

Plasticidad de los receptores de dopamina en las astas posteriores de la médula espinal: Interacción con la modulación opioide del dolor

Teresa Barrenetxea Zorrilla

Director: Dr. Zigor Aira Muga
Ponente: Dr. Jon Jatsu Azkue Barrenetxea
Grupo de Mecanismos del Dolor

2017

Contenido

Agradecimientos	9
Glosario	15
Resumen	19
Introducción	23
1. Vías de proyección descendente dopaminérgicas	25
1.1. Neuroanatomía y neuroquímica	25
1.2. Su influencia en el dolor agudo/persistente	27
2. Receptores de dopamina medulares y su función en la neurotransmisión	29
3. Plasticidad glutamatérgica y neurotransmisión dopaminérgica	31
4. Papel de la neurotransmisión dopaminérgica en la analgesia opioide	32
4.1. Interacción opioide-dopamina en astas posteriores	32
4.2. Regulación dopaminérgica de la represión endógena de la plasticidad sináptica inducida por opioides	34
5. Modulación condicionada del dolor (CPM, <i>conditioned pain modulation</i>)	36
5.1. ¿Qué es la CPM?	36
5.2. Desencadenamiento de la CPM. Protocolos habituales y alternativas	39
Hipótesis/Objetivos	45
Resultados y Discusión	49
Estudio 1. Sobrerregulación sináptica e interacción superaditiva del receptores D2 y opioide de subtipo μ tras daño de un nervio periférico	51
Estudio 2. El receptor dopaminérgico D1 regula constitutivamente la represión mediada por el receptor de subtipo μ de la plasticidad sináptica dependiente del uso en astas posteriores: ¿más daño que beneficio?	63
Estudio 3. Los receptores dopaminérgicos medulares D1 modulan la hiperexcitabilidad mediada por el receptor NMDA y la fosforilación de la subunidad NR1 en la serina 889.	84
Estudio 4. Desencadenamiento del CPM mediante estimulación TENS como alternativa a otros métodos: Estudio del control endógeno de sujetos sanos y pacientes con SC.	92
Conclusiones	111
Material y Métodos	117
ESTUDIOS EN ANIMALES	119
1. Preparación animal y procedimiento de LNR	119
1.1. Preparación animal	119
1.2. Cirugía de ligadura del quinto nervio raquídeo lumbar	119
2. Registro de potenciales de campo evocados en la médula espinal <i>in vivo</i>	120
2.1. Extracción de parámetros	120
2.2. Estimulación del nervio ciático	122
2.3. Registro electrofisiológico	122
2.4. Extracción de parámetros	123
2.5. Verificación histológica	124
3. Superfusión medular controlada	125
4. Evaluación de comportamiento	126
4.1. Umbral de dolor a la estimulación mecánica	126
4.2. Evaluación de la alodinia térmica	129
5. Fraccionamiento subcelular y Western Blot	130
6. Doble y triple inmunofluorescencia para microscopio confocal	131

7. Transfección y cultivo celular	133
8. Análisis estadístico	134
ESTUDIOS EN HUMANOS	136
1. Preparación previa al estudio	136
1.1. Consideraciones éticas generales y específicas	136
1.2. Reclutamiento de pacientes	136
1.3. Cuestionarios	137
2. Protocolo de evaluación de CPM y equipos	137
2.1. Umbral del dolor a la estimulación de presión profunda (PPT)	138
2.2. Estimulación eléctrica heterotópica	139
3. Análisis estadístico	140

Lista de Referencias **145**

Anexos **168**

- Aira Z, Barrenetxea T, Buesa I, Gómez-Esteban JC, Azkue JJ (2014) Synaptic up-regulation and super-additive interaction of dopamine D2-and mu-opioid receptors following peripherals nerve injury. *Pain* 155:2526-2533.
- Aira Z, Barrenetxea T, Buesa I, Azkue JJ (2016) Dopamine D1-like receptors regulate constitutive, μ opioid receptor-mediated repression of use-dependent synaptic plasticity in dorsal horn neurons: more harm than good? *The Journal of Neuroscience* 36(20):5661-5673.
- Aira Z, Barrenetxea T, Buesa I, Martínez E, Azkue JJ (2016) Spinal D1-like dopamine receptors modulate NMDA receptors modulate NMDA receptor-induced hyperexcitability and NR1 subunit phosphorylation at serine 889. *Neuroscience Letters* 618:152-158.
- Desencadenamiento del CPM mediante estimulación eléctrica heterotópica (TENS) como alternativa a otros métodos: Estudio del control endógeno de sujetos sanos y enfermos con sensibilización central (en vías de publicación)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar debo dar las gracias a Jatsu y a Zigor por darme esta oportunidad, por ver cosas que yo ni siquiera me atrevía a imaginar. Esta tesis sabéis que es más vuestra que mía.

Por supuesto, agradezco a la universidad, y principalmente al Departamento de Neurociencias, que me hayan acogido durante esta aventura. Y si hay alguien a quién debo dar las gracias en este momento es a Bego Sanz, la persona con la que me puse por primera vez los guantes y que me hizo sentir frente a una poyata como pez en el agua.

Quiero hacer una mención especial a todas las personas que han confiado en mí y han pasado por la consulta, a todas las asociadas de **Eman Eskua** en Bilbao, de **ACEF** en Santander, de OSCUS Bilbao y a las múltiples personas que desinteresadamente se han presentado voluntarias para uno de los estudios contenidos en esta tesis. Sin personas así, la investigación clínica no sería posible. ¡Gracias!

Con todas las personas que he conocido durante estos años que sufren dolor crónico comparto esta cita:

"Si no está en tus manos cambiar una situación que te produce dolor, siempre podrás escoger la actitud con la que afrontes ese sufrimiento."

Viktor Frankl

Y por último... gracias a las personas que son importantes en mi vida y que me sufren de cerca. Yo soy más de invitar a comer que de hacer dedicatorias así que... no escribiré una larga lista de nombres en este papel, ellos ya saben todo lo que les diría, aunque a algunos les debo una mención especial, como no! A Berna y a Macrín, a Justo y a Teresa, indudablemente sin ellos ni siquiera estaría aquí! A Jose Ignacio y Maria Elena, por haber estado ahí desde el inicio, desde cosas tan básicas como darme las herramientas para llegar hasta aquí, hasta apoyarme cada segundo en este camino, espero que sintáis que ha merecido la pena. Por supuesto, también han sido un apoyo incondicional mis hermanos, siendo cada uno de ellos una fuente de inspiración, creatividad e ilusión respectivamente. Espero ser un ejemplo, por lo menos la décima parte de bueno del que ellos fueron para mí, para esos pequeños monstruitos que alborotan nuestras vidas. También a Mari Carmen, mi segunda ama, por acompañarme en estos años duros a pesar de que los suyos eran mucho peores. Eta familiagaz amaitzeko, abutzuko gau batean aurkitutako mundu grisari galduta koloreari. Egun hartatik, gidari bezala lagundu dit errusiar mendia den bizi hontan.

A todos ellos...gracias, de verdad! ¡Gracias por acompañarme en este viaje!

A la primera persona que me habló de enanas blancas, gigantes rojas y agujeros de gusano, que me enseñó a acariciar abejorros y a sentir asombro por la ciencia; un gran maestro, y mejor persona.

GLOSARIO

AC: Adenilato ciclasa.
AMPC: Adenosín monofosfato cíclico.
ANOVA: *Analysis of variance*, análisis de varianza.
BPQ: Body perception questionnaire
CIND: *Diffuse noxious inhibitory controls*, controles inhibidores nocivos difusos.
Cis-ACPD: Agonista del receptor NMDA.
CPM: *Conditioned pain modulation*, modulación condicionada del dolor.
CREB: *cAMP response element-binding*, factor de transcripción.
CTOP: Antagonista de MOR.
D(1-5): Diferentes receptores dopaminérgicos, del 1 al 5.
DAMGO: [D-Ala, N-Met-Phe,Gly-ol]-enkephalin, agonista de MOR.
D-AP5: Antagonista de NMDA.
EBF: *Low frequency stimulation*, estimulación de baja frecuencia.
EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*, ácido etildiaminotetraacético.
EIDF: Escala de impacto diario de la fatiga.
EGTA: *Ethylene glycol tetracetic acid*, ácido etilglicoltetraacético.
ETM: Error típico de la media.
FIQ: *Fibromyalgia impact questionnaire*, cuestionario de impacto de la fibromialgia sobre la salud.
GABA: *Gamma-aminobutyric acid*, Ácido gamma aminobutírico.
G_i: Proteína G inhibidora.
GRK: Proteína quinasa del receptor acoplado a proteína G.
G_s: Proteína G estimuladora.
HAQ: *Health assessment questionnaire*, cuestionario de incapacidad.
HRP: *Horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano picante.
IC50: *Half maximal inhibitory concentration*, concentración para inhibición de la mitad del máximo.
i.p.: vía interperitoneal.
IRSN: Inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina.
LCRA: Líquido cefalorraquídeo artificial.
LNR: Ligadura del nervio raquídeo.
MHLC: *Multidimensional health locus of control*, escala multidimensional de locus de control sobre la salud.
MOR: Receptor opioide μ .
NMDA: N-metil-D-aspartato.
NeuN: *Neuronal nuclear antigen*, antígeno nuclear neuronal.
NR1: Subunidad 1 del receptor NMDA.
NR2B: Subunidad 2B del receptor NMDA, isoforma de la NR2.
PAG: Sustancia gris periacueductal.
PBST: *Phosphate Buffered Saline Tween*, Tampón fosfato salino con Tween.
PET: *Positron emission tomography*, tomografía de emisión de positrones.
PCS: *Pain catastrophizing scale*, escala de catastrofismo frente al dolor.
PKC: Proteínquinasa C.
PLC: Fosfolipasa C.
PLP: *Long-term potentiation*, potenciación a largo plazo.
PMSF: *Phenylmethanesulfonylfluoride*, fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
pNR1^{ser889}: Subunidad NR1 fosforilada (en el residuo Ser889)
PVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo.
PPT: *Pressure pain threshold test*, test de umbral de presión profunda.
PSD-95: *Postsynaptic density protein*, proteína postsináptica.
SC: Sensibilización central.
SCH23390: Antagonista de D1.
SDS: *Sodium dodecyl sulfate*, dodecilsulfato sódico.
SF-36: Cuestionario sobre la calidad de vida.
SKF38393: Agonista de D1.
SNC: Sistema Nervioso Central.
SRD: Subnúcleo reticular dorsal
TB: Tampón de bloqueo.
TENS: *Transcutaneous electrical nerve stimulator*, estimulador nervioso eléctrico transcutáneo.
vGAT: Transportador vesicular de GABA.
vGLUT2: Transportador vesicular de glutamato 2.
WDR: *Wide range neurons*, neuronas de rango dinámico amplio.
5-HT2B: Receptor de serotonina de la familia 5-HT₂.

RESUMEN

La modulación endógena de la información somatosensorial por las vías descendentes dopaminérgicas resulta fundamental en los procesos de plasticidad sináptica en las astas posteriores de la médula espinal asociados a la generación de Sensibilización Central. Dicha modulación se lleva cabo principalmente mediante dos tipos de actuaciones: (i) la activación directa de los diferentes subtipos de receptores de la dopamina y (ii) el desencadenamiento de mecanismos de interacción con otras familias de receptores implicados en la regulación de la información somatosensorial. Con el objetivo de esclarecer el papel de los receptores D1 (D1R) y D2 (D2R) en la hiperexcitabilidad medular en un modelo de dolor neuropático por ligadura del nervio raquídeo L5 (LNR), así como las interacciones entre dichos receptores y los receptores opioide del subtipo μ (MOR) y glutamatérgico NMDA, hemos registrado la variación de los potenciales evocados por fibras C en respuesta tanto a la administración de fármacos específicos como a patrones de estimulación eléctrica caracterizados por una determinada frecuencia. Además, hemos empleado análisis por Western blot y hemos estudiado las muestras mediante microscopía confocal para evaluar los cambios en la expresión de los receptor en las diferentes condiciones de experimentación así como para comprender, desde el punto de vista anatómico, el tipo de interacciones observadas entre los mismos.

