



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN



**Participación de los receptores 5-HT₃ en el desarrollo y
mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias inducidas
con formalina**

TESIS QUE PRESENTA

MVZ. Esp. MARIANA BRAVO HERNÁNDEZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA**

DIRECTORES DE TESIS:

D en C. PEDRO LÓPEZ SÁNCHEZ

D en C. VINICIO GRANADOS SOTO

MÉXICO, D.F.

JULIO 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 15:30 horas del día 25 del mes de Julio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis titulada:

"Participación de los receptores 5-HT₃ en el desarrollo y mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias inducidas con formalina"

Presentada por la alumna:

Bravo
Apellido paterno

Hernández
Apellido materno

Mariana
Nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	7	0	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Farmacología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Pedro López Sánchez

Dr. Vinicio Granados Soto

Dr. Ofir Picazo Picazo

Dra. Nayeli Paez Martinez

Dr. Francisco Javier Flores Murrieta

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F., el día 25 del mes de junio del año 2011, el que suscribe **Mariana Bravo Hernández** alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Farmacología con número de registro A100704, adscrita a **la Escuela Superior de Medicina**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Pedro López Sánchez** y cede los derechos del trabajo intitulado **“Participación de los receptores 5-HT₃ en el desarrollo y mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias inducidas con formalina”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección marianabh26@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Mariana Bravo Hernández

Nombre y firma

La parte experimental de esta tesis se realizó en el laboratorio de Farmacología Molecular del Centro de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional y en el laborarotio 12 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados sede sur, bajo la dirección de los Doctores Pedro López Sánchez y Vinicio Granados Soto, respectivamente.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestría N° 45055 y los proyectos 455-09 y 20110124 otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los Doctores Pedro López Sánchez y Vinicio Granados Soto por permitirme ser su alumna y por el todo apoyo brindado durante la realización del presente trabajo de investigación. Gracias por creer en mí.

A los Doctores Nayeli Paez Martinez, Ofir Picazo Picazo y Francisco Javier Flores Murrieta por aceptar ser mis sinodales, por sus comentarios que enriquecieron el presente trabajo y por toda la confianza que desde el principio me otorgaron.

A mis compañeros y amigos del CINVESTAV Claudia, Beatriz, Paulino y Jorge por su orientación y apoyo incondicional durante la realización del presente trabajo.

A mis compañeros y amigos de la ESM Jazmin, Jessica, Norma, Elia y Said por sus palabras de aliento y por todos los momentos que compartimos en esta etapa de nuestras vidas.

Al Lic. Hector Vazquez Espinosa por su apoyo en la búsqueda de material bibliográfico.

AL señor Ramón Martínez y todo el personal del Bioterio del CINVESTAV sede sur, por su amabilidad y por facilitarme las ratas de laboratorio con las que se llevo a cabo el presente trabajo de investigación.

A la secretaria de la Maestría en Ciencias en Farmacología Ruth Licea por su apoyo y paciencia en todos los trámites administrativos necesarios durante mi estancia en la Escuela Superior de Medicina.

DEDICATORIAS

A mis padres Raul Bravo y Olivia Hernández por su amor incondicional, por su impecable ejemplo y porque por ustedes soy lo que hasta el día de hoy. Los amo.

A mi hermana Paula Bravo por su apoyo y cariño, por ser mi confidente y amiga. Te quiero.

A mis abuelas y a toda mi familia en general, porque siempre han creído en mí.

A Noe Govea por estar a mi lado siempre.

A todas aquellas personas importantes en mi vida que me brindaron sus consejos y cariño y que por cuestiones de espacio no puedo nombrar una por una.

A los animales de laboratorio que sacrificaron su vida para mejorar la nuestra.

GRACIAS

CONTENIDO

FIGURAS.....	vi
TABLAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
 I. INTRODUCCIÓN.....	 1
A. DOLOR.....	1
1. DEFINICIONES.....	1
2. CLASIFICACIÓN.....	3
3. NOCICEPCIÓN.....	4
B. DOLOR INFLAMATORIO.....	8
1. SENSIBILIZACIÓN.....	9
a) sensibilización periférica.....	10
b) sensibilización central.....	14
2. MODULACIÓN DESCENDENTE.....	18
3. MODELOS DE DOLOR INFLAMATORIO.....	24
a) prueba de formalina.....	24
C. SEROTONINA.....	25
1. HISTORIA.....	25
2. LOCALIZACIÓN.....	26
3. ESTRUCTURA, SÍNTESIS Y METABOLISMO.....	27
4. FUNCIÓN.....	28
5. SEROTONINA Y DOLOR.....	31
6. RECEPTORES DE SEROTONINA.....	33



a) Clasificación.....	35
(1) Acoplados a proteína $G_{i/o}$	36
(2) Acoplados a proteína $G_{q/11}$	41
(3) Acoplados a proteína G_s	42
(4) Receptor 5-HT ₃ , un canal iónico.....	45
7. DOLOR Y RECEPTORES 5-HT ₃	49
a) Receptores 5-HT ₃ en la periferia.....	50
b) Receptores 5-HT ₃ en la medula espinal.....	51
c) Expresión del ARNm de los receptores 5-HT ₃	53
8. FARMACOLOGÍA DEL RECEPTOR 5-HT ₃	55
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	59
III. JUSTIFICACIÓN.....	59
IV. HIPÓTESIS.....	60
V. OBJETIVO GENERAL.....	60
VI. OBJETIVOS PARTICULARES.....	60
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
A. MATERIAL BIOLÓGICO.....	61
B. PREPARACIÓN DE FORMALINA.....	61
C. PREPARACIÓN DE LA CÁNULA.....	62
D. FÁRMACOS.....	62
E. INDUCCIÓN DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS.....	63
F. EVALUACIÓN DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS.....	63
G. CIRUGÍA ESPINAL.....	64
H. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	65
1. CONTROLES.....	65



2.	PRE-TRATAMIENTO.....	66
a)	Agonistas de los receptores 5-HT ₃	66
b)	Antagonista de los receptores 5-HT ₃	66
3.	POST-TRATAMIENTO.....	67
a)	Antagonistas de los receptores 5-HT ₃	67
b)	Agonistas de los receptores 5-HT ₃	67
4.	TRATAMIENTO CONTRALATERAL.....	68
5.	CO-ADMINISTRACIÓN.....	68
6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	69
VIII.	RESULTADOS.....	70
A.	ESTANDARIZACIÓN DEL DESARROLLO DE LA HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS DE LARGA DURACIÓN INDUCIDAS POR FORMALINA.....	70
B.	EVALUACIÓN PERIFÉRICA DE LOS RECEPTORES 5-HT ₃	71
1.	PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT ₃ EN EL DESARROLLO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS.....	71
a)	Efecto de los agonistas.....	71
b)	Efecto del antagonista.....	74
c)	Efecto del antagonista sobre el efecto pronociceptivo de los agonistas de los receptores 5-HT ₃	74
2.	PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT ₃ EN EL MANTENIMIENTO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS..	77
a)	Efecto del antagonista.....	77
b)	Efecto del agonista.....	78
C.	EVALUACIÓN ESPINAL DE LOS RECEPTORES 5-HT ₃	79
1.	PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT ₃ EN EL DESARROLLO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS.....	79
a)	Efecto del agonista.....	79



b) Efecto del antagonista.....	79
c) Efecto del antagonista sobre el efecto pronociceptivo de los agonistas de los receptores 5-HT ₃	81
2. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT ₃ EN EL MANTENIMIENTO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS.....	82
a) Efecto del antagonista.....	82
IX. DISCUSIÓN.....	83
A. LA FORMALINA INDUCE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS..	83
B. RECEPTORES PERIFÉRICOS.....	87
1. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT ₃ PERIFÉRICOS EN EL DESARROLLO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS INDUCIDAS POR FORMALINA.....	87
a) EFECTO DE LOS AGONISTAS.....	88
(1) Efecto de la serotonina.....	88
(2) Efecto de la m-clorofenilbiguanida.....	89
b) EFECTO DEL ANTAGONISTA.....	91
(1) Efecto del ondansetrón.....	91
c) EFECTO DEL ANTAGONISTA SOBRE EL EFECTO PRONOCICEPTIVO DE LOS AGONISTAS DEL RECEPTOR 5-HT ₃ ..	92
2. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT ₃ PERIFÉRICOS EN EL MANTENIMIENTO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS INDUCIDAS POR FORMALINA.....	94
a) EFECTO DEL ONDANSETRÓN Y LA mCPBG.....	94
C. RECEPTORES ESPINALES.....	97
1. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT ₃ ESPINALES EN EL DESARROLLO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS INDUCIDAS POR FORMALINA.....	97
a) EFECTO DE LA mCPBG.....	97
b) EFECTO DEL ONDANSETRÓN.....	99

c) EFECTO DEL ONDANSETRON SOBRE EL EFECTO PRONOCICEPTIVO DE LA MCPBG EN LA MÉDULA ESPINAL.....	100
2. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT ₃ ESPINALES EN EL MANTENIMIENTO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS INDUCIDAS POR FORMALINA.....	101
a) EFECTO DEL ONDANSETRON.....	101
X. CONCLUSIONES.....	103
XI. PERSPECTIVAS.....	105
XII. REFERENCIAS.....	106

FIGURAS

Figura 1	Clasificación del dolor.....	5
Figura 2	Distintos nociceptores detectan distintos tipos de dolor.....	7
Figura 3	Circuitos supraespinales involucrados en la percepción del dolor.....	8
Figura 4	Modelo de alodinia e hiperalgesia basado en la interacción presináptica.....	11
Figura 5	Sensibilización periférica.....	13
Figura 6	Transmisión de la nocicepción de la periferia a la médula espinal.....	15
Figura 7	Sensibilización central.....	18
Figura 8	Activación de la microglía en la médula espinal.....	20
Figura 9	Circuito modulador del dolor.....	22
Figura 10	Estructura química de la serotonina.....	27
Figura 11	Biosíntesis y metabolismo de la serotonina.....	29
Figura 12	Vías de señalización de los receptores de 5-HT acoplados a proteína G....	36
Figura 13	Estructura tridimensional y sitios de unión del ligando del receptor 5-HT ₃	47
Figura 14	Cascadas de señalización del receptor 5-HT ₃	48
Figura 15	Diseño experimental para el curso temporal de los grupos control.....	66
Figura 16	Diseño experimental de los pre-tratamientos.....	67
Figura 17	Diseño experimental de los post-tratamientos.....	68
Figura 18	Diseño experimental de la coadministración.....	69
Figura 19	Efecto de la concentración de formalina en la conducta nociceptiva aguda y de largo plazo.....	72

Figura 20	Efecto de los agonistas de los receptores 5-HT ₃ periféricos sobre el desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración inducidas por formalina al 0.5%.....	73
Figura 21	Efecto del antagonista de los receptores 5-HT ₃ periféricos sobre el desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración inducidas por formalina al 1%.....	75
Figura 22	Efecto del antagonista sobre el efecto pronociceptivo de los agonistas de los receptores 5-HT ₃ periféricos.....	76
Figura 23	Efecto del antagonista de los receptores 5-HT ₃ periféricos sobre el mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo inducidas por formalina al 1%.....	77
Figura 24	Efecto del agonista de los receptores 5-HT ₃ periféricos sobre el mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo inducidas por formalina al 0.5%.....	78
Figura 25	Efecto del agonista selectivo de los receptores 5-HT ₃ espinales sobre el desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración inducidas por formalina al 0.5%.....	80
Figura 26	Efecto del antagonista de los receptores 5-HT ₃ espinales sobre el desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración inducidas por formalina al 1%.....	80
Figura 27	Efecto del antagonista sobre el efecto pronociceptivo del agonista de los receptores 5-HT ₃ espinales.....	81
Figura 28	Efecto del antagonista de los receptores 5-HT ₃ espinales sobre el mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo inducidas por formalina al 1%.....	82

TABLAS

Tabla 1	Características operacionales de los receptores a 5-HT.....	34
Tabla 2	Clasificación de los receptores de 5-HT según su mecanismo transduccional.....	35
Tabla 3	Farmacología del receptor 5-HT ₃	56
Tabla 4	Potencia de los antagonistas de los receptores 5-HT ₃ y su afinidad por otros receptores.....	57
Tabla 5	Efecto del ondansetrón sobre otros receptores <i>in vitro</i>	58
Tabla 6	Afinidad de los fármacos serotoninérgicos sobre el receptor 5-HT ₃	64

RESUMEN

El receptor 5-HT₃ pertenece a la súper-familia de canales iónicos dependientes de ligando, está formado por 5 subunidades que están ensambladas de tal manera que forman un canal iónico central. En humanos se han clonado 5 subunidades para el receptor (5-HT_{3A/B/C/D/E/Ea}). Sin embargo, solo se han caracterizado y considerado funcionales los homopentámeros (5 subunidades de 5-HT_{3A}) y los heterómeros (2 subunidades 5-HT_{3A} y 3 subunidades 5-HT_{3B}, formando el receptor 5-HT_{3AB}). En cuanto a su distribución en el sistema nervioso, se ha detectado la proteína y el RNAm en el ganglio de la raíz dorsal y asta dorsal de la médula espinal. Por medio de estudios de electrofisiología se sabe que el receptor 5-HT₃ conduce cationes (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) de forma no selectiva y excluye a los aniones, lo que permite la despolarización de las membranas, por lo que se ha relacionado con la transmisión nociceptiva. En este mismo sentido, se sabe que en estados de inflamación y daño al tejido se libera serotonina que participa en la transmisión nociceptiva y en la inducción de alodinia e hiperalgesia a través de sus distintos receptores. El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de los receptores 5-HT₃ periféricos y espinales en el desarrollo y mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias inducidas por formalina. Para ello se inyectaron 50 µl de formalina al 0.5 o al 1% en la pata posterior derecha de ratas Wistar hembra (180-220 g). Se administraron por vía subcutánea e intratecal 10 min antes de la administración de formalina, la 5-HT o la m-clorofenilbiguanida (mCPBG, agonista selectivo de receptor 5-HT₃) o el ondansetrón (ODS, antagonista selectivo del receptor 5-HT₃). Además, se realizó la coadministración de cada agonista con el antagonista. También el ondansetrón y la mCPBG se administraron 6 días después de administrada la formalina. Se registró el número de retiros de ambas patas al ser estimuladas sobre la superficie plantar con filamentos de Von Frey de 10 y 250 mN. El pre-tratamiento periférico local (-10 min) con serotonina exógena (30-100 nmoles/pata) o con mCPBG (30-300 nmoles/pata) incrementó de manera significativa la hiperalgesia y alodinia secundarias en ambas patas 6 días después de la administración de formalina. En contraste, el pre-tratamiento periférico local con el antagonista selectivo del receptor 5-HT₃ ondansetrón (300 nmoles/pata) previno el desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias en ambas patas. El efecto pronociceptivo de serotonina (100 nmoles/pata) o mCPBG (300 nmoles/pata) fue completamente prevenido por el ondansetrón (10 nmoles/pata). Sin embargo, el post-tratamiento con ondansetrón (300 nmoles/pata) o con mCPBG (300 nmoles/pata) no afectó la hiperalgesia y alodinia secundarias inducidas por formalina. Por otro lado, el pre-tratamiento espinal (- 10 min) con mCPBG (300 nmoles/rata) incrementó significativamente la hiperalgesia y alodinia secundarias inducidas por formalina en ambas patas 6 días después de la administración periférica de formalina. En contraste, el pre-tratamiento espinal con el ondansetrón (30-100 nmoles/rata) previno la hiperalgesia y alodinia secundarias en ambas patas. El efecto pronociceptivo de la mCPBG (300 nmol/rata) fue completamente prevenido por el ondansetrón (1 nmol/rata). El post-tratamiento espinal con el antagonista selectivo del receptor 5-HT₃ (30-300 nmoles/rata) fue capaz de revertir la hiperalgesia y alodinia secundarias en ambas patas. Tomando juntos nuestros resultados podemos sugerir que la excitabilidad neuronal inducida por serotonina vía el receptor 5-HT₃ participa en el desarrollo pero no en el mantenimiento de estas conductas de largo plazo. Sin embargo, los receptores 5-HT₃ espinales tiene un papel muy importante en el desarrollo pero también en el mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo inducidas por formalina en la rata.

ABSTRACT

The 5-HT₃ receptor belongs to the super family of ligand gated ion channels, consists of five subunits that are assembled so as to form a central ion channel. In human 5 subunits have been cloned (5-HT_{3A/B/C/D/E/Ea}) however, only the homopentamers (five 5-HT_{3A} subunits) and heteromers (two 5-HT_{3A} subunits and three 5-HT_{3B} subunits forming the receptor 5-HT_{3AB}) have been characterized and considered functional. In the nervous system, the mRNA encoding 5-HT₃ receptor and the protein for this receptor have been detected in the dorsal root ganglia and the dorsal horn of the spinal cord. On the other hand, through electrophysiological studies is known that 5-HT₃ receptor leads to influx of non-selective cations (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) and it excludes anions, allowing depolarization of the membrane, which has been linked with nociceptive transmission. In this regard, it's known that tissue injury releases chemical mediators including 5-hidroxytryptamine (serotonin), which participate in the nociceptive transmission and induction of allodynia and hyperalgesia through its different receptors. The aim of this study was assess the role of peripheral and spinal 5-HT₃ receptors on formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia. Female Wistar rats with body weight between 180-220 g were injected with 50 µl of formalin (0.5 or 1%) into the dorsal surface of right hind paw. For local peripheral and spinal evaluation rats received a subcutaneous or intrathecal injection, respectively, of 5-HT or m-chlorophenylbiguanide (mCPBG, selective agonist of 5-HT₃ receptor) or ondansetron (selective antagonist of 5-HT₃ receptor) 10 min before administration of formalin. We also performed co-administration of each agonist to antagonist. Also, the ondansetron and mCPBG were administered 6 days after the formalin injection. We recorded the average of both paws withdrawals when stimulated on the plantar surface with von Frey filaments of 10 to 250 mN. Formalin (0.5 or 1%) produced acute nociceptive behaviors (flinching and licking) followed by long-term secondary mechanical allodynia and hyperalgesia. Ipsilateral peripheral pre-treatment (- 10 min) with exogenous serotonin (30-100 nmol/paw) or the selective 5-HT₃ receptor agonist (30-300 nmol/paw) significantly increased secondary allodynia and hyperalgesia in both paws on day 6 after injection of formalin. In contrast, ipsilateral peripheral pre-treatment with the selective 5-HT₃ antagonist ondansetron (300 nmol/paw) significantly prevented formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia in both paws. The pronociceptive effect of serotonin (100 nmol/paw) or mCPBG (300 nmol/paw) was completely prevented by ondansetron (10 nmol/paw). However, ipsilateral peripheral post-treatment with ondansetron (300 nmol/paw) did not affect formalin-induced secondary mechanical allodynia and hyperalgesia. On the other hand, we assessed the role of spinal 5-HT₃ receptors in the development and maintenance of these long-term behaviors. Spinal pre-treatment (- 10 min) with selective 5-HT₃ receptor agonist mCPBG (300 nmol/rat) dose-dependently increased secondary allodynia and hyperalgesia in both paws on day 6 after peripheral injection of formalin. In constrast, spinal pre-treatment with the selective 5-HT₃ antagonist ondansetron (30-100 nmol/rat) significantly prevented formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia in both paws. The pronociceptive effect of mCPBG (300 nmol/rat) was completely prevented by ondansetron (1 nmol/rat). Spinal post-treatment with ondansetron (30-300 nmol/rat) dose-dependently reversed formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia in both paws. Overall results suggest that a barrage of afferent input induced by 5-HT at peripheral 5-HT₃ receptors participate in the development and but not in maintenance of these long-term behaviors, however the spinal 5-HT₃ receptors have an important role in the development and maintenance of formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia in the rat.

I. INTRODUCCIÓN

A. DOLOR

El sistema sensorial tiene la función de informar al cerebro sobre el estado del medio ambiente externo y el medio interno del organismo. El dolor es una percepción y como tal, es un sistema presente en animales altamente evolucionados. Deniss y Melzack (1983) mencionaron que el dolor es una experiencia perceptiva tridimensional, con una vertiente sensorial-discriminativa que se refiere a su localización, calidad, intensidad y sus características temporo-espaciales, una vertiente afectiva-motivacional representada por experiencias previas, la personalidad del individuo y factores socio-culturales y finalmente una vertiente cognitiva-evaluativa donde se analiza e interpreta el dolor en función de lo que se percibe y el daño potencial que puede ocurrir.

El dolor es un mecanismo de defensa cuya función es salvaguardar la integridad del organismo de factores que pudieran dañarlo. Sin embargo, cuando se pierde la homeostasis de los procesos que lo integran y lo regulan éste sobrepasa su función y se vuelve patológico (crónico y debilitante). La transición implica cambios en la periferia, médula espinal y cerebro que aun no son totalmente comprendidos, por ello desde hace varios años los investigadores se han dado a la tarea de dilucidar la serie de eventos moleculares llevados a cabo en los tres niveles sensoriales y que facilitan el cambio de dolor agudo a estados de dolor persistente.

1. DEFINICIONES

A continuación se describirán una serie de términos que la organización internacional para el estudio del dolor (IASP, *International Asociation for the Study of Pain*) ha propuesto actualmente para describir al dolor de la manera más adecuada. Esta actualización se realizó el 3 de abril de 2011 de la primera

publicación en 1986 con segunda edición en 1994 (Merskey, 1986; Merskey y Bogduk, 1994).

Dolor: Experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a daño tisular real o potencial y que puede ser descrita en términos de la magnitud de dicho daño.

Alodinia: Dolor ocasionado por un estímulo inocuo. Es importante reconocer que la alodinia implica un cambio en la calidad de una sensación, ya sea táctil, térmica o de cualquier otro tipo.

Hiperalgesia: Respuesta exagerada a un estímulo doloroso, es decir, una disminución en el umbral de respuesta a un estímulo nocivo. La evidencia actual sugiere que es una consecuencia de la perturbación del sistema nociceptivo con sensibilización periférica o central o ambas.

Hiperalgesia primaria: Respuesta exagerada al estímulo aplicado en el área del tejido dañado.

Hiperalgesia secundaria: Respuesta exagerada al estímulo aplicado en áreas adyacentes o alejadas al tejido dañado.

Nocicepción: El proceso de codificación neural de los estímulos nocivos.

Neurona nociceptiva: Es una neurona central o periférica del sistema somato-sensorial que es capaz de codificar los estímulos nocivos.

Nociceptores: Receptores de alto umbral sensorial del sistema somato-sensorial periférico nervioso que es capaz de transducir y codificar estímulos nocivos.

Estímulo nocivo: Es un estímulo que daña o que amenaza dañar a los tejidos normales.

Umbral de dolor: La más mínima experiencia de dolor que un sujeto puede reconocer.

Analgesia: Ausencia de dolor en respuesta a la estimulación que normalmente sería dolorosa, en otras palabras es un incremento en el umbral de respuesta a un estímulo nocivo.

2. CLASIFICACIÓN

La clasificación del dolor resulta difícil debido a la gran cantidad de factores anatómicos, fisiológicos y psicológicos que lo originan y actualmente sigue siendo un tema de debate (Merskey, 2007). Sin embargo, se puede clasificar al dolor de acuerdo a la duración y características fisiopatológicas que lo producen (Loeser y Melzack, 1999; Woolf, 2010).

El dolor nociceptivo (transitorio): Es aquél que se activa por los nociceptores cutáneos o de otros tejidos en ausencia de daño tisular. Es un sistema de alerta y de protección fisiológica esencial para detectar y minimizar el contacto con estímulos potencialmente nocivos. Dura pocos segundos y no requiere de tratamiento médico (Figura 1A).

Dolor inflamatorio (agudo): Es el que se produce por la estimulación de nociceptores y activación del sistema inmune en el tejido dañado. También se considera de adaptación y protección porque al incrementar la sensibilidad sensorial después de daño tisular crea una situación que desalienta el contacto físico y movimiento, de esta manera permite la recuperación del mismo. El dolor agudo dura unos pocos días o algunas semanas y la mayoría de los individuos requiere cuidado médico (Figura 1B).

Dolor patológico (crónico): El efecto protector del dolor desaparece y es el resultado del funcionamiento anormal del sistema nervioso. En los síndromes de dolor crónico la intensidad del dolor sobrepasa la magnitud del daño. No solo ocurre después de daño al tejido nervioso (dolor neuropático), sino también en condiciones en las que no existe daño o inflamación (dolor disfuncional). Las condiciones que evocan dolor disfuncional incluyen fibromialgia, síndrome del intestino irritable, enfermedades articulares, migraña, etc. Este tipo de dolor no es un proceso autolimitado, puede persistir por meses o años. Siempre se requiere de cuidado médico pero a menudo es inefectivo reduciendo la calidad de vida de los pacientes (Figura 1C).

3. NOCICEPCIÓN

Se le denomina así al mecanismo molecular por el cual las neuronas aferentes primarias detectan un estímulo que produce dolor (Julius y Basbaum, 2001). Este proceso consiste en varios pasos.

Transducción: Es el proceso por el cual los estímulos nocivos se convierten en señales eléctricas en los nociceptores. Los nociceptores identificados son las fibras A δ y C. Estas existen como terminaciones nerviosas libres que responden selectivamente a estímulos nocivos (térmicos, mecánicos o químicos), no responden a estímulos inocuos y no se adaptan, por el contrario si son estimuladas de manera continua resulta en disminución de su umbral e incremento en su actividad (sensibilización). Las fibras nociceptoras aferentes normalmente son pseudounipolares, con una terminal periférica y una central.

Los neurotransmisores son producidos en el cuerpo de la célula (en los ganglios de la raíz dorsal), son liberados en los dos extremos y participan en la producción de la

señal de dolor periférico, así como en la promoción de eventos que conducen a la percepción de dolor adicional (Woolf y Ma, 2007; Vanderah, 2007).

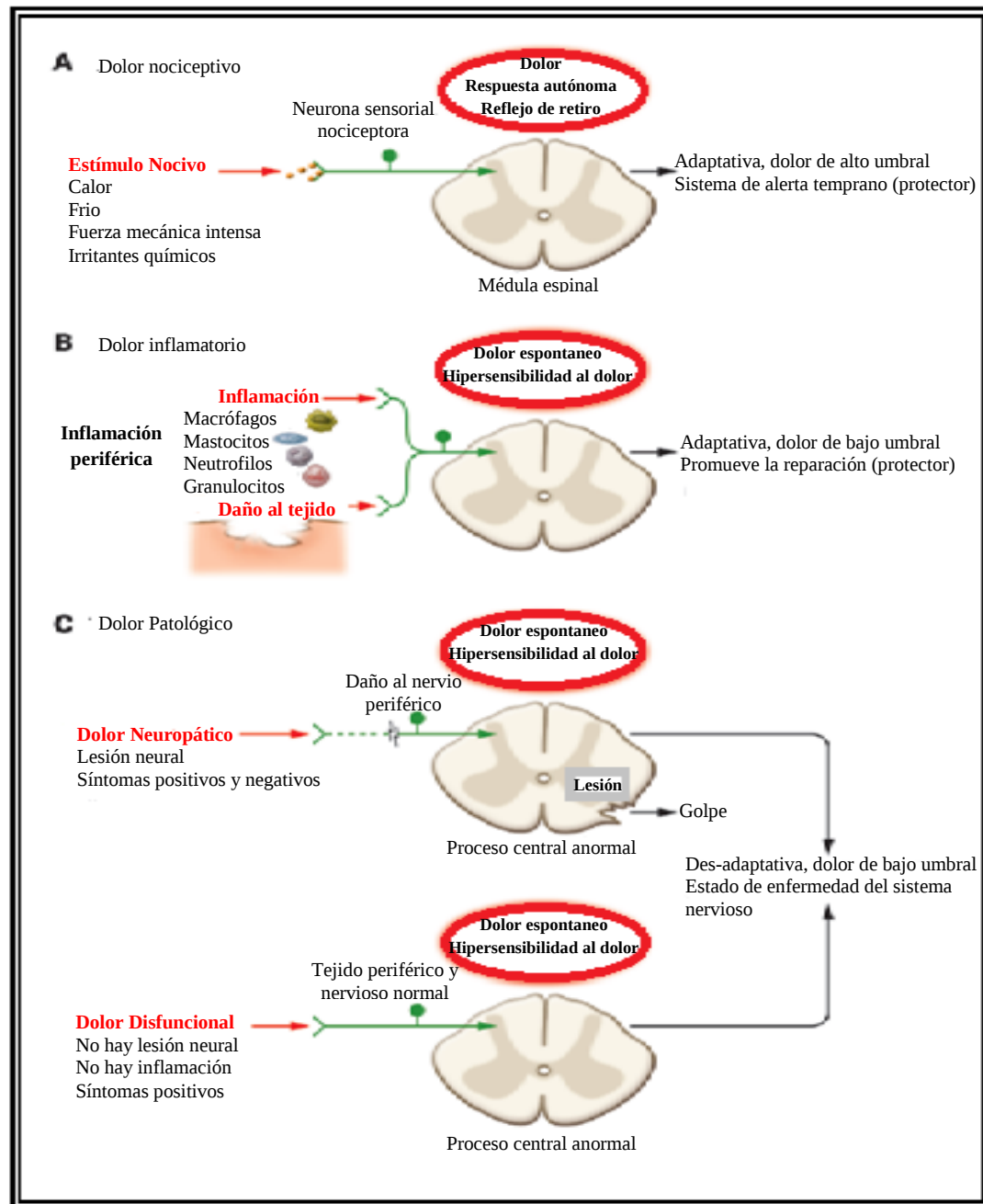


Figura 1. Clasificación del dolor. **(A)** Dolor nociceptivo representado por la sensación asociada con la detección de un estímulo potencialmente dañino que sirve como protector. **(B)** Dolor inflamatorio asociado a daño tisular e infiltración de células inmunes y promueve la reparación al causar hipersensibilidad. **(C)** Dolor patológico, estado de enfermedad causado por daño al tejido nervioso (neuropático) o por función anormal de mismo (disfuncional). Modificado de Woolf, 2010.

Transmisión: Es la segunda etapa en el procesamiento de señales nocivas. La información de la periferia se transmite a la médula espinal, de ahí al tálamo y finalmente a la corteza (Vanderah, 2007). Esta información es transmitida a diferentes velocidades por 2 tipos de neuronas nociceptivas aferentes primarias.

Las fibras C ó nociceptores polimodales no tienen mielina, su velocidad de conducción está entre 0.5 a 2 m/seg, responden a estímulos químicos, térmicos y mecánicos. Las fibras A δ son mielinizadas con una velocidad de conducción de 2 a 20 m/seg, responden a estímulos mecánicos (mecano-receptores) y/o térmicos (termo-receptores) de alta intensidad (Figura 2).

Estas fibras hacen sinapsis en capas superficiales del asta dorsal de la médula espinal con las neuronas de segundo orden que envían sus axones a través del tracto espinotalámico de manera ascendente hasta el tálamo, donde hacen relevo con neuronas de tercer orden las cuales proyectan sus axones a la corteza sensorial. Cabe señalar que las neuronas de segundo orden tienen la capacidad de cambiar su patrón de respuesta (sensibilización central) en circunstancias de descargas frecuentes y sostenidas (producidas en el marco de lesión tisular o nerviosa) provenientes de las fibras aferentes primarias (Scholz y Woolf, 2002).

Modulación: Es el tercer paso en la nocicepción. Este proceso representa los cambios que ocurren en el sistema nervioso en respuesta a los estímulos nocivos y permite que dichas señales sean inhibidas o aumentadas de manera selectiva.

Un sistema de modulación endógeno del dolor es llevado a cabo por las interneuronas inhibitorias o excitatorias que están en las capas superficiales del asta dorsal de la médula espinal y por tractos neurales descendentes que pueden inhibir o

incrementar la transmisión de la señal dolorosa (Millan, 1999, 2002; Vanderah, 2007).

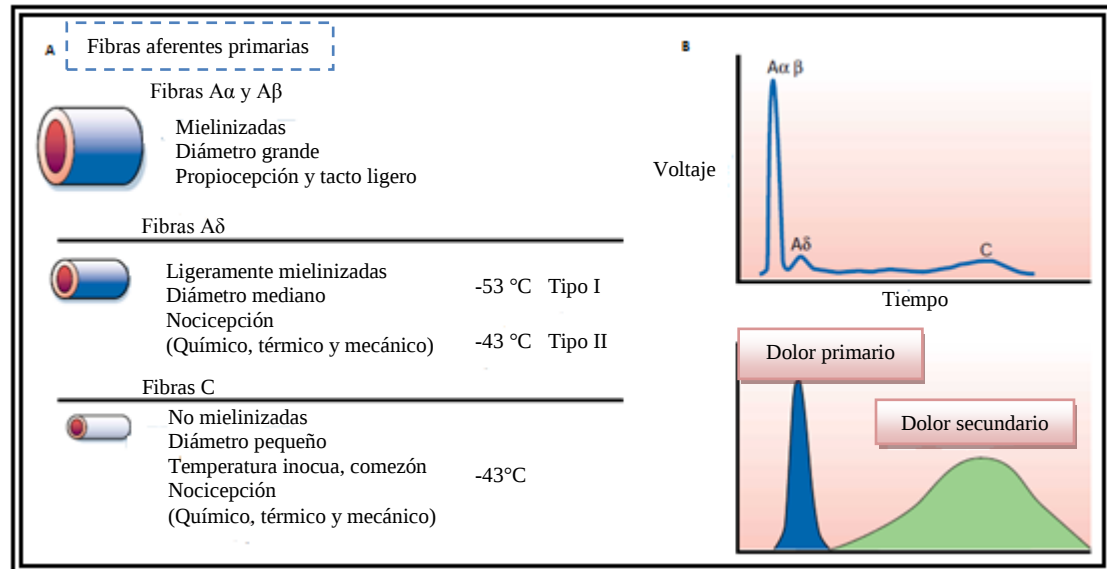


Figura 2. Distintos nociceptores detectan distintos tipos de dolor. **A** Los nervios periféricos incluyen fibras mielinizadas de pequeño (Aδ) y mediano (Aαβ) diámetro y fibras no mielinizadas de pequeño diámetro (C). **B** La velocidad de conducción es directamente proporcional al diámetro de la fibra. Así las fibras con una velocidad de conducción mayor se encargan de la sensación rápida de dolor (primario), mientras que las fibras C son responsables de la respuesta dolorosa más lenta (secundario). Modificado de Julius y Basbaum, 2001.

