiva a nivel de la médula espinal de la rata.

5.2.1. Objetivos particulares

- Definir el subtipo o subtipos del receptor α_2 -adrenérgico espinal involucrado en la antinocicepción inducida por clonidina a través de una aproximación de análisis conductual.
- Definir el subtipo o subtipos del receptor α_2 -adrenérgico espinal involucrado en la modulación nociceptiva a través del análisis de las respuestas de neuronas espinales WDR.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Animales

Se utilizaron 118 ratas Wistar macho con un peso de 295 ± 15 g, habituadas a ciclos de luz-obscuridad de 12/12 h, a una temperatura de 22 ± 2 °C, con alimentación e hidratación *ad libitum*. Estos animales se dividieron en dos grupos experimentales para su evaluación conductual o electrofisiológica. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con los protocolos de investigación aprobados por el *Comité de bioética del Instituto de Neurobiología*, la *Asociación Internacional para el Estudio del Dolor* (IASP, por sus siglas en inglés) (Zimmermann, 1983), y bajo los principios éticos de experimentación en animales, establecidos por la NOM-062-ZOO-1999, los cuales están acorde a los estatutos i) las guías ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) y ii) las guías “*Care and Use of the Laboratory Animals established by the National Institutes of Health*” (Publicación NIH No.8023, 1978).

6.2. Experimentos conductuales (prueba de la formalina)

6.2.1. Procedimiento general

El procedimiento se realizó bajo los parámetros descritos por Dubuisson y Dennis (1977). De forma breve, las ratas se colocaron en cámaras de observación de *plexiglás* abiertas durante 30 min en tres días consecutivos para permitir la adaptación a su entorno. En el tercer día y después de los 30 min las ratas fueron retiradas de las cámaras de observación y sujetadas suavemente mientras que el dorso de la pata trasera era inyectado subcutáneamente (s.c., subcutáneo) con 50 μ l de formalina al 1 %. La inyección se realizó usando una aguja de calibre 30 G. Inmediatamente a la inyección s.c., los animales fueron devueltos a las cámaras de observación y el comportamiento nociceptivo fue cuantificado. El comportamiento nociceptivo se cuantificó como el número de retiros de la pata inyectada durante períodos de 1 min cada 5 min, hasta 60 min después de la inyección de formalina (Wheeler-Aceto y Cowan, 1991; Malmberg y Yaksh, 1992) (Fig. 9). El retiro de la pata inducido por la administración de la formalina genera una curva bifásica. Una fase inicial (0-10 min), seguida por un período de reposo relativamente corto, que fue seguido por una respuesta tónica prolongada (15-60 min). Los antagonistas fueron administrados 20 min antes de la administración de clonidina, y esta última fue administrada 10 min antes de iniciar la prueba (Fig. 9), en todos los casos se administró un volumen de 10 μ l.

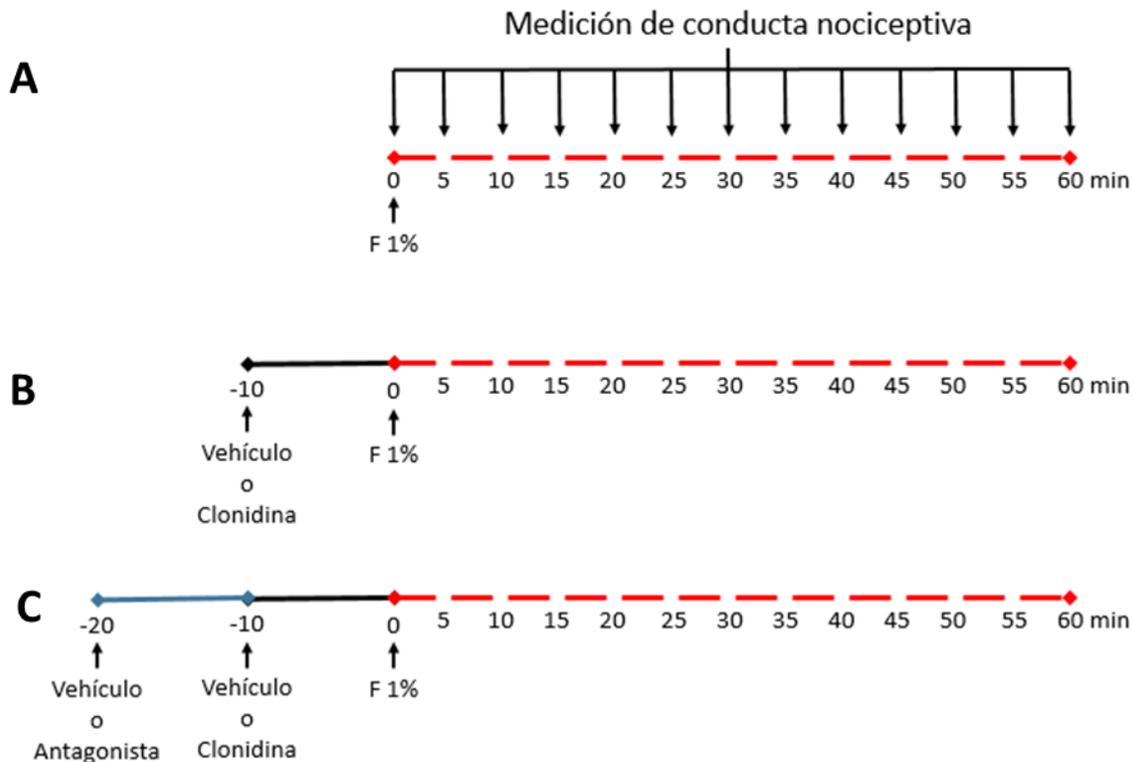


Figura 9. Protocolos experimentales utilizadas en la prueba de la formalina.

A) Grupo control; se administró subcutáneamente (s.c.) 50 μ l de formalina al 1% en el dorso de la pata trasera derecha de las ratas en T=0 (inicio de la prueba de formalina). B) Grupo agonista; se administró intratecalmente (i.t.) 10 μ l de clonidina (0.1, 1 o 10 nmol) 10 minutos después se administró 50 μ l formalina 1% tal y como se describió en el inciso A. C) Grupo antagonista; se administró i.t. 10 μ l de un antagonista α_2 -adrenergico (BRL 44408 0.1, 1 nmol, imiloxan 10 nmol, JP 1302 1 nmol), 10 minutos después se administró intratecalmente 10 μ l de clonidina (1 nmol) tal y como se describió en el inciso B.

6.2.2. Canulación intratecal

Para la administración intratecal (i.t.) de los distintos tratamientos, 5 días antes de la prueba de la formalina se realizó una canulación i.t. crónica (Yaksh y Rudy, 1976). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina/xilacina (75/10 mg/kg) por vía intraperitoneal (i.p.) y el pelo de la parte dorsal de la cabeza y cuello de la rata fue rasurado. Bajo estas condiciones, las ratas fueron montadas en un aparato estereotáxico (David Kopf modelo 1730) asegurando que: (1) las orejas están en una posición normal, relajada; (2) no hay evidencia de exoftalmos y (3) la cabeza se mueve libremente hacia arriba y abajo, pero no se mueve lateralmente.

Bajo estas condiciones experimentales, se insertó un catéter de polietileno del No. 10 (PE-10) a través de una pequeña incisión hecha en la membrana atlanto-occipital de la cisterna magna. Éste se introdujo 9 cm en el espacio intratecal con la finalidad de colocarlo a nivel de los segmentos

L₄ y L₅ de la medula espinal. Después de la cirugía, las ratas se colocaron individualmente en cajas de recuperación con alimento y agua *ad libitum*, permitiéndoles un periodo de recuperación de 5 días antes de realizar la prueba, y posterior al término del experimento, de nuevo se colocaron individualmente en cajas. Las ratas que no recuperaron su peso o que presentaron síntomas de deficiencias neurológicas posoperatorias (catatonia, o pérdida de movilidad en alguna extremidad) fueron excluidas.

6.2.3. Caracterización farmacológica del efecto de la administración intratecal de clonidina o los antagonistas α_2 -adrenérgicos sobre la nocicepción inducida por formalina al 1%.

Se utilizó un grupo experimental con una n = 85 ratas. Dicho grupo fue subdividido en 3 subgrupos con una n=5, n=15 y n=65, donde se realizaron los siguientes protocolos experimentales (Fig. 10).

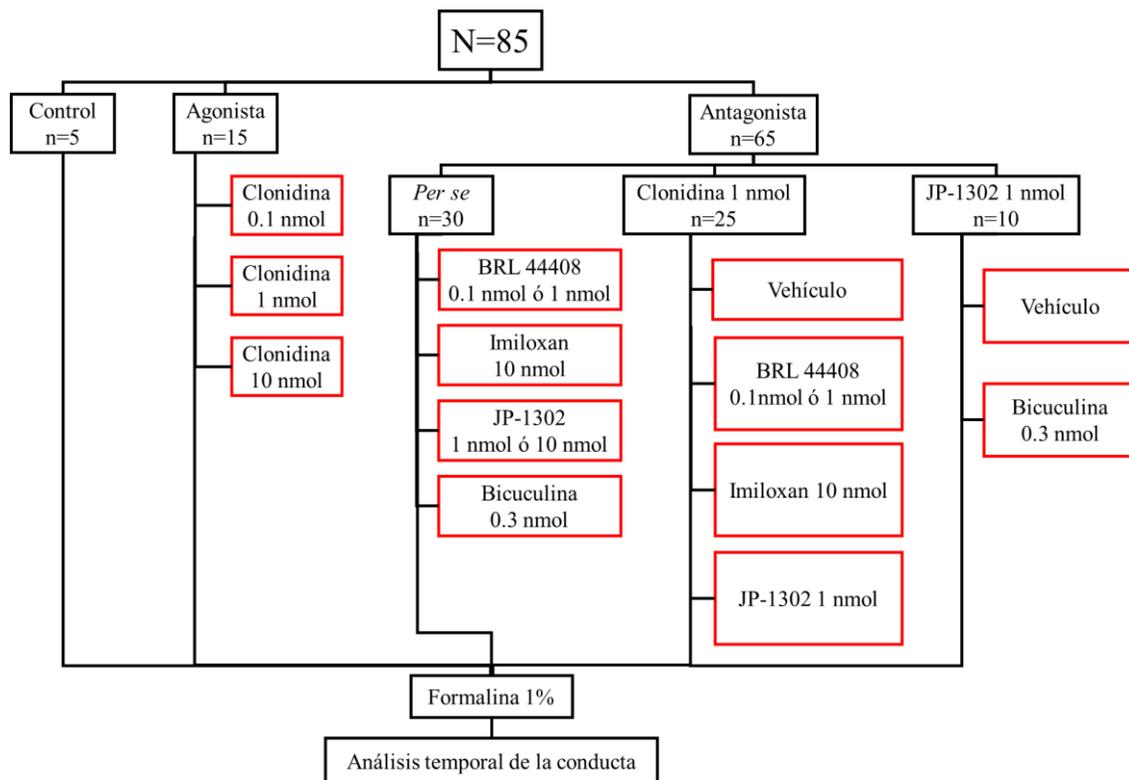


Figura 10. Diseño de grupos experimentales usados en la prueba de la formalina para determinar el subtipo de receptor α_2 -adrenérgico involucrado en el efecto antinociceptivo de la clonidina.

6.2.3.1. Protocolo para evaluar el efecto del vehículo sobre la nocicepción inducida por formalina.

Se utilizó un grupo de animales (n=5) donde se realizaron los cursos temporales del número de sacudidas de la pata inducidas por formalina en animales a los cuáles se les inyectó un volumen de

solución salina isotónica (SSI, vehículo) de 20 µl en el espacio intratecal. La SSI fue administrada 10 minutos antes de la inyección s.c. de formalina.

6.2.3.2. Protocolo para evaluar el efecto de la clonidina sobre la nocicepción inducida por formalina

Se realizaron los cursos temporales del número de sacudías de la pata inducidas por formalina en animales pretratados con diferentes concentraciones de clonidina por vía i.t. (0.1 nmol, n=5; 1 nmol, n=5; o 10 nmol, n=5). La clonidina fue administrada 10 minutos antes de la inyección s.c. de formalina.

6.2.3.3. Protocolo para evaluar el efecto per se de la administración intratecal de los antagonistas BRL 44408, imiloxan, JP-1302 o bicuculina sobre la nocicepción inducida por formalina

Se realizaron los cursos temporales del número de sacudidas de la pata inducidas por formalina en animales pretratados por vía i.t. con los antagonistas: (i) 0.1 nmol o 1 nmol de BRL 44408; (ii) 10 nmol imiloxan; (iii) 1 o 10 nmol de JP-1302; y (iv) 0.3 nmol bicuculina (n=5 en cada uno). Los antagonistas fueron administrados 20 minutos antes de la inyección s.c. de formalina.

6.2.3.4. Protocolo para evaluar el efecto de la administración intratecal de los antagonistas BRL 44408, imiloxan o JP-1302 sobre la antinocicepción inducida por clonidina

Los animales pretratados por vía i.t. con el vehículo (20 µl) o los antagonistas BRL 44408 (0.1 nmol o 1 nmol), imiloxan (10 nmol) y JP-1302 (1 nmol). Diez minutos después, a todos los animales se les administró clonidina (1 nmol) por vía i.t. (n=5 en cada uno). La inyección de formalina se realizó 10 minutos después de la administración de clonidina y se cuantificó la conducta nocifensiva.