Respecto a D1R, los resultados revelan su implicación en la constitución de un mecanismo endógeno de represión de la plasticidad sináptica mediante el reclutamiento de MOR, cuyo funcionamiento continuado, sin embargo, puede paradójicamente facilitar el establecimiento de una sensibilización. Además, y aparentemente de forma paralela, D1R también interacciona con NMDA, facilitando la hiperexcitabilidad que promueve este receptor, así como su fosforilación.

En relación a D2R, hemos observado una interacción superaditiva entre este receptor y MOR, encontrándose ambos receptores sobreexpresados en las densidades sinápticas de las neuronas de las astas posteriores de los animales con dolor sostenido.

Finalmente, hemos establecido un protocolo de estimulación eléctrica para el desencadenamiento de la respuesta condicionada de modulación difusa del dolor (CPM), compuesta en parte por los sistemas descendentes que operan en astas posteriores, mediante la aplicación de una estimulación eléctrica transcutánea (TENS) heterotópica al lugar evaluado. Este protocolo representa una alternativa efectiva, funcional y cómoda tanto para el paciente como para el experimentador para evaluar el estado de la CPM de cada individuo.

INTRODUCCIÓN

1. Vías descendentes dopaminérgicas.

1.1. Neuroquímica y neuroanatomía

El sistema nervioso periférico se encarga de transmitir la información del medio en forma de señales aferentes al sistema nervioso central (SNC). Algunas de ellas, son de carácter nociceptivo, y la progresión de estas señales hacia centros supraespinales puede activar en éstos una serie de sistemas de control descendente del dolor que intervienen sobre la médula espinal, modulando el ascenso de nuevas señales. Actualmente, aún se desconoce parte de este mecanismo, ya que su organización es ciertamente compleja y en él intervienen diversos neurotransmisores y diferentes regiones del SNC. Además, junto con los sistemas descendentes inhibitorios se han identificado sistemas descendentes que facilitan la nocicepción y podrían jugar un papel en la patogénesis de algunas formas de dolor, lo cual complica aún más su estudio.

Entre los sistemas descendentes inhibitorios destacan dos que parecen distinguirse por su anatomía y por los contextos experimentales en los que se han caracterizado: los controles dependientes de la sustancia gris periacueductal (PAG) y los controles inhibitorios difusos del dolor (CIND). Respecto al primero de ellos es importante señalar que la PAG envía axones tanto de carácter excitador como inhibitorio a diversos centros del bulbo raquídeo, especialmente al núcleo magno del rafe, al núcleo reticular gigantocelular y al núcleo reticular paragigantocelular, estructuras en las cuales se originan proyecciones descendentes de naturaleza noradrenérgica y serotoninérgica que producen una disminución de la transmisión nociceptiva en las astas posteriores (Millan, 2002; Morgan et al., 2008). En relación a los CIND, las neuronas que median la acción de estos controles se localizan en la porción más caudal del bulbo raquídeo, fundamentalmente en el subnúcleo reticular dorsal (SRD), y proyectan sus axones descendentes de forma difusa a través de los cordones dorsolaterales de la sustancia blanca medular hasta las astas posteriores de la totalidad de los segmentos medulares y al núcleo espinal del trigémino. A través de este circuito redundante espino-supraespino-espinal, las neuronas del SRD

Introducción

pueden ser activadas por la descarga de aferentes primarios de tipo A δ y C reclutados por estímulos de rango nocivo, y producen a su vez un efecto depresor sobre la nocicepción, de carácter difuso, por medio de sus proyecciones descendentes (Bouhassira et al., 1992). Estudios de laboratorio en animales y en sujetos humanos sugieren la participación de sinapsis serotoninérgicas, noradrenérgicas y opioidérgicas en la acción de los CIND. De hecho, actualmente se están realizando estudios buscando una potenciación de los CIND mediante estrategias farmacológicas que manipulen el sistema monoaminérgico bloqueando la facilitación descendente para reducir el dolor crónico (Bannister et al., 2015).

La influencia tónica de los controles descendentes ha sido estudiada mediante el bloqueo de las vías moduladoras. A nivel de comportamiento, el efecto causado por el bloqueo es predominantemente una facilitación de los reflejos, aunque la influencia descendente depende del método de estimulación utilizado (Kauppila et al., 1998). En los últimos años se están aportando evidencias considerables sobre la participación de los sistemas descendentes en condiciones de dolor persistente, inflamatorio o neuropático, revelando un efecto dual, facilitador e inhibidor. Por ello, es importante utilizar diferentes modelos de daño periférico en los que las dos respuestas descendentes sean activadas. De este modo, se podrán estudiar los factores que provocan que la inhibición predomine en algunos grupos neuronales y la facilitación en otros (Vanegas y Schaible, 2004).

Centrándonos en los tipos de receptores que intervienen en la modulación descendente del dolor en las neuronas de las astas posteriores de la médula espinal se deben destacar los receptores de la serotonina, noradrenalina y dopamina. Respecto a la dopamina podemos señalar que es una de las principales catecolaminas que actúa como neurotransmisor en el SNC y que controla una gran variedad de funciones como la actividad motora, endocrina, el aprendizaje, la memoria, la emotividad, la afectividad y la motivación. Su intervención como modulador de la actividad sensorial cobra especial protagonismo en el estudio de la nocicepción (Missale et al., 1998). La dopamina, como tal, no atraviesa la barrera hematoencefálica pero sí sus precursores, fenilalanina y tirosina y a partir de ellos se produce su biosíntesis en el citosol de los terminales nerviosos dopaminérgicos

Introducción

(Fuxe et al., 1965). Una vez sintetizada se libera en la hendidura sináptica gracias a la fusión de las vesículas en la membrana presináptica producida al activarse los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. De este modo, la dopamina se difunde hasta unirse con los receptores localizados a nivel pre y postsináptico.

Anatómicamente, las fibras diencefaloespinales dopaminérgicas proceden casi exclusivamente de la región A11 (Skagerberg y Lindvall, 1985; Holstege y Kuypers, 1987) y descienden a la médula espinal, mayormente de forma unilateral, innervando difusamente las astas posteriores superficiales así como algunas láminas profundas (Skagerberg et al., 1982, 1988; Holstege y Kuypers, 1987). Estas fibras modulan la señal nociceptiva actuando directamente sobre axones aferentes primarios, neuronas de segundo orden e interneuronas excitadoras. (Skagerberg et al., 1982, 1988; Holstege y Kuypers, 1987).

1.2. Su influencia en el dolor agudo y en el dolor persistente

La temporalidad representa uno de los criterios más utilizados para diferenciar el dolor agudo del dolor crónico, no obstante, existen otros criterios que pueden determinar más acertadamente un tipo de dolor. El dolor agudo suele experimentarse tras un estímulo leve o intenso y en principio es la respuesta a un mecanismo adaptativo. Habitualmente, su causa es determinada y tratada limitando su duración. Por el contrario, una de las características del dolor crónico es que persiste a lo largo del tiempo y en muchos casos su causa es difícil de determinar. El dolor crónico suele ser el resultado de algo mucho más amplio que el reflejo directo de un daño físico, interviniendo una combinación de factores psicológicos, sociales y físicos. Sus síntomas nociceptivos más comunes son quemazón espontánea, sensación de dolor ante estímulos táctiles inocuos (alodinia) y sensación de dolor desproporcionado ante estímulos nocivos (hiperalgesia) (Woolf, 2007). Algunos de estos síntomas y signos se derivan de que el paciente haya desarrollado una sensibilización central (SC), la cual puede considerarse también uno de los criterios para diferenciar el dolor agudo del crónico. La SC se manifiesta a través de dolor espontáneo o persistente, ampliación de

Introducción

los campos receptivos de las neuronas nociceptivas medulares, así como de aparición de hiperalgesia y alodinia (Woolf, 2011).

Aunque los factores que intervienen en el desarrollo de una SC no se conocen con precisión, se ha demostrado la participación de diversos fenómenos de plasticidad neuronal inducidos por la actividad aferente del sistema nervioso periférico. Diversos estudios muestran que una estimulación continua de baja frecuencia (EBF) como resultado de una inflamación aguda o una estimulación eléctrica de alta frecuencia pueden inducir una potenciación sináptica de la señal transmitida por las fibras C aferentes a las neuronas de segundo orden de la superficie de las astas posteriores, incluyendo a las neuronas de rango dinámico amplio (WDR) localizadas en láminas más profundas (Svensen et al., 1999a,b; Ikeda et al., 2000, 2003). El denominador común entre estos fenómenos es el papel desencadenante que juega el ingreso de señal nociceptiva de gran intensidad a la médula espinal desde la periferia a través del sistema aferente primario. Es destacable la importancia de las descargas aferentes de alta frecuencia a través de las fibras amielínicas de calibre fino o fibras C, especializadas en la transmisión de información de carácter termoalgésico, puesto que dichas descargas aferentes producen un incremento en el tráfico sináptico en las astas posteriores e inician en las neuronas de segundo orden una sucesión de señales intracelulares que en última instancia incrementan su excitabilidad.

A nivel celular la SC se puede traducir en alteraciones estructurales y funcionales de los receptores. En ocasiones estas alteraciones se producen por fosforilación, desensibilización, internalización y/o degradación de receptores, y en otras ocasiones, se caracterizan por el reclutamiento o síntesis de otros receptores. La SC es un proceso complejo que puede conducir a una plasticidad a corto o a largo plazo. La potenciación a largo plazo es un fenómeno genuino de plasticidad sináptica dependiente del uso que es bien conocido como base del establecimiento de la memoria. Actualmente, constituye un modelo experimental de SC en animales de laboratorio e hiperalgesia en humanos (Ikeda et al., 2003; Sandkuler, 2007).

Introducción

La principal carencia de los tratamientos clínicos actuales frente al dolor crónico es que habitualmente se encuentran dirigidos a paliar la incidencia e intensidad de los síntomas, planteándose la dificultad de llevar a cabo intervenciones que actúen directamente sobre el mecanismo fisiopatológico que se encuentra detrás del cuadro de síntomas, probablemente relacionado con el mantenimiento de la SC. El dolor crónico implica, además de una hipersensibilidad periférica y central a nivel medular, una alteración de las vías descendentes de modulación del dolor (Kwon et al., 2013), lo cual provoca un aumento en los niveles de dopamina (Weil-Fugazza y Godefroy, 1993; Men y Matsui, 1994; Satoh y Omote, 1996; Gao et al 2001).

La persistencia del dolor parece ser un factor clave en el efecto neto de los controles descendentes sobre la nocicepción, ya que mientras que las vías descendentes inhiben a nivel medular la nocicepción aguda (Millan 2002), la influencia facilitadora descendente es dominante en los modelos de dolor sostenido (Pertovaara et al., 1996). De hecho, la facilitación descendente parece tener una relevancia significativa en la instauración y mantenimiento del dolor (Dubner, 2004). En este sentido en modelos de dolor experimental inducido por inyecciones de capsaicina intradérmica (Simone et al., 1989) o lesión de nervio periférico (Yoon et al., 1996) la sensibilización se mantiene tras la desaparición del input periférico, produciéndose alteraciones que se perpetúan a lo largo del tiempo sin necesidad de la contribución del estímulo periférico primario.