Percepción: Es la última fase del proceso nociceptivo y la encargada de la integración de la información sensorial para producir la experiencia emocional subjetiva desagradable y consciente del dolor. Diversos estudios indican que el cerebro medio, tálamo, hipotálamo, núcleo lentiforme, corteza somato-sensorial (SI y SII) y los cíngulos insular, pre-frontal, anterior y parietal son estructuras básicas en la percepción del dolor (Millan, 1999; Tracey y Manthly, 2007). De estas estructuras, el tálamo es el principal centro de relevo de la información sensorial destinada a la corteza (Figura 3) y son sus núcleos los que definen el procesamiento de esta información (Almeida et al., 2004).

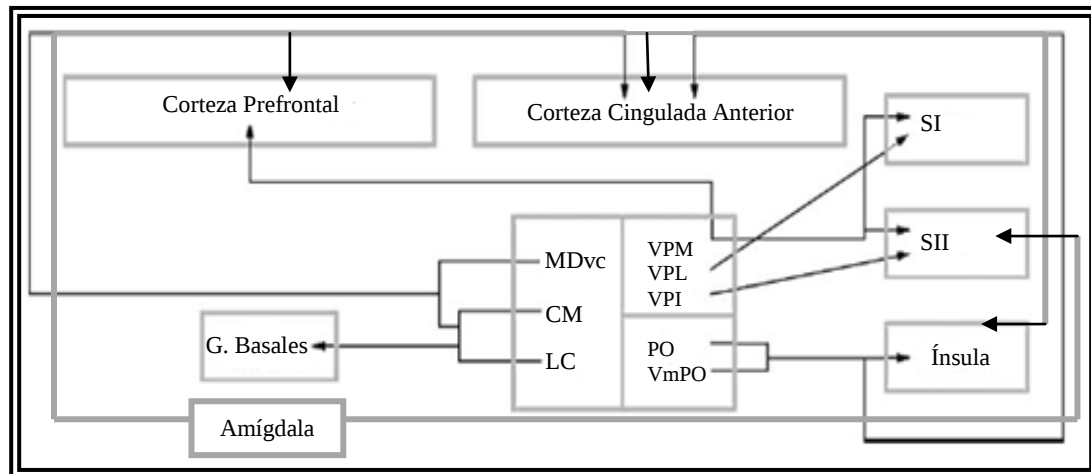


Figura 3. Circuitos supraespinales involucrados en la percepción del dolor. El complejo lateral talámico está integrado por los núcleos ventroposterolateral (VPL), ventroposteromedial (VPM), ventroposteroinferior (VPI). El complejo posterior está formado por los núcleos posterior (PO), ventromedial posterior (VmPO) y el complejo medial por los núcleos medial dorsal (MDvc), centromedial (CM) y central lateral (LC). Modificado de Almeida et al., 2004.

B. DOLOR INFLAMATORIO

La inflamación que resulta de la lesión tisular es provocada por la liberación de una mezcla compleja de citocinas y sustancias neuroactivas (sopa inflamatoria). Estos mediadores actúan sobre receptores específicos y canales iónicos ubicados en la terminal periférica de las fibras aferentes primarias, activando cascadas de señalización que resultan inmediatamente en modulación post-traducciona de moléculas efectoras y posteriormente en la transcripción de genes y finalmente cambios post-transduccionales (Costigan y Woolf, 2000).

Dentro de la sopa inflamatoria encontramos ATP, protones, liberación de 5-hidroxitriptamina e histamina por las células cebadas (Zuo et al., 2003), prostaglandinas del metabolismo del ácido araquidónico. Los macrófagos añaden citocinas (IL-1, IL-6, TNF), factores de crecimiento (Factor de crecimiento neural,

Factor inhibidor de la leucemia). También se libera bradicinina en el sitio de lesión por acción de la enzima COX-2 (Costigan y Woolf, 2000; Moalem et al., 2005; Woolf y Ma, 2007). Las fibras aferentes primarias por sí mismas pueden contribuir a la inflamación porque son capaces de liberar neuropéptidos como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) que inician una respuesta neurogénica al actuar sobre algunas células inflamatorias y provocar mayor liberación de sustancias neuroactivas. Algunos de estos agentes inflamatorios tales como los protones y el ATP pueden despolarizar de manera directa a las fibras aferentes primarias actuando sobre sus receptores ASICs o P2X₃, respectivamente (Julius y Basbaum, 2001), mientras que otros indirectamente provocan la sensibilización de la terminal nerviosa por modificación post-traducciona l de receptores y canales iónicos (Costigan y Woolf, 2000; Scholz y Woolf, 2002).

1. SENSIBILIZACIÓN

La inflamación producida por la lesión del tejido periférico incrementa la intensidad del dolor en respuesta a un estímulo nocivo (hiperalgesia) e induce dolor después de estímulos que de manera normal son inocuos (alodinia) (Sasaki et al., 2006). De acuerdo con la sensación provocada existen 2 tipos de hiperalgesia que suceden después de la lesión tisular, la que se presenta en el sitio de lesión (primaria) y la que se presenta en sitios adyacentes o alejados del área dañada (secundaria) y el desarrollo de éstas involucra mecanismos periféricos y centrales (Treede et al., 1992; Sandkuhler, 2009).

Las fibras aferentes primarias se caracterizan por su capacidad para sensibilizarse a consecuencia de estímulos nocivos que persisten o se repiten y se cree que esto es el

principal mecanismo que explica la hiperalgesia primaria y puede ser provocada tanto por estímulos térmicos como mecánicos (Treede et al., 1992; Cervero et al., 2003).

La hiperalgesia secundaria a diferencia de la primaria es provocada sólo por estímulos mecánicos y los mecanismos que la producen están lejos de ser claros. De manera general se acepta que está basada en alteraciones en los procesos llevados a cabo en el SNC. Se asume que después de lesión periférica también existe un incremento en la excitabilidad en la médula espinal y en el cerebro (sensibilización central) (Millan, 1999, 2002; Costigan y Woolf, 2000; Sasaki, 2006; Woolf y Ma, 2007). El modelo de interacción presináptica propuesto por Cervero et al (2003) basado en la interacción en la médula espinal entre mecano-receptores de bajo umbral y nociceptores (Figura 4) es capaz de explicar parte de este fenómeno. Actualmente se sabe que la facilitación descendente y la activación de la microglía juegan un papel muy importante en el desarrollo y mantenimiento de este estado de dolor persistente (Fu et al., 2000; Katz y Gold, 2006; Ambriz-Tututi et al., 2009; Lagraize et al., 2010).

a) Sensibilización periférica

La sensibilización periférica representa una forma de plasticidad funcional estímulo-dependiente de las fibras aferentes primarias (Basbaum et al., 2009). Los mediadores inflamatorios provocan la reducción del umbral de activación de las fibras aferentes primarias y aumentan su capacidad de respuesta (Figura 5), no sólo de los nociceptores, sino también de fibras que generalmente perciben sólo estímulos inocuos. Como resultado los estímulos de baja intensidad pueden acceder

a la vía nociceptiva y comienzan a producir dolor (Woolf, 1987; Woolf y Ma, 2007).

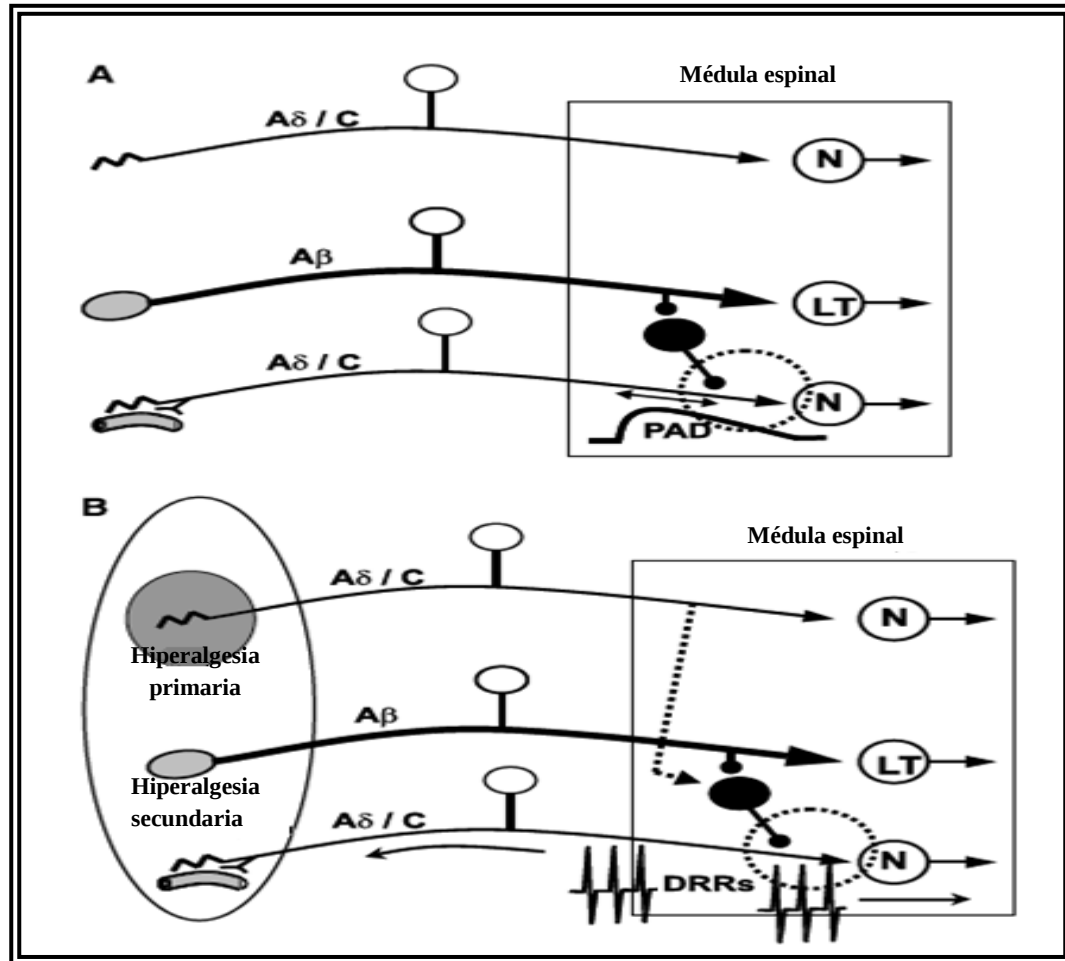


Figura 4. Modelo de hiperalgesia y alodinia basado en la interacción presináptica de mecanoreceptores de bajo umbral ($A\beta$) y nociceptores ($A\delta$ y C). **A:** Bajo circunstancias normales la activación de las fibras $A\beta$ provoca la despolarización primaria aferente (PAD) en las fibras $A\delta$ inhibiendo la transmisión de impulsos nociceptivos. **B:** En condiciones de lesión periférica la activación de nociceptores y su sensibilización resulta en hiperalgesia primaria. Descargas desde esta área llegan a la médula espinal y sensibilizan interneuronas que modulan la inhibición presináptica (neurona negra del diagrama). Ésto resulta en incremento de la PAD en la terminal central de los nociceptores cuando los mecanoreceptores de bajo umbral son activados. La despolarización puede ser lo suficientemente intensa como para producir un potencial de acción que viaja de manera antidrómica como reflejo de raíz dorsal (DRRs) causando vasodilatación local periférica y activación de neuronas nociceptivas centrales (N), así disparando la hiperalgesia secundaria. Modificado de Cervero et al., 2003.

La unión de los mediadores de esta sopa inflamatoria con sus respectivos receptores activa cascadas de señalización intracelular que incluyen la PKC, PKA, PI3K, MAP cinasas, ERK, P38 y JNK. Estos segundos mensajeros actúan, por una parte fosforilando a los principales efectores de la sensibilización periférica (TRPV y canales de sodio rTTX) lo que provoca alteración de su umbral y cinética incrementando las corrientes de sodio en la terminal de tal manera que el estímulo despolarizante produce una mayor excitación (Julius y Basbaum, 2001; Scholz y Woolf, 2002; Woolf y Ma, 2007; Stein et al., 2009; Basbaum et al., 2009). Además la serotonina, prostaglandina E₂ y bradicinina provocan una mayor entrada de calcio a las neuronas sensoriales contribuyendo a la mayor excitabilidad (Linhart et al., 2003).

Los cuerpos celulares de las neuronas nociceptivas (GRD) se mantienen informados sobre el estado de las terminales periféricas. De esta manera la inflamación periférica produce señales retrogradas que provocan el incremento en la transcripción de neuropéptidos, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y canales de sodio, así como el incremento de la traducción de canales TRPV. Todo esto incrementa aun más la transmisión hacia la médula espinal y la sensibilización periférica (Costigan y Woolf, 2000; Scholz y Woolf, 2002; Woolf y Ma, 2007). Por ejemplo, se sabe que el NGF se une a su receptor el TrKA en la terminal periférica formando un complejo que luego es internalizado y transportado de manera retrograda al GRD, donde incrementa la transcripción (Constigan y Woolf, 2000) y expresión de receptores opiáceos μ . Esto aparentemente como un intento de restablecer la función; sin embargo, la mayoría de los cambios producidos son desadaptativos (Woolf y Ma, 2007).

En términos generales la inflamación tiende a causar expansión o aumento en la expresión de receptores y canales iónicos específicos. Neuropéptidos tales como la sustancia P y CGRP también son regulados a la alza y conducidos de forma anterógrada a la terminal periférica donde al ser liberados provocan inflamación neurogénica, provocando mayor liberación de citocinas, incrementando el flujo sanguíneo por vasodilatación y permitiendo extravasación de plasma y perpetuando la inflamación y el edema (Constigan y Woolf, 2000; Xie et al., 2003). Además, estos neuropéptidos también son transportados a la terminal central donde amplifican acciones centrales contribuyendo al inicio de la sensibilización central.

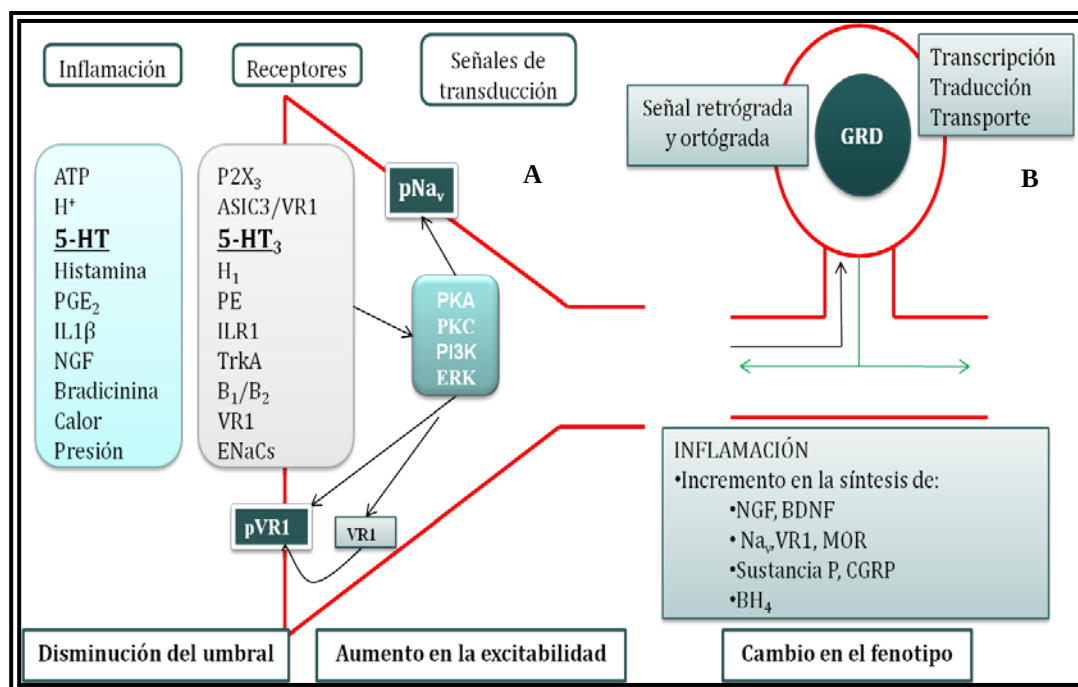


Figura 5. A: La sensibilización periférica involucra una disminución del umbral de la fibra nociceptiva provocada por sustancias inflamatorias que activan distintas cascadas de señalización en la terminal periférica que modifican el tráfico y las propiedades de receptores y canales en la membrana al ser fosforilados. **B:** El cambio de fenotipo ocurre en respuesta a la inflamación y al daño axonal por moléculas que viajan de manera retrograda al GRD donde activan procesos de transcripción de genes. Modificado de Woolf y Ma, 2007.

b) Sensibilización central

Una vez que el estímulo nocivo ha sido convertido a potenciales de acción, éstos viajan desde la periferia hasta el asta dorsal de la médula espinal donde las fibras aferentes primarias hacen sinapsis con neuronas de segundo orden. La médula espinal es el primer sitio de integración sináptica del dolor y contribuye de forma crítica a la sensación de dolor patológico exagerado (Zeilhofer, 2005). De acuerdo con Rexed (1952), la sustancia gris de la médula espinal se divide en 10 laminas (I-X), 6 de ellas en el asta dorsal, 3 en la región intermedia y asta ventral y una rodeando el canal central. Las laminas del asta dorsal pueden agruparse en capas superficiales (lamina I ó zona marginal y lamina II o sustancia gelatinosa) y capas más profundas (III - V ó núcleo propio). La terminal central de las fibras aferentes primarias llegan a la lamina I, II y V del asta dorsal, algunos también a la lamina X (Figura 6) ya que los axones de la mayoría de las neuronas de dichas laminas constituyen el tracto espino-talámico (Willis, 1988; Susuki, 2005).

Las neuronas intrínsecas de la médula espinal se clasifican de acuerdo a la respuesta que presentan ante estímulos aferentes primarios en neuronas específicas (SN), neuronas de amplio rango dinámico (WDR) y neuronas no nociceptivas (N-NOC) o de acuerdo a su proyección en neuronas de proyección (NP), neuronas propioespinales intersegmentales (IPN) e interneuronas excitatorias (EXIN) o inhibitorias (ININ) (Willis, 1988; Millan, 1999; Almeida et al., 2004; Susuki, 2005). La sensibilización central ha proporcionado una explicación de muchos de los cambios temporales, espaciales y de umbral en situaciones clínicas de dolor agudo y crónico y ha puesto de manifiesto la contribución fundamental del SNC en la generación de la sensibilidad anormal al dolor. Aunque fenomenológicamente

pareciera similar a la sensibilización periférica difieren sustancialmente tanto en mecanismos moleculares como en su manifestación clínica (Latremoliere y Woolf, 2009).

La sensibilización central a diferencia de la periférica incluye vías que generalmente no producen dolor como las fibras A β e induce hipersensibilidad en el tejido no inflamado. Entonces los cambios en el SNC alteran la forma en que se responde a estímulos sensoriales en lugar de reflejar la presencia de estímulos nocivos (Latremoliere y Woolf, 2009).

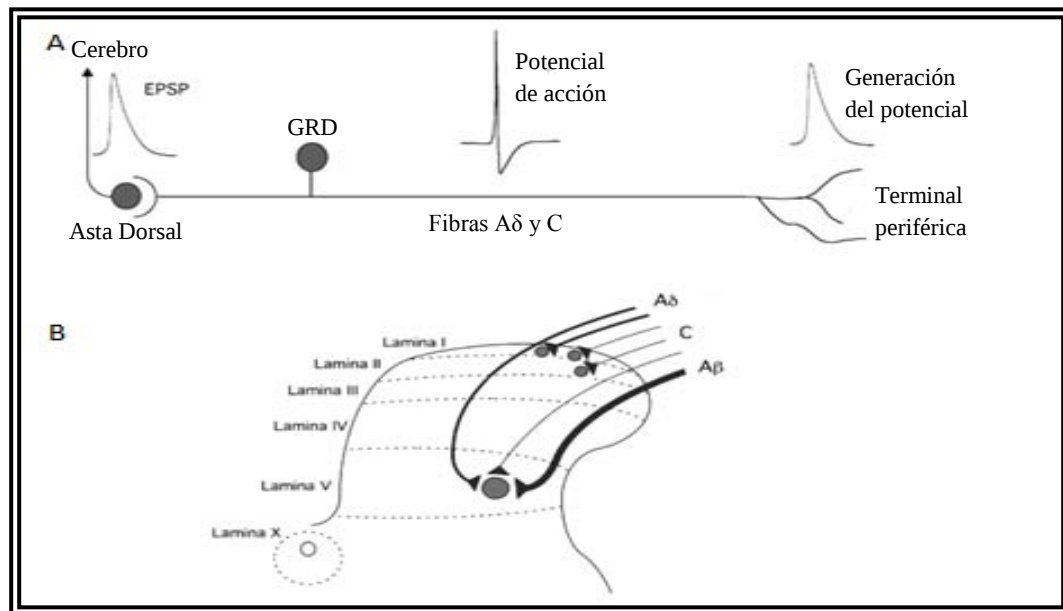


Figura 6. Transmisión de señales nociceptivas desde el tejido periférico al asta dorsal de la médula espinal. **A:** Un estímulo nocivo genera la despolarización de la terminal periférica y un potencial de acción supra-umbral es generado y transmitido por las fibras A δ y C hasta el asta dorsal donde hace sinapsis con neuronas intrínsecas de la médula espinal. **B:** Inervación del asta dorsal por las fibras aferentes primarias. Las fibras C terminan principalmente en las laminas I, II y V; las fibras A δ en las laminas I y V; y las fibras A β en laminas profundas del asta dorsal (lamina III, IV y V). Modificado de Zeilhofer, 2005.

Los mecanismos moleculares que conllevan a sensibilización central provocan un aumento de la excitabilidad de la membrana de las neuronas, el desarrollo de

actividad espontánea, reducción del umbral de activación por estímulos periféricos, ampliación de campo receptivo, aumento de la fuerza y eficacia sináptica (Woolf, 1991; Costigan y Woolf, 2000; Scholz y Woolf, 2002; Woolf y Ma, 2007) y una inhibición reducida (deshinhibición) (Zeilhofer, 2005, 2008; Zeilhofer y Zeilhofer, 2008). El efecto neto es el reclutamiento de impulsos sub-umbrales para generar un aumento en la producción de potenciales de acción que mantiene un estado de facilitación, potenciación y amplificación (Latremoliere y Woolf, 2009). Finalmente, esto induce el desarrollo de plasticidad neuronal provocando potenciales a largo plazo (LTP) comparables con los que subyacen en el aprendizaje y la memoria (Sharif-Naeini y Basbaum, 2011).

La sensibilización central se compone de 2 fases, cada una con mecanismos específicos. La primera y que es responsable de los cambios rápidos en la médula espinal depende de la activación y fosforilación de receptores de glutamato y canales iónicos capaces de modificar sus propiedades. La segunda y de larga duración es dependiente de la transcripción de genes responsable del incremento en la expresión y trafico de receptores a la membrana que son cambios observados en estados de dolor patológico (crónico) (Latremoliere y Woolf, 2009).

Después de la lesión de tejido periférico, la terminal central de las fibras aferentes primarias sensibilizadas libera sustancias neuromoduladoras como el glutamato, sustancia P y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que activan receptores post-sinápticos desencadenando múltiples cascadas de señalización (Costigan y Woolf, 2000; Scholz y Woolf, 2002; Basbaum et al., 2009). En primer lugar el glutamato activa receptores AMPA que despolarizan las neuronas post-sinápticas. Esta despolarización remueve al ión Mg^{2+} que bloquea a los canales

NMDA permitiendo al glutamato activarlos trayendo como consecuencia un incremento de Ca^{2+} intracelular (Figura 7). El incremento de calcio y la activación de múltiples receptores estimulan la participación de diversas enzimas (COX, NOS) y proteincinasas (PKA, PKC, ERK) (Costigan y Woolf, 2000; Latremoliere y Woolf, 2009). Las proteincinasas fosforilan receptores de membrana y canales iónicos incrementando así la excitabilidad neuronal, como es el caso del receptor NMDA que al ser fosforilado permanece más tiempo abierto y es más sensible a la presencia de glutamato. Por su parte, la NOS y la COX sintetizan metabolitos como el óxido nítrico y las prostaglandinas, respectivamente, que actúan de manera pre- y post-sináptica (Veiga et al., 2004; Wiertelak et al., 1994). Además, se activan cambios transcripcionales que inducen a largo plazo alteraciones bioquímicas en las neuronas sensoriales (Costigan y Woolf, 2000; Latremoliere y Woolf, 2009).

Existe también evidencia creciente de que la activación de la glía (microglía y astrocitos) en la médula espinal juega un papel importante en la inducción y mantenimiento del dolor patológico (Mellers et al., 1994; Fu et al., 1999, 2009).

Después de la inflamación periférica producida por formalina se ha demostrado que la microglía presente en la médula espinal se activa presentando cambios en su morfología y función comenzando desde el día 1 con el pico máximo al día 6 post inyección (Fu et al., 1999). La microglía y astrocitos pueden sintetizar y secretar citocinas como IL-1, IL-6, $\text{TNF}\alpha$, NGF que contribuyen al aumento de la excitación neuronal y a la reducción de corrientes inhibitorias (Fu et al., 1999, 2000, 2009; Moalem y Tracy, 2006; Sharif-Naeini y Basbaum, 2011) (Figura 8). Además, es capaz de inducir otros neuromoduladores como productos de la ciclooxigenasa y el

óxido nítrico, importantes en la producción de hiperalgesia (Fu et al., 1999; Veiga et al., 2004).

2. MODULACIÓN DESCENDENTE

El control descendente (supraespinal) del procesamiento nociceptivo llevado a cabo en el asta dorsal de la médula espinal puede ser tanto inhibidor como facilitador y proviene de distintas regiones del cerebro.

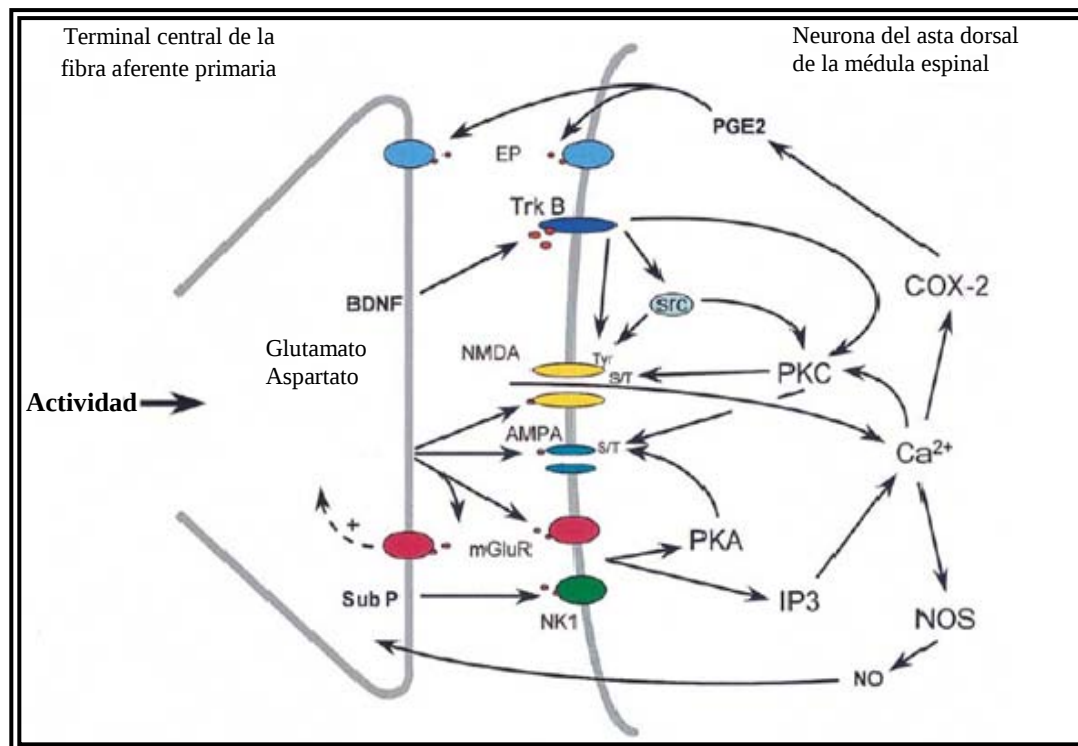


Figura 7. Sensibilización central. La actividad sostenida de las fibras C provoca la liberación de neuromoduladores y neurotransmisores que actúan sobre receptores tirosina-cinasa y receptores metabotrópicos en el asta dorsal de la médula espinal iniciando así múltiples cascadas de señalización. Estas cascadas convergen sobre los receptores AMPA y NMDA, provocando su fosforilación y alterando sus propiedades iniciando con ello la sensibilización central. Las neuronas post-sinápticas en el asta dorsal modulan su propia actividad, así como la actividad de las neuronas pre-sinápticas por la liberación de prostaglandina E₂ (PGE₂) y óxido nítrico (NO), respectivamente. Modificado de Costigan y Woolf, 2000.

No existe una separación anatómica absoluta entre las estructuras involucradas en los mecanismos de inhibición descendente y facilitación descendente (Millan, 2002). En este sentido las regiones que se sabe están implicadas en estos procesos son: la corteza cerebral (corteza cingulada anterior, frontal y lóbulos parietales), el hipotálamo, la sustancia gris periacueductal (PAG), el núcleo parabraquial (NPB), el núcleo del tracto solitario (NTS), la médula rostroventromedial (RVM) incluyendo los núcleos del Rafé y el locus coeruleus y subcoeruleus desde donde envían sus axones a la médula espinal a través del funículo dorsolateral (Millan, 1999, 2002; Ossipov et al., 2010) (Figura 9).

Algunas influencias descendentes son activas de forma tónica pero el equilibrio entre ambas condiciones es dinámico y puede ser alterado por distintos comportamientos y estados emocionales ó patológicos.

Como se sabe desde hace tiempo, el estrés y el miedo están asociados a hipoalgesia que refleja una mayor activación de la inhibición descendente.

Por el contrario, la inflamación por lesión tisular, la lesión de los nervios, la enfermedad y la administración crónica de opiáceos se asocia a hiperalgesia lo que refleja en parte que se activan en mayor medida las vía facilitadoras descendentes.

A la fecha existe suficiente evidencia que sugiere que la facilitación descendente de la nocicepción espinal es uno de los principales procesos que contribuyen a la sensibilización central y al desarrollo y mantenimiento de la hiperalgesia secundaria, lo que indica una tendencia a favor de la facilitación en la transición del dolor agudo al crónico. La RVM es un componente que se ha estudiado ampliamente y que constituye un mecanismo de control en la transmisión nociceptiva espinal (Millan, 2002).

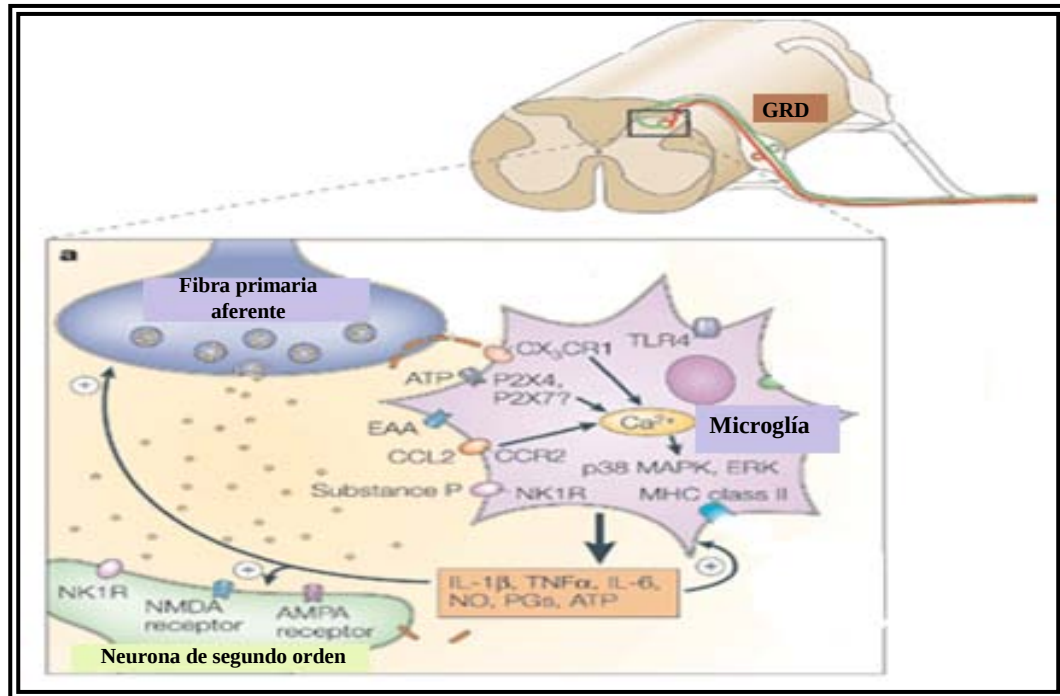


Figura 8. Activación de la microglía en la médula espinal. Varios eventos centrales ocurren después de la lesión tisular y nerviosa. La terminal central de la fibra aferente primaria se encuentra en vecindad con la microglía que mantiene el ambiente en la médula espinal. En estados de dolor inflamatorio y neuropático la microglía es activada por la liberación de neurotransmisores o neuromoduladores desde las fibras aferentes primarias. La microglía activada libera varias citocinas, quimiocinas y otros agentes que modulan la liberación pre-sináptica de neurotransmisores y/o la excitabilidad post-sináptica. La liberación de mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, óxido nítrico, ATP y prostaglandinas (PGs) inician por sí mismas mecanismos de propagación que incrementan la expresión y síntesis de citocinas en la microglía. Esto conduce a un incremento intracelular de calcio y activación de P38 y de la vía MAPK/ERK. Modificado de Marchand et al., 2005.