6.2.3.5. Protocolo para evaluar el efecto de la administración intratecal de bicuculina sobre la antinocicepción inducida por el JP-1302

Se realizaron los cursos temporales del número de sacudidas de la pata inducidas por formalina en animales pretratados con el vehículo (20 µl) o el antagonista bicuculina (0.3 nmol; n=5) 10 minutos previo a la administración intratecal JP-1302 (1 nmol, n=5). La inyección s.c. de formalina se realizó 10 minutos después de la administración de JP-1302.

6.2.4. Tratamiento estadístico de los datos

Los resultados experimentales obtenidos en esta prueba se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media del número de sacudidas por minuto de la pata. Se calculó el área bajo la curva (ABC) por el método de los trapezoides, de la primera (0-15 min) y segunda (15-60 min) fase de la prueba de formalina. El ABC se consideró como una expresión global de la intensidad y duración del efecto. Las diferencias entre los promedios de los distintos grupos de animales fueron analizadas para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas aplicando un análisis de variancia (ANOVA) de una vía seguido por una prueba *post hoc* de Tukey. Una $p < 0.05$ se consideró significativa.

6.3. Experimentos electrofisiológicos

6.3.1. Preparación experimental

Los animales se dividieron en distintos grupos experimentales para su evaluación experimental (Fig. 11). Las ratas se anestesiaron con uretano (2 mg/kg), y se colocaron en decúbito dorsal. Se realizó una incisión en la piel de la garanta para exponer la tráquea. Se abrió la tráquea entre los aros de cartílago teniendo cuidado de no cortarla completamente, y se insertó una cánula intratraqueal. La cánula se aseguró y se conectó a la bomba de respiración (65-70 pulsos/min).

Los animales fueron colocados en un aparato estereotáxico (David Kopf modelo 1730) donde la cabeza y las vértebras fueron fijadas. La temperatura de los animales se mantuvo constante (38°C) a través de una almohadilla de agua circulante. Se realizó una incisión rostro caudal a través de la piel de la espalda del animal. El realizar incisiones paralelas a través del músculo permitió la fijación de las vértebras, utilizando abrazaderas espinales. Se posicionó la primera abrazadera espinal en el marco del equipo de manera rostral a la vértebra L1, se levantó la columna vertebral hacia las abrazaderas y se sujetó firmemente, teniendo cuidado de no lastimar la vértebra. Después de posicionar la segunda abrazadera, gentilmente se empujó la abrazadera hacia atrás en el marco del equipo para estirar el torso del animal y permitir la respiración.

Se cortó y raspó el tejido conectivo y músculo que recubría la vértebra hasta que las uniones entre las vértebras fueron visibles. Se utilizó una gubia para realizar la laminectomía retirando las apófisis espinosas en dirección rostral, posteriormente se utilizó una fresa dental para retirar la parte superior de las vértebras y se mantuvo paralela a la medula espinal evitando dañarla. Una vez

realizada la laminectomía, si retiró la duramadre utilizando una aguja 22G. La médula espinal se mantuvo hidratada por medio de la aplicación tópica de solución salina isotónica (SSI).

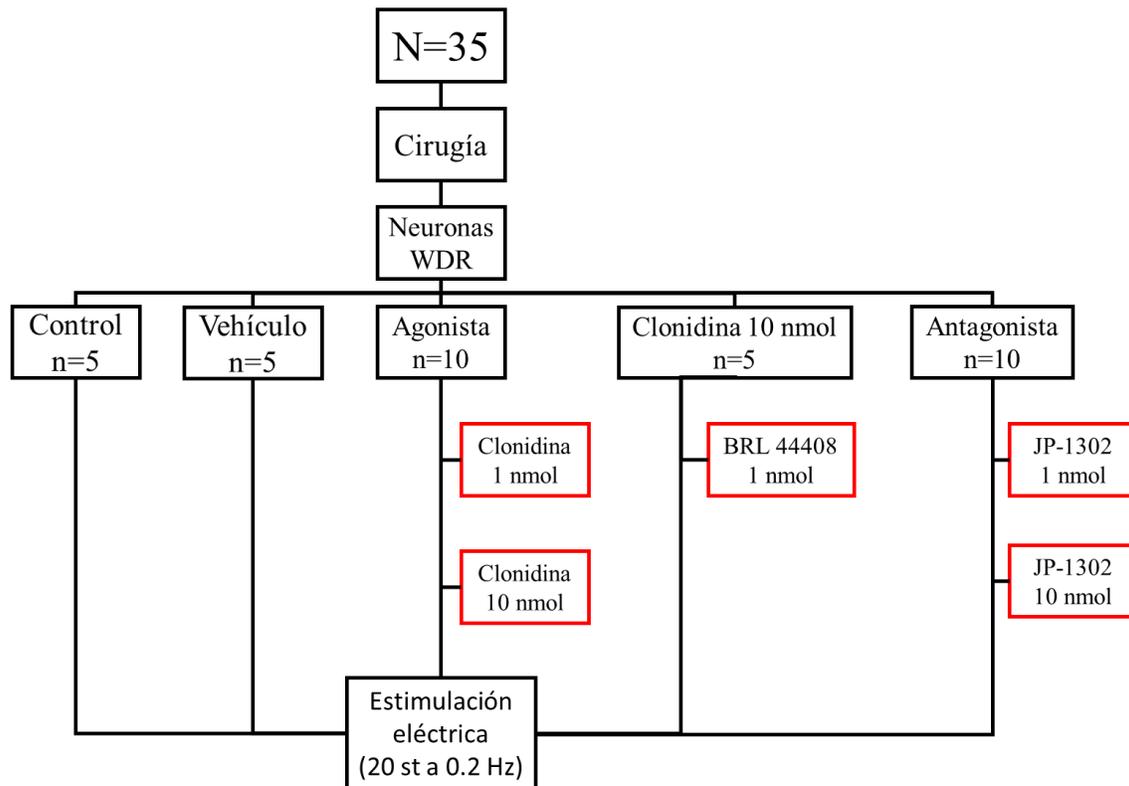


Figura 11. Diseño de grupos experimentales para el análisis electrofisiológico del subtipo de receptor α_2 -adrenérgico involucrado en el efecto antinociceptivo de la clonidina.

6.3.2. Registro extracelular unitario y estimulación

Los registros extracelulares unitarios fueron realizados utilizando microelectrodos de cuarzo-platino/tungsteno (resistencia 4-7 M Ω) montados en un sistema de multielectrodos (System Eckhorn). Dicho sistema fue manipulado utilizando el software Eckhorn Matrix (Thomas RECORDING GmbH, Giessen, Germany). Los microelectrodos fueron insertados entre 400 y 900 μ m de la superficie dentro de las láminas superficiales de los segmentos del asta dorsal izquierda para buscar descargas unitarias. Para cada célula registrada, el campo receptivo somático específico fue localizado por estimulación mecánica manual de la pata trasera ipsilateral. Bajo estas condiciones, la estimulación eléctrica fue aplicada por medio de dos electrodos insertados en el campo receptivo. En este caso, dos agujas finas (27G) conectadas a una unidad de estimulación fueron insertadas s.c. en el campo receptivo periférico de la neurona registrada. Dicho campo receptivo se localizó en todos los casos en la pata ipsilateral al sitio de registro de la neurona. La prueba de estimulación eléctrica fue entonces realizada; dicha prueba consistió en 20 estímulos a

0.2 Hz con pulsos de 1 ms de duración a 1.5 veces la intensidad del umbral (0.1-3 mA) requerido para evocar la respuesta de las fibras C.

La actividad neuronal extracelular inducida por la estimulación eléctrica del campo receptivo fue registrada, amplificada, digitalizada, y discriminada usando el hardware CED y el software Spike 2 (Cambridge Electronic Design; Version 5.20). Las señales crudas y discriminadas fueron alimentadas a través de un monitor de audio y visualizadas en un osciloscopio. Las formas de onda y los trenes de espigas fueron almacenados en un disco duro para su análisis posterior. La actividad evocada de las neuronas de amplio rango dinámico del asta dorsal de la médula espinal fueron registradas y analizadas como frecuencia acumulativa e histogramas peri-estímulo para detectar la ocurrencia de respuestas neuronales estadísticamente significativas.

Sobre esta base, los umbrales de estimulación para evocar potenciales de acción y su frecuencia de ocurrencia, resultado de la estimulación periférica del campo receptivo en la pata trasera, fueron atribuidos al reclutamiento de las fibras A β , A δ y C. Considerando la distancia entre el campo receptivo y los electrodos de registro, las latencias máximas corresponden a las velocidades de conducción periférica de las fibras A β (0-20 ms), A δ (21-90 ms) y C (90-350 ms). Así, el número de potenciales de acción evocados que ocurrieron en respuesta a la estimulación eléctrica (20 estímulos, 0.2 Hz, 1-mseg de duración, 0.1-3 mA) fueron comparados antes (basal) y después del tratamiento con el vehículo o el fármaco(s).

Las respuestas neuronales evocadas fueron evaluadas antes (respuesta basal) y después de la administración espinal de clonidina o JP-1302 a tiempo t = 0, 10, 20, 30, 40, 50, y 60 min. El antagonista BRL 44408 fue administrado 10 min antes de la administración de clonidina. Los fármacos fueron administrados a nivel espinal en un volumen de 10 μ l.

6.3.3. Caracterización farmacológica del efecto de la administración espinal de clonidina sobre las respuestas nociceptivas de neuronas de amplio rango dinámico (WDR).

Se utilizó un grupo experimental con una n= 35 neuronas WDR. Dicho grupo fue subdividido en 5 subgrupos con una n de neuronas WDR de =5, 5, 10, 5 y 10 neuronas.

6.3.3.1. *Protocolo experimental para evaluar el efecto del vehículo sobre las respuestas nociceptivas de neuronas WDR*

En un grupo de neuronas control (n=5) o neuronas pretratadas con solución salina isotónica (SSI, vehículo; 10 µl a nivel de la médula espinal) se registraron las respuestas neuronales de células WDR inducidas por la estimulación eléctrica de su campo receptivo periférico.

6.3.3.2. *Protocolo experimental para evaluar el efecto de la clonidina sobre las respuestas nociceptivas de neuronas WDR*

Se utilizó un grupo de neuronas (n=10) en animales tratados con diferentes concentraciones de clonidina (1 nmol, n=5; o 10 nmol, n=5) donde se registraron las respuestas nociceptivas de neuronas WDR inducidas por la estimulación eléctrica de su campo receptivo en animales.

6.3.3.3. *Protocolo experimental para evaluar el efecto del BRL 44408 sobre la antinocicepción inducida por la clonidina en las respuestas nociceptivas de neuronas WDR*

En un grupo de neuronas (n=5) tratadas con clonidina (10 nmol) se analizaron las respuestas nociceptivas de neuronas WDR en animales pretratados con el antagonista BRL 44408 (1 nmol, n=5). El BRL 44408 se administró de forma tópica en la médula espinal 10 minutos previos a la administración tópica de clonidina (10 nmol, n=5). Es de importancia mencionar que, a este punto no se realizaron experimentos electrofisiológicos con animales pretratados con imiloxan, esto debido a la ausencia de un efecto tanto *per se* como en presencia de clonidina, en los experimentos conductuales.

6.3.3.4. *Protocolo experimental para evaluar el efecto del JP-1302 sobre las respuestas nociceptivas de neuronas WDR*

Se utilizó un grupo de neuronas (n=10) pretratados con JP-1302 (1 nmol, n=5 y 10 nmol, n=5) donde se registraron las respuestas nociceptivas de neuronas WDR inducidas por la estimulación eléctrica de su campo receptivo en animales

6.3.4. Tratamiento estadístico de los datos

Los datos obtenidos de los registros electrofisiológicos se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media. En todos los casos, el número de potenciales evocados inducidos por la estimulación eléctrica fueron normalizados y expresados como porcentaje de cambio con respecto

a la respuesta basal. La respuesta basal fue establecida después de identificar que la neurona tuvo una variación $\leq 10\%$ en su respuesta neuronal inducida por la estimulación eléctrica durante 5 controles consecutivos (5 minutos entre cada prueba). La actividad neuronal evocada antes y después del tratamiento se comparó usando un análisis de varianza de dos vías. La diferencia de actividad global neuronal de un grupo de animales antes y después del tratamiento se comparó usando un análisis de varianza de una vía. De allí si era aplicable, se realizó una prueba *post hoc* de Tukey. En todos los casos se consideró que hubo una diferencia estadística cuando $P < 0.05$.

6.4. Fármacos

Además de los anestésicos usados (ketamina, xilacina y uretano), se emplearon los siguientes fármacos: clorhidrato de clonidina (Sigma Chemical Co., St Lous, MO, EUA); maleato de 2-[2H-(1-metil-1,3-dihidroinindol)metil]-4,5-dihidroimidazol (BRL 44408; Sigma Chemical Co., St Lous, MO, EUA); clorhidrato de imiloxan (Sigma Chemical Co., St Lous, MO, EUA); diclorhidrato de *N*-[4-(4-metil-1-piperazinilo)fenil]-9-acridinamina (JP-1302; Tocris Cookson Ltd, Bristol, Avon, UK) y metioduro de bicuculina (Sigma Chemical Co., St Lous, MO, EUA). Todos los fármacos fueron disueltos en solución fisiológica salina.