2. Receptores de dopamina medulares y su función en la neurotransmisión.

En las astas posteriores de la médula espinal se localizan diferentes subtipos de receptores de la dopamina, que principalmente se agrupan en dos familias: Los receptores de la familia D1 compuesta por los subtipos D1 y D5 y los de la familia D2 integrada por los subtipos D2, D3 y D4 (Kebabian y Calne, 1979; Gingrich y Caron, 1993; Missale et al., 1998).

La activación de los receptores de la familia D1 produce incrementos del AMPc intracelular a través de proteínas G_s que estimulan la adenil ciclasa

Introducción

(AC). Cuando el receptor es activado por su agonista las proteínas G se disgregan en dos subunidades que tienen la capacidad de modular canales iónicos de membrana tales como canales de Ca^{2+} de alto voltaje (Hernández-López et al., 1997), canales de Na^+ (Cantrell et al., 1999) o determinados canales de K^+ (Nicola et al., 2000). También son capaces de aumentar la transmisión de los receptores N-metil-D-aspartato, NMDA, (Wang y O'Donnell, 2001) o afectar a los niveles locales de Ca^{2+} (Kassack et al., 2002). El incremento de AMPc y Ca^{2+} activa factores de transcripción como CREB y c-fos (Das et al., 1997). Los receptores de la familia D1 se localizan principalmente en los terminales postsinápticos (Nieoullon y Almaric 2002; Neve et al., 2004), no obstante a nivel presináptico también pueden modular la liberación de neurotransmisores (Mizuno et al., 2007; Chenchen y Rainnie, 2014).

En relación a los receptores de la familia D2, su activación inhibe la AC por acoplamiento a proteínas G_i además de activar canales de K^+ (Missale et al., 1998) y disminuir la entrada de Ca^{2+} (Neve et al., 2004; Gershon et al., 2007) mediante cambios funcionales en los canales dependientes de voltaje (Taraskevich y Douglas 1978), lo cual produce una hiperpolarización celular. Su localización puede ser tanto pre- como postsináptica (Dal Toso et al., 1989; Giros et al., 1989). Cuando se encuentra a nivel presináptico se comporta como un autorreceptor e inhibe la liberación de neurotransmisor. En algunas neuronas se ha observado internalización de estos receptores, mediada por GRKs y β -arrestinas, tras exposición a agonistas específicos (Kim et al., 2001).

La diferencia de afinidad de los diferentes receptores por la dopamina, que activa uno u otro tipo de receptor en función de la concentración liberada, así como los diversos mecanismos de transducción de señal de cada tipo de receptor o la localización dentro del SNC hace que los efectos asociados puedan ser muy dispares, posibilitando que la dopamina module la señal aferente nociceptiva mediante numerosos mecanismos.

3. Plasticidad glutamatérgica y neurotransmisión dopaminérgica.

El NMDA juega un importante papel en la SC y en el dolor neuropático, principalmente tras lesiones medulares, favoreciendo la plasticidad sináptica (Maren y Baudry, 1995). El aumento de la concentración intracelular de calcio medido por la activación de los receptores NMDA es indispensable para la inducción de la SC. El bloqueo del incremento de calcio previene la potenciación sináptica dependiente de actividad (Cheng et al., 1994; Wang y Kelly, 1995). Además, a través de la señalización del calcio se activan varias proteínquinasas, incluida la proteínquinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII) y la proteínquinasa C (PKC) (Thomas et al., 1994; Otmakhov et al., 2004). La CaMKII tiene la capacidad de autofosforilarse y permanecer más tiempo activa tras la desaparición de la señal de calcio, algo muy importante para la potenciación a largo plazo (Lisman, 1985). La activación de PKC y la consecuente fosforilación de NMDA modulan la activación del subtipo opioide μ (Chen y Huang, 1992). La fosforilación del receptor NMDA mediada por PKC aumenta la probabilidad de apertura del canal y disminuye la afinidad del receptor por el Mg^{2+} extracelular (Chen y Huang, 1992).

Los receptores NMDA se localizan habitualmente en la postsinapsis aunque en ocasiones se encuentran a nivel presináptico (Liu et al., 1994). Los antagonistas del receptor reducen de forma efectiva la alodinia y la hiperalgesia secundaria (Ren et al., 1992, Suzuki et al., 2001) y bloquean la hipersensibilidad asociada al dolor inflamatorio (Woolf y Thompson, 1991) y neuropático (Suzuki et al., 2001), pero provocan serios efectos secundarios como alucinaciones o disforia (Kim et al., 2012), problemas de memoria y de atención (Malhotra et al., 1996) o estados psicóticos, induciendo a largo plazo síntomas esquizofrénicos, como en el caso de la ketamina (Krystal et al., 1994).

El tipo de interacción entre los receptores dopaminérgicos y el receptor NMDA es de naturaleza compleja, interviniendo numerosas variables. En algunos casos, esta interacción produce una potenciación de la señal nociceptiva y en otros casos atenúa o incluso inhibe la transmisión. Concretamente, la interacción del receptor NMDA con la familia del receptor

D1 se produce mediante una convergencia intracelular que implica el desencadenamiento de una cascada compuesta por la activación consecutiva de AMPc, PKA y DARPP-32, dando lugar a una potenciación de la función del receptor NMDA (Greengard et al, 1999; Cepeda y Levine, 2006). Asimismo, también se pueden observar interacciones de tipo físico entre los receptores localizados en la membrana, interacciones proteína-proteína de forma directa. En este caso, los efectos se pueden sumar a los inducidos por la ruta de señalización intracelular. El efecto de la interacción física habitualmente es inhibitorio (Lee et al., 2002; Scott et al., 2002; Scott et al., 2006). La conjunción de todas estas interacciones afecta a la función final del receptor pudiendo modular su efecto de forma muy delicada.

Al buscar referencias sobre estas interacciones entre los receptores NMDA y de dopamina encontraremos abundantes datos referidos a la corteza, principalmente a la zona prefrontal y al estriado, pero son muy escasos los que se circunscriben a la región medular. El objetivo del tercer estudio de la tesis es comprobar si el receptor D1 se encuentra implicado en la hiperexcitabilidad del receptor NMDA en astas posteriores tras la ligadura nerviosa raquídea (LNR), y estudiar en qué consiste dicha implicación.

4. Papel de la neurotransmisión dopaminérgica en la analgesia opioide.

4.1. Interacción opioide-dopamina en astas posteriores.

Los opioides son los analgésicos más efectivos tanto para el dolor moderado como para el severo, aunque su utilización se encuentra limitada por la posibilidad de que generen dependencia y/o por la aparición de efectos secundarios como depresión respiratoria y sedación (Christie, 2008). El principal receptor opioide que media tanto la analgesia como la aparición de efectos secundarios indeseados es el subtipo μ (MOR) (Williams et al., 2013).

MOR es expresado tanto en neuronas centrales como periféricas. Los receptores opioides se encuentran acoplados a proteínas G_i/G_o , lo que hace que su activación produzca la inhibición de la AC y la reducción del AMPc,

Introducción

así como la disminución del flujo de Ca^{2+} y un aumento del de K^{+} . De este modo, son capaces de inducir una hiperpolarización de la membrana y bloquear la neurotransmisión del dolor (Connor y Christie, 1999; Ikeda et al., 2000; Lavine et al., 2002)

Las vías descendentes pueden alterar la neurotransmisión opioidérgica en astas posteriores (Kamei y Saitoh, 1996; Ossipov et al., 2003). En las ocasiones en las que el paciente sufre tolerancia asociada a la administración prolongada de fármacos opioides, presentando síntomas de dolor neuropático, dichos síntomas se pueden atribuir a una depresión del control inhibitorio descendente y a la actuación del sistema facilitador del eje PAG-RVM (revisado en Millan, 2002; Porreca et al., 2002; Fields et al., 2006). De igual manera, se pueden alterar los sistemas descendentes para producir un efecto favorable a la antinocicepción. La administración de medicamentos coadyuvantes que tengan como diana otras familias de receptores situados en las vías del dolor supone una alternativa para maximizar el efecto analgésico de MOR. Así por ejemplo, antiinflamatorios no esteroideos (Christie et al., 2000) o agonistas α -2 adrenérgicos (Chabot-Doré et al., 2014) se plantean como fármacos propicios para la coadministración con agonistas de MOR. Desde esta lógica, existen datos que sugieren que el receptor dopaminérgico D2 estabiliza las interacciones entre los receptores opioides, y que su manipulación farmacológica puede tanto facilitar (Rooney y Sewell, 1989; Morgan y Franklin, 1991) como perjudicar (Morgan y Franklin, 1991; Kamei y Saitoh, 1996) la analgesia opioide. Esta interacción entre el receptor D2 y el MOR se da mediante convergencia intracelular, ya que los dos receptores pueden disminuir los niveles de AMPc cuando son activados y basándonos en esta premisa se justificaría la potenciación del agonista del receptor μ al coadministrarlo con bajas dosis de agonista del receptor D2.

El objetivo del primer estudio es investigar el papel del receptor de dopamina D2 en la modulación de la excitabilidad de la médula espinal frente a un estímulo nociceptivo y la interacción entre dicho receptor y el receptor opioide del subtipo μ en animales sometidos a un modelo de dolor neuropático inducido por LNR.

4.2. Regulación dopaminérgica de la represión endógena de la plasticidad sináptica producida por los opioides.

El uso prolongado de fármacos opioides se ha asociado con la cronificación del dolor (Wilkinson et al., 2001; Webster et al., 2007; Bigal y Lipton, 2009) y con la aparición de hiperalgesia (Chu et al., 2008), de tipo mecánica y térmica, relacionada con la potenciación de la neurotransmisión excitatoria en la médula espinal. Su uso crónico produce un efecto celular excitador, estimulando la propagación de dolor (Wang y Gintzler, 1997; Harrison et al., 1998; Crain y Shen, 2000; Szücs et al., 2004). Se ha propuesto que esta potenciación del dolor por opioides es mediada por los receptores opioides preferentemente acoplados a proteínas G_s (Shen y Crain, 1990; Chakrabarti et al., 2005), o como alternativa mediante el dímero $G_{\alpha\beta}$ de las proteínas nativas $G_{i/o}$ de los receptores opioides (Wang y Gintzler, 1997; Gintzler y Chakrabarti, 2001). Datos más recientes han mostrado que la administración de opioides de forma crónica causa un intercambio en el acoplamiento de la proteína G de los receptores opioides MOR de $G_{i/o}$ a G_s (Wang et al., 2005).

Los estados de SC se caracterizan por la existencia de una facilitación para inducir potenciación neuronal y plasticidad sináptica por estímulos que, en circunstancias fisiológicas normales, no son capaces de producir este tipo de alteraciones. La SC es, en parte, una forma maladaptativa de la potenciación a largo plazo que puede darse en las astas posteriores de la médula espinal tras un daño (de un nervio periférico o una inflamación) (Ji y Woolf, 2001). Actualmente, la potenciación a largo plazo (PLP) se encuentra validada como modelo experimental que induce SC (Ikeda et al., 2003; Sandkuler, 2007). En los últimos 30 años, el campo del aprendizaje a nivel cortical y de la memoria ha captado la atención de muchos investigadores (Malenka y Nicoll, 1999; Malenka, 2003), demostrando que la plasticidad sináptica dependiente de la actividad es una pieza clave para que el sistema nervioso reconfigure sus conexiones para aprender, modificar y almacenar información. Datos recientes sugieren que las modificaciones sinápticas de larga duración en la médula espinal pueden explicar la

Introducción

persistente naturaleza del dolor neuropático (Ji y Woolf, 2001; Tan et al., 2008a).