A pesar de esto, los mecanismos celulares y moleculares de su participación en la facilitación descendente aun no se entienden completamente (Wei et al., 2010). Se han caracterizado 3 tipos de células, las células ON, las células OFF y las células neutras, las cuales aparentemente son la base de su papel modulador bidireccional en la transmisión nociceptiva. Las células OFF provocan una pausa en la actividad inmediatamente después de que el estímulo llega a la RVM contribuyendo a la influencia inhibitoria de la RVM. La administración de opioides en la PAG resulta

en el aumento de la actividad de las células OFF por desinhibición (Cheng et al., 1986), mientras que las células ON muestran actividad explosiva inmediatamente después de recibir el estímulo contribuyendo a la facilitación (Xu et al., 2007; Heinricher et al., 2009).

La administración de lidocaína en la RVM o la transección de sus proyecciones a la médula espinal reducen la hiperalgesia inducida por daño al tejido (Wiertelak et al., 1997; Urban y Gebhart, 1999; Ambriz-Tututi et al., 2011). Por otro lado, la lesión de nervios periféricos incrementa la liberación de CGRP en la médula espinal inducida por capsaicina, la cual es bloqueada por lesión del funículo dorso lateral (Gardell et al., 2003). La hiperalgesia y alodinia inducidas por formalina son mantenidas por la activación de mecanismos facilitadores dependientes de la activación de receptores CCK₂ en la RVM y en la médula espinal (Ambriz-Tututi et al., 2011). Además, la administración subdérmica de formalina en la pata posterior de la rata produce un incremento en la activación de las células ON en la RVM (Vanegas et al., 2004). En este mismo sentido, Budai et al (2006) sugirieron que la activación de los receptores NK1 en la RVM y la consiguiente sensibilización de las células ON puede contribuir al desarrollo de sensibilización central y de hiperalgesia después de la lesión tisular o nerviosa.

La lesión inflamatoria y neural crónica provoca un cambio en el equilibrio entre células ON y OFF, donde predomina la activación de células ON durante largos periodos y la inhibición de células OFF (Urban y Gebhart, 1999; Heinricher et al., 2009). Por su parte, las células neutras aparentemente no presentan cambios en su actividad relacionados con la nocicepción.

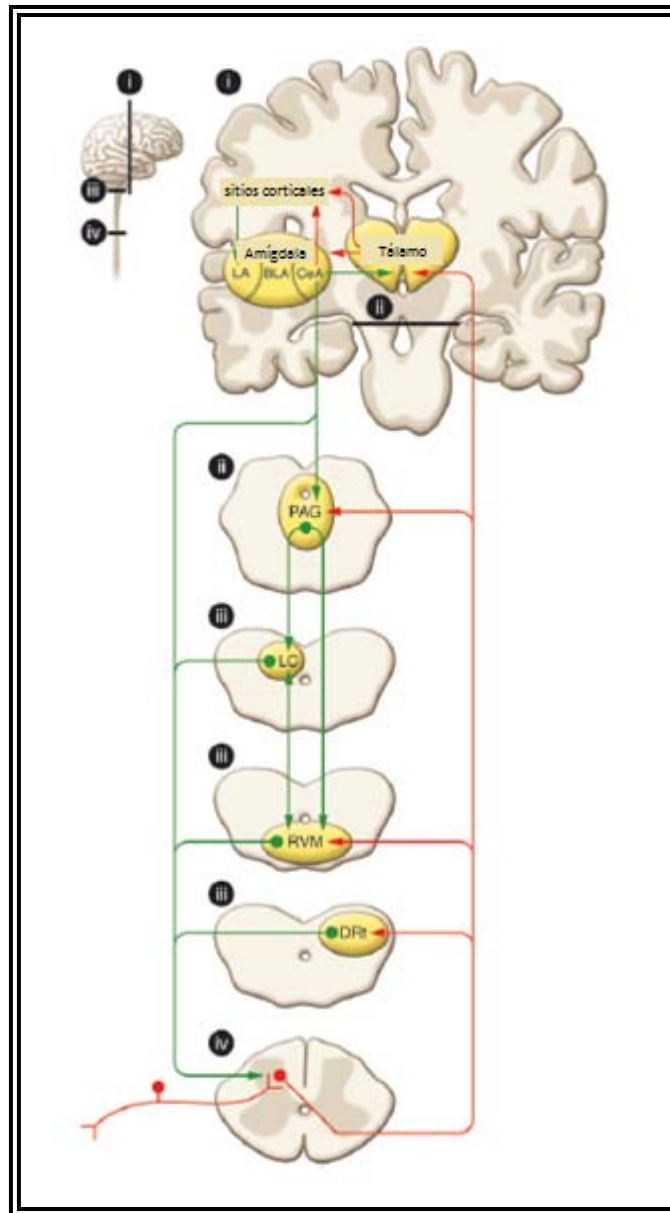


Figura 9. Representación esquemática del circuito modulador del dolor. Los impulsos nociceptivos entran a la médula espinal a través de las fibras aferentes primarias que hace sinapsis sobre neuronas de proyección. Las fibras de proyección ascienden a través del tracto espinotalámico y hacen relevo en el tálamo, y núcleo mesencefálico incluyendo el núcleo reticular dorsal (DRt), la medula rostro-ventro-medial (RVM) y la sustancia gris periacueductal (PAG). Las proyecciones rostrales al tálamo incluyen sitios corticales y amígdala. La cápsula lateral de la amígdala (CeA) ó amígdala nociceptiva recibe impulsos del tallo cerebral y médula espinal. Los impulsos del tálamo y corteza entran a través de la amígdala lateral (LA) y basolateral (BLA). La CeA envía impulsos a sitios corticales y el tálamo en donde la percepción consciente del dolor se integra. La modulación descendente está mediada a través de proyecciones de la PAG, las cuales reciben impulsos de otros sitios como el hipotálamo y también se comunica con la RVM, así como otros núcleos medulares que envían sus proyecciones a la médula espinal a través del funículo dorso-lateral (DLF). El locus coeruleus (LC) recibe impulsos de la PAG, comunica con la RVM y proyecta fibras inhibitorias descendentes. Proyecciones anti y pronociceptivas de la RVM modulan los impulsos y proveen un sistema endógeno de regulación. Tractos ascendentes (rojo) y descendentes (verde) se muestran en el esquema. Las áreas marcadas con i-iv en el diagrama pequeño corresponden con los detalles marcados en el esquema grande. Diagrama modificado de Ossipov et al., 2010.

Sin embargo, estudios posteriores han sugerido que éstas son serotoninérgicas y debido a la gran importancia de la serotonina en la modulación descendente, el papel de estas células debe ser estudiado más ampliamente (Heinricher et al., 2009). Es sabido que la mayor proyección de axones serotoninérgicos a la médula espinal provienen de los núcleos del Rafé ubicados en la RVM, que es la principal fuente de serotonina a nivel central (Millan, 2002), pero su papel en la modulación del dolor

aun no está claro (Susuki et al, 2004). Esto es debido en parte a la gran familia de subtipos de receptores a serotonina presentes en el asta dorsal de la médula espinal que median efectos opuestos en el proceso nociceptivo (Bardin et al., 1997; Susuki et al., 2004; Rocha-González et al., 2005; Sasaki et al., 2006; Dogrul et al., 2009) haciendo más difícil la identificación de su rol en la modulación nociceptiva durante estados de dolor crónico.

Algunos estudios han sugerido que las vías serotoninérgicas modulan la inhibición descendente (Millan 1995, 2002; Yoshimura y Furue, 2006; Song et al., 2009, 2011), como por ejemplo la administración espinal de serotonina disminuye la respuesta nociceptiva en la prueba de formalina (Rocha-González et al., 2005). En contraste, en un estudio reciente en el que se inhibió la síntesis de serotonina de la RVM por medio de un ARN de interferencia para triptófano hidroxilasa demostró una importante participación de las vías serotoninérgicas descendentes en la facilitación del dolor inflamatorio y neuropático (Wei et al., 2010). De igual forma, la administración intraplantar de carragenina (Rahman et al., 2004), intra-articular de monoacetato monosódico (Rahman et al., 2009), subcutánea de formalina (Oyama et al., 1996) y la ligadura de nervios (Susuki et al., 2004; Oatway et al., 2004) coinciden con el importante rol de la serotonina en la facilitación descendente. Sin embargo, aún se requiere mayor investigación sobre los mecanismos serotoninérgicos de facilitación descendente y su participación en el desarrollo y mantenimiento de los estados de dolor persistente y la presencia de hiperalgesia y alodinia secundarias.

3. MODELOS DE DOLOR INFLAMATORIO

Existen varios modelos para estudiar el dolor inflamatorio agudo y tónico o de larga duración (Le Bars et al., 2001). Todos ellos resultan en la lesión al tejido, ya sea por una incisión quirúrgica, quemadura, enfermedad autoinmune ó exposición a un estímulo químico. En todos los casos se activa el sistema inmune y se liberan mediadores inflamatorios (serotonina, prostaglandinas, bradicinina) que activan y sensibilizan a las fibras aferentes primarias y a las neuronas de órdenes superiores involucradas en la transmisión nociceptiva y contribuyendo a la aparición de hiperalgesia y alodinia (Granados-Soto et al., 2009).

Algunos de los métodos más utilizados son las pruebas de formalina (Dubuisson y Dennis, 1977; Abbott et al., 1995), capsaicina (Sakurada et al., 1992) y serotonina (Sufka et al., 1992), el modelo de ácido úrico, la prueba de carragenina (Granados-Soto et al., 2009) y el adyuvante de Freund (Donaldson et al., 1993). La prueba de formalina también ha sido caracterizada como método de generación de alodinia e hiperalgesia (Granados-Soto et al., 2009).

a) Prueba de Formalina

La prueba de formalina es bien conocida como un modelo de dolor inflamatorio de corta duración (~ 1 h). Sin embargo, varios estudios han demostrado que es capaz de inducir hiperalgesia y alodinia secundarias en la pata administrada y en la contralateral (Wiertelak et al., 1994; Wu et al., 2004; Sasaki et al., 2006; Godínez-Chaparro et al., 2011). La formalina produce hiperalgesia y alodinia secundarias a estímulos mecánicos (Filamentos de von Frey) detectados desde el día uno y que se mantienen hasta el día 12 (Granados-Soto et al., 2009; Ambriz-Tututi et al., 2009;

Godínez-Chaparro et al., 2011) ó 3 semanas (Fu et al., 2001) después de la administración de formalina. Los mecanismos y sitios por los cuales la formalina produce y mantiene estas conductas de largo plazo aún no se conocen completamente. Sin embargo, algunos estudios demuestran que están relacionados con su capacidad de generar sensibilización central (Coderre et al., 1990; Veiga et al., 2004), activación de la microglía (Fu et al., 1999, 2000; Wu et al., 2004) y facilitación descendente (Wiertelak et al 1997; Vierk et al., 2008; Ambriz-Tututi et al., 2011).

A continuación se realiza una revisión de uno de los mediadores involucrados en todo el proceso nociceptivo y que es motivo de esta tesis.

C. SEROTONINA

1. HISTORIA

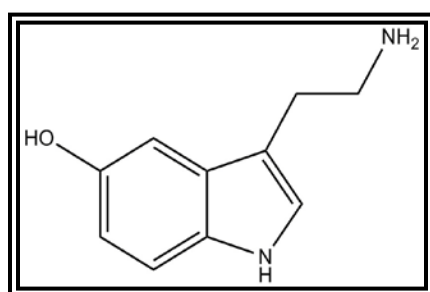
La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una indolamina (Figura 10) que fue aislada por primera vez por Erspamer y Vialli en 1937 de las células enterocromafines originadas de la mucosa gástrica e intestinal a la que se le llamó enteramina (Sjoerdsma y Palfreyman, 1990; Kema et al., 2000). Más tarde, Rapport y colaboradores en 1948 purificaron y caracterizaron una sustancia química del suero a la que llamaron 5-hidroxitriptamina la cual tenía potentes efectos vasoconstrictores (Azmitia, 1999). Luego se comprobó que la enteramina y la serotonina eran la misma sustancia (Rivera y Haddad, 1962). Cabe mencionar que fue a mediados de 1950 cuando se sugirió que la serotonina podía funcionar como una sustancia neurotransmisora en el cerebro de los mamíferos (Brodie y Shore, 1957).

2. LOCALIZACIÓN

La serotonina se distribuye ampliamente en las plantas y los animales, lo cual indica que este sistema es filogenéticamente antiguo. En los mamíferos, se observan altos niveles de serotonina en el intestino (células enterocromafines), pulmones, riñones y testículos (Azmitia et al., 1999). También se encuentra en las plaquetas y el sistema nervioso central. Únicamente en los roedores y el ganado encontramos serotonina en los mastocitos (Folk y Long, 1988).

En lo que respecta a su distribución en el sistema nervioso central, el sistema serotoninérgico se compone de un grupo de neuronas con cuerpos celulares morfológicamente diversos, los cuales se encuentran en algunas regiones de la formación reticular, pero principalmente en los núcleos del *Rafé dorsal* (NRD), *Rafé magno* (NRM), *Rafé oscuro* (NRO) y *Rafé pálido* (NRP) localizados en el tallo cerebral. Se ha demostrado que en los núcleos del *Rafé* la serotonina co-localiza con distintos neuropéptidos como la sustancia P, el glutamato, galanina, encefalina y neuropéptido Y, entre otros (Azmitia et al., 1999). Las proyecciones ascendentes son muy extensas y contienen muchas colaterales que inervan regiones de la corteza cerebral, ganglios basales, sistema límbico y diencefalo. La médula espinal recibe una fuerte inervación serotoninérgica descendente (Törk, 1990; Fink y Göthert, 2007). El núcleo del *Rafé magno* proyecta sus axones a través del funículo dorso lateral a las láminas I, II, IV, V y cerca del canal central mientras que el núcleo del *Rafé oscuro* y el núcleo del *Rafé pálido* descienden sus axones a motoneuronas localizadas en el asta ventral (Ruda et al., 1986; Törk, 1990).

3. ESTRUCTURA, SÍNTESIS Y METABOLISMO



Serotonina (5-HT)

Nombre IUPAC: 3-(2-Aminoetil)-1H-indol-5-ol

Peso Molecular: 176.09 g/mol

Figura10. Estructura de la serotonina. IUPHAR Data Base 2010.

La biosíntesis de serotonina en el humano representa sólo una parte mínima del metabolismo del triptófano, la mayor parte de éste es utilizado para la síntesis de proteínas y su mayor ruta catabólica es la vía de la kinurenina (Kema et al., 2000).

La mayoría de la serotonina se sintetiza en la periferia (95%), mientras que sólo una pequeña fracción es sintetizada en los cuerpos celulares de las neuronas serotoninérgicas (Ducy y Karsenty, 2010). Esto se lleva a cabo a partir del aminoácido esencial L-triptófano en un proceso de 2 pasos (Figura 11). Primero, la enzima triptófano hidroxilasa (EC 1.14.16.4) convierte el triptófano en 5-hidroxitriptófano (5-HTP) (Grahame-Smith, 1964). Anticuerpos contra la triptófano hidroxilasa han demostrado su presencia en varios tejidos como el tracto gastrointestinal, neuronas serotoninérgicas del cerebro, la glándula pineal y las plaquetas de perros, conejos y ratas (Grahame-Smith, 1964; Kema et al., 2000).

Finalmente la formación de la serotonina ocurre por la descarboxilación del 5-HTP, reacción catalizada por la triptófano descarboxilasa (EC 4.1.1.28) y utilizando como coenzima al piridoxal-5-fosfato (la forma activa de la vitamina B₆). La formación de 5-HTP es el paso limitante de la reacción y la disponibilidad de L-triptófano también regula la tasa de síntesis de la serotonina (Kema et al., 2000). Dietas altas

en triptófano aumentan el contenido tisular de serotonina, mientras que dietas deficientes causan niveles reducidos (Moir, 1971).

La serotonina se metaboliza vía desaminación oxidativa (monoamino-oxidasa, MAO), por conjugación con ácido glucorónico y sulfúrico. La MAO está localizada principalmente en la mitocondria y cataliza la desaminación oxidativa de diferentes monoaminas en sus correspondientes aldehídos, amonio y peróxido de hidrogeno.

Existen 2 isoformas de la MAO y la que tiene mayor afinidad por la serotonina es la MAO-A. El producto de la desaminación oxidativa, la 5-hidroxitriptofol (5-HTOL) puede ser oxidado a 5-hidroxitriptofol (5-HTOL) por medio de la aldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.3) y la coenzima NAD o bien, reducido a 5-hidroxitriptofol (5-HTOL) por medio de la aldehído reductasa (EC 1.1.1.1) y la coenzima NADH. La conjugación de serotonina con ácido sulfúrico o con ácido glucorónico representa una vía metabólica menor (Kema et al., 2000).

Además del metabolismo por acción de la MAO, existe un proceso de captación mediado por un cotransportador de Na^+ . El cual se encuentra localizado en la membrana exterior de las terminaciones axonianas serotoninérgicas y en la membrana exterior de las plaquetas (Feldman et al., 1997; Lindstedt et al., 2011).

4. FUNCIÓN

El sistema serotoninérgico está involucrado en funciones fisiológicas muy importantes, su actividad biológica tan variada y su complejidad farmacológica es debido a los diferentes subtipos de receptores a serotonina y la ubicación de los mismos (Müller et al., 2009). En el SNC la 5-HT afecta la función de muchas otras

neuronas y la liberación de neurotransmisores como acetilcolina, dopamina, noradrenalina y GABA (Fink y Göthert, 2007). La 5-HT actúa como un mediador químico de los impulsos parasimpáticos en el encéfalo, principalmente en el hipotálamo, en donde, junto a la adrenalina y noradrenalina en equilibrio mutuo, regulan el funcionamiento de los centros autónomos.

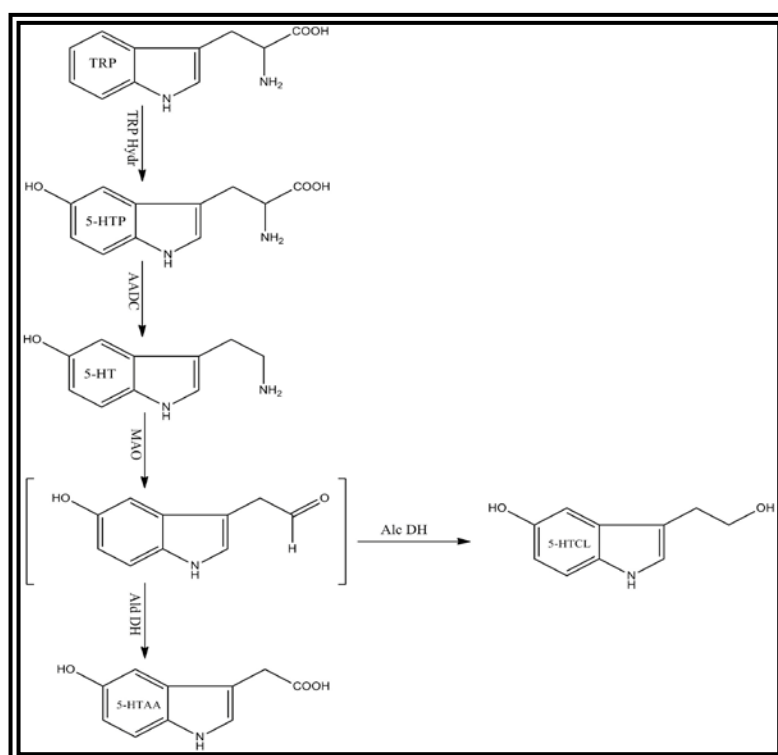


Figura 11. Biosíntesis y metabolismo de la serotonina. Modificado de Kema et al., 2000.
Abreviaciones: TRP; triptófano, TRP hydr; triptófano hidroxilasa, 5-HTP; 5-hidroxitriptófano, AADC; aromático-L-aminoácido descarboxilasa (triptófano descarboxilasa), 5-HT; serotonina, MAO; monoamino-oxidasa, Ald DH; aldehído deshidrogenasa, Alc DH; alcohol deshidrogenasa, 5-HTOL; 5-hidroxitriptofol.

Estas áreas controlan funciones como la presión arterial, temperatura corporal, apetito (Rivera y Haddad, 1962), liberación de prolactina y otras hormonas, vigilia, comportamiento emocional y percepción del dolor (Brodie y Shore, 1957; Gingrich y Hen, 2001; Fink y Göthert, 2007). La 5-HT también está involucrada en la patogénesis de enfermedades como hipertensión, disfunción hormonal, depresión y ansiedad (Fink y Göthert, 2007).

La 5-HT produce aumento de la contractilidad y tono del intestino, efecto que se produce por su acción directa sobre la musculatura lisa y posiblemente estimulando las fibras colinérgicas post-ganglionares (Gershon y Tack, 2007; Berger et al., 2009). Al administrar serotonina vía intravenosa se observó una disminución moderada del flujo plasmático renal, filtración glomerular, excreción de sodio y potasio y en general, disminución del volumen urinario. Su acción sobre el aparato respiratorio ha sido también estudiada y se caracteriza por aumento de la frecuencia y profundidad de la respiración (Rivera y Haddad, 1963). Se ha demostrado que la 5-HT periférica actúa como una hormona que inhibe la formación de hueso. Por el contrario, cuando se produce en el cerebro, la serotonina actúa como un neurotransmisor que ejerce un efecto positivo y dominante sobre la formación y acumulación de masa ósea y limita la resorción ósea (Ducy y Karsenty, 2010).

Aparte de su bien caracterizada función como neurotransmisor, la 5-HT ha sido reportada como un potente inmunoregulator por medio de la estimulación de receptores serotoninérgicos en monocitos de humano. En las células epiteliales pulmonares se le ha asociado con la secreción de citocinas pro-inflamatorias (Rivera y Haddad, 1963). Adicionalmente, la 5-HT juega un rol en la activación de células T y su interacción con células dendríticas. Además, la 5-HT tiene actividad quimiotáctica para eosinófilos, mastocitos y células dendríticas inmaduras vía activación de los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT₂, mientras la modulación de la secreción de IL-6, CXCL10, CCL22 y la maduración de las células dendríticas se lleva a cabo por la activación de los receptores 5-HT₇ y 5-HT₄ (Muller et al., 2009).

5. SEROTONINA Y DOLOR

Existe una gran cantidad de evidencia que sugiere que la 5-HT juega un papel muy importante en la modulación de la transmisión nociceptiva (Richardson, 1990; Millan, 1995; Sommer, 2004; Jeon et al., 2004; Oliveira et al., 2007). A nivel periférico la 5-HT se considera un mediador inflamatorio el cual es liberado de plaquetas, células cebadas y células endoteliales después de lesión tisular y que ejerce acción directa sobre las fibras aferentes primarias, principalmente fibras C (Sommer, 2004; Moalem et al., 2005). La 5-HT es capaz de potenciar el comportamiento nociceptivo al ser administrada junto con otros agentes (Hong y Abbott, 1994). La administración intraplantar de 5-HT (0.05, 0.25, 0.5, o 1.0 nmoles) produce edema en la pata de la rata y de manera dependiente de la concentración incrementa el comportamiento nociceptivo caracterizado por sacudidas y lamidas (Sufka et al., 1992; Doak y Sawynok, 1997; Sommer, 2004). Nakajima et al (2009) demostraron por medio de microdiálisis que la formalina libera serotonina de manera dependiente de la concentración con su pico máximo a los 18 min de la segunda fase de la prueba de formalina, y que la administración de cromoglicato, un estabilizador de la membrana de células cebadas, suprime la liberación de serotonina y la conducta nociceptiva. Se ha observado que varios receptores a 5-HT están involucrados en el comportamiento nociceptivo provocado por la administración de formalina (Doak y Sawynok, 1997; Rocha-González et al., 2005; Castañeda-Corral et al., 2009; Granados-Soto et al., 2010). La 5-HT induce hiperalgesia por sensibilización de fibras aferentes primarias (Oliveira et al., 2007). También se ha demostrado que los receptores 5-HT_{4/6/7} periféricos están involucrados en el

desarrollo y mantenimiento de hiperalgesia y alodinia secundarias inducidas por la administración de formalina (Godínez-Chaparro et al., 2011). Por otro lado, Tambelli et al en el 2006 demostraron que el efecto nociceptivo de la administración subcutánea de 5-HT era indirecto, porque este efecto se veía atenuado por la depleción de polimorfonucleares e inhibición de la cicloxigenasa.

Con respecto a su participación a nivel espinal varios investigadores han demostrado que la administración intratecal de serotonina modula la nocicepción en distintos modelos animales. Actividad pronociceptiva y antinociceptiva se ha observado en el asta dorsal de la médula espinal por acción sobre sus distintos subtipos de receptores (Oyama et al., 1996, Millan, 1995, 1999, 2002; Jeong et al., 2004; Dogrul et al., 2009; Castañeda-Corral et al., 2009). Las vías descendentes serotoninérgicas provenientes de la médula rostral ventromedial modulan la directamente la actividad de neuronas de proyección y de interneuronas y de las fibras aferentes primarias por sinapsis axo-axónicas (Millan, 1995; Rahman et al., 2006). Existe evidencia de plasticidad de las vías serotoninérgicas bajo condiciones de estimulación nociceptiva y daño tisular o nervioso La administración intratecal de 5,7di-hidroxitriptamina (5, 7, DHT) en ratas con ligadura de nervios provocó una disminución en el número de retiros de la pata de las ratas al ser estimuladas mecánicamente o con frío comparadas con el grupo control, sugiriendo una influencia facilitadora de la 5-HT en la nocicepción (Rahaman et al., 2006). Wei et al en 2010 coincidieron con lo anterior al realizar un estudio mucho más fino en el que se inhibió la síntesis la serotonina de la RVM. Los grupos con disminución de 5-HT en la médula espinal mostraron una sensibilidad normal a la estimulación

nociceptiva aguda. Sin embargo, en este mismo grupo se atenuó significativamente la respuesta nociceptiva inducida por formalina y la alodinia e hiperalgesia provocadas por la lesión tisular y nerviosa.

6. RECEPTORES DE SEROTONINA

La historia de los receptores de serotonina inicia con el trabajo de Gaddum y Picarelli (1957) quienes definieron 2 subtipos de receptores llamados D y M, nombres basados en el bloqueo de los mismos por dibenzilina o morfina, respectivamente (Verge et al., 2000). Debido al desarrollo de sofisticadas herramientas farmacológicas en la década de 1980 quedó claro que existían más de dos subtipos de receptores 5-HT (Raymond et al., 2001). La síntesis de compuestos con mayor afinidad y selectividad condujeron a una clasificación posterior. Bradley et al (1986) distinguieron 3 subtipos de receptores. Ellos encontraron que los receptores D tenían alta afinidad por antagonistas como la ketanserina, denominándolos 5-HT₂, mientras que los receptores M demostraron alta afinidad por antagonistas como el MDL 72 222 y agonistas como la 2-metil-5-HT designándoles el nombre de 5-HT₃. Finalmente se identificó un receptor que tenía alta afinidad a la 5-HT pero con una farmacología muy distinta a la de los otros receptores y a éstos se les denominó 5-HT₁ (Zelman et al., 1988).

Más recientemente un gran número de genes que codifican para receptores de 5-HT han sido identificados y su correspondiente distribución de ARNm ha sido descrita (Boess y Martin, 1994).

Tabla 1. Características operacionales de los receptores a 5-HT. Modificado de Hoyer et al., 1994.

Receptor	Subtipo	Localización	Respuesta	Agonistas	Antagonistas	Comentarios
5-HT ₁	5-HT _{1A}	Neuronal principalmente SNC	Hiperpolarización neuronal, hipotensión	8-OH-DPAT, buspirona, 5-CT	WAY 100135 [metiotepina (no selectivo)]	Está bien caracterizado, pero los antagonistas selectivos son muy recientes
	5-HT _{1B}	SNC y algunos nervios periféricos	Inhibe la liberación de neurotransmisores	CP93,129, 5-CT	SDZ 21009 [metiotepina (no selectivo)]	Parece ser el equivalente en roedores del 5-HT _{1DB}
	5-HT _{1D}	Principalmente en SNC	Inhibe la liberación de neurotransmisores	Sumatriptan, L 694247, 5-CT	GR 127935 [metergolina, metiotepina (no selectivo)]	Se han clonado dos tipos de genes (5-HT _{1Du} y 5-HT _{1DB})
	5-HT _{1E}	Sólo en SNC	Inhibe la adenilato ciclasa	5-HT	Ninguno [metiotepina (débilmente)]	Sus funciones en el tejido intacto no se conocen
	5-HT _{1F}	Principalmente en SNC	Inhibe la adenilato ciclasa	5-HT	Ninguno [metiotepina (débilmente)]	Sus funciones en el tejido intacto no se conocen
	5-HT _{1-like} (ahora 5-HT ₇)	Vasculatura intracraneal	Contracción de músculo liso	Sumatriptan, 5-CT	Ninguno [metiotepina (no selectivo)]	Aun no está bien caracterizado.
5-HT ₂	5-HT _{2A}	Musculo liso vascular, plaquetas, pulmón, SNC, tracto GI	Vasoconstricción, agregación plaquetaria, broncoconstricción	α -metil-5-HT, DOI	Ketanserina, cinanserina, pirenperona	Es el clásico 5-HT ₂ que incrementa el metabolismo de PI
	5-HT _{2B} (previamente 5-HT _{1F})	Principalmente periférico	Contracción de la musculatura del fondo gástrico de rata	α -metil-5-HT, DOI	SB200646 (También antagonistas 5-HT _{2C})	Incrementa el metabolismo de PI
	5-HT _{2C} (previamente 5-HT _{1C})	SNC (alta densidad en plexo coroideo)	Incrementa el cambio de PI	α -metil-5-HT, DOI	Mesulergina, (También antagonistas 5-HT _{2A})	Incrementa el metabolismo de PI
5-HT ₃		Neuronas periféricas y centrales	Despolarización	2-metil-5-HT, <i>m</i> -clorofenilbiguanida	Ondansetrón, tropisetron	Efector de muchos reflejos neuronales de 5-HT en la periferia
5-HT ₄		Tracto GI, SNC, corazón, vejiga, fibras aferentes primarias (FAP)	Activación de la liberación de Ach en intestino, taquicardia, AMPc en neuronas del SNC	Metoclopramida, renzaprida (agonista parcial), 5-HT	GR 113808, SB 204070, tropisetron (débilmente)	Esta acoplado positivamente a adenilato ciclasa
5-HT _{5A} y 5-HT _{5B}		SNC	No conocido	5-HT	Metiotepina	Sus funciones en el tejido intacto no se conocen.
5-HT ₆		SNC y periférico (FAP)	Activación de adenilato ciclasa (células HEK 293)	5-HT	Metiotepina	Sus funciones en el tejido intacto no se conocen.
5-HT ₇		SNC y periférico (FAP)	Activación de adenilato ciclasa (células HeLa y COS)	5-HT	Metiotepina	Sus funciones en el tejido intacto no se conocen.

En los últimos 14 años por medio de estudios de clonación molecular se ha confirmado la existencia de 14 subtipos de receptores cada uno codificado por genes distintos. La mayoría pertenecen a una gran familia de receptores que codifican proteínas que traducen señales a través de la unión de nucleótidos de guanina y proteínas reguladoras G (Figura 12) (Raymond et al., 2001).

a) Clasificación

Los receptores a 5-HT se han dividido en 7 subfamilias, que se caracterizaron por la superposición de sus propiedades farmacológicas (Tabla 1), la secuencia de aminoácidos, la organización de sus genes y el acoplamiento con segundos mensajeros (Tabla 2) (Hoyer et al., 1994; Peters et al., 2010).

Tabla 2. Clasificación de los receptores de 5-HT según su mecanismo transduccional. Modificado de Giordano y Schultea 2004.

Familia	Receptor (es)	Mecanismo de acción
Acoplados a proteína $G_{ai/o}$	5-HT _{1A/1B/1D/1E/1F} 5-HT _{5A/5B}	Inhibición de adenilato ciclasa
Acoplados a proteína $G_{aq/11}$	5-HT _{2A/2B/2C}	Activación de fosfolipasa C
Acoplados a proteína G_s	5-HT ₄ 5-HT ₅ 5-HT ₆ 5-HT ₇	Activación de adenilato ciclasa
Canal iónico	5-HT ₃ (subunidades A y B)	Canal iónico dependiente de ligando Corrientes entrantes de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺

(1) Acoplados a proteína $G_{ai/o}$ *Receptores 5-HT₁*

Peroutka y Snyder en 1979 realizaron la caracterización inicial de los receptores 5-HT₁ por medio de estudios de radioligando encontrando sitios de unión con alta afinidad para [³H]-5-HT en corteza de rata y con baja afinidad para espiperona. Más tarde, se identificaron los subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C} (ahora 5-HT_{2C}), 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F} (Barnes et al., 1999). Todos ellos están localizados en la periferia jugando un rol importante en la nocicepción (Granados-Soto et al., 2010).