7. RESULTADOS

7.1. Análisis conductual

Como fue descrito por Debusson and Dennis (1977), la administración subcutánea de formalina al 1% en la pata trasera derecha de la rata produce una respuesta nociceptiva bifásica característica (cuantificada como número de sacudidas de pata) (Fig. 12A, curva control). La primera fase (F1) ocurre inmediatamente después de la administración de formalina y decae a los 10 min, la segunda fase (F2) inicia a los 15 min posteriores a la administración de formalina y decae aproximadamente hasta los 60 min.

7.1.1 Efecto de la administración intratecal de clonidina sobre la nocicepción inducida por formalina

La administración intratecal (i.t.) de clonidina (0.1 nmol, n=5; 1 nmol, n=5; ó 10 nmol, n=5) bloquea de manera significativa la respuesta nociceptiva (sacudidas de la pata) inducida por la formalina (Fig. 12). En la figura 12B y 12C se muestran las áreas bajo la curva (ABC) de la fase 1 y 2 de la prueba de la formalina. El análisis estadístico muestra que la clonidina disminuyó de forma significativa los comportamientos nocifensivos inducidos por la formalina en ambas fases.

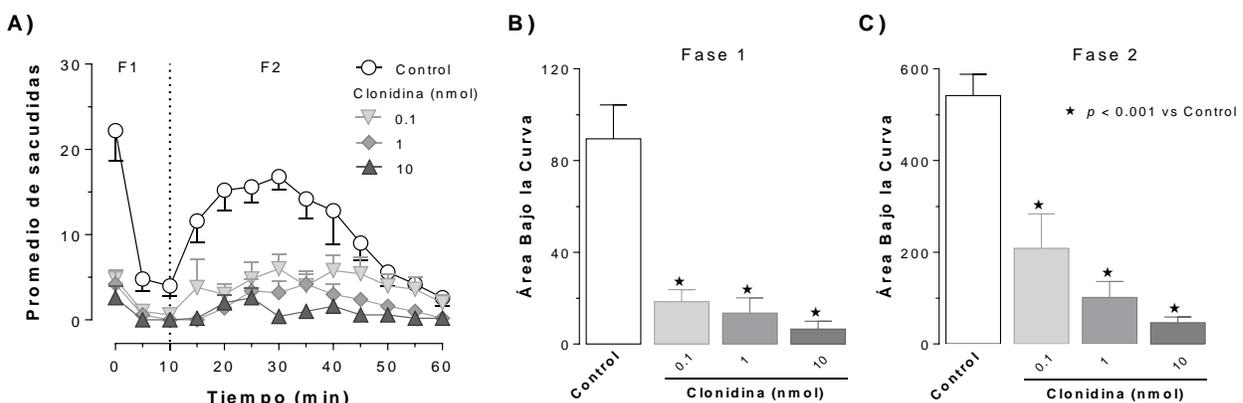


Figura 12. Efecto de la clonidina intratecal (i.t.) sobre el número de sacudidas de la pata inducida por la administración s.c. de formalina (1 %).

A) Se muestra el curso temporal bifásico (F1 y F2) de la respuesta nociceptiva inducida por 1 % de formalina (50 μ l) en las ratas del grupo control y los grupos tratados con clonidina (0.1, 1 ó 10 nmol/10 μ l). La clonidina se administró 10 minutos antes de la administración s.c. de formalina. En ambas fases (B y C) se observa que la clonidina disminuye de forma significativa el ABC con respecto al grupo control. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía ($\star P < 0.001$ vs grupo control). La clonidina se administró 10 minutos antes de la administración s.c. de formalina.

7.1.2 Efecto *per se* de la administración intratecal de los antagonistas BRL 44408, imiloxan, y JP-1302 sobre la nocicepción inducida por formalina

Se evaluó el efecto *per se* de la administración i.t. de BRL 44408 (antagonista específico α_{2A} -adrenérgico), imiloxan (antagonista específico α_{2B} -adrenérgico) y JP-1302 (antagonista específico α_{2C} -adrenérgico). La figura 13 muestran que la administración de BRL44408 (0.1 nmol, n=5; o 1 nmol, n=5) o imiloxan (10 nmol, n=5) no tienen efecto sobre la nocicepción inducida por formalina. En contraste, el JP-1302 (1 nmol, n=5; 10 nmol, n=5) reduce la nocicepción inducida por formalina.

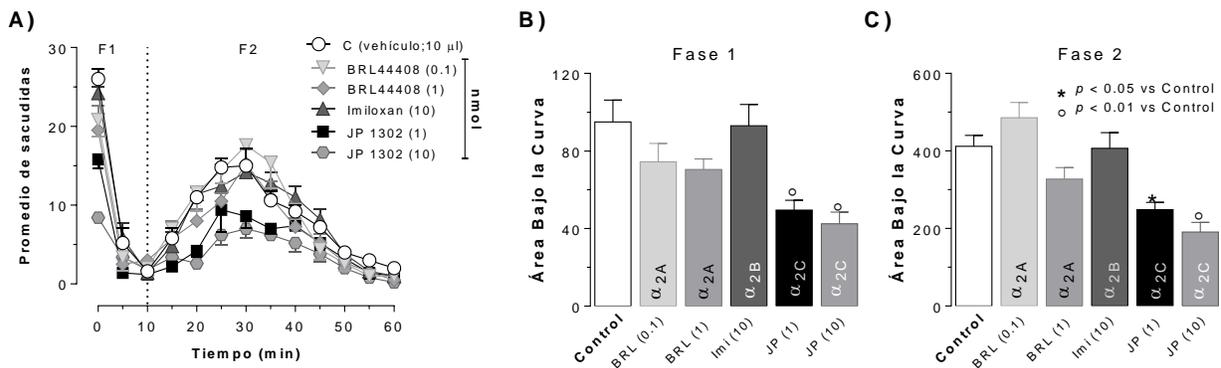


Figura 13. Efecto *per se* de los antagonistas α_2 -adrenérgicos selectivos sobre el número de sacudidas de la pata inducida por formalina al 1%.

A) Curso temporal de la respuesta nociceptiva inducida por formalina en el grupo control (solución salina isotónica, 0.9 % NaCl) y en los grupos tratados con los antagonistas α_2 -adrenérgicos selectivos (BRL 44408 0.1 nmol, 1 nmol; imiloxan 10 nmol; JP-1302 1 nmol y 10 nmol). Los antagonistas se administraron 20 min antes de la administración de formalina. Tanto en la fase 1 (**B**) como en la fase 2 (**C**) no se observa un cambio significativo al comparar la respuesta del grupo control contra los tratados con los antagonistas BRL 44408 o imiloxan. En contraste, la administración de JP-1302 disminuyó significativamente la conducta nociceptiva en comparación con el grupo control. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía (* $P < 0.05$, $\circ P < 0.01$ vs grupo control). Los antagonistas se administraron 20 min antes de la administración de formalina.

7.1.3. Efecto de la administración intratecal de los antagonistas BRL 44408, imiloxan o JP-1302 sobre la antinocicepción inducida por clonidina en la prueba de la formalina

Con base en los resultados se decidió utilizar una dosis i.t. de clonidina de 1 nmol para caracterizar el subtipo de receptor α_2 -adrenérgico involucrado. Como se observa en la Fig. 14, el efecto antinociceptivo inducido por clonidina fue revertido en los animales pretratados con BRL44408 (antagonista α_{2A} -adrenérgico selectivo; 1 nmol) más no con imiloxan (antagonista α_{2B} -adrenérgico selectivo) o JP-1302 (antagonista α_{2C} -adrenérgico selectivo; 1 nmol).

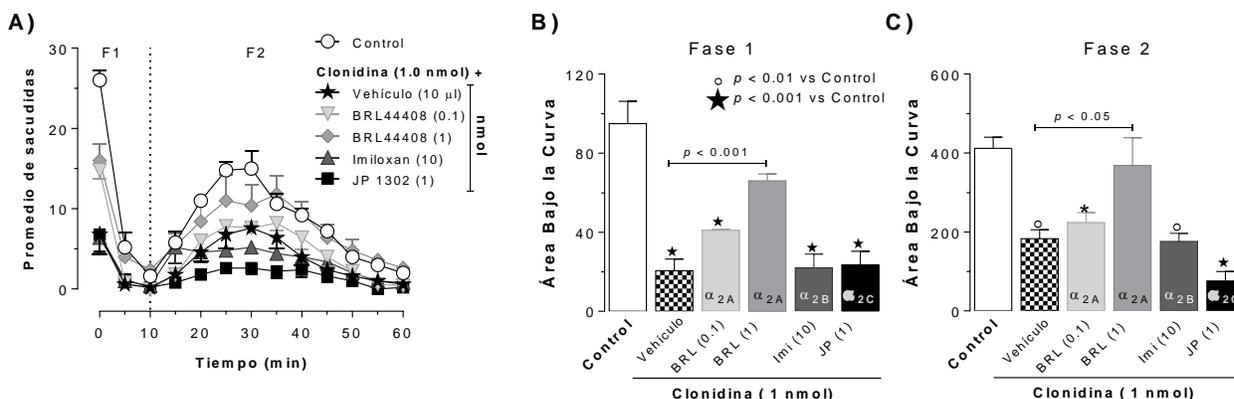


Figura 14. Efecto de los antagonistas α_2 -adrenérgicos selectivos sobre la antinocicepción inducida por clonidina (1 nmol). A) Curso temporal de la respuesta nociceptiva inducida por formalina en el grupo control y en los grupos tratados con: (i) clonidina + vehículo; (ii) clonidina + BRL44408 (0.1 o 1 nmol); (iii) clonidina + imiloxan (10 nmol); o (iv) clonidina + JP-1302 (1 nmol). Los antagonistas fueron administrados 10 min antes que la clonidina. En ambas fases (B y C) el efecto antinociceptivo inducido por clonidina es revertido por la administración de BRL 44408 (de forma particular a 1 nmol) mas no por el imiloxan o el JP-1302. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía ($\circ P < 0.01$, $\star P < 0.001$ vs grupo control). Los antagonistas fueron administrados 10 min antes que la clonidina.

7.1.4 Efecto de la administración intratecal de bicuculina sobre la antinocicepción inducida por el JP-1302

Para tratar de explicar los efectos antinociceptivos inesperados inducidos por la administración i.t. de JP-1302 se realizaron los siguientes experimentos (Fig. 15). El pretratamiento con un antagonista de los receptores GABA_A (bicuculina, 0.3 nmol, i.t.) revirtió el efecto antinociceptivo inducido por el JP-1302. Por otra parte, se observa que la administración de bicuculina (0.3 nmol, n=5) no tuvo un efecto *per se* sobre la nocicepción inducida por formalina

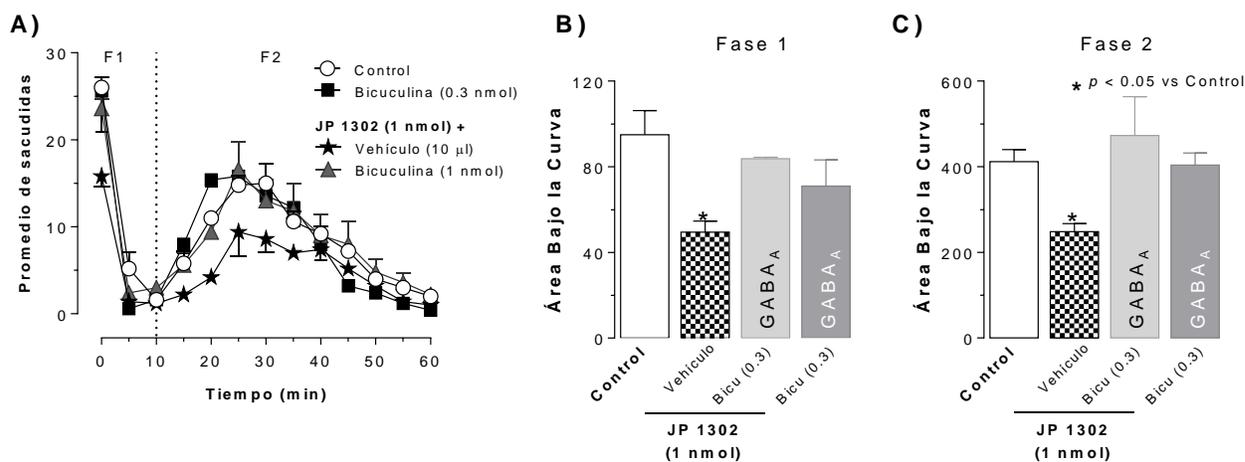


Figura 15. Efecto del antagonista GABAérgico selectivo bicuculina (0.3 nmol) sobre la antinocicepción inducida por el antagonista α_{2C} -adrenérgico selectivo JP-1302 (1 nmol).

A) Curso temporal de la respuesta nociceptiva inducida por formalina en las ratas del grupo: (i) control; (ii) JP-1302 (1 nmol); y (iii) bicuculina + JP-1302. La bicuculina fue administrados 10 min antes que el JP-1302. Tanto en el curso temporal como en la fase 1 (**B**) y fase 2 (**C**) se observa que el efecto antinociceptivo inducido por JP-1302 fue bloqueado por la administración de bicuculina. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía (* $P < 0.05$ vs grupo control). La bicuculina fue administrada 10 min antes que el JP-1302.