Algunos indicadores apuntan a que MOR tiene una función muy relevante como mecanismo de inhibición endógena que regula el desarrollo de sensibilización neuronal y plasticidad sináptica dependiente del uso en las astas posteriores. Concretamente, fenómenos de plasticidad de corta duración inducida por estimulación eléctrica de las fibras C, como el *wind-up*, se producen con mayor facilidad en ratones transgénicos carentes de este receptor opioide o sometidos a un tratamiento con antagonistas selectivos de dicho subtipo (Melzack et al., 2001; Guan et al., 2006). Aunque el *wind-up* es diferente del fenómeno de SC, ya que se trata de una forma de incremento en la eficacia sináptica que se extingue en pocos minutos tras el cese del estímulo, comparten características comunes y es muy probable que compartan también un mecanismo común (Herrero et al., 2000). Existen indicios que señalan a diferentes familias de receptores como causantes de la pérdida de función analgésica del MOR en estados de hipersensibilidad y cronificación del dolor. Habitualmente, la tolerancia viene mediada por la activación de rutas de señalización asociadas a AMPc, PKA y PKC, tal y como se ha comprobado en algunas regiones cerebrales (Zhao et al., 2007; Barraud et al., 2010). Tanto los receptores dopaminérgicos como MOR se encuentran localizados pre- y postsinápticamente en las neuronas de la médula espinal (Abbadie et al., 2002; Millan, 2002) y ambos modulan la activación de estas rutas. Generalmente, los receptores dopaminérgicos de la familia de D1 median las acciones excitatorias aumentando los niveles de AMPc en la neurona diana (Missale et al., 1998; Neve et al., 2004), mientras que los de la familia D2 y los MOR reducen la activación de AC y disminuyen los niveles de AMPc (Neve et al., 2004; Sheng et al., 2009), proporcionando un solapamiento o convergencia intracelular mediante la cual alteraciones en el sistema dopaminérgico del SNC (relacionadas con los receptores de la familia D1) pueden reducir la capacidad analgésica de los opioides (Brewer et al., 2014).

También, como se indicaba anteriormente, el receptor NMDA se encuentra implicado en la pérdida de función analgésica del MOR y en la perpetuación del dolor. La activación de dicho receptor aumenta las señales

Introducción

de calcio y DAG, y provoca un aumento en la expresión de PKC γ (Chen y Huang, 1991) tras el daño de nervio periférico (Kerr y David, 2007) y la inflamación (Martin et al., 1999). De hecho los ratones modificados genéticamente que muestran depleción de PKC γ manifiestan menor dolor neuropático (Malmberg et al., 1997) y una reducción de la alodinia táctil tras ligadura parcial del nervio ciático. Además al administrar inyecciones para inhibir PKC se observa un bloqueo de la alodinia inducida tras la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 (Hua et al., 1999). Por otro lado, también se ha visto que un tratamiento intratecal con antagonista de NMDA reduce significativamente el nivel de PKC en las astas posteriores tras daño constrictivo crónico (Yashpal et al., 2001). Todos estos estudios sugieren que el aumento en la expresión de PKC juega un papel importante en la hipersensibilización nociceptiva mediada por el receptor NMDA.

De acuerdo con lo anterior, los receptores mencionados se encuentran interrelacionados intracelularmente por sus rutas de señalización y esto hace que la respuesta final sea un balance del resultado neto de cada una de las actividades desencadenadas por los mismos. Teniendo en cuenta que las vías dopaminérgicas participan en el inicio y mantenimiento de la plasticidad sináptica mediante la activación del receptor medular D1 (Kim, 2015), el objetivo del segundo estudio es investigar la contribución del receptor D1 en la regulación del MOR en la médula espinal en distintos modelos de SC. Con este estudio se plantea la posibilidad de que el sistema dopaminérgico regule la función del MOR como medio de prevención de la plasticidad sináptica dependiente del uso resultante de una aferencia potencialmente dañina.

5. Modulación condicionada del dolor (CPM, conditioned pain modulation)

5.1. ¿Qué es la CPM?

La CPM se ha convertido en uno de los conceptos más relevantes en los últimos años en el campo del dolor. Es un método psicofísico basado en el paradigma "dolor inhibe dolor", es decir, un estímulo condicionante desencadena determinados sistemas endógenos que modulan la percepción

Introducción

del estímulo test, posibilitando el estudio de la modulación endógena del dolor en cada individuo. Este concepto surgió a raíz de las investigaciones en ratas de Le Bars y colaboradores, quienes estudiaron el bucle espino-bulbo-espinal, mediante el cual las WDR de las astas posteriores reciben el estímulo condicionante nociceptivo desde una parte determinada del cuerpo, enviando una señal ascendente al SRD. La activación del SRD desencadena una modulación descendente, de carácter difuso, de las neuronas de segundo orden (Le Bars y Willer, 2002). Aunque clásicamente estos sistemas de modulación se han integrado en los CIND, actualmente, el término CPM, se utiliza para nombrar los signos conductuales que se manifiestan por la activación de la modulación descendente de una percepción nociceptiva en una prueba dirigida a ese objetivo (Yarnitsky et al., 2010).

La CPM refleja diferentes aspectos clínicos referentes al dolor, como por ejemplo la tendencia de un sujeto a desarrollar dolor crónico postquirúrgico (Grosen et al., 2014; Peters et al., 2015) o la respuesta que experimentará ante determinado medicamento (Yarnitsky et al., 2012), entre otros. En sujetos sanos se ha utilizado en ocasiones para predecir su comportamiento futuro frente a estímulos nociceptivos y para intentar correlacionarlo con determinadas características psicofísicas (Nahman-Averbuch et al., 2014). Esta prueba se puede utilizar también para evaluar la modulación del dolor en pacientes con dolor crónico. Así por ejemplo, se ha testado la CPM en pacientes con desorden de la unión temporomandibular (Oono et al., 2014) usando un estímulo condicionante mecánico en zonas distales al estímulo test. Los resultados reflejan el funcionamiento alterado de la CPM a nivel segmental en las zonas afectadas por dolor persistente en comparación con la respuesta normal en zonas distales, extrasegmentales, libres de dolor. En otros casos, en pacientes con SC, se ha utilizado la CPM junto con el SF-36 (cuestionario sobre calidad de vida), ensayos de hiperalgesia a la presión profunda y de sumación temporal para demostrar que hay una correlación entre los resultados de dichas pruebas, y que además se observa una correlación con déficits cognitivos (Coppieters et al., 2015). Hay numerosos estudios que reflejan una disfunción de los mecanismos de inhibición del dolor asociada a síndromes de dolor crónico idiopático como son el síndrome del intestino irritable (Heymen et al., 2010; Piché et al., 2010) o

Introducción

el síndrome de fibromialgia (SFM) (Lautenbacher et al., 1997; Julien et al., 2005), entre otros.

Los neurotransmisores monoaminérgicos, serotonina, noradrenalina y dopamina, juegan un papel importante en la CPM. Diversos analgésicos tienen la capacidad de activar o reforzar la inhibición descendente mediante la interacción favorable con los neurotransmisores que intervienen en las rutas descendentes del dolor, inhibiendo la señal nociceptiva mediante la facilitación de la liberación de estos neurotransmisores (Millan, 2002; Ossipov et al, 2010). Sujetos con dolor neuropático que han recibido un tratamiento para modificar los niveles de serotonina muestran una CPM menos eficiente (Yarnitsky et al., 2012). En relación a la noradrenalina se ha observado un aumento de la eficiencia de la CPM tras la administración de fármacos que favorecen la liberación de este neurotransmisor (Millan 2002; Ossipov et al., 2010; Niesters et al., 2013). Por último, los estudios clínicos en pacientes con patologías relacionadas con déficit de dopamina, como en el caso de los parkinsonismos (Lee et al., 2006) y el SFM (Wood et al., 2007), muestran un aumento en la respuesta asociada a la CPM del 27,3% tras la administración de apomorfina, un agonista no específico de los receptores de dopamina, mientras que en los sujetos que reciben placebo el aumento sólo es del 4% (Treister et al., 2013).

Los aspectos psicofísicos que afectan a la prueba son muy diversos, existiendo muchos estudios sobre ello. El objetivo principal de dichos estudios ha sido conocer en mayor profundidad el mecanismo desencadenado en la CPM, para poder afinar los protocolos y disminuir la variabilidad. Se han realizado estudios sobre factores intrínsecos al sujeto, como el género (Goodin et al., 2009; Tashani et al., 2010) o la edad (Edwards et al., 2003) y sobre otros que se refieren al estado del sujeto durante la prueba, como la ansiedad (Butler y Finn, 2009; Geva et al., 2014), el nivel de catastrofismo (Goodin et al., 2009) o sobre otros aspectos del estado emocional del sujeto (Chapman et al., 2008). Además, se debe controlar cuidadosamente el entorno en el que se realiza el procedimiento ya que los resultados podrían verse afectados por cualquier mínimo detalle que se dejara al azar.

5.2. Desencadenamiento de la CPM. Protocolos habituales y alternativas.

Debido a la variabilidad tanto intra- como interpersonal al llevar a cabo el procedimiento, a los numerosos aspectos que forman parte del mecanismo o a la posibilidad de que el resultado del procedimiento se vea afectado por patologías o tratamientos farmacológicos presentes durante el estudio, es muy importante delimitar claramente el protocolo que se llevará a cabo para desencadenar la CPM y tener unos criterios definidos de inclusión/exclusión de los sujetos.

Es importante señalar que la CPM correlaciona con la valoración subjetiva del dolor producido por el estímulo y no tanto con la intensidad objetiva del mismo (Nir et al., 2011), lo cual indica que es un fenómeno intrincado con implicaciones de procesos cognitivos. Además, una vez desencadenada la CPM, el nivel de intensidad del estímulo condicionante no afecta al grado de modulación, es decir, a pesar de aumentar la intensidad de estimulación la CPM no varía (Nir et al., 2011). Ello sugiere que la CPM es un fenómeno que alcanza un "techo", corroborando el postulado de que la inhibición del dolor puede ser un fenómeno saturable (Granot et al., 2008).

El punto más criticado del paradigma de CPM es la posible inconsistencia por su alta subjetividad. En respuesta a ello, recientemente se han llevado a cabo estudios utilizando estimulación eléctrica como test e inmersión en agua caliente o fría como condicionante, que demuestran la alta repetibilidad de la CPM en los mismos sujetos con 1-4 semanas de diferencia temporal entre las pruebas (Biurrun Manresa et al., 2014; Jurth et al., 2014). Otro punto de discusión habitual cuando se habla de CPM es el diseño del protocolo y fundamentalmente de los estímulos elegidos para realizar el papel de condicionante y de estímulo test. Existen numerosas combinaciones de estímulos, pero vamos a citar tres por tener una finalidad clínica concreta, siendo las dos primeras las más comunes. La primera consiste en un estímulo test mediante la administración de calor en el antebrazo utilizando una placa Peltier, mientras se sumerge en un baño de agua caliente la extremidad contralateral del sujeto como condicionante. Este protocolo predice satisfactoriamente tanto la incidencia de dolor

Introducción

crónico tras una toracotomía o una cirugía ginecológica como la eficacia de determinados analgésicos, como la duloxetina (Yarnitsky et al., 2012). La segunda combinación resulta del empleo de un estímulo mecánico aplicado sobre una extremidad como test (por ejemplo, usando un algómetro) y la inmersión de la extremidad contralateral en un baño de agua fría funcionando como desencadenante. Este método ha sido utilizado para predecir la recuperación tras cirugías abdominales (Granovsky y Yarnitsky, 2013). Por último, debemos citar un método utilizado en Holanda para predecir el efecto de la administración de pregabalina para tratar el dolor neuropático (Bouwense et al., 2012), empleando la inmersión de una extremidad en agua fría como condicionante y el estímulo eléctrico como test en diferentes dermatomas.