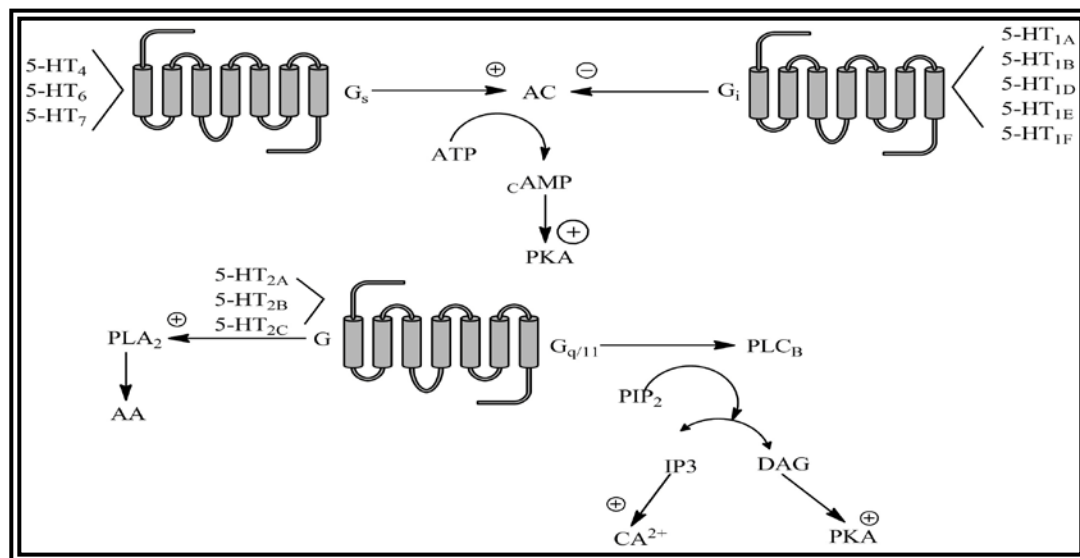


Figura 12 .Vías de señalización de los receptores de 5-HT acoplados a proteína G (Raymond et al., 2001).
Abreviaciones; AC: adenilato ciclasa, cAMP: Adenosin monofosfato cíclico, ATP: adenosin trifosfato, PKA: protein-cinasa A, PLA₂: fosfolipasa A₂, AA: ácido araquidónico, PLCβ: fosfolipasa Cβ, PIP₂: fosfatidil inositol bifosfato, IP₃: inositol trifosfato, DAG: diacilglicerol, PKC: proteincinasa C.

El receptor 5-HT_{1A} es el mejor caracterizado. Su activación abre y cierra canales de K⁺ y Ca²⁺, respectivamente, ejerciendo así una influencia inhibitoria pronunciada sobre la excitabilidad neuronal.

El receptor 5-HT_{1A} se encuentra localizado ampliamente en el hipocampo, áreas de la corteza, septo lateral, núcleos del Rafé dorsal y medio, asta dorsal de la médula espinal en láminas superficiales y profundas y también se le ha identificado en fibras aferentes primarias (Boess y Martin, 1994; Hoyer et al., 1994; Barnes et al., 1999; Millan, 2002). Existen reportes que indican su presencia en células de la glía (Barnes, 1999). El receptor 5-HT_{1A} juega un papel importante en la función neuroendocrina y termorregulación, comportamiento sexual, apetito, memoria, función inmune, depresión y dolor (Raymond et al., 2001). Millan (1994) no encontró efecto antinociceptivo del receptor 5-HT_{1A} a estímulos térmicos, mecánicos y químicos. Sin embargo, recientemente se ha reportado que la activación del receptor 5-HT_{1A} reduce la nocicepción (Oyama et al., 1996; Bardin et al., 2001; Granados-Soto et al., 2010).

El receptor 5-HT_{1B} fue identificado en ratones por Voigt et al (1991) y Adham et al (1992) por medio de una sonda creada a partir de la clonación del receptor 5-HT_{1Dβ} humano. La activación del receptor 5-HT_{1B} incrementa las corrientes de K⁺ que contribuyen a su acción inhibitoria sobre la excitabilidad neuronal (Boess y Martin, 1994). Este receptor está ampliamente expresado en el cerebro de forma pre-sináptica y post-sináptica incluyendo sustancia negra, globo pálido, colículo superior, núcleos de Rafé, estriado, cerebelo, hipocampo, núcleo acumbes (Hoyer et al., 1994). Se han encontrado sitios de unión al receptor 5-HT_{1B} en el asta dorsal de la médula espinal, en particular en las láminas superficiales I y IV principalmente localizados de forma post-sináptica en fibras serotoninérgicas y en neuronas de proyección. La eliminación de fibras aferentes primarias desaparece solo una pequeña proporción de estos receptores en la médula espinal (Millan, 2002).

Con respecto a su participación en la modulación de la nociepción se sabe que el receptor 5-HT_{1B} juega un papel inhibitorio. La administración local periférica de sumatriptán reduce la hiperalgesia térmica y la inflamación periférica producida por carragenina (Sommer, 2004). Por otro lado, los ratones knock out 5-HT_{-/-1B} tienen la sensibilidad incrementada en las pruebas de formalina y de la plancha caliente (Kayser et al., 2007). Consistentemente con lo anterior, la administración periférica local ipsilateral del agonista selectivo de los receptores 5-HT_{1B} (CGS-12066) redujo el comportamiento nociceptivo en ambas fases de la prueba de formalina (Granados-Soto et al., 2010).

El receptor 5-HT_{1D}, antes llamado 5-HT_{1D α} por sus similitudes con el receptor 5-HT_{1D β} (5-HT_{1B}), resultó ser un homólogo al receptor 5-HT_{1D} descubierto en rata y por ello denominado como ahora se le conoce. El 5-HT_{1D} está acoplado negativamente a la adenilato ciclasa, es capaz de regular canales de K⁺ y Ca²⁺ (Barnes et al., 1999; Raymond et al., 2001) y puede formar heterodímeros con el 5-HT_{1B} (Hannon et al., 2008). Inicialmente fue difícil conocer su distribución por la falta de ligandos específicos y los aparentes bajos niveles de ARNm y de proteína en el cerebro (Raymond et al., 2001). Más tarde el ligando selectivo BRL 15572 permitió documentar autoreceptores en el núcleo del Rafé dorsal (Hannon et al., 2008). También se ha encontrado el ARNm del receptor 5-HT_{1D} en el núcleo trigeminal donde co-localiza con CGRP, sustancia P y la óxido nítrico sintasa (Barnes et al., 1999). También está expresado en el ganglio de la raíz dorsal (Pierce et al., 1996; Wu et al., 2001). Por medio de estudios de auto-radiografía del receptor se ha encontrado en ganglios basales, hipocampo y corteza (Barnes et al., 1999). Solo existen algunos estudios conductuales que indican que los receptores 5-HT_{1D}

tienen un efecto antinociceptivo (Granados-Soto et al., 2010) y algunos autores proponen que pudiera deberse a que inhiben la liberación de serotonina y otros neuropeptidos (Barnes et al., 1999; Raymond et al., 2001; Hamon y Bourgoin, 2000).

El receptor 5-HT_{1E} fue identificado por medio de estudio de radioligando en corteza frontal humana (Hannon et al., 2008). El receptor 5-HT_{1E} está acoplado de forma negativa a la adenilato ciclasa y se ha localizado en el putamen, núcleo caudado y amígdala (Barnes et al., 1999). Por estudios conductuales se ha especulado que se encuentra también en la periferia (Granados-Soto et al., 2010). Se sabe que tiene alta afinidad por la 5-HT y baja afinidad por la 5-CT, pero a la fecha no existen ligandos específicos para el receptor.

El gen del receptor 5-HT_{1F} fue originalmente detectado en el ratón. El receptor 5-HT_{1F} está acoplado negativamente a adenilato ciclasa (Barnes y Sharp, 1999). Se ha identificado el ARNm en ganglio de raíz dorsal (Pierce et al 1996; Chen et al., 1998). También muestra una alta expresión del mismo en la corteza olfatoria, núcleo caudado, corteza cingulata, amígdala, hipotálamo, núcleo del Rafé dorsal, sustancia gris periacuedutal, núcleo del tracto solitario (Millan, 2002; Hannon et al., 2008). Se conoce su alta afinidad por el sumatriptán y se han desarrollado ya dos agonistas selectivos del mismo (LY-334370 y LY-344864). Se desconoce mucho sobre sus efectos funcionales pero se cree que puede jugar un papel importante en la función visual y cognitiva y como autoreceptor (Barnes y Sharp, 1999). Wu et al en el 2001 encontraron un aumento en la expresión del receptor 5-HT_{1F} después de la administración de adyuvante de Freund. Por otro lado, Granados-Soto y

colaboradores (2010) sugieren que los receptores 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F} pueden estar involucrados en la inhibición de la conducta nociceptiva provocada por formalina.

Receptores 5-HT₅

Se han clonado en ratones dos subtipos del receptor 5-HT₅ que comparten el 70% de la secuencia, el 5-ht_{5A} y el 5-ht_{5B}. Sus vías de transducción no han sido bien establecidas. Estudios en líneas celulares han ayudado a sugerir que está acoplado negativamente a adenilato ciclasa. Sin embargo, puede estar acoplado de forma positiva a AMPc, producción de fosfatidil inositol y canales de K⁺ (Hannon et al., 2008). Se ha demostrado su presencia en corteza cerebral, hipocampo, cerebelo, hipotálamo, estriado, astrocitos y médula. Únicamente el 5-HT₅ se ha detectado en tejidos periféricos como hígado, corazón y riñón de roedores. Sin embargo, se han encontrado codones de paro en su secuencia por lo que pudiera no ser funcional en humanos (Barnes y Sharp, 1999; Raymond et al., 2001). Se ha descrito su localización en neuronas de proyección e interneuronas, mientras que la presencia del ARNm del receptor en el GRD ha sido inconsistente (Pierce et al., 1996; Chen et al., 1998; Wu et al., 2001; Nicholson et al., 2003).

Se cree que la activación del receptor 5-HT₅ puede estar implicada en la adquisición de conductas adaptativas en situaciones de estrés, ya que el A843277, un agonista selectivo de este receptor, tiene propiedades antidepresivas y antipsicóticas en ratones.

La importancia de continuar investigando sobre su funcionalidad radica en que su distribución se concentra en estructuras que modulan los procesos nociceptivos. Sin

embargo, a la fecha no se han realizado estudios directos que demuestren su actividad en la modulación del dolor.

(2) Receptores acoplados a Proteína $G_{\alpha q/11}$

Receptores 5-HT₂

Existen 3 subtipos de receptores 5-HT₂, el 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}. Los 3 están acoplados a proteína $G_{\alpha q/11}$ y su activación incrementa el fosfatidil inositol y las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , acciones que incrementan la excitabilidad neuronal. El receptor 5-HT_{2A} se refiere al receptor D inicialmente descrito por Gaddum y Picarelli en 1957 y al 5-HT₂ definido por Peroutka y Snyder en 1979. El 5-HT_{2B} fue descrito hace más de 30 años mediante la acción contráctil de la 5-HT en el fondo gástrico de la rata. El tercer subtipo antes conocido como 5-HT_{1C} identificado en el plexo corioideo (Hannon et al., 2008). La familia de estos receptores se caracteriza por su alta afinidad por agonistas como DOI, DOM y antagonistas como ritanserina. Actualmente se han desarrollado antagonistas más potentes y selectivos como MDL-100907 y SB-200646 (Barnes y Sharp, 1999).

El receptor 5-HT_{2A} está ampliamente distribuido en el cerebro (núcleo caudado, núcleo acumbens, corteza, hipocampo), músculo esquelético y liso, riñones y plaquetas (Raymond, 2001). El ARNm del receptor 5-HT_{2A} se ha encontrado en mayor proporción en el GRD (Pierce et al., 1996; Chen et al., 1998; Wu et al., 2001; Nicholson et al., 2003) que en la médula espinal donde se encuentra localizado en terminales centrales de las fibras aferentes primarias, neuronas de proyección e interneuronas inhibitorias. Se ha observado que su activación tiene efectos pronociceptivos en la periferia (Millan, 2002; Sommer, 2004). La administración de

antagonistas del receptor 5-HT_{2A} atenúan la alodinia mecánica secundaria y la hiperalgesia térmica primaria después de la lesión por calor (Sasaki et al., 2006). A nivel supraespinal el receptor 5-HT_{2A} también está localizado en el núcleo parabraquial, núcleo del tracto solitario, núcleo del Rafé magno, RVM, PAG por lo que se cree que el receptor 5-HT_{2A} está involucrado en la antinocicepción.

El receptor 5-HT_{2B} se ha detectado en distintos tejidos como corazón, intestino, riñones, pulmones (Hoyer et al., 1994) y de manera controversial en el cerebro y GRD (Pierce et al., 1996; Chen et al., 1998; Wu et al., 2001; Nicholson et al., 2003). Su activación posee propiedades ansiolíticas y media la vasorelajación dependiente de endotelio.

El receptor 5-HT_{2C} está acoplado positivamente a fosfolipasa C. Se ha localizado su ARNm en corteza, áreas del sistema límbico y ganglios basales, así como en áreas importantes de modulación del dolor como el núcleo del Rafé dorsal, sustancia gris periacueductal, núcleo parabraquial, y locus coeruleus donde se encuentra sobre interneuronas GABAérgicas ejerciendo una influencia inhibitoria en la transmisión noradrenérgica y dopaminérgica.

Existe poca información sobre la participación en el dolor de estos últimos subtipos del receptor 5-HT₂. Sin embargo, recientemente se encontró su expresión en el GRD y su posible participación en la producción de hiperalgesia mecánica en ratones (Lin et al., 2011).

(3) Receptores acoplados a proteína G_s

Los receptores 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ forman parte de esta familia de receptores acoplados a proteína G_s que promueven la formación de AMPc por la activación de

adenilato ciclasa interactuando con varios blancos como la fosforilación de proteincinasa A y canales que modulan el flujo de Ca^{2+} y la excitabilidad neuronal. Otros procesos celulares mediados por este segundo mensajero son cambios en la expresión génica y promoción de cambios celulares de larga duración (Hannon et al., 2008).

Receptores 5-HT₄

Fue el primero caracterizado en el SNC (Boess y Martin, 1994). Algunas benzamidas y agonistas del 5-HT₃ tienen efecto de agonistas sobre este receptor. Entre sus funciones está la modulación de la secreción y motilidad intestinal mediante la liberación de acetilcolina y otros neurotransmisores (Boess y Martin, 1994; Barnes y Sharp, 1999). Su ARNm se encuentra expresado en fibras aferentes primarias (Chen et al., 1998; Nicholson et al., 2003) tanto en su terminal periférica como en la central. Se ha observado que se incrementa su expresión después de la administración de un agente inflamatorio (Wu et al., 2001; Liu et al., 2005). A nivel supraespinal está localizado en la PAG, núcleo del tracto solitario y núcleo parabraquial (Millan, 2002). Diversos estudios han encontrado que juega un papel pronociceptivo en la periferia (Doak y Sawynok, 1997; Sommer, 2004; Godínez-Chaparro et al., 2011). Sin embargo, su papel en la médula espinal se considera es antinociceptivo, probablemente mediante vías colinérgicas descendentes (Millan, 2002).

Receptor 5-HT₆

Dos grupos clonaron el ADNc del receptor en 1993 en el estriado de la rata. Se ha localizado en amígdala, hipocampo, corteza, tálamo, hipotálamo de rata principalmente de manera post-sináptica (Barnes y Sharp, 1999; Raymond et al., 2001; Hannon et al., 2008). De acuerdo con ello, el receptor 5-HT₆ participa en la modulación de la función colinérgica, actividad locomotora, desordenes afectivos, cognición y obesidad. También se ha encontrado en la PAG, médula espinal y GRD (Gerard et al., 1996; Lui et al., 2005). Sin embargo, su presencia en el GRD parecía poco probable (Pierce et al., 1996; Chen et al., 1998; Wu et al., 2001; Nicholson et al., 2003). La administración de los antagonistas selectivos del receptor 5-HT₆ (SB-399885 o SB 258585) en la periferia reduce el comportamiento nociceptivo provocado por formalina (Castañeda-Corral et al., 2009). Por otro lado, el agonista selectivo EMB386088 administrado en la periferia o en la médula espinal es capaz de incrementar la hiperalgesia y alodinia mecánicas secundaria de larga duración inducidas por formalina (Godínez-Chaparro et al., 2011). Ambos datos sugieren que si está presente en las fibras aferentes primarias y que está implicado en la transmisión nociceptiva.

Receptor 5-HT₇

El ADNc del receptor 5-HT₇ se ha identificado por varios grupos en varias especies distintas y ahora se sabe que es el antes llamado 5-HT_{1like} (Hoyer et al., 1994; Raymond et al., 2001; Hannon et al., 2008). Existen al menos 4 isoformas reportadas que difieren en su extremo carboxilo terminal pero esto no modifica su farmacología, mecanismo de transducción o distribución (Barnes y Sharp, 1999;

Raymond et al., 2001). El perfil farmacológico de este receptor está caracterizado por su alta afinidad a agonistas como la 5-CT, 5-HT y 8-OH-DPAT y a antagonistas 5-HT₂ (metergolina y metisergida). Actualmente se cuenta con antagonistas selectivos como SB 258719 y SB 269970 (Rocha-González et al., 2005). Este receptor está distribuido en el SNC principalmente en tálamo, hipotálamo, hipocampo, corteza, núcleo del Rafé dorsal, sustancia negra y sustancia gris periacueductal (Hannon et al., 2008). Se ha encontrado su ARNm en el GRD (Pierce et al., 1996) y se ha observado que después de la administración de adyuvante de Freund (Wu et al., 2001) o veneno de abeja (Lui et al., 2005) se incrementa su expresión. Se ha descrito que los receptores juegan un papel pronociceptivo tanto en la periferia como a nivel espinal en el modelo de formalina (Rocha-González et al., 2005). También que la administración periférica del antagonista selectivo del receptor es capaz de prevenir y revertir la hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias de larga duración inducidas por formalina (Godínez-Chaparro et al., 2011). Sin embargo, en la médula espinal su papel sigue siendo controversial, debido a que algunos datos han sugerido que la serotonina ejerce su papel inhibitorio en médula espinal a través de este receptor, posiblemente actuando sobre inter-neuronas inhibitorias (Bourgoin et al., 2008). Por lo que serán necesarios más estudios para dilucidar el papel de los receptores 5-HT₇ en la médula espinal y su participación en el proceso nociceptivo.

(4) Receptor 5-HT₃, un canal iónico

Hace más de 50 años fue descrito por primera vez como el receptor M en un estudio de la función contráctil de la 5-HT en el íleo de cobayo (Gaddum y Picarelli, 1957).

La denominación actual se aplicó después de la reclasificación de los receptores 5-HT realizada por Bradley et al (1986) y fue oficialmente aprobado por NC-IUPHAR en 1994. Este receptor pertenece a la súper-familia de canales iónicos dependientes de ligando que incluye a los receptores nicotínicos, al receptor de ácido gamma-amino-butírico (GABA_A) y los receptores de glicina sensibles a estricnina (Peters et al., 2010). Se encuentra localizado en el cromosoma 11q23.1-q23.2. El receptor 5-HT₃ está formado por 5 subunidades que están ensambladas de tal manera que forman un canal iónico central. Las subunidades individuales tiene un dominio N-terminal largo, 4 dominios transmembranales (M1-M4) conectados de manera intracelular en las vueltas M1-M2 y M3-M4 y de forma extracelular en las vueltas M2-M3 (Nichols et al., 2008; Barnes et al., 2009; Walstab et al., 2010). Los sitios de unión para el ligando están en la interface entre 2 subunidades (Figura 13). En humanos se han clonado 5 subunidades para el receptor (5-HT_{3A/B/C/D/E/Ea}). Sin embargo, solo se han caracterizado por estequiometría y considerado funcionales los homopentámeros (5 subunidades de 5-HT_{3A}) y los heterómeros (2 subunidades 5-HT_{3A} y 3 subunidades 5-HT_{3B}, formando el receptor 5-HT_{3AB}). Por otro lado, se sabe que las subunidades 5-HT_{3B}, 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D}, 5-HT_{3E} y su isoforma 5-HT_{3Ea} forman receptores no funcionales, únicamente si son co-expresadas con la subunidad 5-HT_{3A} forman complejos heteroméricos con distinta eficacia al unirse con la 5-HT (Davies et al., 1999; Nielser et al., 2007; Nichols et al., 2008; Barnes et al., 2009; Peters et al., 2010).

El receptor 5-HT₃ conduce cationes (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) de forma no selectiva y excluye a los aniones. Su activación por serotonina produce la apertura de su poro y con ello

se activa una corriente entrante iónica que después desensibiliza al receptor (Hoyer et al., 1994; Nichols et al., 2008).

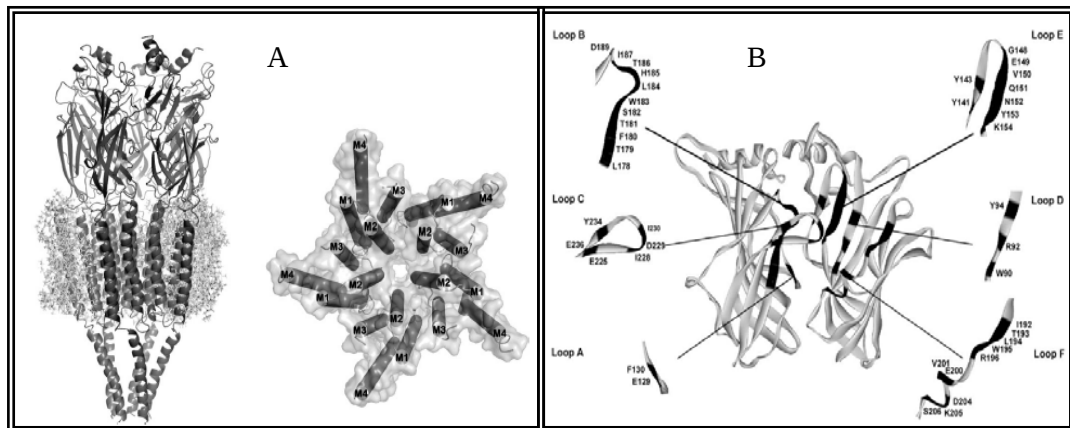


Figura 13. (A) Representación del receptor 5-HT₃ mostrando su estructura pentamérica. Se observan los dominios transmembranales de cada subunidad (Nichols et al., 2008). **(B)** Modelo del sitio de unión del ligando en el receptor 5-HT₃ mostrando 2 de 5 subunidades. El sitio de unión se encuentra en la interface de las 2 subunidades principalmente formado por los loop A-C y de manera complementaria de los D-F (Barnes et al., 2009).

Sin embargo, varios estudios de estructura-actividad han demostrado que el factor determinante en la conductancia del receptor 5-HT_{3A} y su selectividad iónica reside en la secuencia de aminoácidos del dominio M2 (Barnes et al., 2009). Por otro lado, Davies et al en 1999 encontraron que la permeabilidad del receptor en el humano al Ca²⁺ depende de su composición. Así el homopentámero 5-HT_{3A} es permeable a cationes monovalentes y divalentes, pero la incorporación de la subunidad 5-HT_{3B} reduce su permeabilidad al calcio (Davies et al., 1999) y altera la biofísica del receptor (Hapfelmeier et al., 2003.)

La activación del receptor también activa protein-quinasas que provocan la unión y activación de calcio-calmodulina y que a su vez colaboran con la producción de efectos nucleares (por ejemplo, la inducción de proto-oncogenes) e induce un incremento del óxido nítrico que provoca una gran variedad de efectos intracelulares

(alteraciones fisicoquímicas de la membrana, modificación de los receptores NK1, aumento de GMPC) y extracelulares (vasodilatación y neurotransmisión post-sináptica) (Figura 14). El receptor es modulado de manera alostérica por anestésicos locales y esteroides sexuales (Giordano y Schultea, 2004).

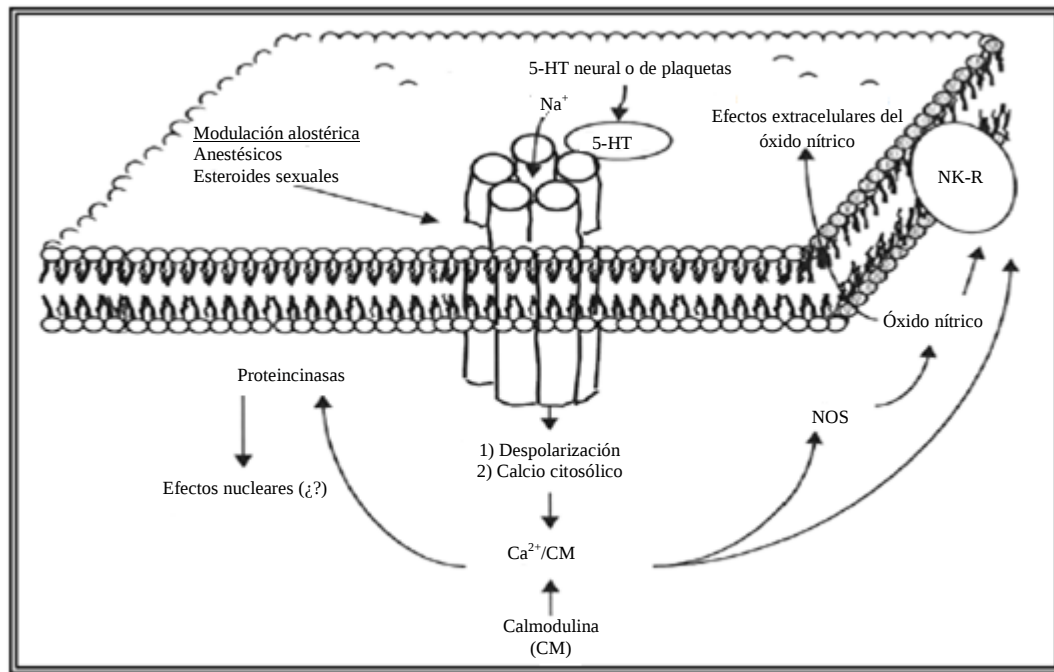


Figura 14. Representación de las cascadas de señalización que se desencadenan después de la activación del receptor 5-HT₃. *Abreviaturas;* 5-HT: 5-hidroxitriptamina, NK-R: receptor a neurocinina, NO: óxido nítrico, Nos: óxido nítrico sintasa. Modificado de Giordano y Schultea, 2004.

La activación de los receptores 5-HT₃ tiene profundas influencias sobre los principales sistemas del cuerpo. Sus efectos principales en el sistema cardiovascular son en el corazón en donde puede estimularlo o inhibirlo en combinación con reflejos y efectores locales y en los vasos sanguíneos donde produce vasodilatación (Kaumann et al., 2006; Hannon et al., 2008). A nivel del tracto gastrointestinal regula distintos efectos en el control del tono, vaciamiento y la secreción intestinal (Raybould, et al., 2003). Está asociado también con la producción de náuseas y

vómito generados por la quimioterapia y radioterapia, y con el síndrome del colon irritable (Faerber et al., 2007; Nichols et al., 2008; Walstab et al., 2010). Se ha observado que el receptor 5-HT₃ también media la contracción rápida de la vejiga urinaria de gato.

La activación del receptor neuronal causa despolarización de las terminales pre-sinápticas resultando en la modulación de la liberación de distintos neurotransmisores incluyendo GABA, glutamato, colesistocinina, acetilcolina, dopamina, noradrenalina, serotonina y sustancia P (Wolff et al., 2000; Peng et al., 2001; Fink y Göthert, 2007; Peters et al., 2010). Por ello, en el sistema nervioso central los antagonistas del receptor 5-HT₃ tienen una influencia profunda en el comportamiento, memoria (Fink y Göthert, 2007) y está implicado en psicosis, ansiedad, cognición y desordenes de alimentación (Walstab et al., 2010). Además, su activación está implicada en la sensibilización de nociceptores periféricos y modulación del dolor (Fink y Göthert, 2007; Faerber et al., 2007).

7. DOLOR Y RECEPTORES 5-HT₃

La complejidad del proceso inflamatorio y su relación con la nocicepción aún no están comprendidos completamente. La serotonina y los receptores 5-HT₃ juegan un papel importante. Los receptores 5-HT₃ se han encontrado en el SNC, en la periferia y en la médula espinal y numerosos experimentos en distintos modelos de dolor han comprobado su participación en los tres niveles.

a) Receptores 5-HT₃ en la periferia

Los receptores 5-HT₃ periféricos están expresados en las terminales aferentes de los nociceptores. Por medio de estudios de electrofisiología se sabe que la activación axonal del receptor 5-HT₃ no sólo incrementa la excitabilidad membranal (Hicks et al., 2002), sino que también modula los potenciales de acción de alta frecuencia en fibras no mielinizadas (Lang et al., 2006). Herramientas farmacológicas han demostrado los efectos de la activación del receptor 5-HT₃ sobre el dolor y la vasodilatación después de la administración intradérmica de serotonina o capsaicina y en otros modelos de dolor inflamatorio. Por ejemplo, la administración periférica de serotonina produce dolor agudo, el cual es atenuado por antagonistas selectivos del receptor 5-HT₃ (Sufka et al., 1992; Richardson, 1990). A distintos grupos de ratones knock out de la subunidad 5-HT_{3A} se les sometió a distintos modelos de dolor inflamatorio agudo como la administración abdominal de ácido acético, administración intraplantar de serotonina ó formalina y a modelos de dolor persistente por daño al tejido como el adyuvante de Freund y la sección del nervio ciático demostrando que la serotonina vía el receptor 5-HT₃ contribuye a la activación tanto de fibras Aδ y fibras C y al proceso nociceptivo (Zeitz et al., 2002). Consistentemente con el estudio anterior, Kaiser et al (2007) encontraron que los ratones knock out para el receptor 5-HT_{3A} disminuyeron dramáticamente su conducta nociceptiva en la segunda fase de la prueba de formalina, no así en la pruebas de la plancha caliente, sugiriendo su influencia pronociceptiva provocada por el daño tisular. Por otro lado, en ratones intactos la administración sistémica y periférica de antagonistas selectivos del receptor 5-HT₃ (ICS-205-930, MDL-72222 y ondansetrón) atenuaron la conducta nociceptiva en la prueba de formalina y en la

prueba de tail flick (Giordano y Dyche, 1989; Giordano y Rogers, 1989; Ye et al., 1997), mientras que el agonista selectivo del receptor, la m-clorofenilbiguanida incrementó significativamente la nocicepción (Doak y Sawynok, 1997). En estadios de dolor persistente poco se ha estudiado su participación, sin embargo, la administración de tropisetron (antagonista selectivo de los receptores 5-HT₃) como tratamiento local en artritis reumatoide, tendinopatías, periartropatías y el síndrome de dolor miofacial produjo analgesia de larga duración (Stratz y Müller, 2004; Faerber et al., 2007).

b) Receptores 5-HT₃ en la médula espinal

Varios estudios se han enfocado en el papel de los receptores 5-HT₃ espinales en la nocicepción. La administración espinal de ciertos agonistas y antagonistas de los receptores 5-HT₃ ha resultado en diferentes efectos en la transmisión nociceptiva de acuerdo a las circunstancias en las que se presenta. La literatura de hace varios años defendió el rol antinociceptivo de las vía serotoninérgicas ejercidas por estimulación eléctrica de la sustancia gris periacueductal y la cual era bloqueada por antagonistas serotoninérgicos (Millan, 1995; Ossipov et al., 2010). Se ha reportado que la administración intratecal de agonistas selectivos de los receptores 5-HT₃ como la 2-metil-serotonina (2-Me-5-HT) o la m-clorofenilbiguanida ejercen un efecto antinociceptivo en la prueba de formalina (Sasaki et al., 2001; Jeong et al., 2004) o en la prueba de Randall y Sellito (Bardin et al., 1997). Un mecanismo propuesto para esta respuesta es la activación del receptor 5-HT₃ de las interneuronas GABAérgicas a nivel espinal, lo que conduce a la liberación de GABA (Peng et al., 2001; Millan, 2002; Huang et al., 2008; Fukushima et al., 2009). En contraste con

estos resultados, el pre-tratamiento intratecal (i.t.) con ondansetrón, antagonista selectivo de los receptores 5-HT₃, atenúa la excitabilidad neuronal predominantemente en la segunda fase de la prueba de formalina y después de la administración de carragenina (Oyama et al., 1996; Green 2000; Rahaman et al., 2004). Consistentemente con esto, el ondansetrón administrado i.t. produce el mismo efecto que la depleción de serotonina por la administración intratecal de 5,7-DHT, una neurotoxina serotoninérgica que profundamente reduce el comportamiento nociceptivo y el aumento de la expresión de ERK fosforilada después de la administración de formalina (Svensson et al., 2006). La facilitación descendente proveniente de la RVM promueve la hiperexcitabilidad neuronal y el comportamiento de hipersensibilidad en muchos estados de dolor crónico (Rahaman et al., 2009; Ossipov et al., 2010), como sucede después de la lesión de los nervios periféricos. Se ha reportado que esta facilitación está mediada en parte por la activación de los receptores 5-HT₃ en la médula espinal (Susuki et al., 2004) y el antagonista selectivo del receptor (ondansetrón) administrado i.t. o de forma sistémica alivia la alodinia en modelos animales de dolor neuropático y en pacientes que lo padecen (Green et al., 2000; Oatway et al., 2004; Dogrul et al., 2009; Chen et al., 2009). Además, recientemente se mostró que la administración intratecal de agonistas del receptor 5-HT₃ produce hipersensibilidad al dolor por la activación de cascadas de señalización que incluyen la activación de la glía, liberación de citocinas e interleucinas y activación directa del receptor sobre las terminales nerviosas. A excepción del trabajo realizado por Peters y cols en 2010, en el que el ondansetrón administrado i.t. fue incapaz de inhibir la hipersensibilidad provocada por daño al nervio, la mayoría de los estudios muestran un claro efecto facilitador de

las serotonina vía activación del receptor 5-HT₃ debido a un incremento en la actividad descendente de fibras serotoninérgicas provenientes de áreas supraespinales como la RVM (Wei et al., 2010).

c) Expresión de los receptores 5-HT₃

La distribución del receptor 5-HT₃ ha sido extensamente estudiada por medio de inmunohistoquímica, hibridación in situ, transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), el uso de radioligandos, utilizando cultivos neuronales (Doucet et al., 2007) encontrándolo presente en el sistema nervioso central y periférico.

Por medio de hibridación in situ y RT-PCR se ha observado que el ARNm de la subunidad 5-HT_{3A} está expresada en las neuronas del sistema nerviosos central y periférico. En contraste, el ARNm de la subunidad 5-HT_{3B} está restringido a las neuronas periféricas (Morales et al., 1996, 2002). Sin embargo, un estudio de inmunomarcaje también detectó el ARNm de la subunidad 5-HT_{3B} en el estrato CA1 del hipocampo de rata y de forma dispersa en neuronas corticales (Doucet et al., 2007).