7.2. Análisis electrofisiológico

Los registros extracelulares en la médula espinal se realizaron en 35 neuronas WDR con un campo receptivo cutáneo localizado ipsilateral al sitio de registro. La mayoría de las neuronas registradas se encontraron a una profundidad promedio de $700 \pm 192 \mu\text{m}$ lo cual sugiere que se encontraban en la lámina V-VI (Manzano-García et al., 2018; Urch y Dickenson, 2003). Estas neuronas fueron caracterizadas de acuerdo con las propiedades de su respuesta (tiempo de latencia) y fueron clasificadas como neuronas WDR ya que se activaban tanto por estímulos no-nocivos como nocivos. En todos los casos, la estimulación eléctrica del campo receptivo periférico evocó respuestas neuronales WDR asociadas a la activación de fibras $A\delta$ y C (Fig. 16).

7.2.1. Estabilidad de los registros electrofisiológicos

Dado que se registraron neuronas WDR en la zona lumbar de la medula espinal durante 60 min, se evaluó el efecto del tiempo en las respuestas nociceptivas neuronales provocadas por la estimulación eléctrica periférica. Como se observa en la Fig. 16A, las respuestas neuronales asociadas a la activación de fibras $A\beta$, $A\delta$ o C de las neuronas pertenecientes al grupo control ($n=5$), no presentaron cambios significativos en su respuesta basal ni posterior a los 60 min de duración de los registros. De forma similar, la administración del vehículo no tuvo efecto sobre la actividad neuronal asociada a fibras $A\beta$, $A\delta$ o fibras C (Fig. 16B). En su conjunto, estos datos muestran que no hay cambios significativos en las respuestas neuronales provocadas en nuestros protocolos experimentales atribuibles al tiempo de duración del experimento o al vehículo usado.

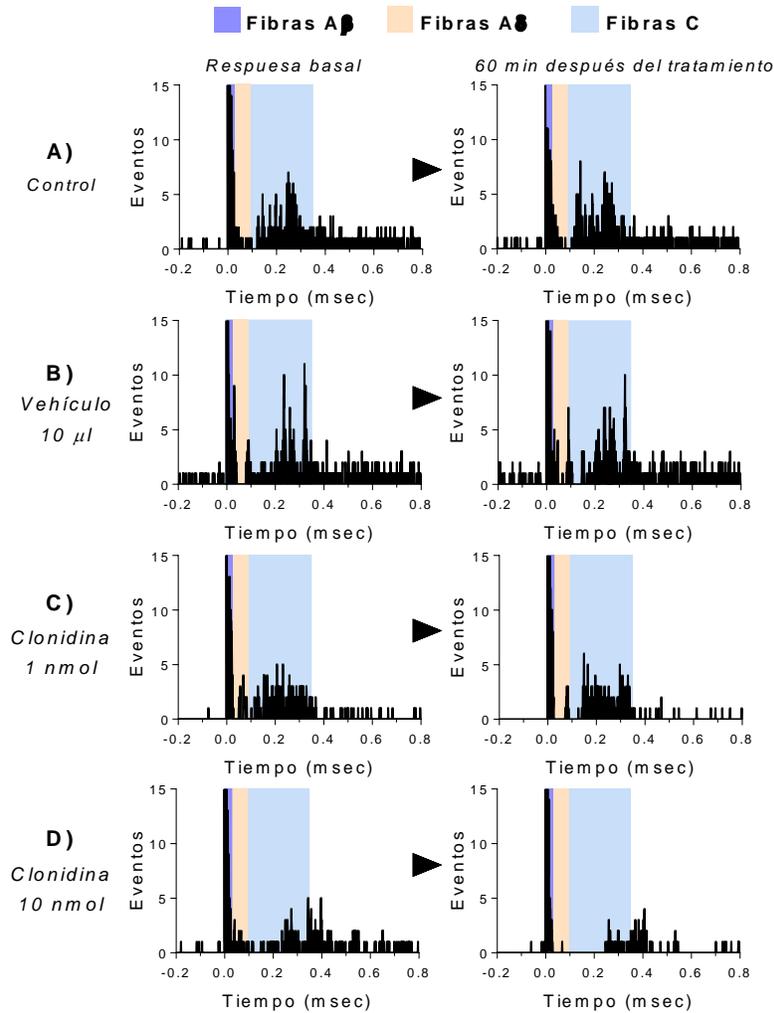


Figura 16. Ejemplos de histogramas peri-estímulo de neuronas WDR construidos a partir de la estimulación eléctrica periférica antes (histograma basal, izquierda) y 60 minutos después de los distintos tratamientos.

Histograma peri-estímulo basal y después de 60 minutos en neuronas WDR control (A) y tratadas con vehículo (B). En estos dos histogramas no se observa diferencia en la actividad de las diferentes fibras que convergen en las neuronas WDR. En (C) y (D) se muestran histogramas peri-estímulo antes (basal) y después (60 minutos) de la administración de clonidina (1 nmol y 10 nmol); en este caso se observa una disminución de la actividad asociada al disparo de las fibras A δ y C, mas no de las fibras A β .

7.2.2. Efecto de la administración espinal de clonidina sobre la actividad de neuronas WDR

La administración espinal de clonidina (1, 10 nmol) no ejerce una inhibición sobre el porcentaje de la actividad neuronal o el porcentaje global de actividad de las fibras A β (Fig. 17A y 17D). En contraste, la clonidina (10 nmol) inhibió la actividad neuronal asociada al disparo de las fibras A δ y C tanto de manera temporal (Fig. 17B y 17C) como global (Fig. 17E y 17F).

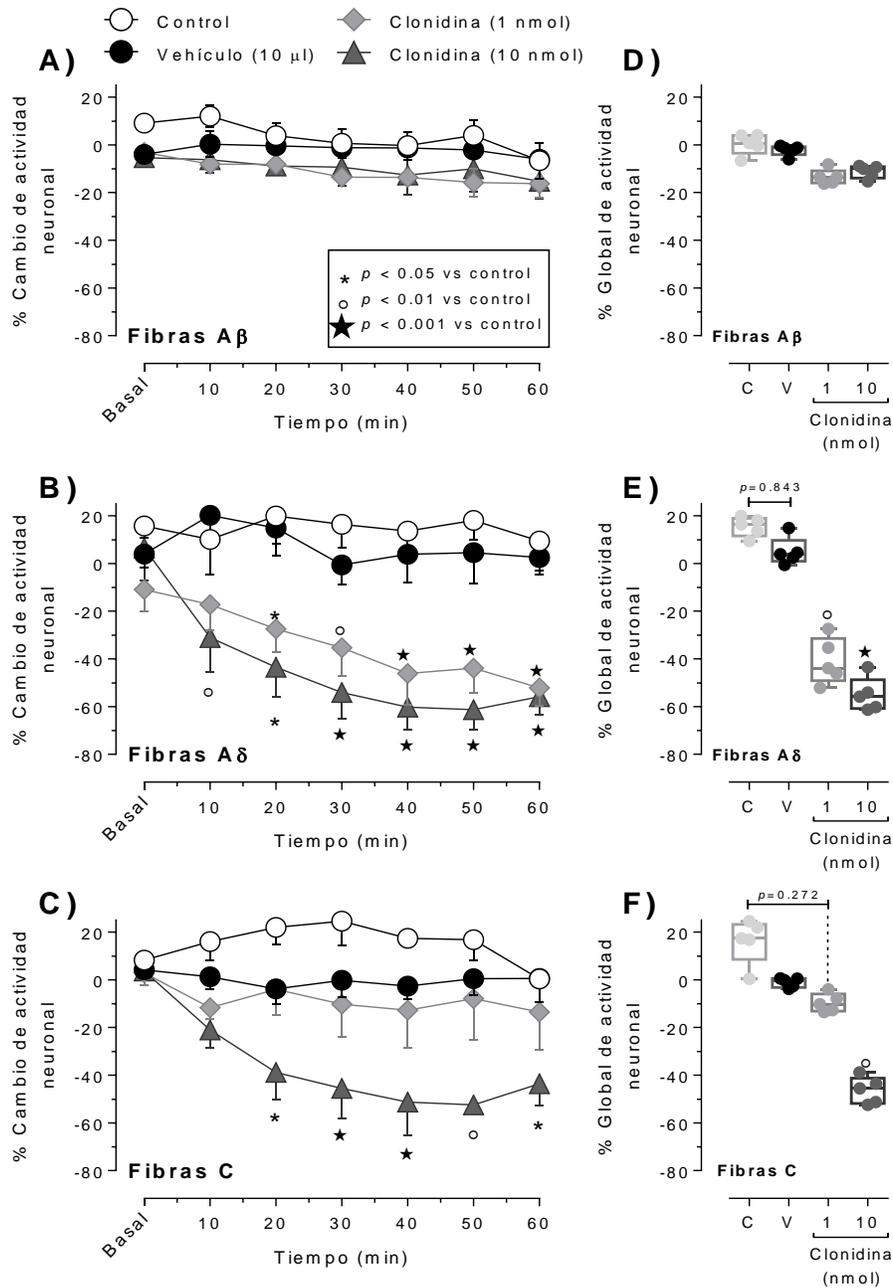


Figura 17. La administración espinal de clonidina inhibe la actividad neuronal de neuronas WDR evocada por la estimulación eléctrica periférica.

Los paneles **A**, **B** y **C** muestran el curso temporal del efecto de la administración de clonidina (1 o 10 nmol) sobre la actividad neuronal asociada al disparo de fibras Aβ, Aδ y C expresada como porcentaje de cambio con respecto a su actividad basal. La administración espinal de clonidina (1 o 10 nmol) no modifica la actividad neuronal asociada a la activación de las fibras Aβ (**A**); sin embargo, disminuye de forma significativa la actividad asociada al disparo neuronal de las fibras Aδ y C (**B** y **C**). Es interesante observar que el efecto antinociceptivo de la clonidina fue más notorio en las fibras Aδ que en las fibras C. Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías de medidas repetidas (* $P < 0.05$, ○ $P < 0.01$, ★ $P < 0.001$ vs. grupo control). Los paneles **D**, **E** y **F** muestran la actividad neuronal global de las fibras Aβ, Aδ y C; la clonidina (1, o 10 nmol) inhibe la actividad global solo de las fibras Aδ y C, más de las fibras Aβ. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía ○ $P < 0.01$, ★ $P < 0.001$ vs. grupo control). La clonidina fue administrada en T=0.

7.2.3. Efecto de la administración espinal del JP-1302 sobre la actividad de neuronas WDR

La administración espinal de JP-1302 (1 nmol y 10 nmol) no tiene efecto sobre la actividad neuronal asociada al disparo de las fibras A β , A δ y C (Fig. 18A, 18B y 18C). La Fig. 18D y 18E muestra un ejemplo de los histogramas peri-estímulo de neuronas WDR tratadas con 1 o 10 nmol de JP-1302 en donde no se observa una disminución en la respuesta de las diferentes fibras que convergen en las neuronas WDR.

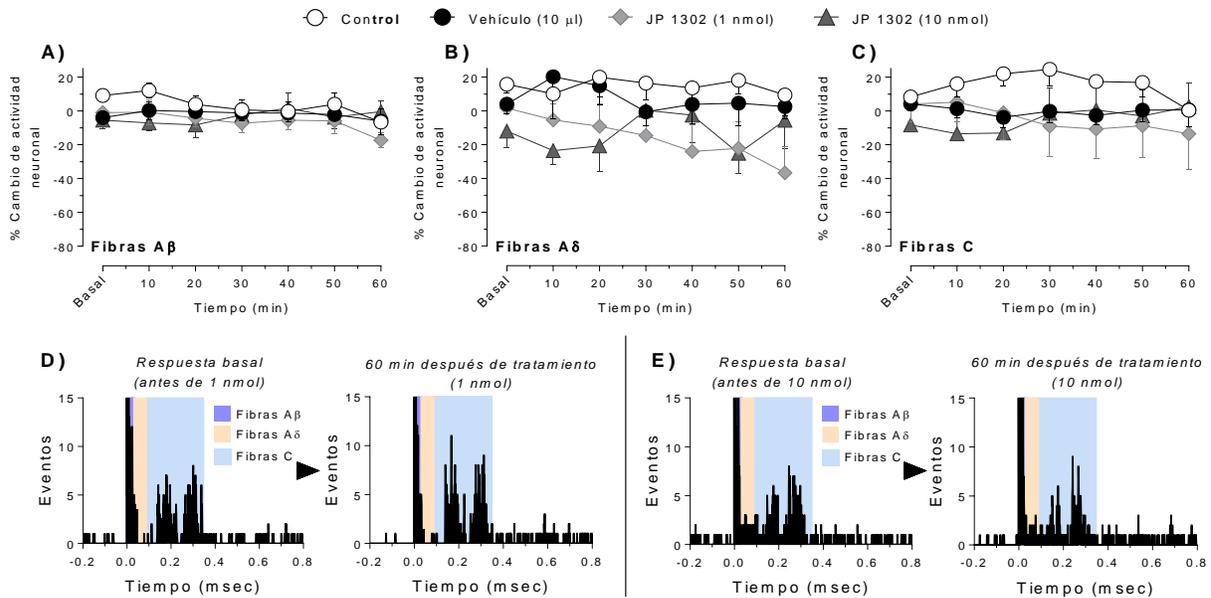


Figura 18. La administración espinal de JP-1302 no inhibe la actividad neuronal de neuronas WDR evocada por la estimulación eléctrica periférica.