Como se puede observar, la inmersión de una extremidad en un baño caliente o frío es el estímulo utilizado comúnmente como condicionante y es en el estímulo test en el que encontramos más variación. Se utilizan habitualmente estímulos térmicos o mecánicos. Sólo en algunos casos aislados se utiliza el estímulo eléctrico como test y en algunos estudios se hacen combinadas para estudiar los diferentes efectos que se pueden conseguir con inmersión en baño caliente o con estimulación eléctrica (Liébrano et al., 2013). En esos casos, la utilización del estímulo eléctrico ya no sólo busca aplicar un estímulo nociceptivo sino que se utiliza el estímulo eléctrico para producir una respuesta moduladora del dolor.

El TENS (estimulador nervioso eléctrico transcutáneo) administra pulsos de corriente eléctrica a través de la superficie intacta de la piel, de forma no invasiva, activando los nervios subyacentes. Es utilizado habitualmente para aliviar el dolor agudo y crónico (DeSantana et al., 2008). A pesar de su uso, no se conoce con certeza si el TENS es efectivo para muchas condiciones clínicas referentes al dolor, ya que los ajustes óptimos de este dispositivo siguen siendo una incógnita actualmente (Jones y Johnson, 2009). La intensidad y la frecuencia parecen claves para conseguir un efecto analgésico (Claydon y Chesterton, 2008). Estudios electrofisiológicos con modelos animales de hiperalgesia muestran que el TENS de alta y de baja frecuencia activan diferentes mecanismos neurofisiológicos (Sluka, 2007). Se ha demostrado que el TENS de baja frecuencia activa los receptores

Introducción

opioides μ y los receptores serotoninérgicos del subtipo 2 y 3, mientras que el TENS de alta frecuencia activa los receptores opioides δ y aumenta los niveles de GABA en la médula espinal (Somers y Clemente, 2009).

Debido a la relevancia del estudio de la CPM como determinante en la modulación endógena del dolor, los esfuerzos actuales se centran en la optimización de los métodos para la evaluación de la CPM con el objetivo de valorar más adecuadamente la situación clínica del paciente. El propósito del cuarto estudio es precisamente elaborar un protocolo en el cual el TENS funcione como desencadenante y estímulo test de la CPM, ofreciendo ventajas como ser preciso y cómodo, tanto para el paciente como para el evaluador, por lo que pudiera llevarse a cabo de forma rutinaria en los centros médicos como herramienta para la elaboración del diagnóstico. Para ello, se desencadena la CPM tanto en un grupo de sujetos sanos como en otro de sujetos con dolor crónico con una CPM poco eficiente, lo cual contribuye a validar la atribución de la respuesta observada al desencadenamiento de la CPM por parte del TENS.

HIPÓTESIS

La hipótesis general del trabajo es que la transmisión dopaminérgica evocada por la actividad aferente nociceptiva sostenida modula la generación de procesos de sensibilización central. Esta modulación vendría determinada por la interacción de los receptores de la dopamina, localizados en las astas posteriores, con receptores opioides y glutamatérgicos.

OBJETIVOS

El objetivo del primer estudio es investigar el papel del receptor de dopamina D2 en la modulación de la excitabilidad de la médula espinal frente a un estímulo nociceptivo y la interacción entre dicho receptor y el receptor opioide del subtipo μ en animales sometidos a un modelo de dolor neuropático inducido por LNR.

El objetivo del segundo estudio es investigar la contribución del receptor D1 en la regulación del MOR en la médula espinal en distintos modelos de SC.

El objetivo del tercer estudio es comprobar si el receptor D1 se encuentra implicado en la hiperexcitabilidad del receptor NMDA en astas posteriores tras la LNR, y estudiar en qué consiste dicha implicación.

El objetivo del cuarto estudio es establecer un protocolo para desencadenar la modulación endógena del dolor mediante un estímulo aferente nociceptivo y estudiar el fenómeno tanto en pacientes sin dolor como en pacientes con sensibilización central.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESTUDIO 1: Sobrerregulación sináptica e interacción superaditiva de los receptores D2 y opioide de subtipo μ tras la lesión de un nervio periférico.

El objetivo de este estudio es evaluar las interacciones funcionales entre el receptor D2 con el MOR en astas posteriores, tanto en condiciones basales como durante el dolor neuropático causado por ligadura experimental del nervio raquídeo L5. Hemos registrado los potenciales en astas posteriores, obtenidos por activación eléctrica de fibras C, para evaluar los efectos de estimulación del receptor D2 y con el objetivo de caracterizar la interacción D2/ μ . Además, hemos empleado análisis por Western blot y hemos estudiado las muestras mediante microscopía confocal para evaluar los cambios en la expresión del receptor, así como para comprender, desde el punto de vista anatómico, la interacción D2/ μ .

RESULTADOS

Sobrerregulación funcional del receptor D2 y necesidad de coactivación del receptor opioide μ

En ratas control, la superfusión espinal del agonista del receptor D2 quinpirol, reduce los potenciales evocados por fibras C de forma dependiente de la concentración. La reducción mínima significativa es $18,74 \pm 0,41\%$ con el fármaco a $100 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$ en el test de Bonferroni respecto a las áreas promedio durante la superfusión con LCRA; fig. 1). Esta reducción provocada por quinpirol se produce de forma más pronunciada en ratas con LNR. De esta manera, al administrar quinpirol a $10 \mu\text{M}$ observamos una depresión significativa de $28,94 \pm 0,18\%$ en las áreas, llegando hasta $46,84 \pm 0,25\%$ de reducción con la concentración de $100 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$ en ambos casos, $n=6$, fig. 1).

Con el propósito de investigar la implicación del MOR en la reducción de la excitación producida por los receptores D2 en las neuronas de las astas posteriores, hemos coadministrado el antagonista CTOP junto con quinpirol

Resultados y discusión

tanto en ratas con LNR como en ratas control. La coadministración de CTOP no afecta significativamente al efecto del quinpirol en animales control (disminución de $18,01 \pm 0,32\%$ a $100 \mu\text{M}$, $p < 0,01$), sin embargo, lo contrarresta por completo en el caso de las ratas con LNR (fig. 1).

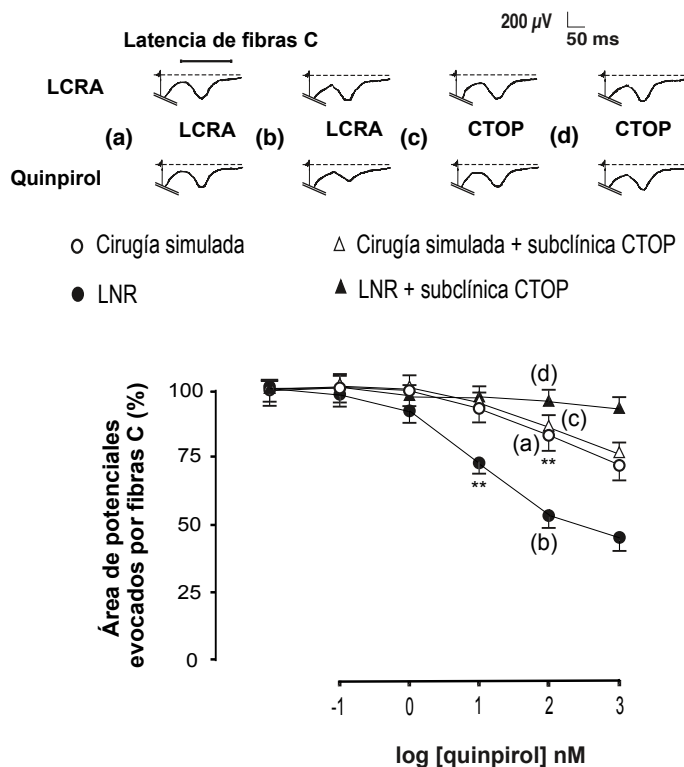


Figura 1. Sobrerregulación funcional de la depresión de los potenciales evocados por fibras C inducida por el receptor D2 y su dependencia del subtipo μ tras la LNR.

Se muestran las medias de las áreas de los potenciales evocados por fibras C durante superfusión medular con el agonista selectivo del receptor D2 quinpirol a concentraciones crecientes, 9 días tras la cirugía. Mientras que la administración de quinpirol a una concentración de $100 \mu\text{M}$ reduce significativamente los potenciales evocados en ratas sometidas a cirugía simulada (círculos blancos), la depresión es potenciada en ratas con LNR, tal como se refleja en el efecto reductor observado a $10 \mu\text{M}$ (círculos negros).

La superfusión simultánea con el antagonista selectivo del MOR (CTOP) a concentraciones subclínicas ($1 \mu\text{M}$) no altera la modulación de los potenciales evocados por quinpirol en ratas control (triángulos blancos), sin embargo, dicha modulación es completamente suprimida en las ratas con LNR (triángulos negros). En la parte superior se muestran registros representativos del efecto de quinpirol sobre los potenciales evocados en las cuatro condiciones experimentales. Se encuentran etiquetadas con asteriscos las concentraciones que muestran diferencias significativas respecto a la línea base en el Test de Bonferroni ($P < 0,01$). Con un objetivo clarificador, únicamente se encuentran etiquetados los primeros efectos significativos.

Sobrerregulación sináptica del receptor D2 y coexpresión con MOR

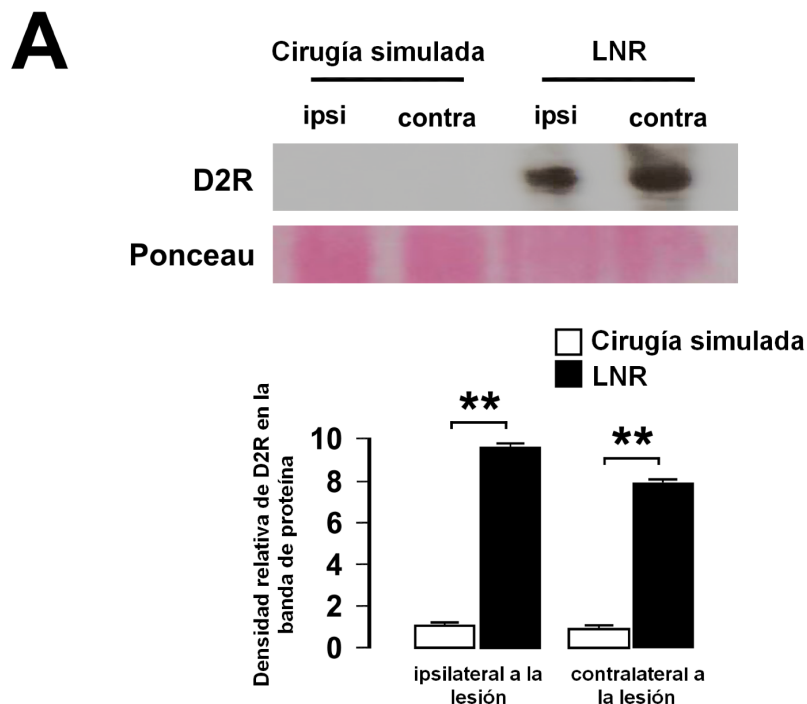
Hemos evaluado bilateralmente la expresión del receptor D2 mediante Western blot en homogeneizados de astas posteriores. La cuantificación de