En el SNC mediante hibridación in situ e inmunohistoquímica se ha detectado el ARNm y la proteína de forma dispersa en distintas áreas corticales, una alta densidad en el área piriforme, cingulata y entorrinal (Tecott et al., 2003). También se encontró en interneuronas de la formación hipocampal, región posteroventral del hipocampo y particularmente en el estrato CA. Otras regiones fueron la amígdala, el núcleo del tracto solitario, área postrema, zona quimiorreceptora de gatillo, el bulbo olfatorio, el núcleo del nervio troclear, núcleo acumbens y putamen, el núcleo del

nervio trigeminal y las laminas I y II del asta dorsal y en motoneuronas del asta ventral de la médula espinal (Kidd et al., 1993; Morales et al., 1998; Rende et al., 1999; Tecott et al., 2003; Maxwell et al., 2003; Giordano y Schultea, 2004; Nichols et al., 2008). En la amígdala basolateral y núcleo medial co-localizó en su mayoría con colecistocinina (Mascagni y McDonald, 2007) y sólo en algunas neuronas con calretinina, péptido intestinal vasoactivo ó parvalbúmina (Mascagni y McDonald, 2007). En la médula espinal co-localizó CGRP (Maxwell et al., 2003).

Con respecto a su distribución en la periferia estudios de inmunoreactividad en el sistema gastrointestinal lo han localizado principalmente en neuronas mientéricas, plexo nervioso submucoso, también en fibras musculares, submucosa, mucosa. Algunas de las neuronas coexpresan péptido intestinal vasoactivo y sustancia P (Raybould et al., 2003; Glatzle et al., 2002).

El ARNm del receptor 5-HT₃ se ha detectado en el ganglio de la raíz dorsal (GRD), en el ganglio simpático lumbar y cervical superior (Pierce et al., 1996) y ganglio trigeminal (Doucet et al., 2007). Se reportó una distribución en proporciones similares de las subunidades 5-HT_{3A} y 5-HT_{3B} en el GRD y en el ganglio nodoso (GN) (Morales et al., 2001). Consistentemente con los estudios anteriores, el cultivo de neuronas sensoriales embrionarias demostró la expresión de ARNm del receptor 5-HT₃ (Chen et al., 1998).

Finalmente, la modificación en la expresión del receptor 5-HT₃ en presencia de dolor se ha estudiado poco. Sin embargo, se han encontrado resultados que coinciden con las respuestas funcionales reportadas. Por ejemplo, el adyuvante de Freund provocó un incremento significativo en la expresión del ARNm en el GRD de distintos subtipos de receptores serotoninérgicos, entre ellos el 5-HT₃ (Wu et al.,

2001). De acuerdo con estos resultados, la administración de veneno de abeja de forma subcutánea en la superficie plantar de la pata trasera de la rata incrementó la expresión del ARNm del receptor 5-HT₃ en el GRD. En contraste, no se encontró modificación de la expresión del ARNm de la subunidad 5-HT_{3A} en el GRD después de 15 días de la administración de iodoacetato monosódico (Rahman et al., 2009).

8. FARMACOLOGÍA DEL RECEPTOR 5-HT₃

La serotonina es el ligando endógeno del receptor 5-HT₃. Existe a la fecha una gran variedad de agonistas y antagonistas con afinidades distintas para el receptor 5-HT₃ (Tabla 3). Los agonistas principales en el SNC y SNP son la 2-metil-5-hidroxitriptamina (2-metil-5-HT) y la meta-clorofenilbiguanida (mCPBG). Los agonistas no han sido empleados clínicamente y su utilidad está limitada para investigación experimental (Giordano y Schultea, 2004).

Investigaciones previas han demostrado que la afinidad del receptor 5-HT₃ por la mCPBG en ratas es cerca de 100 veces mayor que en el humano, mientras que la afinidad por otros ligandos es casi paralela (Mochizuki et al., 1999). El orden de potencia obtenido de varios estudios utilizando radioligandos es mCPBG > 5-HT > 2-metil-5-HT > fenilbiguanida (Hoyer et al., 1994). Otros agonistas se unen al receptor pero con mucha menor afinidad.

Con respecto a los antagonistas, su desarrollo se basó en la estructura de la 5-HT y de un antagonista no selectivo del receptor, la cocaína (Walstab et al., 2010). Subsecuentemente se desarrollaron otros agentes que presentaron mayor actividad antagonista en estudios *in vitro* e *in vivo* sobre el receptor (Giordano y Schultea,

2004). El bemesetrón (MDL-72222) y el tropisetrón (ICS 205-930) fueron los primeros en formularse (Richardson et al., 1985), posteriormente se desarrollo del ondansetrón (GR 38032F) (Bluter et al., 1988).

Tabla 3. Farmacología del receptor 5-HT₃. Tomado y modificado de Giordano y Schultea, 2004.

Agonistas	Antagonistas
5-carboxiamidotriptamina	Dolasetrón
m-clorofenil-biguanida	Ondansetrón
5-HHT(Q)	Granisetrón
2-metil-5-HT	Tropisetrón (también 5-HT ₄)
Neurocinina	Palosetrón
Fenilalanina 107	Alosetrón
YM-31636	R-Zacloprida (también 5-HT ₄)
PSAB-OFPP	Esteroides sexuales
Quipazina	Mitirzapina
SR7227A	Clozapina
	Anpirolina (también 5-HT _{1B})
	Y-25130
	ADR-851S
	ADR851R

El orden de potencia entre los antagonistas del receptor 5-HT₃ disponibles en el mercado es granisetrón>tropisetrón>ondansetrón>dolasetrón. Todos ellos en las dosis adecuadas son capaces de bloquear de manera competitiva los receptores 5-HT₃ periféricos y espinales (Hoyer et al., 1994; Wolf et al., 2000). Algunos reportes indican actividad leve de los antagonistas sobre otros receptores (Bluter et al., 1988; Haus et al., 2004) (Tabla 4). Se ha observado un efecto débil del ondansetrón sobre distintos receptores en diferentes preparaciones *in vitro* (Bluter et al., 1988) (Tabla 5).

Las características farmacocinéticas de los antagonistas de los receptores 5-HT₃ son muy similares. Son bien absorbidos por vía oral y fácilmente atraviesan la barrera hemato-encefálica. Son metabolizados por diferentes subtipos del sistema enzimático citocromo P450 y sus metabolitos son eliminados principalmente por vía renal.

Tabla 4. Potencia de los antagonistas de los receptores 5-HT₃ y su afinidad por otros receptores. SD: Sin datos. Modificado de Hoyer et al., 1994 y Wolf et al., 2000.

	Afinidad por el receptor 5-HT ₃							Afinidad por otros receptores	
	Conejo			Rata		Cobayo		Ratón	
	Vago (PA ₂)	Corazón (PA ₂)	GN (PA ₂)	Vago (PA ₂)	Vago (PK _B)	Ileo (PK _B)	Colon (PK _B)	NIE-115 (pIC ₅₀)	
Bemesetrón	7.9	9.3	9.4	7.9	6.4	6.7	6.7	8.7	SD
Tropisetrón	10.2	10.6	10.3	11.0	7.8	8.0	8.0	9.7	5-HT ₄
Granisetrón	9.9	10.7	SD	9.8	7.9	8.1	8.1	SD	SD
Ondansetrón	9.4	10.1	10.1	8.6	7.0	7.3	7.1	9.6	5-HT _{1B} , 5-HT _{1C} , α1-adrenérgicos Opioides μ
Dolasetrón	SD	9.8	SD	SD	SD	SD	SD	SD	Receptores H ₁

El ondansetrón se metaboliza predominantemente por el citocromo P450-3A y el tropisetrón y dolasetrón por el subtipo 2D6 localizados en el hígado. La vida media del ondansetrón es cercana a las 4 h, mientras que la del tropisetrón es en promedio de 8 horas (Wolf et al., 2000).

La toxicidad de los antagonistas es baja, no existe evidencia de mutagenicidad o teratogenicidad. Los efectos secundarios comúnmente reportados son dolor de cabeza, constipación, mareos, cansancio, dolor abdominal y diarrea, ocasionalmente problemas de conducción cardíaca (Wolf et al., 2000; Haus et al., 2004).

Tabla 5. Efecto del ondansetrón (GR38932F) sobre otros receptores *in vitro*. Tomado de Bluter et al., 1988.

Preparación	Receptor	Agonista	PA ₂
Vena safena de gato	5-HT _{1-like}	5-HT	<5.0
Vena safena de perro	5-HT _{1-like}	5-HT	<4.6
Aorta de conejo	5-HT ₂	5-HT	4.6
musculo ano-coccígeo de rata	Adrenoreceptores α_1	Fenilefrina	<5.2
conductos deferentes de rata	Adrenoreceptores α_2	UK14304	<5.2
Atrio de rata	Adrenoreceptores β_1	Isoprenalina	<4.5
Atrio de rata	Muscarínicos	Muscarina	<5.0
GCS de rata	Nicotínicos	DMPP	5.5
CGS de rata	GABA _A	GABA	4.5
Ileo de cobayo	H ₁	Histamina	5.0
Ileo de cobayo	H ₂	Histamina	5.5

Valor de PA₂ determinado por el método de Schild (1947) de los efectos del GR38932F (3×10^{-6} – 3×10^{-5} M) realizado por duplicado. *Abreviaturas:* GCS: Ganglio cervical superior, 5-HT: 5-hidroxitriptamina, DMPP: 1,1-dimetil-4-fenilpiperazin iodo, GABA: ácido γ -aminobutírico.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es conocido que la activación del receptor 5-HT₃ en SNC tiene un efecto pronociceptivo y/o antinociceptivo dependiendo de la intensidad y duración del estímulo dado, y que a nivel periférico su activación es claramente pronociceptiva. Sin embargo, no se conoce la participación del receptor 5-HT₃ en el desarrollo y mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración en el modelo de formalina.

III. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de la participación de los receptores 5-HT₃ en el desarrollo y mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias puede dar paso a nuevos blancos y estrategias terapéuticas para evitar o reducir el desarrollo de estas respuestas en pacientes cuyo dolor inflamatorio es controlado de manera deficiente.

IV. HIPÓTESIS

Los receptores 5-HT₃ participan en el desarrollo y/o mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración en el modelo de formalina.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de los receptores 5-HT₃ en el desarrollo y/o mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración en el modelo de formalina.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar el desarrollo de la hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración inducidas por formalina.
- Evaluar el papel de los receptores 5-HT₃ periféricos en el desarrollo y/o mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración inducidas por formalina.
- Evaluar el papel de los receptores 5-HT₃ espinales en el desarrollo y/o mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias a larga duración ocasionadas por formalina.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron ratas Wistar hembra de 8 a 10 semanas de edad, con un peso corporal de 180-220 g, proporcionadas por el Bioterio del Cinvestav, Sede sur. Las ratas se mantuvieron en ciclos de luz-oscuridad de 12 h, con libre acceso a agua y alimento. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las guías sobre aspectos éticos para la investigación del dolor experimental en animales (Zimmerman, 1983). Cada rata se utilizó sólo una vez y fue sacrificada en una cámara de CO₂ al final de cada experimento.

B. PREPARACIÓN DE FORMALINA

La formalina es una solución diluida de formaldehído comercial (37% w/v Merck-México, S.A., México, D.F.). El formaldehído al 37% se considera como formalina al 100% y de éste se realizaron las diluciones adecuadas para obtener formalina al 0.5 y 1%.

Cabe señalar que, como se reportó previamente (Doak and Sawynok, 1997; Castañeda-Corral et al., 2009), la formalina al 0.5% se utilizó en aquellos experimentos en los que se esperaba un incremento en la respuesta después de la administración del fármaco. Por el contrario, se utilizó formalina al 1% cuando el efecto previsto era la antinocicepción.

C. PREPARACIÓN DE LA CÁNULA

Inicialmente el catéter de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) se recortó para generar varios fragmentos con una longitud aproximada de 10 cm. Después, cada segmento se anudó ligeramente a $\frac{3}{4}$ de su longitud, el nudo se fijó con metilmetacrilato y la cánula se estiró casi al doble por uno de sus extremos. Finalmente, la cánula se cortó en el extremo que se estiró previamente 8 cm después del nudo. Previo a la cirugía las cánulas se mantuvieron inmersas en etanol al 70% y antes de utilizarse se llenaron de solución salina.

D. FÁRMACOS

En el presente estudio se utilizaron los siguientes fármacos: ondansetrón (9-metil-3-[(2-metilimidazol-1-il) metil]-2,3-dihidro-1H-carbazol-4-one), serotonina (5-hidroxitriptamina) (3-(2-Aminoetil)-5-hidroxitriptamina clorohidrato) y m-clorofenilbiguanida (2-(3-clorofenil)-1-(diaminometilidene) guanidina) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Todos los fármacos fueron disueltos en solución salina.

Los fármacos se eligieron con base en la selectividad correspondiente por los receptores y su eficacia (Tabla 6). Las dosis se calcularon sobre la base de estudios previos y una prueba piloto que se llevó a cabo en el laboratorio. La administración periférica local (subcutánea, s.c.) de los fármacos se realizó en un volumen de 50 μ l en la pata tratada con formalina. Para la administración intratecal (i.t.) de los fármacos se utilizó un volumen de 10 μ l a través de un catéter implantado en el área, que se conectó a una jeringa de 100 μ l (Hamilton Co, Reno, NV) llena de solución salina estéril (PE-20).

E. INDUCCIÓN DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS

Las ratas fueron gentilmente inmovilizadas para tener acceso a sus extremidades posteriores. Después se les administraron 50 μ l de formalina diluida (al 0.5 ó 1%) vía s.c. en la superficie dorsal de la pata posterior derecha por medio de una aguja de calibre 30 (Fu et al., 2000, 2009). La sensibilización inducida por la inyección de formalina se evaluó los días 1, 3, 6 y 12. Sin embargo, para los subsecuentes experimentos, se eligió el día 6 para evaluar los comportamientos nociceptivos, debido a que en este tiempo se puede observar la recuperación clínica del tejido dañado (cicatriz).

F. EVALUACIÓN DE LA HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS

La hiperalgesia y alodinia secundarias se evaluaron como se reportó previamente (Ambriz-Tututi et al., 2009). Brevemente, las ratas se colocaron en una caja con piso de malla de alambre durante 30 minutos con la finalidad de permitirles adaptarse a su entorno. Se utilizaron 2 filamentos de von Frey, cada uno con una fuerza de 10 mN (1 g) y 250 mN (26 g), respectivamente. Éstos fueron aplicados sobre la superficie plantar de ambas patas en la base del tercer dedo. Se completaron 3 pruebas en cada pata, de 10 aplicaciones cada una y se hizo el promedio del número de veces que la rata retiró su pata con la aplicación del estímulo.

Bajo condiciones normales una fuerza de 10 mN no activa nociceptores cutáneos y por ende no es capaz de causar el retiro de la extremidad en animales normales (Leem et al., 1993; Ambriz-Tututi et al., 2009). Cuando se obtuvo respuesta a este estímulo se consideró alodinia. Por otro lado, una fuerza de 250 mN es considerada

un estímulo nocivo (Leem et al., 1993; Ambriz-Tututi et al., 2009). Se considero como hiperalgesia cuando se presentó una respuesta a este estímulo en ausencia de daño al tejido. También se considero hiperalgesia cuando se obtuvo una respuesta exagerada a un estímulo nocivo.

Tabla 6. Afinidad de los fármacos serotoninérgicos sobre el receptor 5-HT₃. Tomado de IUPHARM 2010.

Especie	Receptor	Fármaco	Tipo	pKi	Afinidad por otros receptores
Rata	5-HT _{3A}	mCPBG	Agonista	9.0	-----
Humano	5-HT _{3A}	mCPBG	Agonista	6.6 – 7.2	-----
Humano	5-HT _{3A}	5-HT	Agonista	6.5 - 6.9	5-HT ₇ > 5-HT _{1B} > 5-HT _{1D} > 5-HT _{1A} = 5-HT _{2C} >>5-HT ₃
Humano	5-HT _{3A}	ODS	Antagonista	7.8 - 8.3	-----
Rata	5-HT _{3A}	ODS	Antagonistas	8.6	-----
Humano	5-HT _{3AB}	ODS	Antagonista	7.8	-----

Abreviaturas: ODS: ondansetrón, mCPBG: m-clorofenilbiguanida, 5-HT: 5-hidroxitriptamina.

G. CIRUGÍA ESPINAL

Para evaluar el papel que tienen los receptores 5-HT₃ en el procesamiento del dolor a nivel espinal fue necesario llevar a cabo el método de canulación intratecal crónico descrito por Yaksh y Rudy en 1976. Las ratas se sometieron a cirugía 5 días antes de la administración de formalina. Para someter a las ratas al procedimiento quirúrgico se utilizó una mezcla de ketamina (45 mg/kg)/xilacina (12 mg/kg) vía intraperitoneal (i.p.). Posteriormente se colocaron en un estereotáxico, una vez posicionadas se realizó el abordaje quirúrgico mediante una incisión sobre tejido cutáneo en la línea media dorsal de la protuberancia occipital 2 cm en dirección caudal. Una vez expuestos y localizados los músculos superficiales (occipital, cervicoauricular y cervicoescutural), se realizó un corte sobre la protuberancia

occipital externa transeccionando en su origen a los músculos esplenio de la cabeza y romboideo, posteriormente mediante disección roma fue localizada la membrana atlanto-occipital. A continuación se llevó a cabo una pequeña incisión sobre la misma para permitir la inserción del catéter (PE10) de 8 cm de longitud, el cual se condujo suavemente de manera caudal hasta el segmento toracolumbar. Finalmente, el catéter fue fijado y se realizó una sutura en punto de cruz en tejido muscular con material absorbible (Cat-gut 3-0), mientras que la piel y tejido subcutáneo se afrontaron mediante puntos separados con sutura no absorbible (Seda 3-0). Las ratas se recuperaron de la cirugía en cajas individuales. Cada 24 h los animales se evaluaron y aquellos que mostraron algún signo de disfunción motora, agitación, pérdida de peso o deficiencia en sus reflejos se descartaron del estudio.

H. DISEÑO EXPERIMENTAL

1. CONTROLES

Para determinar los efectos de la formalina, a los grupos controles se les administraron vía subcutánea 50 μ l de formalina al 0.5 ó 1% y 1, 3, 6 y 12 días después se evaluaron con los filamentos de von Frey de manera ipsilateral y contralateral (Figura 15). Para excluir la posibilidad de que el vehículo de la formalina y los fármacos afectara la respuesta de retiro en la prueba, a un grupo de animales se les administraron 50 μ l de solución salina al 0.9% por vía subcutánea y se evaluaron como se describió antes.

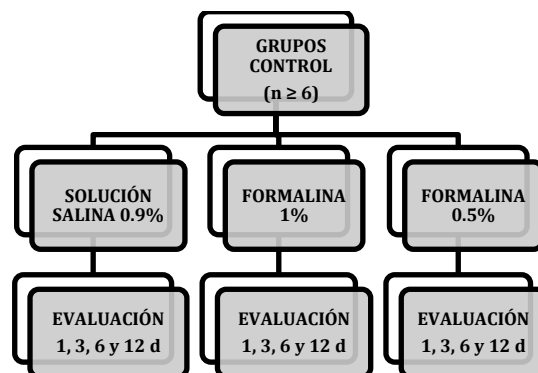


Figura 15. Diseño experimental para el curso temporal de los grupos control.

2. PRE-TRATAMIENTO

a) Agonistas de los receptores 5-HT₃

Para evaluar el efecto de los agonistas del receptor 5-HT₃ en el desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias producidas por la administración de formalina al 0.5% se realizó la administración periférica local de dosis crecientes de serotonina (3 a 100 nmoles) o de m-clorofenilbiguanida (mCPBG, 10 a 30 nmoles) por vía subcutánea a los grupos correspondientes 10 min antes de la administración de formalina (Figura 16). Para la administración espinal se utilizaron dosis crecientes de mCPBG (30-300 nmoles). Todos los grupos se evaluaron al día 6 con los filamentos de von Frey.

b) Antagonista de los receptores 5-HT₃

La evaluación del efecto del antagonista selectivo del receptor 5-HT₃ en el desarrollo de la hiperalgesia y alodinia secundarias producidas por la administración de formalina al 1% se realizó mediante la administración de dosis crecientes de ondansetrón (10-300 nmoles) por vía subcutánea a los grupos correspondientes 10

minutos antes de la administración de formalina (Figura 16). Para la administración espinal se utilizaron únicamente 10, 30 y 100 nmoles de ondansetrón. Todos los grupos se evaluaron al día 6 con los filamentos de von Frey.

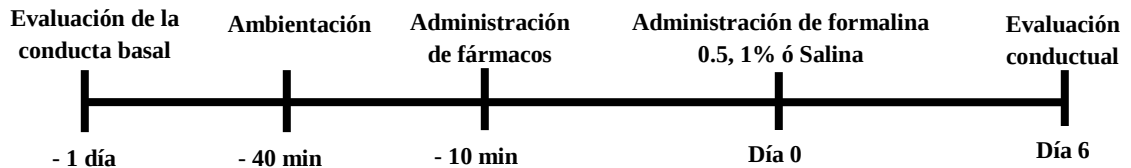


Figura 16. Diseño experimental de los pre-tratamientos.

3. POST-TRATAMIENTO

a) Antagonista de los receptores 5-HT₃

Para evaluar el efecto del antagonista selectivo del receptor 5-HT₃ en el mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias producidas por la administración de formalina al 1%, se indujeron primero estas respuestas como se describió anteriormente. Al 6° día después de administrada la formalina, se administró de manera periférica local la dosis de ondansetrón con el máximo efecto observado en el pre-tratamiento (300 nmoles) y sólo si existía efecto con ésta, se procedería a administrar las dosis siguientes. Para la administración espinal se utilizaron dosis crecientes del ondansetrón (30-300 nmoles). Todos los grupos fueron evaluados 1 h después con los filamentos de von Frey (Figura 17).

b) Agonistas de los receptores 5-HT₃

Para confirmar los resultados observados en el post-tratamiento periférico local con el antagonista de los receptores 5-HT₃, se decidió administrar de forma periférica

local la dosis máxima efectiva del agonista selectivo, la mCPBG (300 nmoles) al 6º día después de administrada la formalina, y solo si existía efecto con ésta, se procedería a administrar las dosis siguientes. La evaluación del grupo se llevo a cabo 1 h después con los filamentos de von Frey (Figura 17).

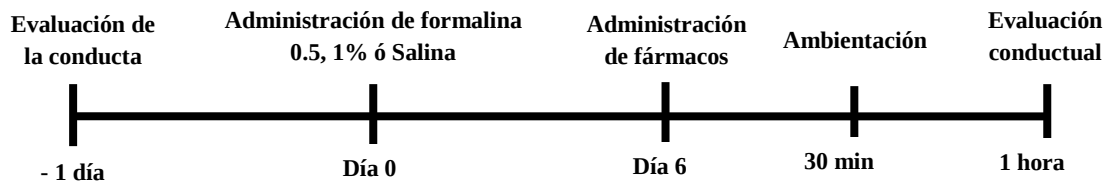


Figura 17. Diseño experimental de los post-tratamientos.

4. TRATAMIENTO CONTRALATERAL

Con la finalidad de averiguar si el efecto nociceptivo o antinociceptivo producido por los fármacos a nivel periférico era debido a una acción local y no a un efecto sistémico se comparó la eficacia del fármaco administrado de manera ipsilateral y contralateral contra el grupo control (salina). Lo anterior se utilizó para todos los fármacos que presentaron un efecto estadísticamente diferente al grupo control y se eligió aquella dosis que mostró la mayor eficacia en la curva dosis-respuesta.

5. COADMINISTRACIÓN

Con la finalidad de confirmar que los efectos observados sobre la hiperalgesia y alodinia secundarias están mediados específicamente por el receptor 5-HT₃, se realizó la co-administración de cada uno de los agonistas (5-HT y mCPBG) con el antagonista (ondansetrón) de manera periférica local y espinal antes de la administración de formalina al 0.5% (Figura 18).

Para la administración del antagonista se eligió la dosis mínima inefectiva (10 nmoles en la periferia y 1 nmol por vía espinal) la cual se administró 10 min antes de la administración de la dosis con máximo efecto del agonista (100 nmoles de 5-HT y 300 nmoles de la mCPBG). La evaluación se llevó a cabo al día 6 con los filamentos de von Frey.

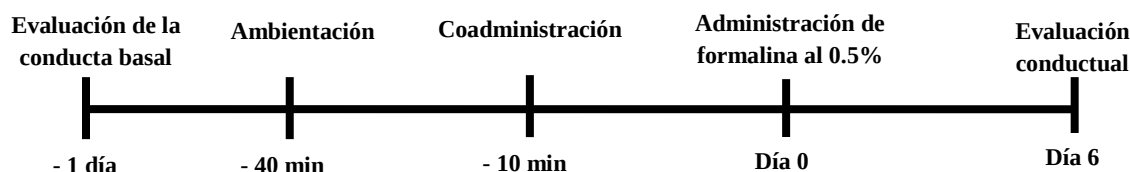


Figura 18. Diseño experimental de la coadministración.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos del comportamiento nociceptivo de larga duración se expresaron como el número de respuesta de retiro de la pata. Se gráfico el promedio del retiro de la pata ipsilateral y contralateral de las 3 pruebas realizadas con 10 aplicaciones de los filamentos de von Frey cada una en función del tiempo en días. En todos los casos los datos se reportaron como el promedio ($\bar{X}$) $\pm$ el error estándar (EE) y se graficaron en el programa Graphpad Prism 5.0.

Para determinar las diferencias entre los tratamientos se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una ó dos vías seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls mediante el uso del programa Sigmastat 3.5 en donde una $P < 0.05$ se consideró significativa.

VIII. RESULTADOS

A. ESTANDARIZACIÓN DEL DESARROLLO DE LA HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS DE LARGA DURACIÓN INDUCIDAS POR FORMALINA

Como previamente se reportó (Doak y Sawynok, 1997; Rocha-González et al., 2005) la inyección de formalina (0.5 y 1%) en la superficie dorsal de la pata posterior derecha de la rata produjo un patrón típico de comportamiento nociceptivo (sacudidas y lamidas) caracterizado por su curso bifásico (~1 h) independiente de la concentración de formalina. La fase I inició inmediatamente después de su administración y se prolongó por alrededor de 10 min, después siguió un periodo corto sin manifestación alguna de la conducta nociceptiva (10 -15 min). Finalmente después de 15 min de haber realizado la administración de la formalina comenzó la fase II y la conducta de sacudidas se observó nuevamente de los 15 a los 60 min alcanzando su máximo entre los 35 y 40 min. La intensidad y duración fueron dependientes de la concentración de formalina (Figura 19A).

Las ratas fueron evaluadas con los filamentos de von Frey (10 y 250 mN) 1, 3, 6 y 12 días después de la administración de formalina, observando una disminución en el umbral de retiro de ambas patas. La aplicación del filamento de 10 mN en estas ratas provocó un promedio de 2 retiros de la pata administrada y de la contralateral considerando esta respuesta como alodinia. Por otro lado, el filamento de 250 mN provocó un promedio de 5 retiros en ambas patas. A esta respuesta se le consideró hiperalgesia. En ambos casos se encontró una diferencia significativa comparados con el grupo control (solución salina) desde el día uno y al menos hasta el día 12 (Figura 19B, 19C, 19D y 19E). Estos resultados coinciden con los datos

previamente reportados (Ambriz-Tututi et al., 2009; Godínez-Chaparro et al., 2011) por lo que el modelo se consideró confiable y reproducible.

B. EVALUACIÓN PERIFÉRICA DEL RECEPTOR 5-HT₃

1. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT₃ EN EL DESARROLLO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS

a) Efecto de los agonistas de los receptores 5-HT₃ sobre el desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración

La formalina al 0.5% produjo hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias en la pata administrada y en la contralateral que fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) del grupo control (Figura 20A, 20B, 20C y 20D). Las concentraciones más altas administradas (30 y 100 nmoles/pata) de la 5-HT incrementaron de forma significativa ($P < 0.05$) la hiperalgesia y alodinia secundarias en la pata administrada y en la contralateral (Figura 20A y 20B), lo cual sugiere que los receptores serotoninérgicos están involucrados en el desarrollo de estas conductas.

La administración de las concentraciones ≥ 30 nmoles/pata de la mCPBG (agonista selectivo de los receptores 5-HT₃) incrementaron significativamente ($P < 0.05$) la alodinia secundaria ipsilateral y contralateral (Figura 20C).

Estas concentraciones también incrementaron la hiperalgesia secundaria contralateral de manera significativa con respecto al grupo de formalina al 0.5%, no obstante sólo las concentraciones ≥ 100 nmoles/pata fueron capaces de incrementar significativamente ($P < 0.05$) la hiperalgesia secundaria ipsilateral (Figura 20D).

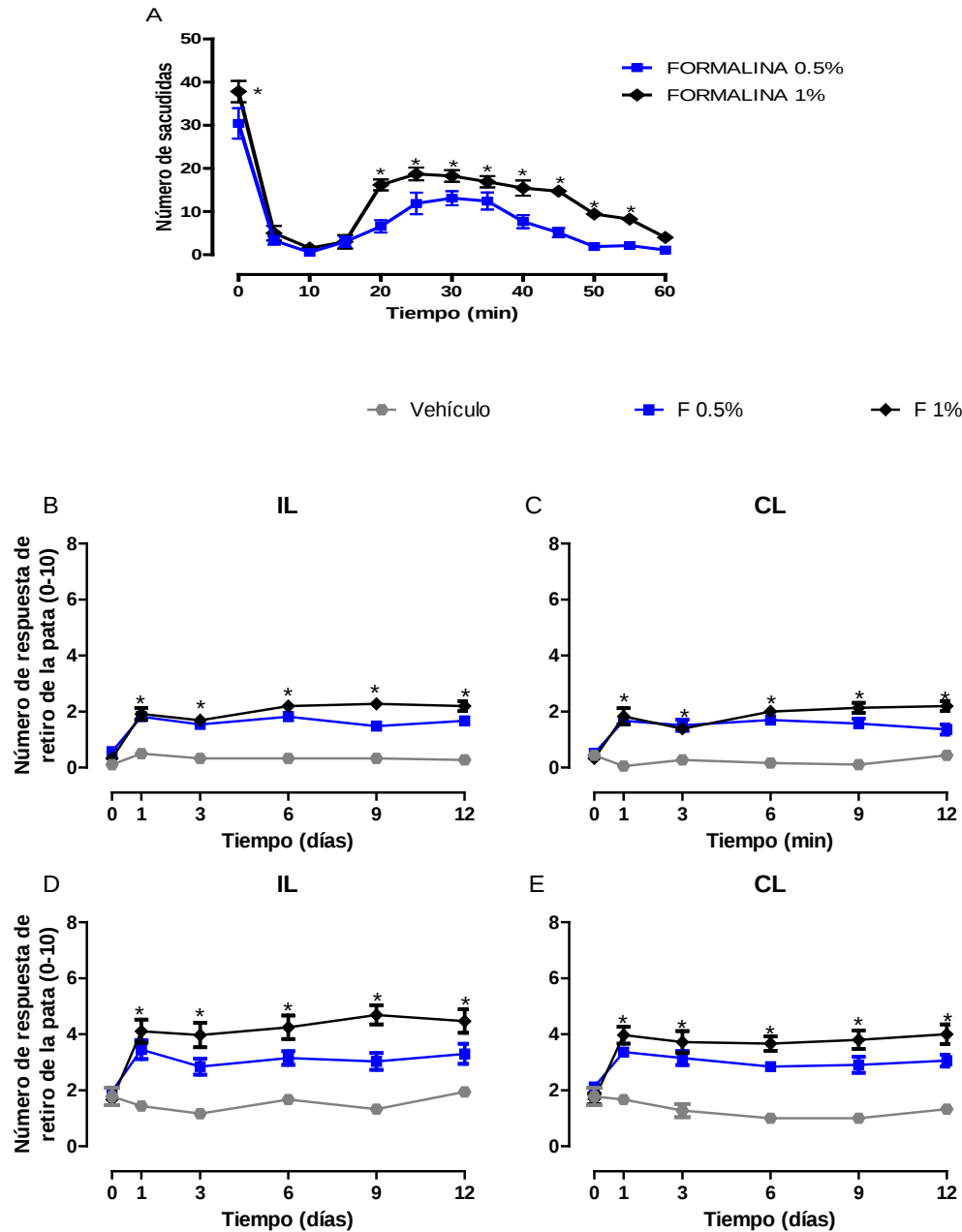


Figura 19. Efecto de la concentración de formalina en la conducta nociceptiva aguda y de largo plazo. **Arriba:** (A) Curso temporal de la conducta nociceptiva aguda después de la inyección subcutánea (s.c.) de formalina al 0.5 o 1% (50 μ l) en la región dorsal de la pata posterior derecha de la rata. Fase I (0-10 min) y Fase II (10 - 60 min). * $P < 0.05$ vs formalina al 0.5% por ANOVA de dos vías de medidas repetidas **Abajo:** Curso temporal de largo plazo del promedio de respuestas del retiro de la pata después de 10 aplicaciones con 2 distintos filamentos de von Frey, 10 mN para alodinia (B y C) y 250 mN para hiperalgesia (D y E) inducidas después de la administración de vehículo (salina) ó formalina al 0.5 y 1%. * $P < 0.05$ vs vehículo por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. IL: ipsilateral, CL: contralateral.