Los paneles A, B y C muestran el curso temporal del efecto de la administración espinal de JP-1302 (1 nmol o 10 nmol) sobre la actividad neuronal asociada al disparo de las fibras A β , A δ o C expresada como porcentaje de cambio con respecto a su actividad basal. La administración espinal de JP-1302 (1 nmol y 10 nmol) no afecta la actividad neuronal asociada al disparo de las fibras A β (A), A δ (B) o C (C). Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías ($P < 0.05$ vs grupo control). Los paneles D y E muestran dos ejemplos de histograma peri-estímulo obtenido antes (basal) y después de la administración de 1 nmol (D) o 10 nmol (E) de JP-1302, en el cual no se observa una disminución en la respuesta de los distintos componentes de actividad neuronal. El JP-1302 fue administrada en T=0.

7.2.4. Efecto de la administración espinal de BRL 44408 sobre la inhibición inducida por clonidina en la actividad nociceptiva de neuronas WDR

De manera temporal y como porcentaje global de actividad el pretratamiento con el antagonista BRL 44408 (antagonista α_{2A} -adrenérgico selectivo; 1 nmol) bloquea la antinocicepción inducida por 10 nmol de clonidina (10 nmol). De forma particular, la Fig. 19B y 19C muestra los cursos temporales donde se observa que el efecto de la clonidina sobre la actividad asociada a la activación de las fibras A δ y C es bloqueado por el BRL 44408. Resultados similares se obtienen en las gráficas del efecto global de los distintos tratamientos (Fig. 19E y 19F). La Fig. 19G muestra un

ejemplo de un histograma peri-estímulo donde se ilustra el efecto de la clonidina sobre el disparo neuronal asociado al disparo de fibras A δ y C en una neurona WDR; 60 minutos después de la administración de clonidina se observa una clara disminución de la actividad de las fibras antes mencionadas. Por otra parte, la Fig. 19H muestra que la administración de BRL 44408 bloquea el cambio en la actividad neuronal inducida por clonidina.

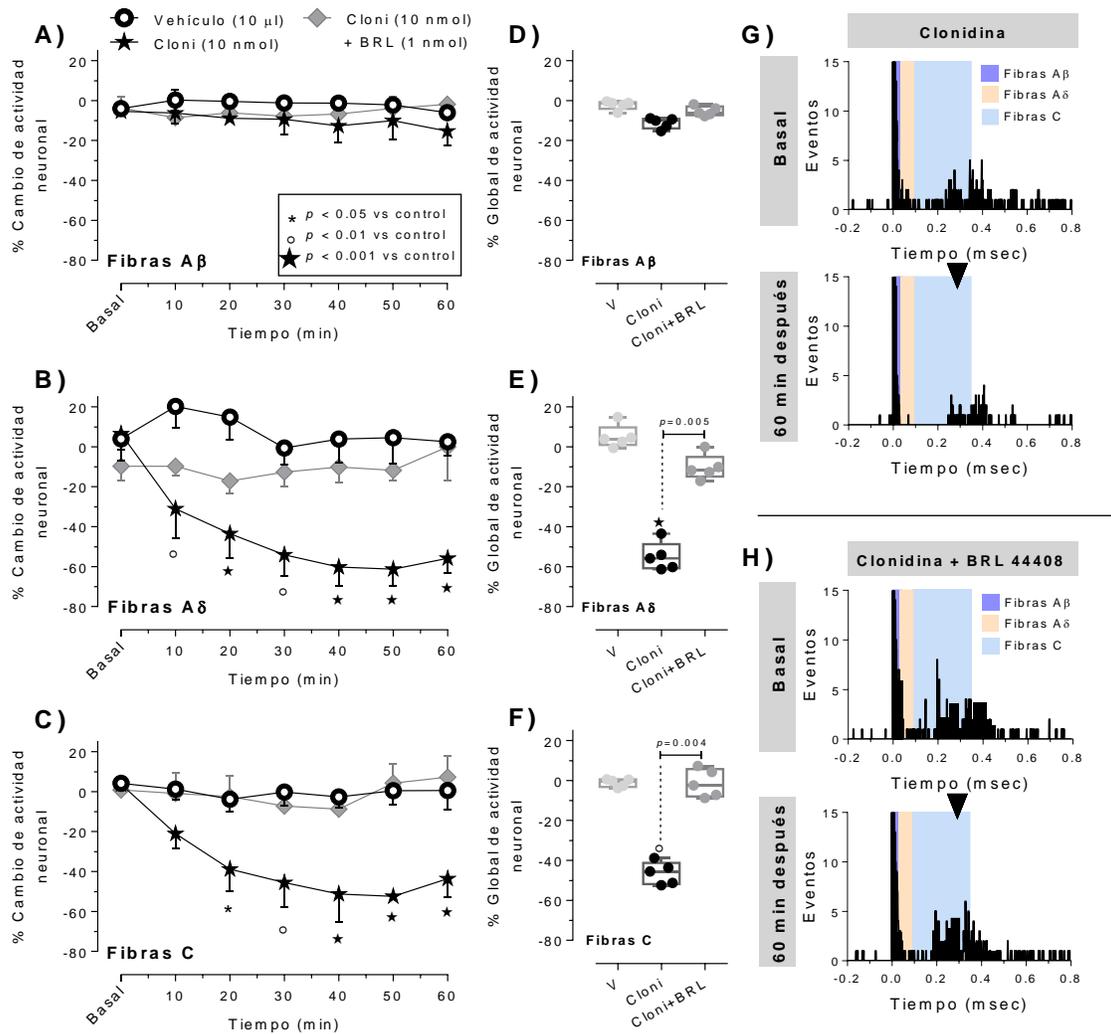


Figura 19. La administración espinal de BRL 44408 bloquea la inhibición de la actividad neuronal inducida por la clonidina. Los paneles **A**, **B** y **C** muestran los cursos temporales del efecto del: (i) vehículo, (ii) clonidina, o (iii) clonidina + BRL44408 sobre la actividad neuronal asociada al disparo de fibras A β , A δ y C expresada como porcentaje de cambio con respecto a su actividad basal. La administración espinal de los distintos tratamientos no ejerce ningún efecto sobre la actividad neuronal asociada a la activación de las fibras A β (**A**); sin embargo, el BRL 44408 bloquea la antinocicepción inducida por la administración de clonidina observada tanto para las fibras A δ y C (**B** y **C**). Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías de medidas repetidas ($P < 0.05$ vs grupo control). Los paneles **D**, **E** y **F** muestra la actividad global neuronal de las fibras A β , A δ y C en respuesta al pretratamiento con BRL 44408 (1 nmol) sobre la inhibición inducida por clonidina; el pretratamiento con BRL 44408 (1 nmol) abole la inhibición de la actividad neuronal inducida por clonidina (10 nmol) en las fibras A δ y C. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía ($P < 0.01$ vs grupo control). Los paneles **G** y **H** muestran dos ejemplos de histograma peri-estímulo obtenido antes (basal) y después del tratamiento con clonidina (**G**) o con BRL 44408 + clonidina (**H**); el efecto de la clonidina observado como una disminución de la actividad asociada al disparo de las fibras A δ y C (**G**) no se observa después del pretratamiento con BRL 44408 (**H**).

8. DISCUSIÓN

8.1. General

El presente trabajo tuvo como objetivo dilucidar, a través de experimentos de nocicepción conductual y electrofisiológicos, el subtipo de receptor α_2 -adrenérgico espinal involucrado en la antinocicepción inducida por clonidina. Es de importancia mencionar que los experimentos electrofisiológicos fueron realizados en neuronas de amplio rango dinámico (WDR) y no directamente sobre fibras aferentes primarias ($A\beta$, $A\delta$ o C). No obstante, dichas neuronas de segundo orden presentan convergencia de las diferentes fibras aferentes primarias, las cuales pueden ser discriminadas con base en su periodo de latencia. Por otra parte, los experimentos de nocicepción conductual fueron realizados por medio de la prueba de la formalina, la cual es clasificada como un modelo de dolor persistente, siendo así un buen método para determinar el potencial efecto analgésico de un compuesto (Bannon y Malmberg, 2007; Wheeler-Aceto y Cowan, 1991).

Con base en los resultados obtenidos y lo anteriormente mencionado, podemos demostrar por medio de la prueba de la formalina, y experimentos electrofisiológicos, que el receptor α_{2A} -adrenérgico se encuentra involucrado en la antinocicepción espinal inducida por clonidina. Por otra parte, por medio de la prueba de la formalina, se observó que el receptor α_{2C} -adrenérgico ejerce un efecto antinociceptivo espinal, el cual es revelado por el JP-1302.

8.2. **La administración espinal de clonidina inhibe la nocicepción conductual y electrofisiológica**

Los resultados en los experimentos conductuales y electrofisiológicos muestran que la clonidina induce antinocicepción (Fig 12 y Fig 17); estos resultados concuerdan con reportes previos (Erne-Brand et al., 1999; Murata et al., 1989; Omote et al., 1991; O'Neill y Haigler, 1985). De forma específica, experimentos conductuales y electrofisiológicos en roedores han demostrado que la activación de receptores espinales α_2 -adrenérgicos por la clonidina ejerce un efecto antinociceptivo (Ackerman et al., 2003; Giovannoni et al., 2009; Nguyen et al., 2017; Pan et al., 1999; Rauck et al., 2015). En concordancia, diversos estudios clínicos demuestran que la administración epidural de clonidina ejerce un efecto analgésico (Brunschwiler et al., 1998; De Negri et al., 1997; Fogarty et al., 1993; Hood et al., 1996).

En este punto es relevante mencionar que aun cuando los receptores α_2 -adrenérgicos han sido subclasificados en al menos tres subtipos, denominados receptores α_{2A} -, α_{2B} - y α_{2C} -adrenérgicos, el papel específico en la modulación espinal de la nocicepción no ha sido explorada en modelos funcionales de dolor (Bernard et al., 1990; McCleary y Leander, 1981; Starke y Altmann, 1973), diversos estudios de biología molecular han demostrado que los diferentes subtipos de receptores α_2 -adrenérgico se expresan en la médula espinal y ganglios de la raíz dorsal. A nivel de la raíz dorsal, el receptor α_{2A} -adrenérgico se expresa principalmente en las fibras aferentes primarias (Aoki et al., 1994; Bücheler et al., 2002; Stone et al., 1998); el subtipo α_{2B} - se localiza en ganglios de la raíz dorsal y en neuronas del asta dorsal de la medula espinal (Nicholson et al., 2005). Por otra parte, el subtipo α_{2C} - se encuentra localizado en fibras descendentes e interneuronas de la medula espinal (Bücheler et al., 2002; Stone et al., 1998). En este contexto, para tratar de discernir el subtipo(s) de receptor α_2 -adrenérgico implicada en la antinocicepción inducida por clonidina, se analizó el efecto antinociceptivo de este fármaco en la prueba de la formalina (experimentos conductuales) y electrofisiológicamente en presencia de antagonistas (competitivos) selectivos, los cuales presentan un perfil de afinidad mayor (Tabla 3) a su subtipo de receptor α_2 -adrenérgico, ya sea; α_{2A} - (BRL 44408; Dwyer et al., 2010; Uhlén et al., 1994; Young et al., 1989), α_{2B} - (imiloxan; Michel et al., 1990; Uhlén et al., 1994; Young et al., 1989) y α_{2C} -adrenérgicos (JP-1302; Sallinen et al., 2007; Tricklebank, 2007).

	BRL 44408	Imiloxan	JP-1302
<i>Receptor adrenérgico</i>	pKi	pKi	pKi
α_{2A} -	8.7	-	5.5
α_{2B} -	6.8	7.3	5.8
α_{2C} -	6.2	-	7.5

Tabla 3. Perfil de afinidad de los antagonistas selectivos a los diferentes receptores α_2 -adrenérgicos.

8.3. Papel de los receptores α_{2A} -adrenérgicos en la antinocicepción inducida por clonidina

El pretratamiento con 1 nmol de BRL 44408 bloqueó la antinocicepción inducida por la clonidina tanto en los experimentos de conductuales y electrofisiológicos (Fig. 14 y 19). Estos datos sugieren que el efecto antinociceptivo de la clonidina es mediado principalmente por la activación de receptores α_{2A} -adrenérgicos espinales. Considerando que diversos estudios muestran la presencia de receptores α_{2A} -adrenérgicos a nivel de aferentes primarias nociceptivas (*i.e.* fibras A δ y C) (Birder y Perl, 1999; Bücheler et al., 2002; Stone et al., 1998), nosotros hipotetizamos que el efecto

de la clonidina sobre este subtipo de receptores podría llevarse a cabo a nivel de las aferentes primarias. Esta suposición se ve reforzada considerando los experimentos electrofisiológicos, donde la clonidina sólo inhibe la actividad neuronal asociada a las fibras A δ y C (Fig. 17 B y C) pero no la actividad de las fibras A β (Fig. 17A). Estos resultados descartan que la clonidina esté inhibiendo neuronas de segundo orden (*i.e.* WDR), y a su vez apoyan nuestra hipótesis sobre una inhibición directa de la clonidina sobre las aferencias primarias.