Resultados y discusión

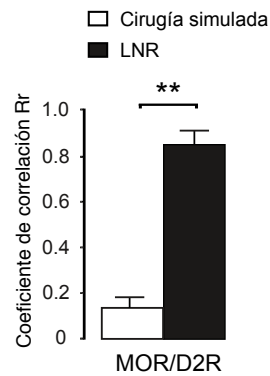
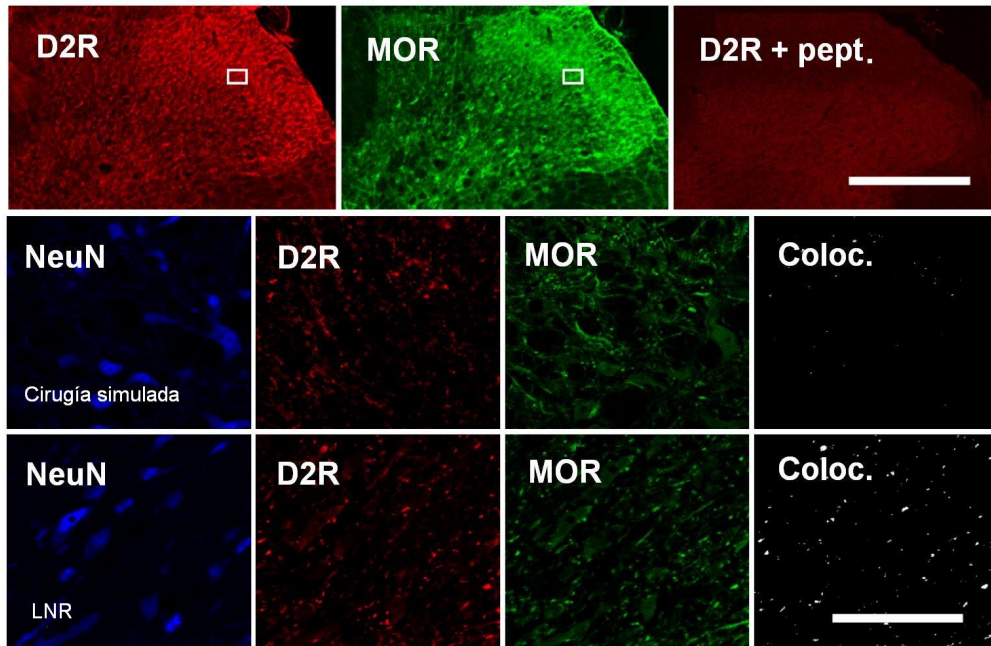
la densidad de las bandas obtenidas muestra un incremento significativo y bilateral de la proteína del receptor D2 9 días después de la LNR ($p < 0,01$ mediante t-Student; fig. 2A). Con el objetivo de determinar si este aumento global implica el aumento en la expresión del receptor D2 en los compartimentos sinápticos, hemos llevado a cabo experimentos de doble inmunofluorescencia usando anticuerpos selectivos de marcadores presinápticos y postsinápticos, sinaptofisina y PSD-95, respectivamente (resultados en fig 2C).

Los resultados muestran un aumento significativo de coexpresión de D2 tanto con PSD-95 ($R_r = 0,78$ en el análisis de correlación) como con sinaptofisina ($R_r = 0,84$) en las secciones lumbares de ratas con LNR. En el tejido de las ratas sometidas a cirugía simulada se observa una coexpresión notablemente menor ($R_r = 0,23$ y $R_r = 0,24$, respectivamente. Valores de $z = -40,77$ y $z = -49,07$ en el test exacto de Fisher, $p < 0,01$ en ambos).

Los experimentos de triple inmunofluorescencia usando anticuerpos frente al subtipo μ y frente al marcador neuronal NeuN indican un nivel bajo de coexpresión de D2/ μ en el neuropelo de las astas posteriores en ratas sin daño nervioso ($R_r = 0,16$). No obstante, este dato aumenta significativamente en ratas con LNR 9 días después de la intervención ($R_r = 0,84$, $z = -93,84$; $p < 0,01$ en el test exacto de Fisher; fig. 2C).



B



C

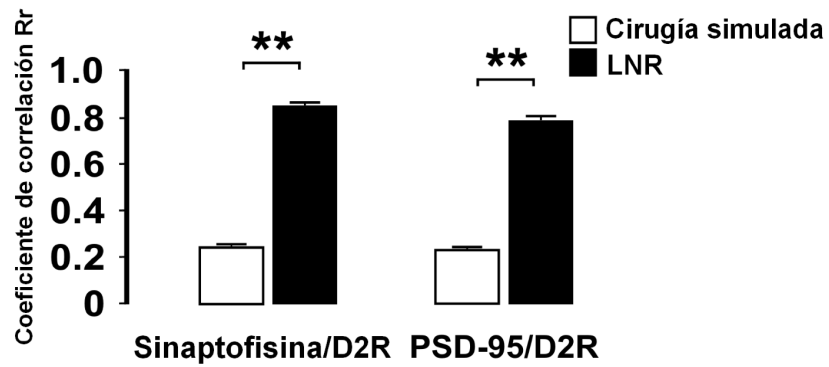


Figura 2. Sobrerregulación sináptica del receptor D2 y colocalización con el subtipo μ en astas posteriores lumbares tras la LNR.

Resultados y discusión

A. Análisis de Western Blot de la expresión del receptor D2 en homogeneizados de astas posteriores, tanto de ratas control como de ratas con LNR (9 días tras la cirugía). La expresión del receptor D2 aumenta drásticamente, y bilateralmente, en el tejido de la médula espinal tras la LNR. El análisis de la densidad de la banda (en la parte inferior) muestra un incremento de densidad en las ratas con LNR respecto a los homogeneizados de las ratas a las que se les ha practicado una cirugía simulada.

Los asteriscos indican las diferencias significativas en la prueba t-Student ($P < 0,01$)

B. Dobles (línea superior) y triples (segunda y tercera línea) inmunofluorescencias de secciones lumbares transversales para el receptor D2 (rojo), MOR (verde) y marcador neuronal NeuN (azul). Las micrografías de baja resolución muestran la distribución de los inmunorreactivos afines al subtipo μ y al receptor D2 en astas posteriores de ratas no tratadas (barra de escala igual a $200\mu\text{m}$). La inmunofluorescencia desapareció tras la preabsorción por exceso de antígeno (microfotografía del extremo superior derecho). La triple inmunofluorescencia revela bajos niveles de coexpresión del receptor D2 y el subtipo μ (combinado) en el neuropelo de las astas posteriores de ratas sin LNR, sin embargo, la coexpresión aumenta tras la LNR (9 días tras la cirugía).

La barra de escala representa $20\mu\text{m}$. El gráfico de barras muestra el análisis de correlación de D2/ μ en la prueba de inmunofluorescencia (los asteriscos indican $P < 0,01$ en el test exacto de Fisher).

C. Análisis de correlación de la coexpresión del receptor D2 con marcadores pre- y postsinápticos (sinaptofisina y PSD-95 respectivamente) en las pruebas de doble inmunofluorescencia de secciones transversales lumbares de ratas con LNR y ratas control. Las correlaciones del receptor D2 tanto con sinaptofisina como con PSD-95 incrementan significativamente tras la LNR. Los asteriscos indican la significatividad estadística de las diferencias en el test exacto de Fisher ($P < 0,01$) La barra de escala equivale a $3\mu\text{m}$.

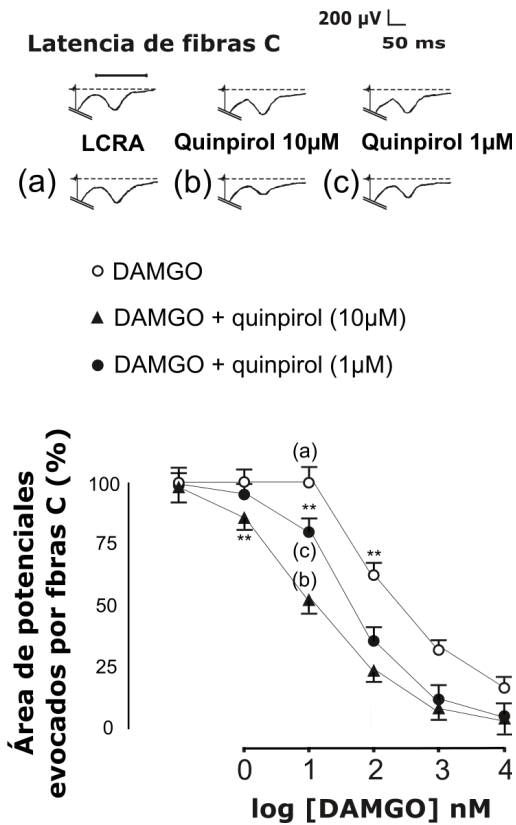
El receptor D2 potencia la disminución de los potenciales evocados producida por el subtipo μ

Hemos examinado si la estimulación farmacológica del receptor D2 con quinpirol influye en la depresión de potenciales evocados por fibras C que produce en el MOR en astas posteriores. La superfusión medular con DAMGO, agonista del subtipo μ reduce significativamente los potenciales evocados en las ratas con dolor neuropático ($37,52 \pm 0,61\%$ a $100\mu\text{M}$, $p < 0,01$, $n=5$; reducción del $67,9 \pm 0,48\%$ a $1\mu\text{M}$; fig. 3A).

La administración de quinpirol a $1\mu\text{M}$ aumenta la depresión de los potenciales evocados por fibras C mediada por DAMGO, reduciendo en dos órdenes de magnitud la menor cantidad de DAMGO necesaria para producir un efecto depresor significativo ($16,66 \pm 0,57\%$ de reducción para DAMGO a $1\mu\text{M}$, $p < 0,01$). El valor de IC_{50} de DAMGO fue significativamente menor durante la coadministración de quinpirol (de $158 \pm 1,31\text{ nM}$ a $11 \pm 1,37\text{ nM}$; $p < 0,01$ en la t de Student; fig. 3B)

Resultados y discusión

A



B

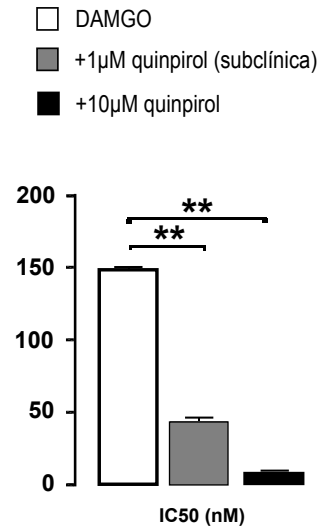


Figura 3. La estimulación del receptor D2 facilita la depresión de la excitabilidad en las astas posteriores, mediada por el MOR, en ratas con dolor neuropático.

A. Medias de las áreas de los potenciales evocados por fibras C durante superfusión medular con DAMGO, agonista del MOR, a concentraciones crecientes. Mientras los potenciales evocados son significativamente reducidos por la administración de DAMGO a concentraciones de 100 nM (círculos blancos), si se coadministra con quinpirol a 10 μ M la concentración de DAMGO necesaria para conseguir un efecto depresor significativo es menor de 1nM (triángulos) o de 10 nM si la concentración de quinpirol se reduce a niveles subclínicos (1 μ M) (círculos negros).

B. Gráfico de barras que muestra los valores de IC₅₀ de DAMGO en ratas con dolor neuropático cuando se administra tanto sólo como en combinación de quinpirol, a 1 μ M (dosis subclínica) o a 10 μ M. Los asteriscos denotan las significación estadística (P<0,01 en el test de t de Student).

DISCUSIÓN

El presente trabajo muestra la existencia de una sobrerregulación anatómica y funcional del receptor D2 durante el dolor neuropático asociado a la LNR. Tras la lesión se observa una disminución de los potenciales evocados mediada por D2 que es potenciada y dependiente del MOR. Además, se muestra que la interacción entre los receptores D2/ μ es superaditiva, encontrándose ambos receptores sobreexpresados en las densidades sinápticas de las neuronas de las astas posteriores de los animales con dolor sostenido.

La modulación mediada por el aumento de D2R tras la LNR implica una sobreexpresión sináptica

La estimulación de los receptores D2 de las astas posteriores por el agonista quinpirol provoca una disminución, significativa y dependiente de concentración, de los potenciales evocados por fibras C. Tal efecto concuerda con hallazgos previos procedentes de estudios de comportamiento (Barasi et al., 1985, 1987; Liu et al., 1992), así como con registros extracelulares e intracelulares obtenidos en el complejo del trigémino y en las astas dorsales (Fleetwood-Walker et al., 1988; Tamae et al., 2005; Charbit et al., 2009; Lapirot et al., 2011; Taniguchi et al., 2011).