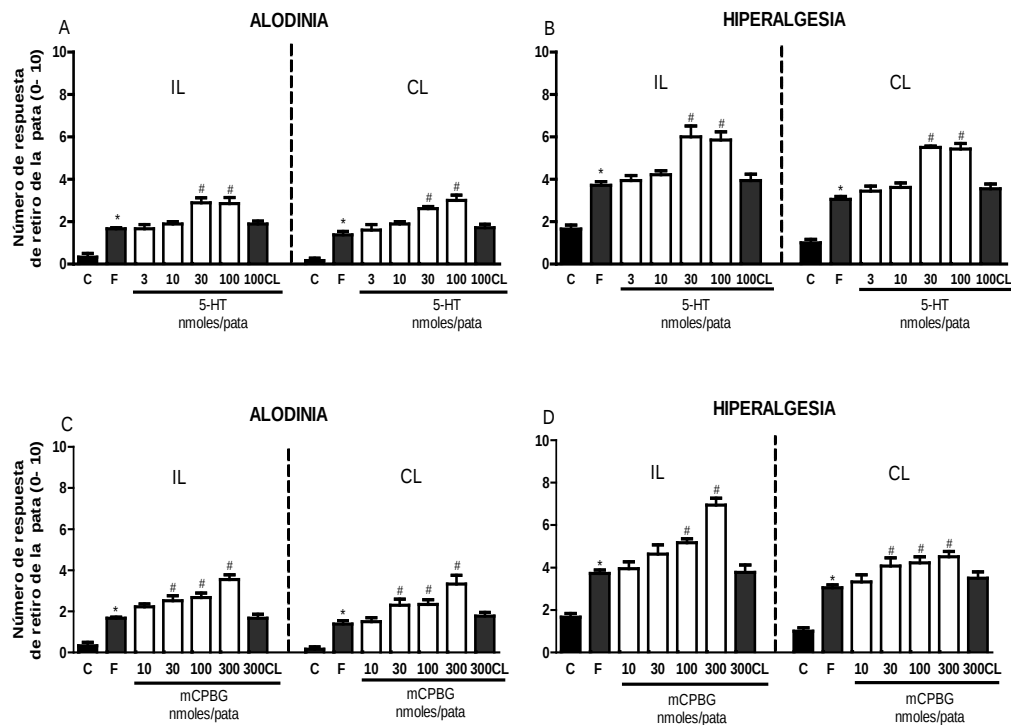


Figura. 20. Efecto pronociceptivo del pre-tratamiento periférico local (- 10 min) con el agonista serotoninérgico endógeno 5-HT (**Arriba**) o el agonista selectivo del receptor 5-HT₃ mCPBG (**Abajo**) sobre la hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias producidas por la administración de formalina al 0.5%. Los datos están expresados con el número de respuestas de retiro de la pata ipsilateral (IL) y contralateral (CL) con la aplicación de los filamentos de von Frey (10 y 250 mN) en la superficie plantar de ambas patas antes (control, C) y después de la administración de formalina (F) *P < 0.05 vs C y #P < 0.05 vs F por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. 5-HT; 5-hidroxitriptamina, mCPBG; m-clorofenilbiguanida.

Estos datos sugieren que los receptores 5-HT₃ están involucrados en el desarrollo de la hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias de larga duración inducidas por formalina al 0.5%.

El pre-tratamiento de la pata contralateral con las concentraciones más altas de los agonistas no modificó los comportamientos nociceptivos de larga duración observados con la administración de formalina al 0.5% (Figura 20A, 20B, 20C y 20D), lo que sugiere un efecto local.

Doak y Sawynok en 1997 reportaron efectos sistémicos adversos (salivación) de la mCPBG al utilizar la concentración de 50 nmoles. En contraste, en este estudio sólo la concentración de 300 nmoles/pata de la m-CPBG causó salivación en el 50% de los animales utilizados sin modificar su conducta nociceptiva de larga duración. Estas diferencias pueden deberse a diversos factores como la cepa utilizada, su peso, edad, etc.

b) Efecto del antagonista de los receptores 5-HT₃ sobre el desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración

El pre-tratamiento periférico local con ondansetrón (300 nmoles/pata) previno de forma significativa ($P < 0.05$) la alodinia secundaria en la pata administrada y en la contralateral (Figura 21A). La hiperalgesia secundaria ipsilateral y contralateral fue prevenida de manera significativa ($P < 0.05$) a concentraciones $\geq$ a 100 nmoles/pata (Figura 21B). Estos datos aportan mayor evidencia que sugiere que los receptores 5-HT₃ desempeñan un papel importante en el desarrollo de la hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración. En contraste, el pre-tratamiento en la pata contralateral con la concentración más alta del antagonista no modificó los comportamientos nociceptivos de larga duración observados con la administración de formalina al 1% (Figura 21A y 22B) lo que sugiere un efecto meramente local.

c. Efecto del antagonista sobre el efecto pronociceptivo de los agonistas de los receptores 5-HT₃

El pre-tratamiento periférico local ipsilateral con la dosis máxima efectiva del agonista (5-HT 100 nmoles/pata) incrementó ($P < 0.05$) la hiperalgesia y alodinia secundarias, efecto que fue bloqueado completamente en la pata administrada y en

la contralateral por el pre-tratamiento periférico local ipsilateral con el antagonista (ondansetrón). Cabe mencionar que la dosis utilizada del antagonista *per se* no modificó el comportamiento nociceptivo inducido por formalina al 0.5% (Figura 22A y 22B). Estos datos sugieren que al menos una parte del efecto pronociceptivo producido por la 5-HT está mediado por el receptor 5-HT₃.

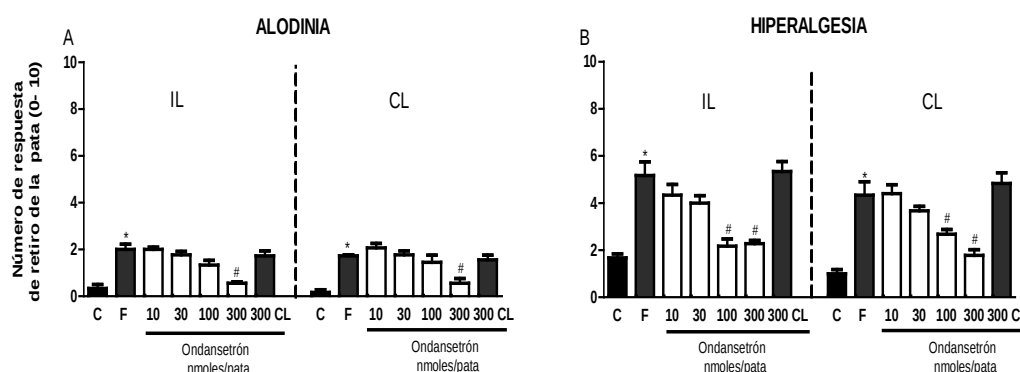


Figura. 21. Efecto antinociceptivo del pre-tratamiento periférico local (-10 min) con el antagonista selectivo del receptor 5-HT₃ (ondansetrón) sobre la hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias producidas por la administración de formalina al 1%. Los datos están expresados con el número de respuestas de retiro de la pata ipsilateral (IL) y contralateral (CL) con la aplicación de los filamentos de von Frey (10 y 250 mN) en la superficie plantar de ambas patas antes (control, C) y después de la administración de formalina (F). *P < 0.05 vs C y #P < 0.05 vs F por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls.

El pre-tratamiento periférico local ipsilateral con la dosis máxima del agonista altamente selectivo de los receptores 5-HT₃ (mCPBG 300 nmoles/rata) incrementó significativamente (P < 0.05) la hiperalgesia y alodinia secundarias, efecto que fue bloqueado completamente en la pata administrada y en la contralateral por el pre-tratamiento periférico local ipsilateral con el antagonista (ondansetrón).

Como en el caso anterior, la concentración utilizada del antagonista *per se* no modificó el comportamiento nociceptivo inducido por formalina al 0.5% (Figura 22C y 22D). Esto sugiere que el efecto pronociceptivo producido por la mCPBG está mediado únicamente por el receptor 5-HT₃.

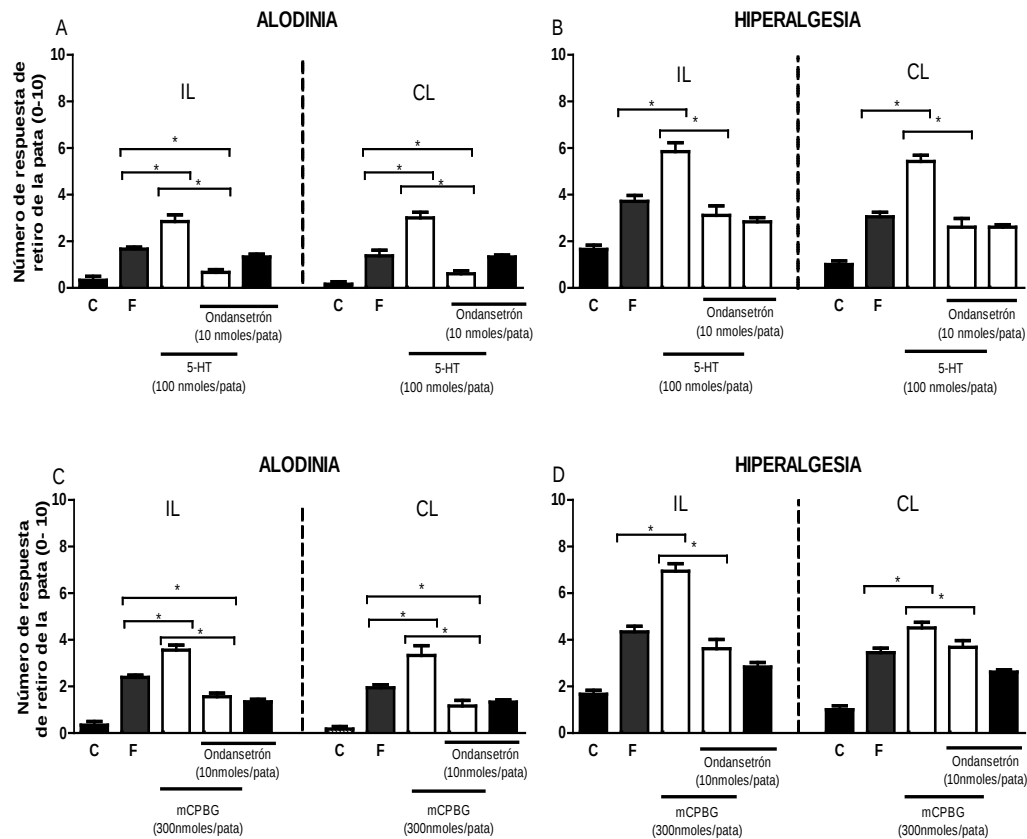


Figura 22. Efecto del pre-tratamiento periférico local (- 10 min) del antagonista selectivo del receptor 5-HT₃ (ondansetrón) sobre el efecto pronociceptivo del agonista serotoninérgico endógeno 5-HT (**Arriba**) o el agonista selectivo la mCPBG (**Abajo**) sobre la hiperalgnesia y alodinia mecánicas secundarias producidas por la administración de formalina al 0.5%. Los datos están expresados con el número de respuestas de retiro de la pata ipsilateral (IL) y contralateral (CL) con la aplicación de los filamentos de von Frey (10 y 250 mN) en la superficie plantar de ambas patas antes (control, C) y después de la administración de formalina (F). *P < 0.05 por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. 5-HT; 5-hidroxitriptamina, mCPBG; m-clorofenilbiguanida.

2. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT₃ EN EL MANTENIMIENTO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS

a) Efecto del antagonista de los receptores 5-HT₃ sobre el mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo

El post-tratamiento local ipsilateral con ondansetrón (300 nmoles/pata) no fue capaz de revertir la hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración inducidas por formalina tanto en la pata administrada como en la contralateral (Figura 23A y 23B). El post-tratamiento en la pata contralateral con la concentración más alta del antagonista no modificó los comportamientos nociceptivos de larga duración observados con la administración de formalina 1% (Figura 23A y 23B) lo que sugiere un efecto meramente local. Estos hallazgos sugieren que los receptores 5-HT₃ periféricos no participan en el mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración.

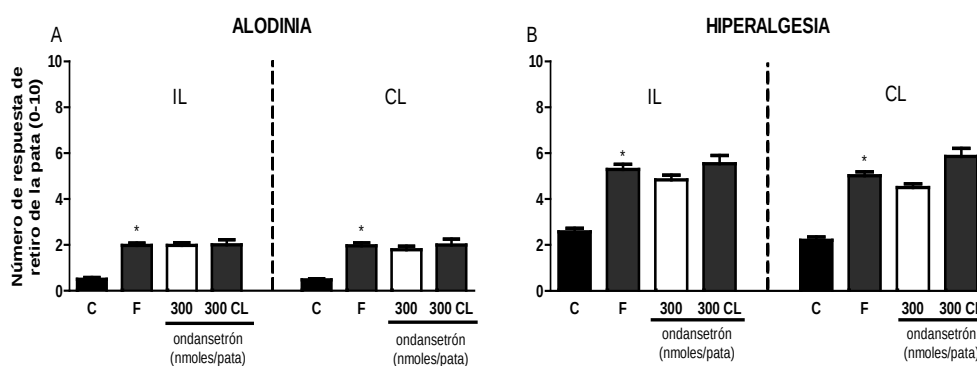


Figura. 23. Efecto del post-tratamiento periférico local (6 días) con el antagonista selectivo del receptor 5-HT₃ (ondansetrón) sobre la hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias producidas por la administración de formalina al 1%. Los datos están expresados con el número de respuestas de retiro de la pata ipsilateral (IL) y contralateral (CL) con la aplicación de los filamentos de von Frey (10 y 250 mN) en la superficie plantar de ambas patas antes (control, C) y después de la administración de formalina (F). *P < 0.05 vs C y #P < 0.05 vs F por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls.



b) Efecto del agonista de los receptores 5-HT₃ sobre el mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo

El pos-tratamiento local ipsilateral con mCPBG (300 nmoles/pata) no fue capaz de incrementar significativamente la hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración inducidas por formalina tanto en la pata administrada como en la contralateral (Figura 24A y 24B). Estos datos aportan mayor evidencia que sugiere que los receptores 5-HT₃ periféricos no participan en el mantenimiento de estas conductas nociceptivas de larga duración.

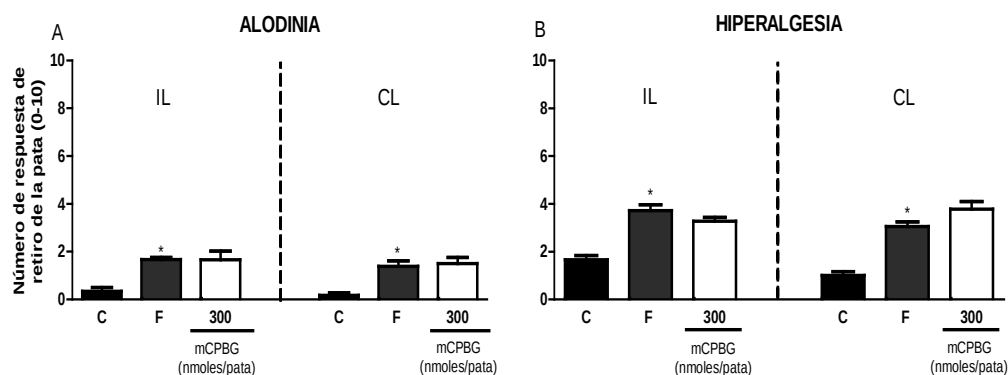


Figura. 24. Efecto del post-tratamiento periférico local (6 días) con el agonista selectivo del receptor 5-HT₃ (mCPBG) sobre la hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias producidas por la administración de formalina al 0.5%. Los datos están expresados con el número de respuestas de retiro de la pata ipsilateral (IL) y contralateral (CL) con la aplicación de los filamentos de von Frey (10 y 250 mN) en la superficie plantar de ambas patas antes (control, C) y después de la administración de formalina (F). *P < 0.05 vs C y #P < 0.05 vs F por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls.

C. EVALUACIÓN ESPINAL DEL RECEPTOR 5-HT₃

1. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT₃ ESPINALES EN EL DESARROLLO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS

a) Efecto del agonista selectivo de los receptores 5-HT₃ sobre el desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración

La administración espinal de la mCPBG (agonista selectivo de los receptores 5-HT₃) incrementó de manera concentración-dependiente la alodinia secundaria ipsilateral y contralateral (Figura 25A). La concentración de 300 nmoles/rata fue capaz de incrementar la hiperalgesia secundaria ipsilateral de manera significativa con respecto al grupo de formalina al 0.5%. Por otro lado, las concentraciones ≥ 100 nmoles/rata incrementaron significativamente ($P < 0.05$) la hiperalgesia secundaria contralateral (Figura 25B). Estos datos sugieren que los receptores 5-HT₃ espinales están involucrados en el desarrollo de la hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias de larga duración inducidas por formalina al 0.5%.

b) Efecto del antagonista de los receptores 5-HT₃ sobre el desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración

El pre-tratamiento intratecal con ondansetrón (10-300 nmoles/rata) disminuyó de forma significativa ($P < 0.05$) la alodinia secundaria en la pata administrada. De igual forma, las concentraciones ≥ 30 nmoles/rata disminuyeron la alodinia en la pata contralateral (Figura 26A) y la hiperalgesia secundaria ipsilateral y contralateral de manera significativa ($P < 0.05$) (Figura 26B). Estos datos aportan mayor evidencia que sugiere que los receptores 5-HT₃ espinales desempeñan un

papel importante en el desarrollo de la hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración.

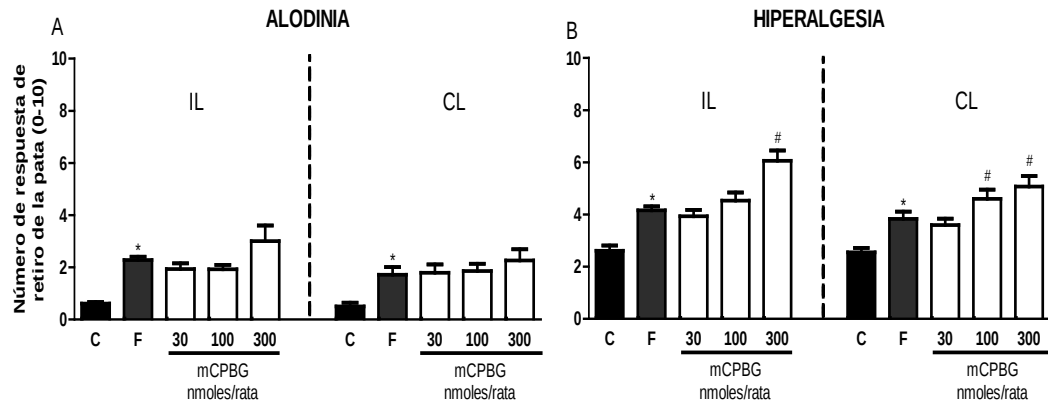


Figura 25 Efecto pronociceptivo del pre-tratamiento espinal (- 10 min) con el agonista selectivo del receptor 5-HT₃ (mCPBG) sobre la hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias producidas por la administración de formalina al 0.5%. Los datos están expresados con el número de respuestas de retiro de la pata ipsilateral (IL) y contralateral (CL) con la aplicación de los filamentos de von Frey (10 y 250 mN) en la superficie plantar de ambas patas antes (control, C) y después de la administración de formalina (F) *P < 0.05 vs C y #P < 0.05 vs F por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls.

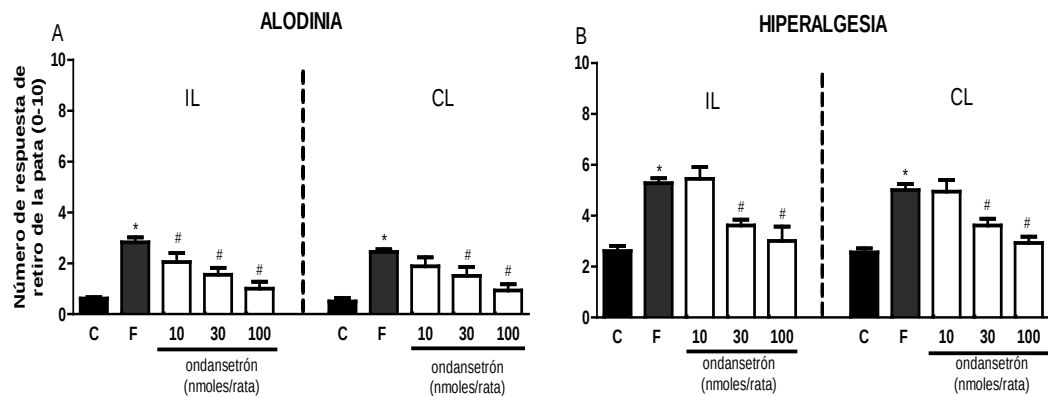


Figura. 26 Efecto del pre-tratamiento espinal (-10 min) con el antagonista selectivo del receptor 5-HT₃ (ondansetrón) sobre la hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias producidas por la administración de formalina al 1% a nivel periférico local. Los datos están expresados con el número de respuestas de retiro de la pata ipsilateral (IL) y contralateral (CL) con la aplicación de los filamentos de von Frey (10 y 250 mN) en la superficie plantar de ambas patas antes (control, C) y después de la administración de formalina (F). *P < 0.05 vs C y #P < 0.05 vs F por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls.

c) Efecto del antagonista sobre el efecto pronociceptivo del agonista de los receptores 5-HT₃

El pre-tratamiento intratecal con la dosis máxima efectiva del agonista (mCPBG 300 nmoles/rata) incrementó ($P < 0.05$) la hiperalgesia y alodinia secundarias, efecto que fue bloqueado completamente en la pata administrada y en la contralateral por el pre-tratamiento intratecal con el antagonista (ondansetrón). Cabe mencionar que la concentración utilizada del antagonista *per se* no modificó el comportamiento nociceptivo inducido por formalina al 0.5% (Figura 27A y 27B). Esto sugiere que el efecto pronociceptivo producido por la mCPBG está mediado por los receptores 5-HT₃ espinales.

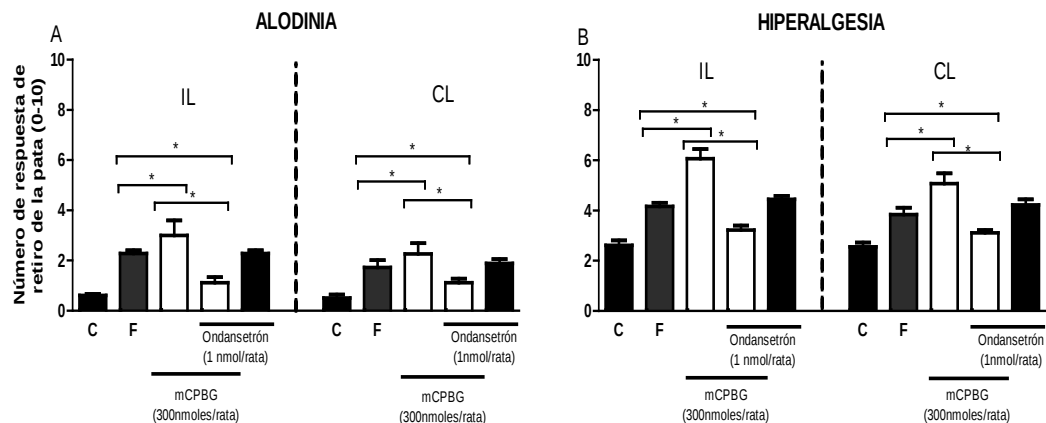


Figura. 27. Efecto del pre-tratamiento espinal (- 10 min) del antagonista selectivo del receptor 5-HT₃ (ondansetrón) sobre el efecto pronociceptivo del agonista selectivo del receptor 5-HT₃ (mCPBG) sobre la hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias producidas por la administración de formalina al 0.5%. Los datos son expresados con el número de respuestas de retiro de la pata ipsilateral (IL) y contralateral (CL) con la aplicación de los filamentos de von Frey (10 y 250 mN) en la superficie plantar de ambas patas antes (control, C) y después de la administración de formalina (F). * $P < 0.05$ por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls, mCPBG; m-clorofenilbiguanida.

2. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT₃ EN EL MANTENIMIENTO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS

a) Efecto del antagonista de los receptores 5-HT₃ espinales sobre el mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo

El post-tratamiento intratecal con ondansetrón (30-300 nmoles/rata) fue capaz de revertir significativamente ($P < 0.05$) la hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración inducidas por formalina tanto en la pata administrada como en la contralateral (Figura 28A y 28B). Estos hallazgos sugieren que los receptores 5-HT₃ espinales participan de forma importante en el mantenimiento de estas conductas nociceptivas de larga duración.

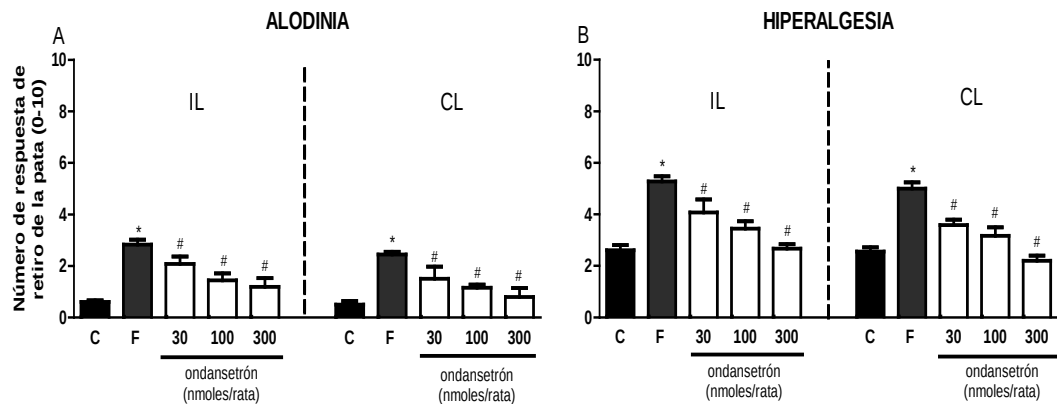


Figura 28. Efecto del post-tratamiento espinal (6 días) con el antagonista selectivo del receptor 5-HT₃ (ondansetrón) sobre la hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias producidas por la administración de formalina al 1%. Los datos están expresados con el número de respuestas de retiro de la pata ipsilateral (IL) y contralateral (CL) con la aplicación de los filamentos de von Frey (10 y 250 mN) en la superficie plantar de ambas patas antes (control, C) y después de la administración de formalina (F). * $P < 0.05$ vs C y # $P < 0.05$ vs F por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls.

IX. DISCUSIÓN

A. LA FORMALINA INDUCE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS

La inyección subcutánea de 50 μ l de formalina diluida al 0.5 y 1% en la ~~oreja~~ ^{oreja} dorsal de la pata posterior derecha de ratas hembra produjo una conducta de sacudidas y lamidas bifásica dependiente de la concentración de formalina. Estos resultados concuerdan con lo ya reportado y previamente caracterizado (Dubbuissou y Dennis, 1977; Wheeler-Aceto y Cowan, 1991; Olsen et al., 1992 ; Rocha-González et al., 2005; Castañeda-Corral et al., 2009). La fase I inició rápido, con gran intensidad y corta duración (~ 10 min), la cual es debida a estimulación directa de los nociceptores (Dubbuissou y Dennis, 1977). La fase II inició después de un periodo en el cual la rata no mostró ninguna conducta que sugiriera nocicepción (~20 min después de la administración de formalina) y alcanzó su máximo aproximadamente a los 25 min y aparentemente terminó a los 60 min post-administración de formalina. Ésta fase se debe a la liberación de diferentes componentes inflamatorios en la periferia y a nivel central, así como a un proceso de sensibilización central (Coderre et al., 1990; Olsen et al., 1992 ; Doak y Sawynok, 1997; Parada et al., 2001).

Varios estudios han demostrado que la formalina no solo induce esta respuesta nociceptiva aguda, sino que también es capaz de provocar hiperalgesia y alodinia secundarias utilizando concentraciones de 10% (Cadet et al., 1993; Bianchi and Panerai, 1997), 5% (Wiertelak et al., 1994; Fu et al, 1999, 2000, 2001; Wu et al., 2004; Vieiga et al., 2004; Vierck et al., 2008), 1% (Ambriz-Tututi et al., 2009; Godínez-Chaparro et al., 2011) y 0.5% (Jolivald et al., 2006; Ambriz-Tututi et al.,

2009; Godínez-Chaparro et al., 2011). En este sentido, la inyección de formalina en la región orofacial derecha de la rata produce hiperalgesia en el lado derecha de la cara con una duración de al menos 7 días (Cadet et al., 1993). Cuando ésta es administrada en el dorso de la pata provoca la disminución de la latencia del retiro de la cola de la rata en la prueba de tail flick lo que se traduce como hiperalgesia secundaria (Wiertelak et al., 1994; Vieiga et al., 2004). Del mismo modo, la inyección de formalina en la cola de la rata induce una reducción en el umbral de retiro de la pata de la rata sometida estimulación térmica (Bianchi y Panerai et al., 1997). Consistente con lo anterior, la formalina administrada en el dorso de la pata posterior derecha genera hiperalgesia térmica y mecánica hasta por 4 semanas tanto en la pata administrada como en la contralateral (Fu et al., 1999, 2000; 2001; Wu et al., 2004; Vierck et al., 2008). Además, Ambriz-Tututi et al (2009) demostraron que la formalina al 1% no sólo produce hiperalgesia, sino también alodinia mecánica secundaria en ambas patas. Estos datos fueron reproducidos por Ambriz-Tututi et al (2011) y Godínez-Chaparro et al. (2011), quienes también mostraron evidencia de que concentraciones menores de formalina (0.5%) inducen hiperalgesia y alodinia secundarias en ambas patas desde el día 1 y hasta al menos el día 12. En contraste con esto, Jolivalt et al. (2006) sólo encontraron alodinia mecánica secundaria en la pata administrada y no en la contralateral 6 días post-administración de formalina al 0.5%.

En el presente trabajo la administración de formalina (0.5 y 1%) produjo hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias en ambas patas desde el día 1 hasta al menos el día 12, lo que confirma la evidencia de que estas conductas de largo plazo son producidas por la administración de formalina.

Los mecanismos por los cuales la formalina induce estas conductas de larga duración aun no están completamente comprendidos. Sin embargo, existen varios hechos que indican que la liberación de sustancias inflamatorias por la administración de formalina ejerce una respuesta nociceptiva persistente asociada a la intensa actividad de fibras C aferentes en la periferia que provocan cambios a nivel espinal (Katz y Gold, 2006). En este mismo sentido, la bupivacaína administrada 5 min (Coderre et al., 1990) ó 10 min (Fu et al., 2000, 2001) antes de la inyección de formalina disminuye su fase tónica y bloquea la hiperalgesia y alodinia secundarias en ambas patas. De igual forma en otro experimento, el bloqueo del nervio infraorbital 30 min antes de la administración de formalina es capaz de prevenir el desarrollo de hiperalgesia al día 7 post-administración (Cadet et al., 1993), indicando que el desarrollo de estas conductas de largo plazo dependen de la respuesta neuronal ocurrida en la fase II de la prueba de formalina. La sensibilización central está estrechamente involucrada con la aparición de hiperalgesia y alodinia secundarias, evidencia de ello es que la hiperalgesia inducida con formalina se bloquea con la administración intratecal de un antagonista de los receptores NMDA y un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (L-NAME) (Wiertelak et al, 1994), sustancias fundamentales en el desarrollo de sensibilización central. De igual forma, se reportó que la administración espinal de celecoxib antes o después de la inyección de formalina inhibe la hiperalgesia secundaria (Veiga et al., 2004).

Cambios a largo plazo inducidos por la sensibilización central implican activación de la microglía y facilitación descendente. Hay evidencia que indica que la formalina induce la activación y cambios en el fenotipo de la microglía (Fu et al.,

1999, 2009) con un curso temporal similar a la hiperalgesia secundaria de largo plazo inducida por formalina (Fu et al., 2000, 2001). Además, la administración de formalina incrementa la expresión de la COX-1 en la microglía hasta por 2 semanas (Zhang et al., 2007). Por otra parte, la suramina (antagonista de los receptores P2) y la minociclina (inhibidor de la activación de la microglía) reducen la hiperalgesia secundaria inducida por formalina (Wu et al., 2004).

Finalmente existe evidencia creciente de que las proyecciones descendentes de la RVM juegan un papel importante en el mantenimiento de los estados de dolor persistente (Porreca et al., 2002). La administración en la RVM de lidocaína o de YM022, antagonista selectivo de los receptores CCK₂ significativamente revierte pero no previene la hiperalgesia y alodinia secundarias inducidas por formalina (Ambriz-Tututi et al., 2011). Otro reporte reciente indicó que las fibras descendentes serotoninérgicas provenientes de la RVM contribuyen a la facilitación durante el desarrollo de estados de dolor persistente después de la administración de formalina (Wei et al., 2010).

Este estudio se llevo a cabo en ratas hembra. En este sentido, algunos autores han reportado que el ciclo estral puede tener influencia sobre la conducta nociceptiva en algunos modelos de dolor (Gaumond et al., 2002; Vierck et al., 2008; Fillingim et al., 2009). Datos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la hiperalgesia y alodinia secundarias inducidas por formalina al 1% es similar, tanto en hembras como en machos (datos no mostrados). De manera similar, no se encontraron diferencias en la conducta nociceptiva de sacudidas en un modelo automatizado de formalina (Yaksh et al., 2001). A pesar de esto, se ha reportado que altas concentraciones de formalina (5%) pueden producir diferencias en la conducta

nociceptiva tónica entre hembras y machos (You et al., 2006). No obstante, de acuerdo a lo publicado, las concentraciones utilizadas de formalina en el presente estudio no presentan influencia sobre la respuesta entre hembras y machos por lo que podemos inferir que no es un factor que influya en nuestros resultados. Sin embargo, es importante señalar que con nuestros datos no se puede descartar que el sexo influya o modifique la eficacia de algunos fármacos utilizados para tratar el dolor de largo plazo (Fillingim et al., 2009).