Por otra parte, los experimentos realizados descartan la participación de los receptores α_{2B} -adrenérgicos considerando que, debido al perfil de afinidad que presenta el imiloxan (antagonista α_{2B} -adrenérgico, Tabla 3), no interactúa con algún otro de los subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos, así mismo, los resultados obtenidos en los estudios conductuales (Fig. 14), son similares a los experimentos, *in vivo*, realizados por Zhang et al., en 2012, los cuales muestran que a concentraciones de 70 nmol el imiloxan no ejerce un efecto sobre la modulación de la nocicepción.

8.4. El bloqueo de receptores α_{2C} -adrenérgicos produce un efecto antinociceptivo en la prueba de la formalina

Un resultado relevante fue el hecho de que la administración intratecal de 1 o 10 nmol de JP-1302 (antagonista α_{2C} -adrenérgico) tuvo un efecto antinociceptivo *per se* en los experimentos de nocicepción conductual (tanto en fase 1 como 2 de la prueba de la formalina; ver Fig. 13), y dicho efecto no fue observado en los experimentos electrofisiológicos (Fig. 18). Estos resultados en principio sugieren que los receptores α_{2C} -adrenérgicos son pro-nociceptivos y que están basalmente activos. Dicho hallazgo no ha sido reportado, pues, aunque en estudios previos se haya utilizado el JP-1302 (0.0226 nmol) en la prueba de la formalina (Yoon et al., 2011), dicho antagonista no presentó efectos *per se*, así mismo, en estudios realizados por Sallinen et al., en 2007, utilizando concentraciones máximas de 100 nmol, sólo reportaron un posible efecto antidepresivo al someter a los animales a la prueba de nado forzado, hipotetizando que dicho efecto podía estar mediado por la activación de receptores α_1 -adrenérgicos. Sin embargo, el grupo de Sallinen no realizó experimentos para evaluar ese posible efecto antidepresivo, ni experimentos conductuales para evaluar nocicepción. Debido a esto, es necesario indicar que el efecto antinociceptivo del JP-1302 puede estar mediado por un mecanismo diferente al cual aquí hipotetizamos. Aun cuando no

existen evidencias claras, podemos inferir que el efecto antinociceptivo del JP-1302 pudiera estar mediado por la participación de interneuronas GABAérgicas (Fig. 15) (Baba et al., 2000, 2000).

Es necesario señalar que diversos reportes asocian la activación de receptores α_2C -adrenérgicos con un mecanismo de retroalimentación negativa; que provoca la inhibición de la liberación de neurotransmisores (Langer, 2015; Langer et al., 1977; Pelayo et al., 1977). Considerando que la noradrenalina promueve la transmisión GABAérgica en la médula espinal (Gassner et al., 2009) a través de la activación postsináptica de receptores α_1 -adrenérgicos en interneuronas GABAérgicas (Millan, 2002; Yoshimura y Furue, 2006), es probable que el bloqueo de receptores α_2C -adrenérgicos presinápticos (Burnett y Gebhart, 1991; Holmberg et al., 2003; Nicholas et al., 1993; Rosin et al., 1993; Scheinin et al., 1994; Talley et al., 1996) promueva la liberación de neurotransmisores, lo cual facilitaría la transmisión GABAérgica (Kawasaki et al., 2003; Zhang y Ordway, 2003) en un modelo de nocicepción, esto tendría como resultado un efecto antinociceptivo.

Dicho mecanismo de inhibición indirecta a nivel espinal, mediado por interneuronas, ha sido propuesto por diversos autores (Millan, 2002; Pertovara, 2006; Pertovaara y Almeida, 2006; Petkó y Antal, 2000). Bajo esta premisa, el bloqueo de receptores α_2C -adrenérgicos eliminaría la retroalimentación negativa (Bücheler et al., 2002; Holmberg et al., 2003; Philipp et al., 2002; Stone et al., 1998; Zhang y Ordway, 2003) y facilita la activación de una neurona postsináptica (en este caso una interneurona GABAérgica, ver Fig. 20) (Baba H et al., 2000, 2000; Chen et al., 2006; Gassner et al., 2009; Rudomin y Schmidt, 1999; Wei-Xiu et al., 2009).

Para probar la hipótesis de la neurotransmisión GABAérgica en el efecto del JP-1302, se realizaron experimentos en presencia de bicuculina (antagonista inespecífico de los receptores GABA_A), la cual no presentó efectos *per se* sobre la nocicepción inducida por la formalina (Fig. 15). Los experimentos conductuales con bicuculina (0.3 nmol / 10 μ l) muestran que la antinocicepción inducida por el JP-1302 es revertida con el pretratamiento de este fármaco. Estos resultados sugieren que existe una participación de los receptores GABA_A en el efecto antinociceptivo del JP-1302 (Fig. 15) lo que refuerza nuestra hipótesis acerca de un posible mecanismo GABAérgico.

Por otra parte, es interesante notar que la antinocicepción inducida por el JP-1302 sólo se observó en los experimentos conductuales mas no en los electrofisiológicos. Esta discrepancia puede ser debida al estímulo nocivo que se está empleando, pues la prueba de la formalina emplea

un estímulo químico generando la conducta bifásica (fase 1 y 2); resultados similares son observados registrando electrofisiológicamente neuronas WDR en la médula espinal (Dickenson y Sullivan, 1987). De forma específica, la fase 1 de corta duración se presenta dentro de los primeros 10 min posteriores a la administración s.c. de formalina, generando nocicepción de tipo agudo por la activación de canales TRPA1 presentes en fibras C con la consecuente despolarización de aferentes nociceptivas C (Fischer et al., 2014; Kerstein et al., 2009). Mientras que en la fase 2 se genera nocicepción inflamatoria posterior a los 20 min de la administración de formalina, dicha inflamación es persistente y puede derivar en una sensibilización central (Fu et al., 2000, 2001; Hunskaar y Hole, 1987; Shibata et al., 1989; Tjølsen et al., 1992). En cambio, bajo el protocolo de experimentación empleado para los experimentos electrofisiológicos, se utilizaron estímulos eléctricos puntuales sobre un campo receptivo periférico específico; dichos estímulos despolarizan la membrana de las fibras aferentes primarias generando potenciales de acción sin generar procesos inflamatorios (Burchiel, 1984; Calvillo et al., 1982; Chapman et al., 1998; Fraser et al., 1992; Urch y Dickenson, 2003).

Estas diferencias metodológicas son de gran importancia, pues se ha demostrado que la administración de formalina s.c. induce un incremento de la actividad noradrenérgica, 4 veces superior a las condiciones basales (Ma et al., 2001; Martins et al., 2013; Sajadeianfard et al., 2005), no siendo el caso mediante la estimulación eléctrica sobre un campo receptivo periférico. Siendo así, dicho incremento en la actividad noradrenérgica inducida por la formalina podría mantenerse de forma constante por la administración de JP-1302, mediante el mecanismo previamente propuesto (Fig. 20), generando así un efecto antinociceptivo en los experimentos conductuales mas no en los electrofisiológicos.

En cualquier caso, estos resultados plantean nuevas preguntas acerca del mecanismo de acción involucrado en el efecto antinociceptivo del JP-1302. ¿Dicho efecto antinociceptivo será observable en un modelo electrofisiológico mediante la administración s.c. de formalina sobre un campo receptivo periférico? y plantea nuevas preguntas sobre su interacción y relación con el sistema GABAérgico u otros sistemas inhibidores de la transmisión nociceptiva.

10. REFERENCIAS

- Ackerman LL, Follett KA, Rosenquist RW. Long-term outcomes during treatment of chronic pain with intrathecal clonidine or clonidine/opioid combinations. *Journal of Pain and Symptom Management* 2003; 26(1): 668-677.
- Adegboye MB, Kolawole IK, Bolaji BO. Dose related effects of oral clonidine pre-medication on bupivacaine spinal anaesthesia. *African Health Sciences* 2018; 18(4): 1283-1291.
- Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research* 2004; 1000:40-56.
- Andersson JL, Lilja A, Hartvig P, Långström B, Gordh T, Handwerker H, Torebjörk E. Somatotopic organization along the central sulcus, for pain localization in humans, as revealed by positron emission tomography. *Experimental Brain Research* 1997; 117(2): 192-199.
- Aoki C, Go CG, Venkatesan C, Kurose H. Perikaryal and synaptic localization of α_{2A} -adrenergic receptor-like immunoreactivity. *Brain research* 1994; 650: 181-204.
- Archer T, Jonsson G, Minor BG, Post C. Noradrenergic-serotonergic interactions and nociception in the rat. *European Journal of Pharmacology* 1986; 120(3): 295-307.
- Baba H, Goldstein PA, Okamoto M, Kohno T, Ataka T, Yoshimura M, Shimoji K. Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 2): effects on somatodendritic sites of GABAergic neurons. *Anesthesiology* 2000; 92(2): 485-492.
- Baba H, Shimoji K, Yoshimura M. Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 1): effects on axon terminal of GABAergic and glycinergic neurons. *Anesthesiology* 2000; 92(2): 473-484.
- Bannister K, Dickenson AH. What do monoamines do in pain modulation? *Current Opinion in Supportive and Palliative Care* 2016; 10(2): 143-148.
- Bannon AW, Malmberg AB. Models of nociception: Hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Current Protocols in Neuroscience* 2007; Chapter8: Unit 8.9.
- Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Progress in Neurobiology* 1995; 46: 575-605.
- Bell A. The neurobiology of acute pain. *The Veterinary Journal* 2018; 237: 55-62.

- Bernard JM, Quintin L, Pinaud M. Clonidine: du traitement de l'hypertension artérielle à l'utilisation en anesthésie I – Principaux effets et mécanismes d'action de la clonidine. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 1990; 9(1): 59-66.
- Berridge CW, Schmeichel BE, España RA. Noradrenergic modulation of wakefulness/arousal. *Sleep Medicine Reviews* 2012; 16(2): 187-197.
- Birder LA, Perl ER. Expression of α_2 -adrenergic receptors in rat primary afferent neurons after peripheral nerve injury or inflammation. *The Journal of Physiology* 1999; 515(Pt2): 533-542.
- Blaxall HS, Murphy TJ, Baker JC, Ray C, Bylund DB. Characterization of the alpha-2-C adrenergic receptor subtype in the opossum kidney and in the OK cell line. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1991; 259: 323-329.
- Bourne S, Machado AG, Nagel SJ. Basic anatomy and physiology of pain pathways. *Neurosurgery Clinics of North America* 2014; 25: 629-638.
- Brenchat A, Nadal X, Romero L, Ovalle S, Muro A, Sánchez-Arroyos R, Portillo-Salido E, Pujol M, Montero A, Codony X, Burgueño J, Zamanillo D, Hamon M, Maldonado R, Vela JM. Pharmacological activation of 5-HT₇ receptors reduces nerve injury-induced mechanical and thermal hypersensitivity. *Pain* 2010; 149: 483-494.
- Brunschwiler M, Van Gessel E, Forster A, Bruce A, Gamulin Z. Comparison of clonidine, morphine or placebo mixed with bupivacaine during continuous spinal anaesthesia. *Canadian Journal of Anaesthesia* 1998; 45(8): 735-740.
- Bücheler MM, Hadamek K, Hein L. Two alpha(2)-adrenergic receptor subtypes, alpha(2A) and alpha(2C), inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. *Neuroscience* 2002; 109(4): 819-826.
- Burchiel KJ. Effects of electrical and mechanical stimulation on two foci of spontaneous activity which develop in primary afferent neurons after peripheral axotomy. *Pain* 1984; 18(3): 249-265.
- Burnett A, Gebhart GF. Characterization of descending modulation of nociception from the A5 cell group. *Brain research* 1991; 546: 271-281.
- Butelman ER, Woods JH. Effects of clonidine, dexmetomidine and xylazine on thermal antinociception in rhesus monkeys. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1993; 264(2): 762-769.

- Bylund DB. Subtypes of α_2 -adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge. *Trends in Pharmacology Sciences* 1988; 9:356-361.
- Bylund DB. Pharmacological characteristics of α_2 adrenergic subtypes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995; 763: 1-7.
- Bylund DB, Ray-Prenger C, Murphy TJ. Alpha-2A and alpha-2B adrenergic receptor subtypes: antagonist binding in tissues and cell lines containing only one subtype. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1988; 245: 600-607.
- Calvillo O, Madrid J, Rudomín P. Presynaptic depolarization of unmyelinated primary afferent fibers in the spinal cord of the cat. *Neuroscience* 1982; 7(6): 1389-1400.
- Carbone E. Noradrenergic Inhibition of presynaptic TRPV1 channels: a new pathway of pain control. *The Journal of Physiology* 2017; 595.8; 2413-2414.
- Casey KL, Minoshima S, Berger KL, Koeppe RA, Morrow TJ, Frey KA. Positron emission tomography analysis of cerebral structures activated specifically by repetitive noxious heat stimuli. *Journal of Neurophysiology* 1994; 71: 802-807.
- Chan AK, Cheung CW, Chong YK. Alpha-2 agonists in acute pain management. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2010; 11(17): 2849-2868.
- Chapman V, Suzuki R, Dickenson AH. Electrophysiological characterization of spinal neuronal response properties in anaesthetized rats after ligation of spinal nerves L5-L6. *Journal of Physiology* 1998; 507.3: 881-894.
- Chen Q, Li DP, Pan HL. Presynaptic alpha1 adrenergic receptors differentially regulate synaptic glutamate and GABA release to hypothalamic presympathetic neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006; 316(2):733-742.
- Cliffer KD, Urca G, Elde RP, Giesler Jr GJ. Studies of peptidergic input to the lateral spinal nucleus. *Brain Research* 1988; 460(2): 356-360.
- Coghill RC, Sang CN, Maisog JM, Iadarola MJ. Pain intensity processing within the human brain: a bilateral, distributed mechanism. *Journal of Neurophysiology* 1999; 82: 1934-1943.
- Das V. An introduction to pain pathways and pain “targets”. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 2015; 131: 1-30.
- Debusson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-174.