El presente estudio muestra por primera vez que la eficacia en la modulación de la excitación medular por el receptor D2 se encuentra potenciada tras la LNR, lo cual implica que las vías dopaminérgicas descendentes, fundamentalmente provenientes del núcleo A11 (Hökfelt et al., 1979; Skagerberg y Lindvall, 1985), están activadas en condiciones de dolor sostenido. Estos resultados parecen apoyar la idea de que las neuronas medulares provenientes de A11 participan en la inhibición producida por los CIND mediante la activación de los receptores D2 (Lapirot et al., 2011). Este planteamiento es relevante en un escenario de dolor clínico, ya que las proyecciones diencefaloespinales están asociadas a la patofisiología de la migraña (Charbit et al., 2009, 2010; Akerman et al., 2011; Kagan et al., 2013). Además, alteraciones en la respuesta de los

Resultados y discusión

CIND parecen tener un papel central en pacientes con dolor (van Wijk y Veldhuijzen, 2010; Yarnitsky, 2010).

Nuestros datos revelan que la sobrerregulación funcional del receptor D2 en astas posteriores se encuentra asociada a un incremento en la disponibilidad del receptor en el compartimento sináptico. Los análisis de los Western Blot muestran un aumento bilateral en la expresión de D2 en los homogeneizados de las astas posteriores de las ratas con LNR. Asimismo, las tinciones inmunofluorescentes realizadas indican una colocación de D2 tanto con sinaptofisina (presinápticamente) como PSD-95 (postsinápticamente). Estas observaciones respaldan los resultados previos de electrofisiología en los que se aprecia contribución funcional tanto pre- como postsináptica de este receptor (Yao et al., 2008) en neuronas de las astas posteriores (Taniguchi et al., 2011).

El hecho de que los cambios en la expresión de D2 se produzcan bilateralmente puede tener relación con la naturaleza bilateral de la ruta diencefaloespinal que se origina en A11 (Qu et al., 2006). Además, esta proyección media las respuestas moduladoras difusas con escasa selectividad lateral o segmental (Skagerberg y Lindvall, 1985; Lapirot et al., 2011). El tráfico de receptores a enclaves sinápticamente activos es un mecanismo fundamental que determina la neurotransmisión, tanto de tipo inhibitorio como excitador (Lau y Zukin, 2007; Luscher et al., 2011; Anggono y Huganir, 2012). De esta manera, en el contexto de neuroplasticidad producido por la lesión nerviosa, los cambios subcelulares en la reorganización del receptor D2 observados en este estudio pueden ser interpretados como instrumentales en la sobrerregulación funcional de la modulación de las respuestas evocadas por fibras C por parte de las fibras descendentes dopaminérgicas.

Tras la LNR la modulación mediada por el receptor D2 requiere la coactivación del subtipo μ

En condiciones normales el subtipo μ no interviene en la modulación mediada por D2 en astas posteriores, lo cual concuerda con los resultados de estudios previos que muestran que una aplicación intratecal del

Resultados y discusión

antagonista opioide naloxona no tiene influencia en la disminución de hiperalgesia inducida por dopamina (Liu et al., 1992; Yang et al., 1996). Una de las principales conclusiones del presente estudio es que la sobrerregulación funcional de la modulación mediada por el receptor D2 tras la lesión requiere un reclutamiento conjunto del MOR. Ello sugiere que los determinantes celulares y moleculares de la función dopaminérgica en astas posteriores implican una interacción con el sistema opioide. De hecho, en este estudio el antagonista CTOP, a concentraciones subclínicas, suprime la depresión de los potenciales evocados mediada por el quinpirol. Aunque el mecanismo molecular para este cambio no está establecido, la modulación opioide de la liberación de dopamina puede considerarse como un mecanismo potencial. Concuere con esta tesis el hecho de que los opioides operan sobre la liberación de dopamina en el SNC (Wood et al., 1980, 1983ab), promoviendo también la liberación de ligandos endógenos de MOR, como la met-enkefalina, la cual está presente en las láminas superficiales de las astas posteriores (Maves et al., 1994) adquiriendo un papel importante en situaciones de estimulación nociceptiva (Le Bars et al., 1987; Cesselin et al., 2009). Así, un importante determinante de la modulación mediada por D2 puede ser la actividad endógena del MOR, el cual se activa tónicamente tras la lesión nerviosa mostrando escasa actividad en condiciones basales (Buesa et al., 2008).

No obstante, a pesar de que este mecanismo puede predecir que el bloqueo del subtipo μ , en ratas con LNR, reduce la acción inhibitoria de D2 a los niveles previos a la lesión, difícilmente puede explicar su completa desaparición. De este modo, los resultados obtenidos indican una mayor complejidad, en los cambios que afectan en la interacción D2/ μ , que la simple modulación de la liberación de un neurotransmisor. El hecho de que la mayor parte de la sobreexpresión del receptor D2 tras la LNR ocurra en enclaves sinápticos enriquecidos con el subtipo μ posibilita una localización anatómica de la interacción D2/ μ . Esta localización conjunta hace que se den condiciones únicas para interacciones a nivel intracelular. Asimismo, es una posibilidad consistente con las interacciones proteína-proteína aunque el nivel de resolución de las pruebas aquí realizadas no pueda resolver tal hipótesis. Por ejemplo, estudios en las neuronas del estriado sugieren que la coexpresión de los receptores D2 y μ (Ambrose et al., 2004) podría ser

Resultados y discusión

un fenómeno que subyace a la desensibilización heteróloga del subtipo μ estableciendo una interacción a nivel proteína-proteína (Soderman y Unterwald, 2009). En este sentido, la posibilidad de heteromerización con otros receptores acoplados a proteínas G le confiere al subtipo μ propiedades funcionales distintas a las que se encuentran en poblaciones homogéneas, incluyendo propiedades farmacológicas y de unión con proteínas G o de difusión horizontal a través de la membrana (George et al., 2000; Prinster et al., 2005). Este nivel de interacción es coherente con que la inhibición mediada por el receptor D2 se vuelva dependiente del MOR tras la lesión nerviosa, ya que la unidad receptora del heterómero puede volverse dependiente en coestimulación con dos o más unidades receptoras del heterómero (Ferré et al., 2007; Fuxe et al., 2007). El aumento de μ y D2 en las localizaciones sinápticas, tal como se muestra en el estudio, respaldan la hipótesis de la existencia de adaptaciones subcelulares tras la lesión nerviosa, las cuales tendrían como objetivo reposicionar a los dos receptores a zonas activas, es decir, facilitar un escenario en lugares donde es propicia la interacción proteína-proteína.

Potenciación del receptor μ mediada por la activación de D2

Con el objetivo de profundizar en la interacción μ /D2, en el contexto de los cambios neuroadaptativos desencadenados por la LNR, hemos estudiado si la activación del receptor D2 ejerce alguna influencia sobre la antinocicepción promovida por el subtipo opioide μ . Para ello, evaluamos el efecto supresor de DAMGO sobre los potenciales evocados por fibras C en presencia de quinpirol a concentraciones subclínicas, es decir, concentraciones a las cuales por sí sólo no es capaz de alterar los potenciales. Tras la prueba observamos que el quinpirol subclínico aumenta considerablemente la potencia del DAMGO, respaldando así la idea de la existencia de una potente interacción positiva entre D2 y μ (fig. 3).

Los receptores de la dopamina pueden influir en los niveles y en la liberación del agonista opioide encefalina (Hong et al., 1978; Pasinetti et al., 1984; George et al., 1987; Llorens-Cortes et al., 1991), así como en el reciclaje del MOR en el SNC (Azaryan, 1996). Respecto a la dirección de la

Resultados y discusión

influencia dopaminérgica sobre la antinocicepción opioide los datos no son concluyentes, reflejan efectos tanto facilitadores como supresores del tono opioide. Además, los efectos observados dependen de la dosis, ruta de administración y paradigma de evaluación (McGilliard y Takemori, 1979; Kiritsy-Roy et al., 1989; Morgan y Franklin, 1991; Kamei y Saitoh, 1996; King et al., 2001; Romero-Calvo et al., 2010; Taniguchi et al., 2011). Los datos presentados en el presente estudio se obtienen tras administrar el fármaco por superfusión sobre las neuronas de las astas posteriores, y sugieren que la plasticidad de los sistemas dopaminérgicos descendentes activados por la lesión nerviosa implica interacciones superaditivas de D2/ μ a niveles medulares del procesamiento nociceptivo. Este resultado adquiere gran relevancia clínica ya que habitualmente los opioides se administran en pacientes con dolor crónico o sostenido, escenario en el cual los cambios neuroplásticos del SNC se encuentran ya establecidos.

La colocalización de los dos receptores en un subgrupo de neuronas de las astas posteriores, probablemente interneuronas excitadoras (Kemp et al., 1996), sugiere que la interacción descrita se produce a nivel intracelular. Teóricamente, el receptor D2 y el subtipo opioide μ podrían interactuar a través de la convergencia en la apertura de canales de potasio en las mismas neuronas, ya que es un mecanismo asociado tanto con la activación de D2 en neuronas medulares (Tamae et al., 2005; Taniguchi et al., 2011) como con la activación de MOR en el SNC (Miyake et al., 1989; Grigg et al., 1996). Previamente ya hemos descrito facilitación sinérgica heteróloga del receptor opioide δ tras la LNR (Buesa et al., 2008), y además numerosas publicaciones tratan las interacciones superaditivas entre los receptores opioides y otro tipo de receptores, como por ejemplo en el caso del subtipo $\alpha 2$ (consultar Chabot-Doré et al., 2014 para revisión). Como se ha discutido previamente, el potencial para la formación de un complejo heterooligomérico, propiedad común a los heterómeros de receptores asociados a proteínas G (Ferré et al., 2007; Fuxe et al., 2007), podría constituir la base para comprender los mecanismos de intercomunicación intermolecular que propician la mutua influencia entre los receptores D2 y μ durante el dolor sostenido.

Resultados y discusión

Los resultados mostrados en este estudio suponen la primera indicación de un fenómeno de facilitación de la modulación de la información nociceptiva mediada por el subtipo μ , en astas posteriores, propiciado por la activación del receptor D2. Esta facilitación se produce en un contexto de interacción mutua y bidireccional entre ambos receptores, desencadenado por la LNR. Desde una visión fisiopatológica, estos descubrimientos sugieren que la ruta dopaminérgica A11-medular puede potenciar la función medular del MOR, y aunque no sea bien conocida aún, debe ser considerada como uno de las mayores contribuyentes a la antinocicepción durante el dolor sostenido. La incremento en la expresión tanto de MOR como de D2 en las misma localizaciones sinápticas es un indicio de que ambos podrían interactuar a nivel molecular. Finalmente, desde el punto de vista de sus implicaciones terapéuticas, los datos señalan un mecanismo novedoso de la regulación del MOR, cuya explotación posibilitaría la reducción de las dosis de agonista de μ administradas, así como los efectos no deseados, mediante la activación simultánea de D2 en astas posteriores, fortaleciendo los mecanismos de control endógeno del dolor. Se deberían llevar a cabo más estudios en el futuro para garantizar la seguridad y efectividad de la administración combinada de opioides y sustancias con D2 como diana para tratar a pacientes con dolor, así como para evaluar la adecuación de la ruta medular de administración en pacientes con dolor.

ESTUDIO 2: El receptor dopaminérgico D1 regula constitutivamente la represión mediada por el receptor de subtipo μ de la plasticidad sináptica dependiente del uso en astas posteriores: ¿más daño que beneficio?