B. RECEPTORES PERIFÉRICOS

1. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT₃ PERIFÉRICOS EN EL DESARROLLO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS INDUCIDAS POR FORMALINA

Existe evidencia que soporta que la serotonina se libera durante la fase II de la prueba de formalina (Nakajima et al., 2009) y que es un mediador importante de la nocicepción. La administración subcutánea de 5-HT causa un comportamiento intenso de sacudidas y lamidas y modifica las propiedades electrofisiológicas de las fibras C (Sufka et al., 1992; Parada et al., 2001; Moalem et al., 2005). También existe evidencia que indica la presencia del receptor 5-HT₃ en la terminal periférica de las fibras aferentes primarias (Kidd et al., 1993; Pierce et al., 1996; Chen et al., 1998; Morales et al., 2001; Morales y De-Wang, 2002). La activación de los receptores 5-HT₃ produce despolarización de fibras mielinizadas y no mielinizadas (Todorovic y Anderson, 1990; Zeitz et al., 2002), además de sensibilización (Lang et al., 2006) e hiperalgesia (Oliveira et al., 2007). En este sentido estudios recientes han demostrado que la serotonina actuando sobre receptores 5-HT₂ (Sasaki et al., 2006; Lin et al., 2011), 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ (Godínez-Chaparro et al., 2011)

participa en el desarrollo de hiperalgesia mecánica y térmica y alodinia mecánica secundarias inducidas por daño al tejido. Consistentemente con esta información, nuestros resultados indican que los receptores 5-HT₃ periféricos participan en el desarrollo de estas conductas de largo plazo.

a) EFECTO DE LOS AGONISTAS SOBRE EL DESARROLLO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS

(1) Efecto de la serotonina

EL pre-tratamiento con serotonina incrementó de forma significativa la hiperalgesia y alodinia secundarias en la pata administrada y en la contralateral, la eficacia máxima observada se alcanzó con 100 nmoles y la administración contralateral de esta dosis no modificó los comportamientos nociceptivos de larga duración observados con la administración de formalina al 0.5% lo que sugiere un efecto periférico local. De acuerdo con nuestros datos se ha reportado que la administración periférica de serotonina produce despolarización de neuronas (Ireland, 1987), nocicepción, sensibilización, hiperalgesia y que es capaz de potenciar el efecto pronociceptivo de sustancias como formalina, bradicinina, histamina, prostaglandina E₂ (Sufka et al., 1991; Hong y Abbott, 1994; Doak y Sawynok et al., 1997; Ernberg et al., 2000; Parada et al., 2001; Rocha-González et al., 2005; Oliveira et al., 2007). A este respecto, existen reportes con agonistas y antagonistas serotoninérgicos que sugieren que la serotonina en la periferia puede ejercer su efecto pronociceptivo de corto y largo plazo a través de la activación de los receptores 5-HT₂ (Todorovic y Anderson, 1990; Sufka et al., 1991; Sasaki et al., 2006; Lin et al., 2011), 5-HT₃ (Giordano y Rogers, 1989; Sufka et al., 1992; Doak y

Sawynok, 1997; Ernberg et al., 2000; Zeitz et al., 2002; Lang et al., 2006), 5-HT₄ (Doak y Sawynok, 1997; Parada et al., 2001; Godínez-Chaparro et al., 2011), 5-HT₆ (Castañeda-Corral et al., 2009; Godínez-Chaparro et al., 2011), 5-HT₇ (Rocha-González et al., 2005; Godínez-Chaparro et al., 2011). Sin embargo, en la periferia también se encuentran los receptores 5-HT₁ con los cuales se ha observado un efecto antinociceptivo en la prueba de formalina (Granados-Soto et al., 2010). No obstante, en la mayoría de los estudios conductuales se reporta un efecto hiperalgésico de la serotonina a nivel periférico. Con nuestros datos se aporta más evidencia que a través de la activación de los receptores serotoninérgicos periféricos las fibras aferentes primarias son sensibilizadas, lo que conduce a modificaciones en el SNC que a su vez provoca el desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración.

(2) Efecto de la m-clorofenilbiguanida

El pre-tratamiento con mCPBG (agonista selectivo de los receptores 5-HT₃) incrementó de forma significativa la hiperalgesia y alodinia secundarias en la pata administrada y en la contralateral comparada con el grupo de F 0.5%. La eficacia máxima se alcanzó con la dosis de 300 nmoles. A diferencia de lo observado con la administración de 5-HT la respuesta pronociceptiva de la mCPBG fue dependiente de la dosis, esto probablemente debido a la activación específica del receptor 5-HT₃ dejando de lado la activación (pronociceptiva o antinociceptiva) del resto de los receptores serotoninérgicos que en su conjunto modularon la respuesta observada con 5-HT.

La administración contralateral de la dosis máxima efectiva (300 nmoles/pata) no modificó los comportamientos nociceptivos de larga duración observados con la administración de formalina lo que sugiere un efecto periférico local. Sin embargo, Doak y Sawynok en 1997 reportaron efectos sistémicos adversos (salivación) de la mCPBG al utilizar la concentración de 50 nmoles. En contraste, en este estudio sólo la concentración de 300 nmoles/pata de la m-CPBG causó salivación en el 50% de los animales utilizados 10 min después de su administración. No obstante, esto no modificó su conducta nociceptiva de larga duración por lo cual no se descartó el uso de esta dosis del estudio. Las diferencias entre nuestros resultados y el reporte de Doak y Sawynok, pueden deberse a diversos factores como el modelo de estudio, la cepa utilizada, su peso, edad, etc.

De acuerdo con nuestros resultados se ha demostrado que la mCPBG incrementa la conducta nociceptiva de ambas fases de la prueba de formalina (Doak y Sawynok, 1997), e incrementa la excitabilidad de fibras C en el nervio sural de la rata tanto en el tejido normal como después de daño al nervio (Moalem et al., 2005). Además ratones *knock out* de la subunidad 5-HT_{3A} presentaron una reducción significativa en el comportamiento de dolor persistente (Fase II de formalina) después de la lesión tisular (Kayser et al., 2007) y después de la administración de serotonina intraperitoneal (Zeitz et al., 2002), pero no mostraron diferencia en la conducta nociceptiva comparados con los *wild type* después de la lesión nerviosa. No obstante, nuestros resultados sugieren que no sólo la activación de los receptores 5-HT₃ periféricos participan en la sensibilización periférica si no que también están implicados en el desarrollo hiperalgesia y alodinia de larga duración después de la lesión al tejido.

b) EFECTO DEL ANTAGONISTA SOBRE EL DESARROLLO DE LA HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS

(1) Efecto del ondansetrón

La administración periférica local de ondansetrón 10 minutos antes de la formalina al 1% fue capaz de prevenir el desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias en ambas patas. La eficacia máxima observada se alcanzó con 300 nmoles y la administración contralateral de esta dosis no modificó los comportamientos nociceptivos de larga duración observados con la administración de formalina, lo que sugirió un efecto periférico local.

En otro estudio, el pre-tratamiento local con granisetron (antagonista de los receptores 5-HT₃) redujo la conducta nociceptiva presente en la fase II de la prueba de formalina en ratones *wild type* pero no en los *knock out* para la subunidad 5-HT_{3A} (Kayser et al., 2007). Mientras que la administración de ondansetrón en la cola de la rata incrementó la latencia de retiro en la prueba de *tail flick* mostrando un aparente efecto anestésico (Ye et al., 1997). Esto sugiere que el receptor 5-HT₃ participa en la nocicepción.

La participación de los receptores 5-HT₃ periféricos en el desarrollo de dolor persistente está menos estudiada. Sin embargo, consistente con nuestros datos se reportó que la administración de 5-HT en el músculo masetero de humanos indujo hiperalgesia y alodinia, conductas que fueron antagonizadas por la administración previa de granisetron (Enberg et al., 2000). En contraste, la administración de granisetron disminuyó la duración pero no inhibió la hiperalgesia mecánica inducida por serotonina o α -metil5-HT (Lin et al., 2011). Cabe mencionar que a diferencia de nuestro modelo ambos experimentos fueron medidos en el corto plazo.

c) EFECTO DEL ANTAGONISTA SOBRE EL EFECTO PRONOCICEPTIVO DE LOS AGONISTAS DEL RECEPTOR 5-HT₃

El pre-tratamiento periférico local ipsilateral con ondansetrón bloqueó completamente el efecto pronociceptivo de largo plazo inducido por la administración de la dosis efectiva máxima de 5-HT. Es importante resaltar que la dosis utilizada del antagonista *per se* no modificó la hiperalgesia y alodinia secundarias inducidas por formalina al 0.5%. Este experimento se llevó a cabo con la finalidad de aportar mayor evidencia que indicara que el efecto observado en los experimentos anteriores estaba mediado específicamente por el receptor 5-HT₃.

Estudios electrofisiológicos han demostrado que la 5-HT produce despolarización en cultivos de neuronas de ganglio de raíz dorsal (GRD) y ganglio cervical superior (GCS) efecto que es bloqueada por ICS-205930 o MDL-72222, respectivamente (Todorovic y Anderson, 1990; Ireland; 1987). Así, se ha sugerido que el receptor 5-HT₃ es el responsable de esta respuesta. Se ha reportado también que la coadministración local de tropisetron en la pata ipsilateral pero no en la contralateral redujo de manera significativamente la hiperalgesia mecánica inducida por 5-HT. Esta evidencia soporta nuestros resultados, con los que podemos sugerir que las conductas pronociceptivas observadas por la administración de serotonina además de estar mediadas por los receptores 5-HT_{4/6/7} periféricos (Godínez-Chaparro et al., 2011), también están por el receptor 5-HT₃.

Con la finalidad de confirmar nuestras observaciones y los reportes anteriores se realizó la coadministración de la dosis máxima efectiva de mCPBG (agonista selectivo del receptor 5-HT₃) con el antagonista selectivo (ondansetrón) en el que encontramos datos que hay que remarcar. El primero es el hecho de qué el

ondansetrón aunque administrado a una dosis *per se* inefectiva es capaz de unirse al receptor y bloquearlo. Teniendo esto en mente, observamos cómo no sólo bloqueó el efecto pronociceptivo inducido por la mCPBG, lo cual sugiere fuertemente que el receptor 5-HT₃ es el responsable de las conductas nociceptivas observadas, sino que también previno en cierto grado la hiperalgesia y alodinia secundarias que son inducidas por la administración de formalina al 0.5% (Figura 22). Esto refleja que la serotonina endógena liberada por la lesión tisular que se desencadena después de la administración de formalina (Nakajima et al., 2009) no es capaz de activar los receptores 5-HT₃ previamente bloqueados por el ondansetrón lo que reitera que los receptores 5-HT₃ periféricos son activados en presencia de lesión tisular y que participan de manera importante en el desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración.

Se debe mencionar que el ondansetrón se ha caracterizado desde hace varias décadas (Butler et al., 1988) y aunque se sabe que es capaz de unirse a otros receptores como el 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C}, 5-HT_{1-like}, 5-HT₂, adrenoreceptores $\alpha_{1/2}$, adrenoreceptores β_1 , opioides- μ , muscarínicos y nicotínicos, lo hace de manera muy débil. El PA₂ reportado para ellos es < 5.5 mientras que para el receptor 5-HT₃ es de 8.6 por lo cual se considera altamente selectivo, haciendo nuestro reporte confiable.

En resumen y tomando junta toda la evidencia antes mostrada podemos sugerir de forma importante que la activación de los receptores 5-HT₃ periféricos participa en el desarrollo de la hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo inducidas por formalina. El mecanismo exacto de este proceso necesitará de posteriores investigaciones.

2. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT₃ PERIFÉRICOS EN EL MANTENIMIENTO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS INDUCIDAS POR FORMALINA

a) EFECTO DEL ONDANSETRÓN Y LA mCPBG SOBRE EL MANTENIMIENTO DE LA HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS

El post-tratamiento local ipsilateral con las dosis efectivas máximas de ondansetrón (antagonista selectivo de los receptores 5-HT₃) o mCPBG (agonista selectivo de los receptores 5-HT₃) no fueron capaces de revertir o incrementar, respectivamente de forma significativa la hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración inducidas por formalina tanto en la pata administrada como en la contralateral. Como en los experimentos anteriores la administración contralateral de la dosis efectiva máxima no modificó los comportamientos nociceptivos de larga duración observados con la administración de F1%. El único reporte equiparable con nuestros datos fue realizado en el modelo de formalina agudo, en donde la administración de tropisetron (antagonista 5-HT_{3/4}) entre la fase I y fase II de la prueba no modificó la conducta de lamidas y sacudidas de la fase II, sugiriendo que la activación de los nociceptores contribuye en cierto grado a la sensibilización periférica y central (Parada et al., 2001) y que una vez desencadenados estos procesos los receptores 5-HT_{3/4} pudieran ya no estar involucrados. En contraste, Godínez-Chaparro et al (2011) demostraron que el post-tratamiento con cromoglicato (un estabilizador de la membrana de las células cebadas) o con antagonistas selectivos de los receptores 5-HT_{4/6/7} reduce la hiperalgesia y alodinia secundarias inducida con formalina, sugiriendo que la 5-HT periférica no sólo inicia sino que también mantiene estas conductas de largo plazo. En este sentido, ellos proponen que existe una liberación

continúa de serotonina en la pata lesionada, la cual se une a los receptores 5-HT_{4/6/7} y de esta manera contribuye al desarrollo de la hiperalgesia y alodinia secundarias.

Tomando como una realidad que la serotonina continúa liberándose en la periferia, la pregunta a resolver sería porqué la activación o el bloqueo del receptor 5-HT₃ parecen no modificar estas conductas de largo plazo una vez ya establecidas. A continuación se menciona evidencia que podría ser utilizada para generar especulaciones y futuras investigaciones para tratar de dilucidar estos resultados.

En primer lugar, existe evidencia que indica que la hiperalgesia y alodinia secundarias están mantenidas de manera muy importante por mecanismos centrales y de facilitación descendente (Porreca et al., 2002; Ambriz-Tututi et al., 2011).

En segundo lugar y a diferencia del resto de los subtipos de receptores de 5-HT, se debe considerar que el 5-HT₃ es el único canal iónico dependiente de ligando (LGIC), lo cual le confiere características biofísicas particulares.

Los LGICs bajo distintas condiciones fisiológicas y patológicas están moviéndose de manera constante dentro y fuera de la superficie de la membrana (Moss y Smart, 2001). El movimiento dinámico del receptor a la membrana es esencial para la transmisión sináptica y la plasticidad (Sheng y Park 2000). En este sentido, se ha demostrado que el incremento de 5-HT por periodos prolongados en la mucosa intestinal provoca internalización del receptor 5-HT₃ en las neuronas mientéricas (Freeman et al., 2006). En otro estudio realizado en cultivos celulares (HEK293 y N1E-115) se observó internalización de los receptores 5-HT₃ minutos después de la exposición tónica a agonistas exógenos (5-HT, quipazina y mCPBG).

Otro factor a considerar es que los LGICs existen en 2 fases principalmente activo (abierto) e inactivo (cerrado) y cada una de estas clases puede contener múltiples

estado o conformaciones que difieren en su vida media, el sitio de unión al ligando, la posibilidad de desensibilización, etc. Basado en esto, se ha reportado que la exposición continua de 5-HT en células transfectadas con el receptor 5-HT₃ provoca desensibilización gradual y monoexponencial en el receptor 5-HT_{3A}, mientras que en el heteropentámero 5-HT_{3AB} sucede también pero mucho más rápido y de forma biexponencial (Corradi et al., 2009). Además, se observó que la incorporación de la subunidad B provoca la apertura espontánea del canal (Hu y Peoples, 2008). Se ha propuesto que la densidad del receptor 5-HT₃ en estado estacionario sobre la membrana determina su cinética de desensibilización y la sensibilidad de éste para ser inhibido por la anandamida (un agonista de los receptores canabinoides), la cual se ha observado interactúa con el receptor 5-HT₃ y que pudiera modular la participación del receptor en el control del dolor y la emesis (Xiong et al., 2008).

Finalmente existen múltiples factores que pueden contribuir a la regulación de la densidad del receptor y probablemente al tráfico hacia la superficie de membrana de la terminal periférica o central como son los mecanismos que involucran la activación de proteincinasas (Sun et al., 2003; Ilegems et al., 2004) y/o incremento en la expresión del ARNm y/o de la proteína, fenómeno que se ha reportado en presencia de lesión tisular (Wu et al., 2001; Liu et al., 2005).

En resumen y tomando junta esta información nuestros datos sugieren que los receptores 5-HT₃ participan en el desarrollo pero no en el mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias inducidas por formalina y la evidencia antes mostrada alienta a dilucidar mediante que mecanismos sucede esto.

C. RECEPTORES ESPINALES

1. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT₃ ESPINALES EN EL DESARROLLO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS INDUCIDAS POR FORMALINA.

a) EFECTO DE LA m-CLOROFENILBIGUANIDA SOBRE EL DESARROLLO DE ALODINIA E HIPERALGESIA SECUNDARIAS DE LARGA DURACIÓN

La administración espinal de mCPBG incrementó la hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración inducidas por formalina al 0.5%, sugiriendo un rol pronociceptivo de los receptores 5-HT₃ espinales en desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración. El receptor 5-HT₃ se ha encontrado expresado de forma importante en láminas superficiales del asta dorsal de la médula espinal (Morales et al., 1996, 2002). La población exacta de neuronas que lo expresan es controvertida. Maxwell et al (2003) encontraron que el 87% de los axones del asta dorsal que marcaron para el receptor 5-HT₃ no marcaron para IB4 o CGRP, sugiriendo que se encuentran principalmente sobre interneuronas o fibras ligeramente mielinizadas. En contraste, otros han propuesto que está tanto en subpoblaciones de nociceptores no mielinizados como mielinizados (Zeitz et al., 2002). Por otro lado, se ha detectado inmunoreactividad en interneuronas GABAérgicas en la amígdala basolateral (Mascagni y Mc Donald, 2007) y mediante hibridación el receptor 5-HT₃ se detectó también en interneuronas GABAérgicas y encefalinérgicas en la médula espinal de ratón (Huang et al., 2008).

Se ha demostrado que la 5-HT exógena potencia la liberación de neuropéptidos como la sustancia P, CGRP y neurocinina A vía activación de receptor 5-HT₃ desde las terminales centrales de las fibras aferentes primarias (Saria et al., 1990). La

administración intratecal de 5,7-DHT disminuye la serotonina en la médula espinal y con ello previene la fosforilación de ERK y la hiperalgesia después de la administración de formalina (Svensson et al., 2004). Además, la toxina conduce a la reducción de la respuesta a estímulos mecánicos y térmicos (Rahman et al., 2006). La disminución de la síntesis de serotonina en la RVM atenuó significativamente la respuesta nociceptiva inducida por formalina y la alodinia e hiperalgesia provocadas por la lesión tisular y de los nervios (Wei et al., 2010). La evidencia mencionada relaciona predominantemente a la serotonina espinal con un efecto facilitador del dolor. Consistentemente con nuestros resultados la mCPBG incrementó la alodinia provocada por la constricción del nervio ciático en ratas (Oatway et al., 2004). Sin embargo, el papel de la serotonina y sus receptores 5-HT₃ en la médula espinal continúa siendo controvertido. Existe evidencia que sugiere que la serotonina en la médula espinal tiene un papel antinociceptivo (Yaksh et al., 1979; Millan et al., 1995; Yoshimura y Furue, 2006; Liu et al., 2007). Bardin et al (1997) demostraron que la serotonina y la mCPBG administradas en la médula espinal redujeron el comportamiento nociceptivo en la prueba de Randall y Sellito. De igual forma, los agonistas del receptor 5-HT₃, 2-metil-5-HT (Sasaki et al., 2001) y la mCPBG (Jeong et al., 2004; Yoon et al., 2006) produjeron una disminución dosis dependiente en ambas fases de la prueba de formalina. El efecto antinociceptivo resultado de la activación del receptor 5-HT₃ se ha mostrado principalmente en modelos de dolor agudo (Alhaider et al., 1991; Paul et al., 2001; Song et al., 2009). En marcado contraste, su papel pronociceptivo se ha descrito en modelos de dolor tónico y de largo plazo, como la prueba de formalina (Oyama et al., 1996) o la administración del adyuvante de Freund (Wei et al., 2010). Esto sugiere que los receptores 5-HT₃

en la médula espinal participan en el desarrollo de estados de dolor persistente y de larga duración.

b) EFECTO DEL ONDANSETRON SOBRE EL DESARROLLO DE ALODINIA E HIPERALGESIA SECUNDARIAS DE LARGA DURACIÓN

La administración espinal de ondansetrón 10 min antes de la formalina al 1% fue capaz de prevenir el desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias en ambas patas. En otro estudio, la administración intratecal de granisetron y ondansetrón disminuyeron la segunda fase de la prueba de formalina (Oyama et al., 1996; Svensson et al., 2006). Sin embargo, la administración espinal de ondansetrón inhibió la respuesta a estímulos mecánicos y térmicos con igual magnitud tanto en ratas tratadas con carragenina como en ratas *naive*, lo que refleja que al menos 3 h después de la administración de carragenina la facilitación descendente mediada por el receptor 5-HT₃ está inalterada (Rahman et al., 2004; Asante y Dikenson, 2010). En este sentido, se debe señalar que nuestro trabajo es el primero en demostrar que al bloquear los receptores 5-HT₃ espinales antes de generar lesión tisular se previenen las conductas nociceptivas de largo plazo, lo que sugiere que la activación de los receptores 5-HT₃ espinales es necesaria para desarrollo de hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo. Consistente con esto, se ha demostrado que las neuronas de la lamina I/III de la médula espinal expresan NK1 y que vía activación del receptor 5-HT₃ son el origen del circuito espinal-bulbo-espinal el cual es crucial para codificar los estímulos polimodales en la médula espinal (Susuki et al., 2002). Esta facilitación descendente se sugiere que está mediada a través del receptor 5-

HT₃ ya que la administración intratecal de ondansetrón atenúa la respuesta neuronal a estímulos químicos (Greene et al., 2000).

c) EFECTO DEL ONDANSETRÓN SOBRE EL EFECTO PRONOCICEPTIVO DE LA mCPBG EN LA MÉDULA ESPINAL

El pre-tratamiento espinal con ondansetrón bloqueó completamente el efecto pronociceptivo de largo plazo inducido por la administración de la dosis efectiva máxima de mCPBG (300 nmoles /rata). Es importante resaltar que la dosis utilizada del antagonista *per se* no modificó la hiperalgesia y alodinia secundarias inducidas por formalina al 0.5%. Este experimento se llevó a cabo con la finalidad de aportar mayor evidencia que indicara que el efecto observado en los experimentos anteriores estaba mediado específicamente por los receptores 5-HT₃ espinales. El único estudio equiparable con nuestros datos demostró que después de la lesión de la médula espinal la administración de mCPBG provoca una disminución en la latencia de retiro de la pata, la cual es revertida por la administración de ondansetrón (Oatway et al., 2004).

En contraste, el pre-tratamiento espinal con tropisetron o granisetron disminuye el efecto antinociceptivo provocado por la administración de 5-HT o mCPBG en la prueba Randall y Sellito (Bardín et al., 1997). De acuerdo con esto, la administración de LY-278584, antagonista de los receptores 5-HT₃, disminuyó el efecto antinociceptivo de la 5-HT en ambas fases de la prueba de formalina (Jeong et al., 2004).

Esta discrepancia con nuestros resultados posiblemente radica en que estos últimos datos fueron obtenidos en modelos de dolor agudo, en los cuales se ha observado

principalmente un papel antinociceptivo de los receptores 5-HT₃ en la médula espinal. Se ha sugerido que este efecto antinociceptivo es dependiente de la activación de interneuronas GABAérgicas (Alhaider et al., 1991; Peng et al., 2001; Fukushima et al., 2009). Mientras que nuestro modelo de dolor inflamatorio por ser de largo plazo involucra mecanismos centrales y de plasticidad neuronal que posiblemente le otorgan ese rol pronociceptivo.

2. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES 5-HT₃ ESPINALES EN EL MANTENIMIENTO DE HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS INDUCIDAS POR FORMALINA

a) EFECTO DEL ONDANSETRÓN SOBRE LA HIPERALGESIA Y ALODINIA SECUNDARIAS DE LARGA DURACIÓN

El post-tratamiento espinal con ondansetrón fue capaz de revertir de forma significativa la hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración inducidas por formalina al 1% tanto en la pata administrada como en la contralateral. Esto sugiere que los receptores 5-HT₃ espinales participan en el mantenimiento de estas conductas de largo plazo. De acuerdo a nuestros resultados se ha de mostrado de manera consistente que el ondansetrón es capaz de disminuir la alodinia mecánica en ratas con lesión de la medula espinal (Chen et al., 2009; Oatway et al., 2004) y ligadura de nervios espinales (Susuki et al., 2004; Dogrul et al., 2009; Wei et al., 2010). Este efecto antialodínico del ondansetrón se ha observado también en el tratamiento de pacientes con dolor neuropático (McCleane et al., 2003). En el mismo sentido, la administración de ondansetrón después de la administración intra-articular de iodoacetato monosódico inhibió significativamente las respuestas a

estímulos tanto nocivos como inocuos, mientras que en los animales control sólo inhibió las respuestas de estímulos nocivos. Estos datos sugieren un cambio adaptativo en la modulación de la respuesta neuronal mediante las vías excitatorias serotoninérgicas (Rahman et al., 2009). En contraste, en otro estudio, la administración intratecal de ondansetrón no produjo ninguna modificación en la hiperalgesia y alodinia después de la lesión de nervios periféricos (Peters et al., 2010). De la misma manera, la administración intracerebroventricular de ondansetrón no produjo analgesia en presencia de estímulos químicos, mecánicos y térmicos (Giordano y Dyche, 1989). A pesar de esto, la mayoría de los trabajos coinciden con nuestros resultados mostrando que la serotonina proveniente de la RVM principalmente actúa sobre el receptor 5-HT₃ participando de forma importante en el mantenimiento de las conductas nociceptivas de larga duración.

En resumen, y tomando junta esta información, nuestros datos sugieren que los receptores 5-HT₃ espinales participan en el desarrollo y en el mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia secundarias inducidas por formalina y la evidencia antes mostrada alienta a dilucidar mediante que mecanismos sucede esto.

X. CONCLUSIONES

A. CONCLUSIONES PARTICULARES

La formalina al 0.5 y 1% produjo un comportamiento nociceptivo caracterizado por sacudidas y lamidas (~1 h) e indujo hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias de larga duración (12 días). Este modelo es confiable y reproducible.

La administración periférica local de serotonina incrementa la hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo inducidas por formalina, lo que sugiere la participación de los receptores serotoninérgicos en el desarrollo de estas conductas.

La administración periférica local de mCPBG, agonista selectivo de los receptores 5-HT₃ incrementa la hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo inducidas por formalina, lo que sugiere la participación de los receptores 5-HT₃ en el desarrollo de estas conductas.

La administración periférica local de ondansetrón, antagonista selectivo de los receptores 5-HT₃, previene el desarrollo de la hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo inducidas por formalina y bloquea el efecto pronociceptivo de la 5-HT y de la mCPBG, lo que sugiere la participación de los receptores 5-HT₃ en el desarrollo de estas conductas.

La administración periférica local de ondansetrón o de mCPBG no revierte la hiperalgesia y alodinia secundarias inducidas por formalina. Esto sugiere que los receptores 5-HT₃ no participan en el mantenimiento de hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración.

Estos datos juntos sugieren que los receptores 5-HT₃ periféricos están involucrados en el desarrollo pero no el mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias de larga duración inducidas por formalina.

La administración espinal de mCPBG, agonista de los receptores 5-HT₃, incrementa la hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo inducidas por formalina, lo que sugiere la participación de los receptores 5-HT₃ espinales en el desarrollo de estas conductas.

La administración espinal de ondansetrón, antagonista selectivo de los receptores 5-HT₃, previene el desarrollo de la hiperalgesia y alodinia secundarias de largo plazo inducidas por formalina y bloquea el efecto pronociceptivo de la mCPBG, lo que sugiere la participación de los receptores 5-HT₃ espinales en el desarrollo de estas conductas.

La administración espinal de ondansetrón revierte la hiperalgesia y alodinia secundarias inducidas por formalina. Esto sugiere que los receptores 5-HT₃ espinales participan en el mantenimiento de hiperalgesia y alodinia secundarias de larga duración.

Estos datos juntos sugieren que los receptores 5-HT₃ espinales están involucrados en el desarrollo y mantenimiento de la hiperalgesia y alodinia mecánicas secundarias de larga duración inducidas por formalina.

B. CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados sugieren que el receptor 5-HT₃ tiene un papel pronociceptivo en el procesamiento de dolor de largo plazo a nivel periférico y espinal.

XI. PERSPECTIVAS

La comprensión de los circuitos nociceptivos y los mecanismos que promueven la experiencia emocional del dolor apenas comienza. El dolor tiene importantes funciones fisiológicas, nos advierte del daño tisular real o potencial y cuando la lesión está presente promueve conductas de protección del área afectada y la restricción de movimiento para facilitar su recuperación.

Sin embargo, en ocasiones cuando la lesión ha sanado, el sistema se convierte en una fuente de dolor prolongado y exagerado. Los mecanismos moleculares en la transición del dolor agudo al dolor crónico aun no son completamente comprendidos. En este sentido, este trabajo aporta información valiosa que involucra a las vías serotoninérgicas en esta transición y en el mantenimiento de estados de dolor patológico. Integrando nuestros resultados con la información que hasta en momento existe puede conducir al desarrollo de aproximaciones terapéuticas novedosas para prevenir o tratar padecimientos que cursan con estados de dolor crónico.

XII. REFERENCIAS

- ✓ Abbott F, Franklin K y Westbrook R. The formalin test: Scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain* 60:91-102, 1995.
- ✓ Alhaider A, Lei S y Wilcox G. Spinal 5-HT₃ receptor-mediated antinociception: Possible release of GABA. *The Journal of Neuroscience* 7:1881-1888, 1991.
- ✓ Almeida T, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: A neuroanatomical review. *Brain Research* 1000:40-56, 2004.
- ✓ Ambriz-Tututi M, Rocha-González HI, Castañeda-Corral G, Araiza-Saldaña CI, Caram-Salas NL, Cruz SL y Granados-Soto V. Role of opioid receptors in the reduction of formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia in rats. *European Journal of Pharmacology* 619:25-32, 2009.
- ✓ Ambriz-Tututi M, Cruz SL, Urquiza-Marín H y Granados-Soto V. Formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia are maintained by descending facilitation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 98:417-424, 2011.
- ✓ Asante C y Dickenson A. Descending serotonergic facilitation mediated by spinal 5-HT₃ receptors engages spinal rapamycin-sensitive pathways in the rat. *Neuroscience Letters* 484:108-112, 2010.
- ✓ Azmitia E. Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology* 21: 34-45, 1999.
- ✓ Bardin L, Jourdan D, Alloui A, Lavarenne J y Eschaliier A. Differential influence of two serotonin 5-HT₃ receptor antagonists on spinal serotonin-induced analgesia in rats. *Brain Research* 765:267-272, 1997.
- ✓ Bardin L, Tarayre J, Koek W y Colpaert F. In the formalin model of tonic nociceptive pain, 8-OH-DPAT produces 5-HT_{1A} receptor-mediated behaviorally specific analgesia. *European Journal of Pharmacology* 421:109-114, 2001.
- ✓ Barnes N y Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083-1152, 1999.

- ✓ Barnes N, Hales T, Lummis S, Peters J. The 5-HT₃ receptor - the relationship between structure and function. *Neuropharmacology* 56:273-284, 2009.
- ✓ Basbaum A, Bautista D, Scherrer G y Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267-284, 2009.
- ✓ Berger M, Gray J, Roth B. The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine* 60:355-366, 2009.
- ✓ Bianchi M y Panerai A. Formalin injection in the tail facilitates hindpaw withdrawal reflexes induced by thermal stimulation in the rat: effect of paracetamol. *Neuroscience Letters* 237:89-92, 1997.
- ✓ Boess F y Martin I. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* 33:275-317, 1994.
- ✓ Bourgoin S, Viguiet F, Michot B, Kayser V, Vela J, Hamon M. 5-HT₇ receptor stimulation exerts anti-hyperalgesic effects in rats suffering from neuropathic pain via activation of GABAergic interneurons. *Fundamentals of Clinical Pharmacology* 22:127-128, 2008.
- ✓ Bradley P, Engel G, Feniuk W, Fozard J, Humphrey P, Middlemiss D, Mylecharane E, Richardson B, Saxena P. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology* 25:563-576, 1986.
- ✓ Brodie B y Shore A. A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 66:631-642, 1957.
- ✓ Butler A, Hill J, Ireland S, Jordan C y Tyers M. Pharmacological properties of GR38032F, a novel antagonist at 5-HT₃ receptors. *British Journal of Pharmacology* 94:397-412, 1988.
- ✓ Cadet R, Aigouy L y Woda A. Sustained hyperalgesia can be induced in the rat by a single formalin injection and depends on the initial nociceptive inputs. *Neuroscience Letters* 156:43-46, 1993.

- ✓ Castañeda-Corral G, Rocha-González H, Araiza-Saldaña C, Ambriz-Tututi M, Vidal-Cantú G y Granados-Soto V. Role of peripheral and spinal 5-HT₆ receptors according to the rat formalin test. *Neuroscience* 162:444-452, 2009.
- ✓ Cervero F, Laird J, García-Nicas E. Secondary hyperalgesia and presynaptic inhibition: An update. *European Journal of Pain* 7:345-351, 2003.
- ✓ Cheng Z, Fields H y Heinricher M. Morphine microinjected into the periaqueductal gray has differential effects on 3 classes of medullary neurons. *Brain Research* 375:57-65, 1986.
- ✓ Chen J, Vasko M, Wu X, Staeva T, Baez M, Zgombick J y Nelson D. Multiple subtypes of serotonin receptors are expressed in rat sensory neurons in culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 287:1119-1127, 1998.
- ✓ Chen Y, Oatway A y Weaver L. Blockade of the 5-HT₃ receptor for days causes sustained relief from mechanical allodynia following spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research* 87:418-424, 2009.
- ✓ Coderre T, Vaccarino A y Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Research* 535:155-158, 1990.
- ✓ Corradi J, Gumilar F y Bouzat C. Single-channel kinetic analysis for activation and desensitization of homomeric 5-HT_{3A} receptors. *Biophysical Journal* 97:1335-1345, 2009.
- ✓ Costigan M y Woolf C. Pain: Molecular mechanisms. *Journal of Pain* 1:35-44, 2000.
- ✓ Davies P, Pistis M, Hanna M, Peters J, Lambert J, Hales T y Kirkness E. The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 397:359-363, 1999.
- ✓ Doak G y Sawynok J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: Involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience* 80:939-949, 1997.
- ✓ Dogrul A, Ossipov M y Porreca F. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5-HT₃ and 5-HT₇ receptors. *Brain Research* 1280:52-59, 2009.