- D'Mello, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. *British Journal of Anaesthesia* 2008; 101(1): 8-16.
- De Negri P, Borelli F, Salvatore R, Visconti C, De Vivo P, Mastronardi P. Spinal anesthesia with clonidine and bupivacaine in young humans: interactions and effects on the cardiovascular system. *Minerva Anestesiologica* 1997; 63(4): 119-125.
- Derbyshire SW, Jones AK, Gyulai F, Clark S, Townsend D, Firestone LL. Pain processing during three levels of noxious stimulation produces differential patterns of central activity. *Pain* 1997; 73: 431-445.
- Dickenson AH, Sullivan AF. Subcutaneous formalin-induced in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain* 1987; 30(3): 349-360.
- Dinakar P, Stillman AM. Pathogenesis of Pain. *Seminars in Pediatric Neurology* 2016; 23: 201-208.
- Dwyer JM, Platt BJ, Rizzo SJ, Pulicicchio CM, Wantuch C, Zhang MY, Cummons T, Leveajarao SJ, Smith DL, Shilling AD, Wang J, Butera J, Resnick L, Rozenweig-Lipson S, Schechter LE, Beyer CE. Preclinical characterization of BRL 44408: antidepressant- and analgesic-like activity through selective α_2A -adrenoceptor antagonism. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 2010; 13(3): 1193-1205.
- Eisenach JC, De Kock M, Klimscha W. α_2 -adrenergic agonists for regional anesthesia. A clinical review of clonidine (1984-1995). *Anesthesiology* 1996; 85: 655-674.
- Eisenach JC, DuPen S, Dubois M, Miguel R, Allin D. Epidural clonidine study group. Epidural clonidine analgesia for intractable cancer pain. *Pain* 1995; 61: 391-399.
- Eisenach JC, Hood DD, Curry R. Relative potency of epidural to intrathecal clonidine differs between acute thermal pain and capsaicin-induced allodynia. *Pain* 2000; 84: 57-64.
- Enna SJ, McCarson KE. The role of GABA in the mediation and perception of pain. *Advances in Pharmacology* 2006; 54: 1-27.
- Erne-Brand F, Jirounek P, Drewe J, Hampl K, Scheneider MC. Mechanism of antinociception of clonidine in nonmyelinated nerve fibres. *European Journal of Pharmacology* 1999; 383(1): 1-8.
- Fairbanks CA, Stone LS, Kitto KF, Nguyen HO, Posthumus IJ, Wilcox GL. α_2C -adrenergic receptors mediate spinal analgesia and adrenergic-opioid synergy. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 2002; 300: 282-290.

- Fairbanks CA, Stone LS, Wilcox GL. Pharmacological profiles of alpha 2-adrenergic receptor agonists identified using genetically altered mice and isobolographic analysis. *Pharmacology & Therapeutics* 2009; 123: 224-238.
- Fan QQ, Li L, Wang WT, Yang X, Suo ZW, Hu XD. Activation of α_2 -adrenoceptors inhibited NMDA receptor-mediated nociceptive transmission in spinal dorsal horn of mice with inflammatory pain. *Neuropharmacology* 2014; 77: 185-192.
- Fang X, McMullan S, Lawson SN, Djouhri L. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurons in the rat *in vivo*. *The Journal of Physiology* 2005; 565(Pt 3): 927-943.
- Fernandes EC, Luz LL, Mytakhir O, Lukoyanov NV, Szucs P, Safronov BV. Diverse firing properties and A β -, A δ -, and C-afferent inputs of small local circuit neurons in spinal lamina I. *Pain* 2016; 157: 475-487.
- Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nature Reviews. Neuroscience* 2004; 5(7): 565-567.
- Filos KS, Goudas LC, Patroni O, Polyzou V. Hemodynamic and analgesic profile after intrathecal clonidine in humans. *Anesthesiology* 1994; 81: 591-601.
- Filos KS, Goudas LC, Patroni O, Polyzou V. Intrathecal clonidine as a sole analgesic for pain relief after cesarean section. *Anaesthesiology* 1992; 77: 267-274.
- Fischer M, Carli G, Raboisson P, Reeh P. The interphase of the formalin test. *Pain* 2014; 155(3): 511-521.
- Fogarty DJ, Carabine UA, Milligan KR. Comparison of the analgesic effects of intrathecal clonidine and intrathecal morphine after spinal anaesthesia in patients undergoing total hip replacement. *British Journal of Anaesthesia* 1993; 71: 661-664.
- Fu KY, Light AR, Maixner W. Long-lasting inflammation and long-term hyperalgesia after subcutaneous formalin injection into the rat hindpaw. *The Journal of Pain* 2001; 2(1): 2-11.
- Fu KY, Light AR, Maixner W. Relationship between nociceptor activity, peripheral edema, spinal microglia activation and long-term hyperalgesia induced by formalin. *Neuroscience* 2000; 101(4): 1127-1135.
- Fraser HM, Chapman V, Dickenson AH. Spinal local anaesthetic actions on afferent evoked responses and wind-up of nociceptive neurons in the rat spinal cord: combination with morphine produces marked potentiation of antinociception. *Pain* 1992; 49(1): 33-41.

- Garland EL. Pain processing in the human nervous system: A selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. *Primary Care* 2012; 39(3): 561-571.
- Gassner M, Ruscheweyh R, Sandkühler J. Direct excitation of spinal GABAergic interneurons by noradrenaline. *Pain* 2009; 145: 204-210.
- Gebhart GF. Descending modulation of pain. *Neuroscience and Biobehavioral reviews* 2004; 27(8): 729-737.
- Giovannitti SA, Thoms SM, Crawford JJ. Alpha-2 adrenergic receptor agonists: a review of current clinical applications. *Anesthesia Progress* 2015; 62: 31-38.
- Giovannoni MP, Ghelardini C, Vergelli C, Dal-Piaz V. α_2 -agonists as analgesic agents. *Medical Research Reviews* 2009; 29(2):339-368.
- Gomes JA, Li X, Pan HL, Eisenach JC. Intrathecal adenosine interacts with a spinal noradrenergic system to produce antinociception in nerve-injured rats. *Anesthesiology* 1999; 91(4): 1072-1079.
- Gyires K, Zádori ZS, Török T, Mátyus P. α_2 -Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions. *Neurochemistry International* 2009; 55: 447-453.
- Holmberg M, Fagerholm V, Scheinin M. Regional distribution of alpha(2C)-adrenoceptor in brain and spinal cord of control mice and transgenic mice overexpressing the alpha(2C)-subtype: an autoradiographic study with [(3)H]RX821002 and [(3)H]rauwolscine. *Neuroscience* 2003; 117(4): 875-898.
- Hood DD, Mallak KA, Eisenach JC, Tong C. Interaction between intrathecal neostigmine and epidural clonidine in human volunteers. *Anesthesiology* 1996; 85(8): 315-325.
- Hori K, Hoshino M. GABAergic neuron specification in the spinal cord, the cerebellum, and the cochlear nucleus. *Neural Plasticity* 2012; Article ID 921732: 11.
- Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987; 30(1): 103-114.
- Iadarola MJ, Berman KF, Zeffiro TA, Byas-Smith MG, Gracely RH, Max MB, Bennett GJ. Neural activation during acute capsaicin-evoked pain and allodynia assessed with PET. *Brain* 1998; 121(5): 931-947.
- Ito K, Sugimoto N. The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression. *Journal of Neuroendocrinology* 2010; 22: 355-361.

- Kawasaki Y, Kumamoto E, Furue H, Yoshimiura M. α_2 -Adrenoceptor-mediated presynaptic inhibition of primary afferent glutamatergic transmission in rat substantia gelatinosa neurons. *Anesthesiology* 2003; 98(3): 682-689.
- Kerstein PC, del Camino D, Moran MM, Stucky CL. Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors. *Molecular Pain* 2009; 5: 19
- Khodayar MJ, Shafaghi B, Naderi N, Zarrindast MR. Antinociceptive effect of spinally administered cannabinergic and α_2 -adrenoceptor drugs on the formalin test in rat: possible interactions. *Journal of Psychopharmacology* 2006; 20: 67-74.
- Kukkonen JP, Jansson CC, Akerman KEO. Agonist trafficking of $G_{i/o}$ -mediated α_{2A} -adrenoceptor responses in HEL 92.1.7 cells. *British Journal of Pharmacology* 2001; 132: 1477-1484.
- Kuraishi Y, Hirota N, Sato Y, Kaneko S, Satoh M, Takagi H. Noradrenergic inhibition of the release of substance P from the primary afferents in the rabbit spinal dorsal horn. *Brain Research* 1985; 359(1): 177-182.
- Langer SZ. α_2 -Adrenoceptors in the treatment of major neuropsychiatric disorders. *Trends in Pharmacological Sciences* 2015; 36(4): 196-202.
- Langer SZ, Adler-Graschinsky E, Giorgio O. Physiological significance of α -adrenoceptor-mediated negative feedback mechanism regulating noradrenaline release during nerve stimulation. *Nature* 1977; 265(5595): 648-650.
- Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurons in the rat. *Pain* 1979; 6(3): 283-304.
- Levy R, Deer TR, Henderson J. Intracranial neurostimulation for pain control: a review. *Pain Physician*. 2010; 13(2):157–65.
- Lin H, Heo BH, Kim WM, Kim YC, Yoon MH. Antiallodynic effect of tianeptine via modulation of the 5-HT₇ receptor of GABAergic interneurons in the spinal cord of neuropathic rats. *Neuroscience Letters* 2015; 598: 91-95.
- Llorca-Torrallba M, Borges G, Nieto F, Mico JA, Berrocoso E. Noradrenergic locus coeruleus pathways in pain modulation. *Neuroscience* 2016; 338: 93-113.
- Lloyd DR, Murphy AZ. The neuroanatomy of sexual dimorphism in opioid analgesia. *Experimental Neurology* 2014; 259: 57-63.

- Lumley MA, Cohen JL, Borszcz GS, Cano A, Radcliffe AM, Porter LS, Schubiner H, Keefe FJ. Pain and emotion: A biopsychosocial review of recent research. *Journal of Clinical Psychology* 2011; 67(9): 942-968.
- Lumkin EA, Caterina MJ. Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature* 2007; 445: 858-865.
- Ma J, Qiao JT, Dafny N. Opiate-like substances mediate norepinephrine-induced but not serotonin-induced antinociception at spinal level. Reevaluation by an electrophysiological model of formalin test in rats. *Life Sciences* 2001; 69: 969-976.
- Malmberg AB, Yaksh TL. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1992; 263: 136-46.
- Manzano-García A, González-Hernández A, Tello-García IA, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M. The role of peripheral vasopressin 1^a and oxytocin receptors on the subcutaneous vasopressin antinociceptive effects. *European Journal of Pain* 2018; 22(3): 511-526.
- Martins I, de Vries MG, Teixeira-Pinto A, Fadel J, Wilson SP, Westerink BHC, Tavares I. Noradrenaline increases pain facilitation from the brain during inflammatory pain. *Neuropharmacology* 2013; 71: 299-307.
- McCarson KE, Enna SJ. GABA pharmacology: the search for analgesics. *Neurochemical Research* 2014; 39(10): 1948-1963.
- McCleary PE, Leander JD. Clonidine analgesia and suppression of operant responding: Dissociation of mechanism. *European Journal of Pharmacology* 1981; 69(1): 63-69.
- Mendell LM. Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Experimental Neurobiology* 1966; 16(3): 316-332.
- Michel AD, Loury DN, Whiting RL. Assessment of imiloxan as a selective alpha 2B adrenoceptor antagonist. *British Journal of Pharmacology* 1990; 99(3): 560-564.
- Millan MJ. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology* 2002; 66: 355-474.
- Minor BG, Danysz W, Post C, Jonsson G, Sundström E, Archer T. Noradrenergic and serotonergic involvement in brief shock-induced analgesia in rats. *Behavioral Neuroscience* 1988; 102(6): 915-924.
- Muñoz-Islas E, Vidal-Cantú GC, Bravo-Hernández M, Cervantes-Durán C, Quiñonez-Bastidas GN, Pinerda-Farias JB, Barragán-Iglesias P, Granados-Soto V. Spinal 5-HT_{5A} receptors

- mediate 5-HT-induced antinociception in several pain models in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2014; 120: 25-32.
- Murata K, Nakagawa I, Kumeta Y, Kitahata LM, Collins JG. Intrathecal clonidine suppresses noxiously evoked activity of spinal wide dynamic range neurons in cats. *Anesthesia and Analgesia* 1989; 69(2): 185-191.
- Nguyen V, Tiemann D, Park E, Salehi A. Alpha-2 agonists. *Anesthesiology Clinics* 2017; 35: 233-245.
- Nicholas AP, Pieribone V, Hökfelt T. Distribution of mRNAs for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology* 1993; 328(4): 575-594.
- Nicholson R, Dixon AK, Spanswick D, Lee K. Noradrenergic receptor mRNA expression in adult rat superficial dorsal horn and dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience Letters* 2005; 380: 316-321.
- Nickel B, Engel J, Szelenyi I. Possible involvement of noradrenergic descending pain-modulating pathways in the mode of antinociceptive action of flupirtine, a novel non-opioid analgesic. *Agents and Actions* 1988; 23(1-2): 112-116.
- Omote K, Kitahata LM, Collins JG, Nakatani K, Nakagawa I. Interaction between opiate subtype and alpha-2 adrenergic agonists in suppression of noxiously evoked activity of WDR neurons in the spinal dorsal horn. *Anesthesiology* 1991; 74(4): 737-743.
- O'Neill TP, Haigler HJ. Effects of clonidine on neuronal firing evoked by a noxious stimulus. *Brain research* 1985; 327(1-2): 97-103.
- Ossipov MH. The perception and endogenous modulation of pain. *Scientifica (Cairo)* 2012; 2012: 561761.
- Ossipov MH, Morimura K, Porreca F. Descending pain modulation and chronification of pain. *Current Opinion Support and Palliative Care* 2014; 8(2): 143-151.
- Pan HL, Chen SR, Eisenach JC. Intrathecal clonidine alleviates allodynia in neuropathic rats: Interaction with spinal muscarinic and nicotinic receptors. *Anesthesiology* 1999; 90(2):509-514.
- Paqueron X, Conklin D, Eisenach JC. Plasticity in action of intrathecal clonidine to mechanical but not thermal nociception after peripheral nerve injury. *Anesthesiology* 2003; 99: 199-204.

- Pelayo F, Dubocovich ML, Langer SZ. Regulation of noradrenaline release in the rat pineal through a negative feedback mechanism mediated by presynaptic α -adrenoceptors. *European Journal of Pharmacology* 1977; 45(3): 317-318.
- Pertovaara A, Almeida A. Descending inhibitory systems. *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier 2006; 81 (3rd series. Vol. 3): 179-192.
- Pertovaara A, Wei H. Attenuation of ascending nociceptive signals to the rostroventromedial medulla induced by a novel α -adrenoceptor agonist, MPV-2426, following intrathecal application in neuropathic rats. *Anesthesiology* 2000; 92: 1082-1092.
- Pertovaara A. Antinociceptive properties of fadolmidine (MPV-2426), a novel α_2 -adrenoceptor agonist. *CNS Drug Reviews* 2004; 10: 117-126.
- Pertovaara A. Noradrenergic pain modulation. *Progress in Neurobiology* 2006;80:53-83.
- Petkó M, Antal M. Propriospinal afferent and efferent connections of the lateral and medial areas of the dorsal horn (laminae I-IV) in the rat lumbar spinal cord. *Journal of Comparative Neurology* 2000; 422(2): 312-325.
- Philipp M, Brede M, Hein L. Physiological significance of alpha(2)-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 2002; 283(3): R287-295.
- Pihlavisto M, Sjöholm B, Scheinin M, Wurster S. Modulation of agonist binding to recombinant human α_2 -adrenoceptors by sodium ions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1448: 135-146.
- Pinard A, Seddik R, Bettler B. GABAB receptors: physiological functions and mechanisms of diversity. *Advances in Pharmacology* 2010; 58: 231-255.
- Ramana-Reddy SV, Yaksh TL. Spinal noradrenergic terminal system mediates antinociception. *Brain Research* 1980; 189(2): 391-401.
- Rauck RL, North J, Eisenach JC. Intrathecal clonidine and adenosine: effects on pain and sensory processing in patients with chronic regional pain syndrome. *Pain* 2015; 156(1): 88-95.
- Reigle TG. Increased brain norepinephrine metabolism correlated with analgesia produced by the periaqueductal gray injection of opiates. *Brain Research* 1985; 338(1): 155-159.
- Rosin DL, Zeng D, Stornetta RL, Norton FR, Riley T, Okusa MD, Guyenet PG, Lynch KR. Immunohistochemical localization of α_{2A} -adrenergic receptors in catecholaminergic and other brainstem neurons in the rat. *Neuroscience* 1993; 56(1): 139-155.

- Rudomin P, Schmidt RF. Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Experimental Brain Research* 1999; 129(1): 1-37.
- Ruffolo RR, Hieble JP. α -Adrenoceptors. *Pharmacology & Therapeutics* 1994; 61(1): 1-64.
- Ruffolo RR, Nichols AJ, Stadel JM, Hieble JP. Pharmacologic and therapeutic applications of α_2 -adrenoceptor subtype. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1993; 33: 243-279.
- Sajadeianfard J, Khatami S, Semnanian S, Naghdi N, Jorjani M. In vivo measurement of noradrenaline in the locus coeruleus of rats during the formalin test: A microdialysis study. *European Journal of Pharmacology* 2005; 512(2-3): 153-156.
- Sallinen J, Höglund I, Engström M, Lehtimäki J, Virtanen R, Sirviö J, Wurster S, Savola JM, Haapalinna A. Pharmacological characterization and CNS effects of a novel highly selective α_2C -adrenoceptor antagonist JP-1302. *British Journal of Pharmacology* 2007; 150(4): 391-402.
- Sandkühler J, Gebhart GF. Relative contributions of the nucleus raphe magnus adjacent medullary reticular formation to the inhibition by stimulation in the periaqueductal gray of the spinal nociceptive reflex in the pentobarbital-anesthetized rat. *Brain Research* 1984; 305: 77-87.
- Scheinin M, Lomasney JW, Hayden-Hixson DM, Schambra UB, Caron MG, Lefkowitz RJ, Fremeau RT Jr. Distribution of α_2 -adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. *Brain Research. Molecular Brain Research* 1994; 21(1-2): 133-149.
- Schoo SM, Bobeck EN, Morgan MM. Enhanced antinociception with repeated microinjections of apomorphine into the periaqueductal gray in male and female rats. *Behavioral Pharmacology* 2018; 29: 234-240.
- Shaikh SI, Revur LR, Mallappa M. Comparison of epidural clonidine and dexmetomidine for perioperative analgesia in combined spinal epidural anesthesia with intrathecal levobupivacaine: A randomized controlled double-blind study. *Anesthesia Essays and Researches* 2017; 11(2): 503-507.
- Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989; 358: 347-352.
- Smith ESJ. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. *Journal of Neurology* 2018; 265(2): 231-238.

- Smith H, Elliot J. Alpha(2) receptors and agonists in pain management. *Current Opinion in Anaesthesiology* 2001; 14(5): 513-518.
- Sommer C. (2009). Serotonin in Pain and Pain control. Müller C, Jacobs B (Eds.). *Handbook of Behavioral Neurobiology of Serotonin* (pp. 457-471). London, UK: ELSEVIER.
- Starke K, Altmann KP. Inhibition of adrenergic neurotransmission by clonidine: An action on prejunctional α -receptors. *Neuropharmacology* 1973; 12(4): 339-347.
- Stone LS, Broberger C, Vulchanova L, Wilcox GL, Hökfelt T, Riedl MS, Elde R. Differential distribution of α_{2A} y α_{2C} adrenergic receptor immunoreactivity in the rat spinal cord. *The Journal of Neuroscience* 1998; 18(15): 5928-5937.
- Stone LS, Kitto KF, Eisenach JC, Fairbanks CA, Wilcox GL. ST91 [2-(2,6-Diethylphenylamino) - 2-imidazoline Hydrochloride]-mediated spinal antinociception and synergy with opioids persists in the absence of functional α_{2A} - or α_{2C} -adrenergic receptors. *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 2007; 323: 899–906.
- Sugiura Y, Terui N, Hosoya Y. Difference in distribution of central terminals between visceral and somatic unmyelinated (C) primary afferent fibers. *Journal of Neurophysiology* 1989; 62(2): 834-840.
- Sullivan GM, Coplan JD, Kent JM, Gorman JM. The noradrenergic system in pathological anxiety: A focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. *Biological Psychiatry* 1999; 46(9): 1205-1218.
- Summers RJ, McMartin LR. Adrenoceptors and their second messenger systems. *Journal of Neurochemistry* 1993; 60: 10-23.
- Suzuki R, Morcuende S, Webber M, Hunt SP, Dickenson AH. Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways. *Nature Neuroscience* 2002; 5(12): 1319-1326.
- Svokos K, Nalwalk JW, Leurs R, Menge WMPB, Timmerman H, Hough LB. A role for spinal, but not supraspinal, α_2 -adrenergic receptors in the actions of improgan, a powerful, non-opioid analgesic. *Brain Research* 2001; 923: 12-19.
- Talbot JD, Marret S, Evans AC, Meyer E, >Bushnell MC, Duncan GH. Multiple representations of pain human cerebral cortex. *Science* 1991; 251: 1355-1358.

- Talley EM, Rosin DL, Lee A, Guyenet PG, Lynch KR. Distribution of α_{2A} -adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology* 1996; 327(1): 111-134.
- Tarkka IM, Treede RD. Equivalent electrical source analysis of pain-related somatosensory evoked potential elicited by a CO₂ laser. *Journal of Clinical Neurophysiology* 1993; 10: 513-519.
- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51(1): 5-17.
- Tobaldini G, Reis RA, Sardi NF, Lazzarini MK, Tomim DH, Lima MMS, Fischer L. Dopaminergic mechanisms in periaqueductal gray-mediated antinociception. *Behavioral Pharmacology* 2018; 29: 225-233.
- Treviño DL, Coulter JD, Willis WD. Location of cells of origin of spinothalamic tract in lumbar enlargement of monkey. *Journal of Neurophysiology* 1973; 36: 750-761.
- Tricklebank MD. JP-1302: a new tool to shed light on the roles of α_{2C} -adrenoceptors in brain. *British Journal of Pharmacology* 2007; 150(4): 381-382.
- Uhlén S, Porter AC, Neubig RR. The novel α -2 adrenergic radioligand [³H]-MK912 is α_{2C} selective among human α -2A, α -2B and α -2C adrenoceptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1994; 271 (3): 1558-1565.
- Uhlén S, Wikberg JES. Delineation of three pharmacological subtypes of α_{2} -adrenoceptor in the rat kidney. *British Journal of Pharmacology* 1991; 104: 657-664.
- Urch CE, Dickenson AH. In vivo single unit extracellular recordings from spinal cord neurons of rats. *Brain research. Brain research protocols* 2003; 12(1): 26-34.
- Vanegas H, Schaible HG. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Research Reviews* 2004; 46: 295-309.
- Viguier F, Michot B, Hamon M, Bourgoin S. Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms –Implications of 5-HT₇ and other 5-HT receptor types. *European Journal of Pharmacology* 2013; 716: 8-16.
- Wagman IH, Price DD. Responses of dorsal horn cells of *M. mulatta* to cutaneous and sural nerve A and C fiber stimuli. *Journal of Neurophysiology* 1969; 32(6): 803-817.
- Wei-Xiu Y, Shao-Rui C, Hong C, Hui-Lin P. Stimulation of α_{1} -adrenoceptors reduces glutamatergic synaptic input from primary afferents through GABA_A receptors and T-type Ca²⁺ channels. *Neuroscience* 2009; 158(4): 1616-1624.

- Wheeler-Aceto H, Cowan A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology* 1991; 104(1): 35-44.
- Williams ACC, Craig K. Updating the definition of pain. *Pain* 2016; 157: 2420-2423.
- Willis WD. Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 1985; 308(1136):253-270.
- Willis WD, Kenshalo DR, Leonard RB. The cells of the origin of the primate spinothalamic tract. *Journal of Comparative Neurology* 1979; 188: 543-574.
- Woller SA, Eddinger KA, Corr M, Yaksh TL. An overview of pathways encoding nociception. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2017; 35 (Suppl. 107): S40-S46.
- Yaksh TL, Rudy TA. Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. *Science* 1976; 192: 1357-1358.
- Yoon MH, Huang LJ, Choi JI, Lee HG, Kim WM, Kim CM. Antinociceptive effect of intrathecal ginsenosides through α_2 -adrenoceptors in the formalin test of rats. *British Journal of Anaesthesia* 2011; 106(3): 371-379.
- Yoshimura M, Furue H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *Journal of Pharmacology Sciences* 2006; 101: 107-117.
- Young P, Berge J, Chapman H, Cawthorne MA. Novel α_2 -adrenoceptor antagonists show selectivity for α_2A - and α_2B -adrenoceptor subtypes. *European Journal of Pharmacology* 1989; 168(3): 381-386.
- Zhang W, Ordway GA. The α_2C -adrenoceptor modulates GABA release in mouse striatum. *Brain research. Molecular brain research* 2003; 112(1-2):24-32.
- Zhang Y, Zhang RX, Zhang M, Shen XY, Li A, Xin J, Ren K, Berman BM, Tan M, Lao L. Electroacupuncture inhibition of hyperalgesia in an inflammatory pain rat model: involvement of distinct spinal serotonin and norepinephrine receptor subtypes. *British Journal of Anaesthesia* 2012; 109(2): 245-252.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16: 109-110.