- ✓ Donaldson L, Seckl J y McQueen D. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: Effects of adjuvant dose. *Journal of Neurosciences Methods* 49:5-10, 1993.
- ✓ Doucet E, Latremolière A, Darmon M, Hamon M y Emerit M. Immunolabelling of the 5-HT_{3B} receptor subunit in the central and peripheral nervous systems in rodents. *European Journal of Neuroscience* 26:355-366, 2007.
- ✓ Dubuisson D y Dennis S. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4:161-74, 1977.
- ✓ Ducy P y Karsenty G. The two faces of serotonin in bone biology. *Journal of Cell Biology* 191:7-13, 2010.
- ✓ Ernberg M, Lundeberg T y Kopp S. Effect of propranolol and granisetron on experimentally induced pain and allodynia/hyperalgesia by intramuscular injection of serotonin into the human masseter muscle. *Pain* 84:339-346, 2000.
- ✓ Ernberg M, Lundeberg T y Kopp S. Pain and allodynia/hyperalgesia induced by intramuscular injection of serotonin in patients with Fibromyalgia and healthy individuals. *Pain* 85:31-39, 2000.
- ✓ Faerber L, Drechsler S, Ladenburger S, Gshaidmeier H y Fischer W. The neuronal 5-HT₃ receptor network after 20 years of research - evolving concepts in management of pain and inflammation. *European Journal of Pharmacology* 560:1-8, 2007.
- ✓ Feldman S, Meyer J y Quenzer L. Serotonin In: *Principles of Neuropsychopharmacology*. Ed. Snahuer Associates. USA 9:345-389, 1997.
- ✓ Fillingim R, King C, Ribeiro-Dasilva M, Williams B y Riley J. Sex, gender, and pain: A review of recent clinical and experimental findings. *Journal of Pain* 10:447-485, 2009.
- ✓ Fink K y Göthert M. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacological Reviews* 59:360-417, 2007.
- ✓ Folk G y Long J. Serotonin as a neurotransmitter: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology* 91:251-257, 1988.

- ✓ Freeman S, Glatzle J, Robin C, Valdellon M, Sternini C, Sharp J y Raybould H. Ligand-induced 5-HT₃ receptor internalization in enteric neurons in rat ileum. *Gastroenterology* 131:97-107, 2006.
- ✓ Fu K, Light A, Matsushima G y Maixner W. Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hind paw. *Brain Research* 825:59-67, 1999.
- ✓ Fu K, Light A y Maixner W. Relationship between nociceptor activity, peripheral edema, spinal microglial activation and long-term hyperalgesia induced by formalin. *Neuroscience* 101:1127-1135, 2000.
- ✓ Fu K, Light A y Maixner W. Long-lasting inflammation and long-term hyperalgesia after subcutaneous formalin injection into the rat hind paw. *The Journal of Pain* 2:2-11, 2001.
- ✓ Fu K, Tan Y, Sung B y Mao J. Peripheral formalin injection induces unique spinal cord microglial phenotypic changes. *Neuroscience Letters* 449:234-239, 2009.
- ✓ Fukushima T, Ohtsubo T, Tsuda M, Yanagawa Y y Hori Y. Facilitatory actions of serotonin type 3 receptors on GABAergic inhibitory synaptic transmission in the spinal superficial dorsal horn. *Journal of Neurophysiology* 102:1459-1471, 2009.
- ✓ Gaddum J y Picarelli Z. Two kinds of tryptamine receptor. *British Journal of Pharmacology* 12:323-328, 1957.
- ✓ Gardell L, Vanderah T, Gardell S, Wang R, Ossipov M, Lai J y Porreca F. Enhanced evoked excitatory transmitter release in experimental neuropathy requires descending facilitation. *The Journal of Neuroscience* 23:8370-8379, 2003.
- ✓ Gaumond I, Arsenault P y Marchand S. The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. *Brain Research* 958:139-145, 2002.
- ✓ Gerard C, Mestikawy S, Lebrand C, Adrien J, Ruat M, Traiffort E, Hamon M y Martres M. Quantitative RT-PCR distribution of serotonin 5-HT₆ receptor mRNA in the central nervous system of control or 5,7-dihydroxytryptamine treated rats. *Synapse* 23:164-73, 1996.
- ✓ Gershon M y Tack J. The serotonin signaling system: From basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 132:397-414, 2007.

- ✓ Gingrich J y Hen R. Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice. *Psychopharmacology* 155:1-10, 2001.
- ✓ Giordano J y Dyche J. Differential analgesic actions of serotonin 5-HT₃ receptor antagonists in the mouse. *Neuropharmacology* 28:423-427, 1989.
- ✓ Giordano J y Rogers V. Peripherally administered serotonin 5-HT₃ receptor antagonists reduce inflammatory pain in rats. *European Journal of Pharmacology* 170:83-86, 1989.
- ✓ Giordano J y Schultea T. Serotonin 5-HT₃ receptor mediation of pain and antinociception: Implications for clinical therapeutics. *Pain Physician* 7:141-147, 2004.
- ✓ Glatzle J, Sternini C, Robin C, Zittel T, Wong H, Reeve R y Raybould H. Expression of 5-HT₃ receptors in the rat gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 123:217-26, 2002.
- ✓ Godínez-Chaparro B, Barragán-Iglesias P, Castañeda-Corral P, Rocha-González HI y Granados-Soto V. Role of peripheral 5-HT₄, 5-HT₆, and 5-HT₇ receptors in development and maintenance of secondary mechanical allodynia and hyperalgesia. *Pain* 152:687-697, 2011.
- ✓ Göthert M, Rappold G y Brüss M. Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} and 5-HT_{3E}. *Molecular Pharmacology*. 72:8-17, 2007.
- ✓ Grahame-Smith G. Tryptophan hydroxylation in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 16:586-592, 1964.
- ✓ Granados-Soto V, Amaya-Castellanos E, Ambriz-Tututi M, Castañeda-Corral G y Rocha-González HI. Methodological aspects of pain models. *Transworld Research Network* 2:99-118, 2009.
- ✓ Granados-Soto V, Argüelles CF, Rocha-González HI, Godínez-Chaparro B, Flores-Murrieta FJ y Villalón CM. The role of peripheral 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} serotonergic receptors in the reduction of nociception in rats. *Neuroscience* 165:561-568, 2010.
- ✓ Green G, Scarth J y Dickenson A. An excitatory role for 5-HT in spinal inflammatory nociceptive transmission; State-dependent actions via dorsal horn 5-HT₃ receptors in the anaesthetized rat. *Pain* 89:81-88, 2000.

- ✓ Hamon M y Bourgoïn S. Role of serotonin and other neuroactive molecules in the physiopathogenesis of migraine. *Current Hypotheses. Pathologie-Biologie* 48:619-629, 2000.
- ✓ Hannon J y Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research* 195:198-213, 2008.
- ✓ Hapfelmeier G, Tredt C, Haseneder R, Zieglgänsberger W, Eisensamer B, Rupprecht R y Rammes G. Co-expression of the 5-HT_{3B} serotonin receptor subunit alters the biophysics of the 5-HT₃ receptor. *Biophysical Journal* 84:1720-1733, 2003.
- ✓ Haus U, Späth M y Färber L. Spectrum of use and tolerability of 5-HT₃ receptor antagonists. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 33:12-18, 2004.
- ✓ Heinricher M, Tavares I, Leith J y Lumb B. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Research Reviews* 60:214-225, 2009.
- ✓ Hicks G, Coldwell J, Schindler M, Ward P, Jenkins D, Lynn P, Humphrey P y Blackshaw L. Excitation of rat colonic afferent fibers by 5-HT₃ receptors. *The Journal of Physiology* 544:861-869, 2002.
- ✓ Hong Y y Abbott F. Behavioural effects of intraplantar injection of inflammatory mediators in the rat. *Neuroscience* 63:827-836, 1994.
- ✓ Hoyer D, Clarke D, Fozard J, Hartig P, Martin G, Mylecharane E, Saxena P y Humphrey P. International Union of Pharmacology: Classification of receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Reviews* 46:157-203, 1994.
- ✓ Hu X y Peoples R. The 5-HT_{3B} subunit confers spontaneous channel opening and altered ligand properties of the 5-HT₃ receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 283:6826-6831, 2008.
- ✓ Huang J, Wang Y, Wang W, Li Y, Tamamakib N y Wua S. 5-HT_{3A} receptor subunit is expressed in a subpopulation of GABAergic and enkephalinergic neurons in the mouse dorsal spinal cord. *Neuroscience Letters* 441:1-6, 2008.
- ✓ Ilegems E, Pick H, Deluz C, Kellenberger S y Vogel H. Noninvasive imaging of 5-HT₃ receptor trafficking in live cells: From biosynthesis to endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry* 279:53346-53352, 2004.

- ✓ Ireland S. Origin of 5-hydroxytryptamine-induced hyperpolarization of the rat superior cervical ganglion and vagus nerve. *British Journal of Pharmacology* 92:407-416, 1987.
- ✓ Jeong C, Choi J y Yoon M. Roles of serotonin receptor subtypes for the antinociception of 5-HT in the spinal cord of rats. *European Journal of Pharmacology* 502:205-211, 2004.
- ✓ Jolivald C, Ramos K, Herbetsson K, Esch F y Calcutt N. Therapeutic efficacy of prosaposin-derived peptide on different models of allodynia. *Pain* 121:14-21, 2006.
- ✓ Julius D y Basbaum A. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210, 2001.
- ✓ Katz E y Gold M. Inflammatory hyperalgesia: A role for the C-fiber sensory neuron cell body? *The Journal of Pain* 7:170-178, 2006.
- ✓ Kaumann A y Levy F. 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacology and Therapeutics* 111:674-706, 2006.
- ✓ Kayser V, Elfassi I, Aubel B, Melfort M, Julius D, Gingrich J, Hamon M y Bourgoin S. Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT_{1A}^{-/-}, 5-HT_{1B}^{-/-}, 5-HT_{2A}^{-/-}, 5-HT_{3A}^{-/-} and 5-HTT^{-/-} knock-out male mice. *Pain* 130:235-248, 2007.
- ✓ Kema I, Vries E y Muskiet F. Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications* 747:33-48, 2000.
- ✓ Kidd E, Laporte A, Langlois X, Fattaccini C, Doyen C, Lombard M, Gozlan H y Hamon M. 5-HT₃ receptors in the rat central nervous system are mainly located on nerve fibers and terminals. *Brain Research* 612:289-298, 1993.
- ✓ Lagraize S, Guo W, Yang K, Wei F, Ren K y Dubner R. Spinal cord mechanisms mediating behavioral hyperalgesia induced by neurokinin-1 tachykinin receptor activation in the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* 171:1341-1356, 2010.
- ✓ Lang P, Moalem-Taylor G, Tracey D, Bostock H y Grafe P. Activity-dependent modulation of axonal excitability in unmyelinated peripheral rat nerve fibers by the 5-HT₃ serotonin receptor. *Journal of Neurophysiology* 96:2963-2971, 2006.

- ✓ Latremoliere A y Clifford W. Central sensitization: A generator of pain hypersensitivity by Central neural plasticity. *Journal of Pain* 10:895-926, 2009.
- ✓ Le Bars D, Rosario M y Camden S. Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews* 53:597-652, 2001.
- ✓ Leem J, Willis W, Weller S y Chung J. Cutaneous sensory receptors in the rat foot. *Journal of Neurophysiology* 69:1684-1699, 1993.
- ✓ Leem J, Willis W, Weller S y Chung J. Differential activation and classification of cutaneous afferents in the rat. *Journal of Neurophysiology* 70:2411-2424, 1993.
- ✓ Lin S, Chang W, Lin C, Huang C, Wang H y Sun W. Serotonin receptor 5-HT_{2B} mediates serotonin-induced mechanical hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience* 31:1410-1418, 2011.
- ✓ Lindstedt F, Berrebi J, Greayer E, Lonsdorf T, Schalling M, Ingvar M y Kosek E. Conditioned pain modulation is associated with common polymorphisms in the serotonin transporter gene. *PloS One* 6:e8252, 2011.
- ✓ Linhart O, Obreja O y Kress M. The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E₂ and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. *Neuroscience* 118:69-74, 2003.
- ✓ Liu F, Xing G, Qu X, Xu I, Han J y Wan Y. Roles of 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor subtypes in the inhibitory effects of 5-HT on C-fiber responses of spinal wide dynamic range neurons in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321:1046-1053, 2007.
- ✓ Liu X, Wu S, Wang Y, Wang W, Zhou L, Li Y. Changes of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by bee venom-induced inflammatory pain. *Neuroscience Letters* 375:42-46, 2005.
- ✓ Loeser J y Melzack R. Pain: An overview. *Lancet* 353:1607-1609, 1999.
- ✓ Mascagni F y McDonald J. A Novel Subpopulation of 5-HT_{3A} Receptor immunoreactive interneurons in the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* 144:1015-1024, 2007.

- ✓ Maxwell D, Kerr R, Rashid S y Anderson E. Characterization of axon terminals in the rat dorsal horn that are immunoreactive for serotonin 5-HT_{3A} receptor subunits. *Experimental Brain Research* 149:114-124, 2003.
- ✓ McCleane G, Suzuki R y Dickenson A. Does a single intravenous injection of the 5HT₃ receptor antagonist ondansetron have an analgesic effect in neuropathic pain? A double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Anesthesia and Analgesia* 97:1474-1478, 2003.
- ✓ Mellers S, Dykstra C, Grzybycki D, Murphy S y Gebhart G. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology* 33:1471-1478, 1994.
- ✓ Merskey H. Classification of chronic pain: Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Monograph for Subcommittee on Taxonomy, International Association for the Study of Pain. *Pain Supplement*. 3:1-226, 1986.
- ✓ Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms: International Association for the Study of Pain; 1994.
- ✓ Merskey H. The taxonomy of pain. *Medical Clinics of North America* 91:13-20, 2007.
- ✓ Millan M. Serotonin and pain: Evidence that activation of 5-HT_{1A} receptors does not elicit antinociception against noxious thermal, mechanical and chemical stimuli in mice. *Pain* 58:45-61, 1994.
- ✓ Millan M. Serotonin (5-HT) and pain: A reappraisal of its role in the light of receptor multiplicity. *The Neurosciences* 7:409-419, 1995.
- ✓ Millan M. The induction of pain: An integrative review. *Progress in Neurobiology* 57:1-164, 1999.
- ✓ Millan M. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology* 66:355-474, 2002.
- ✓ Moalem G y Tacey J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Research Reviews* 51:240-264, 2006.

- ✓ Moalem G, Grafe P y Tracey J. Chemical mediators enhance the excitability of unmyelinated sensory axons in normal and injured peripheral nerve of the rat. *Neuroscience* 134:1399-1411, 2005.
- ✓ Moalem G y Tracey D. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Research Reviews* 51:240-264, 2006.
- ✓ Mochizuki S, Miyake A y Kiyoshi F. Identification of a domain affecting agonist potency of *meta*-chlorophenylbiguanide in 5-HT₃ receptors. *European Journal of Pharmacology* 369:125-132, 1999.
- ✓ Moir A. Interaction in the cerebral metabolism of the biogenic amines: Effect of intravenous infusion of L-tryptophan on tryptophan and tyrosine in brain and body fluids. *British Journal of Pharmacology* 43:724-731, 1971.
- ✓ Morales M, Battenberg E, Lecea L, Sanna P y Bloom F. Cellular and subcellular immunolocalization of the type 3 serotonin receptor in the rat central nervous system. *Molecular Brain Research* 36:251-260, 1996.
- ✓ Morales M, Battenberg E y Bloom F. Distribution of neurons expressing immunoreactivity for the 5HT₃ receptor subtype in the rat brain and spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology* 385:385-401, 1998.
- ✓ Morales M, McCollum N y Kirkness E. 5-HT₃-receptor subunits A and B are co-expressed in neurons of the dorsal root ganglion. *The Journal of Comparative Neurology* 438:163-172, 2001.
- ✓ Morales M y De Wang S. Differential composition of 5-hydroxytryptamine 3 receptors synthesized in the rat CNS and peripheral nervous system. *The Journal of Neuroscience* 22:6732-6741, 2002.
- ✓ Moss J y Smart T. Constructing inhibitory synapses. *Nature Reviews* 2:240-250, 2001.
- ✓ Müller T, Dürk T, Blumenthal B, Grimm M, Cicko S, Panther E, Sorichter S, Herouy Y, Di Virgilio F, Ferrari D, Norgauer J y Idzko M. 5-Hydroxytryptamine modulates migration, cytokine and chemokine release and T-cell priming capacity of dendritic cells in vitro and in vivo. *PloS One* 4:e6453, 2009.
- ✓ Nakajima K, Obata H, Ito N, Goto F y Saito S. The nociceptive mechanism of 5-hydroxytryptamine released into the peripheral tissue in acute inflammatory pain in rats. *European Journal of Pain* 13:441-447, 2009.

- ✓ Nichols D y Nichols C. Serotonin receptors. *Chemical Reviews* 108:1614-1641, 2008.
- ✓ Nicholson R, Small J, Dixon A, Spanswick D y Lee K. Serotonin receptor mRNA expression in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience Letters* 337:119-122, 2003.
- ✓ Niesler B, Walstab J, Combrink S, Moeller D, Kapeller J, Rietdorf J, Bönisch H, Göthert M, Rappold G y Brüss M. Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D}, and 5-HT_{3E}. *Molecular Pharmacology* 72:8-17, 2007.
- ✓ Oatway M, Chen Y y Weaver L. The 5-HT₃ receptor facilitates at-level mechanical allodynia following spinal cord injury. *Pain* 110:259-268, 2004.
- ✓ Oliveira M, Pelegrini-Da-Silva A, Parada C y Tambeli C. 5-HT acts on nociceptive primary afferents through an indirect mechanism to induce hyperalgesia in the subcutaneous tissue. *Neuroscience* 145:708-714, 2007.
- ✓ Ossipov M, Dussor G y Porreca F. Central modulation of pain. *The Journal of Clinical Investigation* 120:3379-3787, 2010.
- ✓ Oyama T, Ueda M, Kuraishi Y, Akaike A y Satoh M. Dual effect of serotonin on formalin-induced nociception in the rat spinal cord. *Neuroscience Research* 25:129-135, 1996.
- ✓ Parada C, Tambeli C, Cunha FQ y Ferreira SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience* 102:937-944, 2001.
- ✓ Paul D, Yao D, Zhu P, Minor L y Garcia M. 5-Hydroxytryptamine₃ (5-HT₃) receptors mediate spinal 5-HT antinociception: An antisense approach. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298:674-678, 2001.
- ✓ Peng Y, Wu J, Willis W y Kenshalo D. GABA_A and 5-HT₃ receptors are involved in dorsal root reflexes: Possible role in periaqueductal gray descending inhibition. *Journal of Neurophysiology* 86:49-58, 2001.

- ✓ Peroutka S y Snyder S. Multiple serotonin receptors: Differential binding of [³H]5-hydroxytryptamine, [³H]lysergic acid Diethylamide and [³H]spiroperidol. *Molecular Pharmacology* 16:687-699, 1979.
- ✓ Peters C, Hayashida K, Ewan E, Nakajima K, Obata H, Xu Q, Yaksh T y Eisenach J. Lack of analgesic efficacy of spinal ondansetron on thermal and mechanical hypersensitivity following spinal nerve ligation in the rat. *Brain Research* 1352:83-93, 2010.
- ✓ Peters J, Lummis S, Barnes N, Hales T y Niesler B. 5-HT₃ receptors. NC-IUPHAR, 2010.
- ✓ Pierce A, Xie G, Levine J y Peroutka S. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: A polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 70:553-559, 1996.
- ✓ Porreca F, Burgess S, Gardell L, Vanderah T, Malan T, Ossipov M, Lappi D y Lai J. Inhibition of neuropathic pain by selective ablation of brainstem medullary cells expressing the mu-opioid receptor. *The Journal of Neuroscience* 21:5281-5288, 2001.
- ✓ Rahman W, Suzuki R, Rygh L y Dickenson A. Descending serotonergic facilitation mediated through rat spinal 5-HT₃ receptors is unaltered following carrageenan inflammation. *Neuroscience Letters* 361:229-231, 2004.
- ✓ Rahman W, Suzuki R, Webber M, Hunt S y Dickenson A. Depletion of endogenous spinal 5-HT attenuates the behavioural hypersensitivity to mechanical and cooling stimuli induced by spinal nerve ligation. *Pain* 123:264-274, 2006.
- ✓ Rahman W, Bauer C, Bannister K, Vonsy J, Dolphin A y Dickenson A. Descending serotonergic facilitation and the antinociceptive effects of pregabalin in a rat model of osteoarthritic pain. *Molecular Pain* 5:45, 2009.
- ✓ Raybould H, Glatzle J, Robin C, Meyer J, Phan T, Wong H y Sternini C. Expression of 5-HT₃ receptors by extrinsic duodenal contribute to intestinal inhibition of gastric emptying. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology* 284:367-372, 2003.
- ✓ Raymond J, Mukhin Y, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys T, Grewal J y Garnovskaya M. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacology and Therapeutics* 92:179-212, 2001.

- ✓ Rende M, Morales M, Brizi E, Bruno R, Bloom F, Sanna P. Modulation of serotonin 5-HT₃ receptor expression in injured adult rat spinal cord motoneurons. *Brain Research* 823:234-240, 1999.
- ✓ Rexed B. Cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *Journal of Comparative Neurology* 96:415, 1952.
- ✓ Richardson B, Engel G, Donatsch P y Stadler P. Identification of serotonin M-receptor subtypes and their specific blockade by a new class of drugs. *Nature* 316:126-31, 1985.
- ✓ Richardson B. Serotonin and nociception. *Annals of the New York Academy of Sciences* 600:511-520, 1990.
- ✓ Rivera J y Haddad J. Serotonina y síndrome del carcinoide. *Revista Médica Hondureña* 32:100-105, 1962.
- ✓ Rocha-González H, Meneses A, Carlton S y Granados-Soto V. Pronociceptive role of peripheral and spinal 5-HT₇ receptors in the formalin test. *Pain* 117:182-192, 2005.
- ✓ Ruda M, Bennett G y Dubner R. Neurochemistry and neurocircuitry in the dorsal horn. *Progress in Brain Research* 66:219, 1986.
- ✓ Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S y Kisara K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology* 31:1279-1285, 1992.
- ✓ Sandkühler J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiological Reviews* 89:707-758, 2009.
- ✓ Saria A, Javorsky F, Humpel C y Gamse R. 5-HT₃ receptor antagonists inhibit sensory neuropeptide release from the rat spinal cord. *Neuroreport* 1:104-106, 1990.
- ✓ Sasaki M, Ishizaki K, Obata H y Goto F. Effects of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin test. *European Journal of Pharmacology* 424:45-52, 2001.

- ✓ Sasaki M, Obata H, Kawahara K, Saito S y Goto F. Peripheral 5-HT_{2A} receptor antagonism attenuates primary thermal hyperalgesia and secondary mechanical allodynia after thermal injury in rats. *Pain* 122:130-136, 2006.
- ✓ Scholz J y Woolf C. Can we conquer pain?. *Nature Neuroscience* 5:1062-1067, 2002.
- ✓ Sharif-Naeini R y Basbaum A. Targeting pain where it resides...in the brain. *Science Translational Medicine* 3:65ps1, 2011.
- ✓ Sheng M y Pak D. Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. *Annual Review of Physiology* 62:755-778, 2000.
- ✓ Sjoerdsma A y Palfreyman M. History of serotonin and serotonin disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* 600:1-7, 1990
- ✓ Sommer C. Serotonin in pain and analgesia: Actions in the periphery. *Molecular Neurobiology* 30:117-125, 2004.
- ✓ Song Z, Ultenius C, Meyerson B y Linderöth B. Pain relief by spinal cord stimulation involves serotonergic mechanisms: An experimental study in a rat model of mononeuropathy. *Pain* 147:241-248, 2009.
- ✓ Song Z, Meyerson B, Linderöth B. Spinal 5-HT receptors that contribute to the pain-relieving effects of spinal cord stimulation in a rat model of neuropathy. *Pain* 152:1666-1673, 2011.
- ✓ Stein C, Clark J, Vasko O, Wilcox G, Overland A, Vanderah T y Spencer R. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. *Brain Research Reviews* 60:90-113, 2009.
- ✓ Stratz T y Müller W. Treatment of chronic low back pain with tropisetron. *Scandinavian Journal of Rheumatology Supplement* 119:76-78, 2004.
- ✓ Sufka K, Schomburg F y Giordano J. Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 41:53-56, 1992.
- ✓ Sun H, Hu X, Moradel E, Weight F y Zhang L. Modulation of 5-HT₃ receptor-mediated response and trafficking by activation of protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 278:34150-34157, 2003.

- ✓ Suzuki R, Morcuende S, Webber M, Hunt S y Dickenson A. Superficial NK1 expressing neurones control spinal excitability by activation of descending pathways. *Nature Neuroscience* 5:319-326, 2002.
- ✓ Suzuki R, Rahman W, Hunt S y Dickenson A. Descending facilitatory control of mechanically evoked responses is enhanced in deep dorsal horn neurones following peripheral nerve injury. *Brain Research* 1019:68-76, 2004.
- ✓ Suzuki R y Dickenson A. Spinal and supraspinal contributions to central sensitization in peripheral neuropathy. *Neurosignals* 14:175-181, 2005.
- ✓ Suzuki R, Rahman W, Rygh L, Webber M, Hunt S y Dickenson A. Spinal-supraspinal serotonergic circuits regulating neuropathic pain and its treatment with gabapentin. *Pain* 117:292-303, 2005.
- ✓ Svensson C, Tran T, Fitzsimmons B, Yaksh T y Hua XY. Descending serotonergic facilitation of spinal ERK activation and pain behavior. *The FEBS Letters* 580:6629-6634, 2006.
- ✓ Tambeli C, Oliveira M, Clemente J, Pelegrini-Da-Silva A y Parada A. A novel mechanism involved in 5-hydroxytryptamineinduced nociception: The indirect activation of primary afferents. *Neuroscience* 141:1517-1524, 2006.
- ✓ Tecott L, Andres V, Mariq V y Julius D. Nervous system distribution of the serotonin 5-HT₃ receptor mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:1430-1434, 1993.
- ✓ Tjølsen A, Berge O, Hunskaar S, Rosland J y Hole K. The formalin test: An evaluation of the method. *Pain* 51:5-17, 1992.
- ✓ Todorovic S y Anderson E. 5HT₂ and 5HT₃ receptors mediate two distinct depolarizing responses in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research* 511:71-79, 1990.
- ✓ Törk I. Anatomy of the serotonergic system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 600:9-35, 1990.
- ✓ Tracey T y Mantyh P. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron* 55:377-391, 2007.

- ✓ Treede R, Meyer R, Raja S y Campbell J. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Progress in Neurobiology* 38:397-421, 1992.
- ✓ Urban M y Gebhart G. Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America* 96:7687-7692, 1999.
- ✓ Vanegas H y Schaible H. Descending control of persistent pain: Inhibitory or facilitatory?. *Brain Research Reviews* 46:295-309, 2004.
- ✓ Vanderah T. Patophysiology of pain. *Medical Clinics of North America* 91:1-12, 2007.
- ✓ Veiga A, Duarte I, Avila M, Motta P, Tatsuo M y Francischi J. Prevention by celecoxib of secondary hyperalgesia induced by formalin in rats. *Life Sciences* 75:2807-2817, 2004.
- ✓ Vergé D y Calas A. Serotonergic neurons and serotonin receptors: Gains from cytochemical approaches. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 18:41-56, 2000.
- ✓ Vierck C, Yeziarski R y Light R. Long-lasting hyperalgesia and sympathetic dysregulation after formalin injection into the rat hind paw. *Neuroscience* 153:501-506, 2008.
- ✓ Walstab J, Rappold G y Niesler B. 5-HT₃ receptors: Role in disease and target of drugs. *Pharmacology and Therapeutics* 128:146-196, 2010.
- ✓ Wei F, Dubner R, Zou S, Ren K, Bai G, Wei D y Guo W. Molecular depletion of descending serotonin unmasks its novel facilitatory role in the development of persistent pain. *The Journal of Neuroscience* 30:8624-8636, 2010.
- ✓ Wheeler-Aceto H, Cowan A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology* 104:35-44, 1991.
- ✓ Wiertelak E, Furness L, Horan R, Martinez J, Maier S y Watkins L. Subcutaneous formalin produces centrifugal hyperalgesia at a non-injected site via the NMDA-nitric oxide cascade. *Brain Research* 649:19-26, 1994.
- ✓ Wiertelak E, Furness L, Watkins L y Maier S. Illness-induced hyperalgesia is mediated by a spinal NMDA-nitric oxide cascade. *Brain Research* 664:9-16, 1994.

- ✓ Wiertelak E, Roemer B, Maier R y Watkins L. Comparison of the effects of nucleus tractus solitarius and ventral medial medulla lesions on illness-induced and subcutaneous formalin-induced hyperalgesia. *Brain Research* 748:143-150, 1997.
- ✓ Willis W. Dorsal horn neurophysiology of pain *Annals of the New York Academy of Sciences* 531:76-89, 1988.
- ✓ Wolf H. Preclinical and clinical pharmacology of the 5-HT₃ receptor antagonists. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 113:37-45, 2000.
- ✓ Wolf C. What is this called pain?. *The Journal of Clinical Investigation* 120:3742-3744, 2010.
- ✓ Woolf C. Physiological, inflammatory and neuropathic pain. *Advances and Technical Standards in Neurosurgery* 15:39-62, 1987.
- ✓ Woolf C. Generation of acute pain: Central mechanisms. *British Medical Bulletin* 47:523-33, 1991.
- ✓ Woolf C y Ma Q. Nociceptors-Noxious stimulus detectors. *Neuron* 55:353-364, 2007.
- ✓ Wu S, Zhu M, Wang W, Wang Y, Li Y y Yew D. Changes of the expression of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by complete Freund's adjuvant-induced inflammation. *Neuroscience Letters* 307:183-186, 2001.
- ✓ Wu Y, Willcockson H, Maixner W y Light A. Suramin inhibits spinal cord microglia activation and long-term hyperalgesia induced by formalin injection. *The Journal of Pain* 5:48-55, 2004.
- ✓ Xie G, Wang Y, Sharma M, Gabriel A, Mitchell J, Xing Y, Meuser T y Palmer P. 5-Hydroxytryptamine-induced plasma extravasation in the rat knee joint is mediated by multiple prostaglandins. *Inflammation Research* 52:32-38, 2003.
- ✓ Xiong W, Hosoi M, Nyeo B y Zang L. Anandamide inhibition of 5-HT_{3A} receptors varies with receptor density and desensitization. *Molecular Pharmacology* 73:314-322, 2008.
- ✓ Xu M, Kim C, Neubert M y Heinricher M. NMDA receptor-mediated activation of medullary pro-nociceptive neurons is required for secondary thermal hyperalgesia. *Pain* 127:253-262, 2007.

- ✓ Yaksh T y Rudy T. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiology and Behavior* 17:1031-1036, 1976.
- ✓ Yaksh T y Wilson P. Spinal serotonin terminal system mediates antinociception. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 208:446-453, 1979.
- ✓ Yaksh T, Ozaki G, McCumber D, Rathbun M, Svensson C, Malkmus S y Yaksh M. An automated flinch detecting system for use in the formalin nociceptive bioassay. *Journal of Applied Physiology* 90:2386-2402, 2001.
- ✓ Ye J, Mui W, Ren J, Hunt T, Wu W y Zbuzek V. Ondansetron exhibit the properties of a local anesthetic. *Anesthesia and Analgesia* 85:1116-1121, 1997.
- ✓ Yoon M, Bae H, Choi J, Kim S, Chung S y Kim C. Lack of reciprocity between opioid and 5-HT₃ receptors for antinociception in rat spinal cord. *Pharmacology* 77:195-202, 2006.
- ✓ Yoshimura M y Furue H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *Journal of Pharmacological Sciences* 101:107-117, 2006.
- ✓ You H, Cao D, Yuan B y Arendt-Nielsen L. Sex differences in the responses of spinal wide-dynamic range neurons to subcutaneous formalin and in the effects of different frequencies of conditioning electrical stimulation. *Neuroscience* 138:1299-1307, 2006.
- ✓ Zeilhofer H. Synaptic modulation in pain pathways. *Reviews Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 154:73-100, 2005.
- ✓ Zeilhofer H y Zeilhofer U. Spinal dis-inhibition in inflammatory pain. *Neuroscience Letters* 437:170-174, 2008.
- ✓ Zeilhofer H. Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain-contributions of inflammation and microglia. *International Immunopharmacology* 8:182-187, 2008.
- ✓ Zeitz K, Guy N, Malmberg A, Dirajlal S, Martin W, Sun L, Bonhaus D, Stucky C, Julius D y Basbaum A. The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *Neuroscience* 22:1010-1019, 2002.

- ✓ Zemlan F, Behbehani M y Murphy R. Serotonin receptor subtypes and the modulation of pain transmission. *Progress in Brain Research* 77:349-55, 1988.
- ✓ Zhang F, Wan Y, Zhang Z, Light A y Fu K. Peripheral formalin injection induces long-lasting increases in cyclooxygenase 1 expression by microglia in the spinal cord. *The Journal of Pain* 8:110-117, 2007.
- ✓ Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110, 1983.
- ✓ Zuo Y, Perkins N, Tracey D y Geczy C. Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: A key role of mast cells. *Pain* 105:467-479, 2003.