El objetivo de este estudio es explorar la influencia de la neurotransmisión dopaminérgica, mediada por D1, en función del MOR en contextos diferentes de la nocicepción central; incluyendo la excitación aferente inducida por un estímulo nociceptivo único, la plasticidad sináptica inducida por estimulación nociceptiva repetitiva o el dolor neuropático sostenido a causa de una lesión nerviosa. Hemos usado técnicas electrofisiológicas y procedimientos de estudio conductual para evaluar la función del receptor opioide del subtipo μ . Además, hemos estudiado aspectos neuroanatómicos y cuantitativos de la expresión del receptor mediante inmunofluorescencia confocal y métodos bioquímicos.

RESULTADOS

El receptor D1 reduce la excitabilidad en astas posteriores tras la LNR mediante el subtipo μ

Con el objetivo de evaluar la habilidad del receptor D1 para modular la transmisión de la señal nociceptiva en astas posteriores hemos registrado los potenciales evocados por fibras C en láminas superficiales durante la superfusión con el agonista del receptor D1, SKF38393. La administración del fármaco no altera los potenciales evocados en ratas sin LNR (fig. 4). Sin embargo, en ratas con LNR, SKF38393 reduce significativamente los potenciales de forma dependiente de concentración. La reducción es estadísticamente significativa a 1 μ M (reducción del $48,18 \pm 0,26\%$; $p < 0,01$; $n=6$).

Recientes estudios muestran interacciones entre la neurotransmisión dopaminérgica y la analgesia opioide (Becker et al., 2001; Aira et al., 2014; Brewer et al., 2014). En este estudio hemos explorado si la modulación de los potenciales evocados mediada por el receptor D1 implica la activación

Resultados y discusión

del subtipo μ . La coadministración del antagonista selectivo del subtipo μ CTOP a una concentración subclínica (100 nM), que de por sí no altera los potenciales evocados, bloquea completamente la depresión de los potenciales producida por SKF38393 a 1 μM (fig. 4). En contraste con ello, la depresión inducida por SKF38393 no se ve afectada por la coadministración de bicuculina (100 nM), antagonista de receptor GABA (reducción de un $45,89 \pm 0,19\%$; $p < 0,01$; $n=6$).

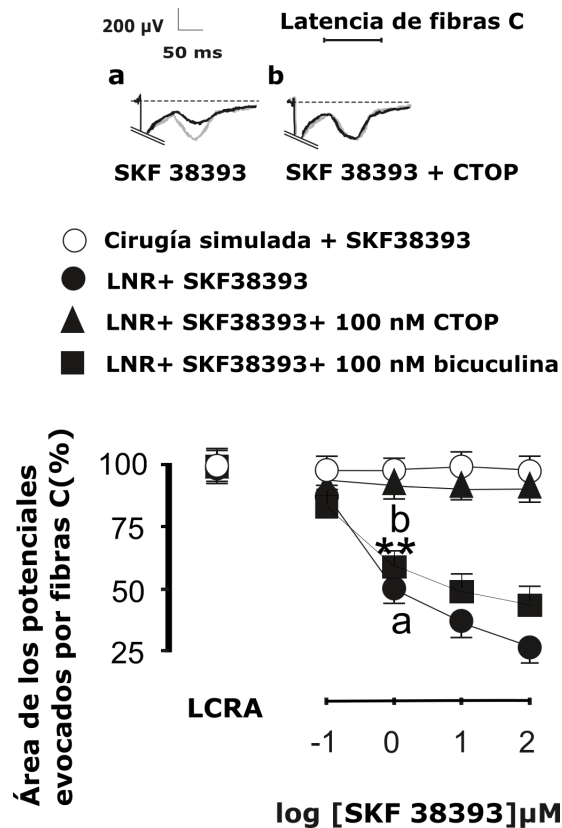
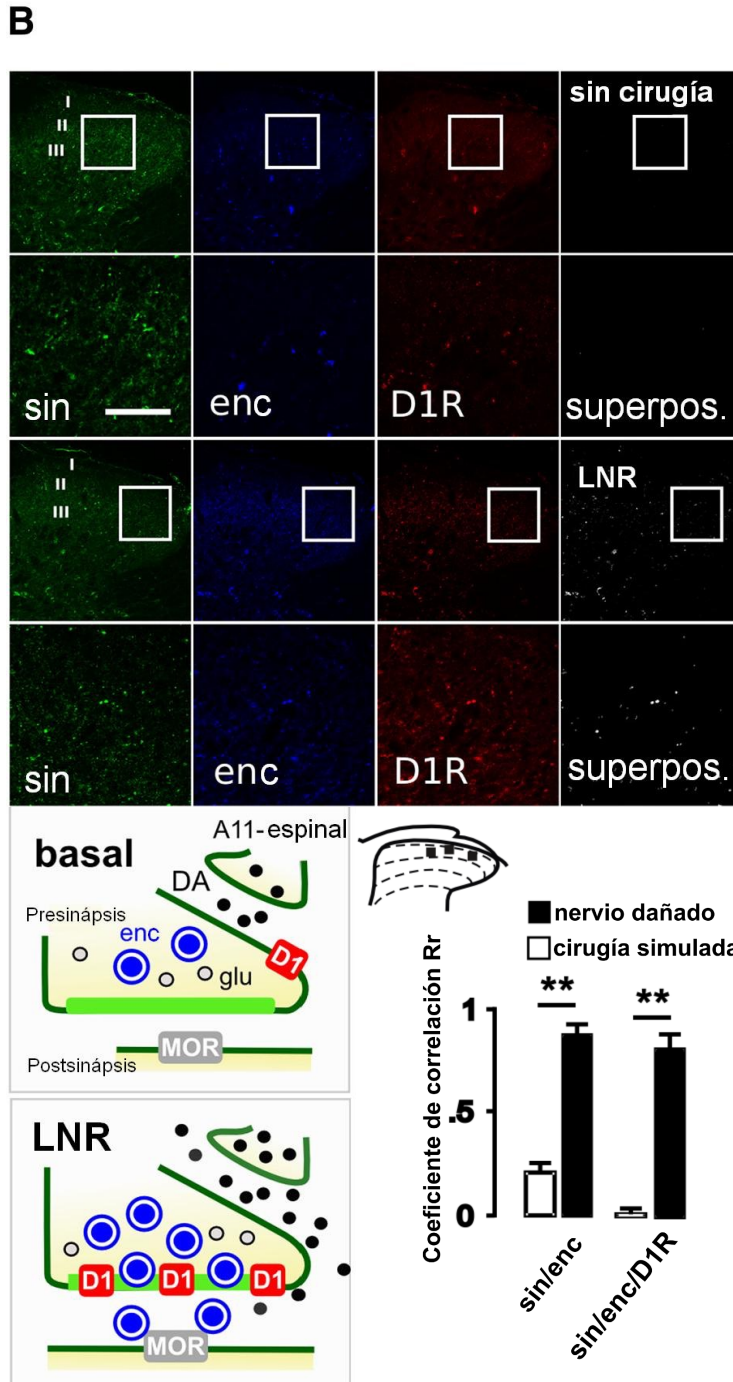
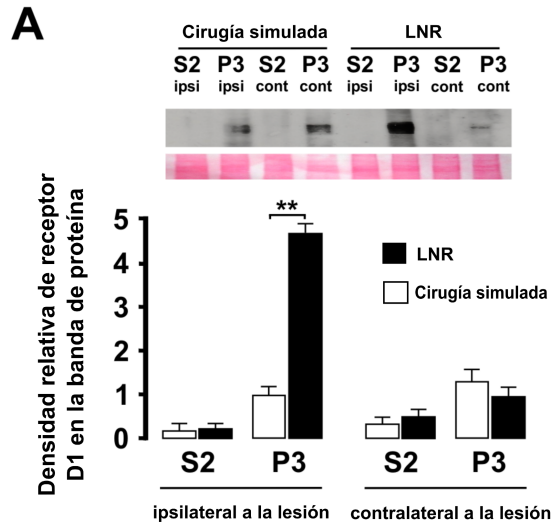


Figura 4. El MOR es mediador de la depresión de potenciales que induce la activación del receptor D1 en ratas con ligadura.

Las medias de las áreas de los potenciales evocados por fibras C durante la superfusión con concentraciones crecientes y acumulativas del agonista del receptor D1 SKF38393 en ratas con LNR (círculos negros), en combinación con concentraciones subclínicas de CTOP (triángulos negros) o con bicuculina (cuadrados negros). En círculos blancos se representa a las ratas con cirugía simulada. SKF38393 reduce los potenciales evocados en ratas con LNR pero no en ratas que han sufrido cirugía simulada. Dicha reducción es bloqueada por la coadministración de CTOP pero no por la aplicación de bicuculina.

Los asteriscos indican significancia estadística a $p < 0,01$, empleando la prueba *post hoc* de Bonferroni seguido de una ANOVA de una vía, cuando se comparan potenciales antes y durante el tratamiento ($n=6$ cada grupo; las barras indican el E.T.M.) Con el objetivo de mostrarlo con más claridad, únicamente están etiquetados los primeros valores estadísticamente significativos. En la parte superior, se muestran registros representativos, ilustrando el efecto de SKF38393 a 1 μM sobre los potenciales evocados por fibras C en ausencia (a) o presencia (b) de CTOP a 100 μM (escala de 50ms; 200mV; barra horizontal= latencia de las fibras C).

Resultados y discusión



Resultados y discusión

Figura 5. Coexpresión de D1R y de met-enkefalina en neuronas glutamatérgicas, pero no en las neuronas GABAérgicas localizadas en las láminas superficiales de las astas dorsales. Triple inmunofluorescencia con marcaje en secciones lumbares han mostrado colocalización del receptor D1 en neuronas encefalinérgicas que contienen VGLUT2, marcador de neuronas glutamatérgicas, pero no en neuronas que contienen vGAT, marcador de neuronas GABAérgicas. La colocalización triple se indica con color blanco. Se presentan las microfotografías de baja resolución y en ellas se marcan las zonas ampliadas con alta resolución. Barra de escala igual a 10 μm .

La LNR promueve un aumento en la expresión presináptica del receptor D1 en enclaves que contienen met-enkefalina

Existen evidencias previas de que contextos asociados a incrementos en los niveles de dopamina favorecen el aumento en la expresión del receptor D1 (Aubert et al., 2005), y de que la liberación de dopamina en las astas posteriores aumenta en el dolor patológico (Gao et al., 2001). Hemos evaluado si los cambios observados en el perfil modulador de D1 se relacionan con aumentos en la expresión del receptor en las neuronas de astas posteriores. Con este fin, hemos determinado la expresión de D1 en los homogeneizados de astas posteriores extraídos de ratas con LNR (9 días tras la cirugía). Los resultados del Western blot muestran un incremento del D1 en la fracción sináptica (P3) solo del lado lesionado, pero sin observarse en la fracción citoplasmática (S2) de ninguno de los dos lados. El análisis de densidad relativa muestra un incremento notable y significativo en comparación con el grado de inmunorreactividad en la fracción P3 ipsilateral a la lesión en ratas sometidas a cirugía simulada ($p < 0,01$ mediante test t-Student; fig. 6A).

Empleando inmunofluorescencia confocal triple y utilizando la sinaptofisina como marcador presináptico, hemos detectado un incremento significativo de la presencia del receptor D1 en densidades presinápticas inmunopositivas a met-enkefalina tras la LNR (fig. 6B). Las comparaciones mediante correlación de píxeles utilizando el test exacto de Fisher confirman niveles de correlación estadísticamente más altos en las ratas con LNR en relación con ratas con cirugía simulada (R_r 0,73 vs 0,02; $z = -75,72$, $p < 0,01$).

Resultados y discusión

Figura 6. Aumento en la expresión presináptica del receptor D1 y de met-enkefalina tras la LNR

A. Los Western blot de los homogeneizados de astas posteriores de las ratas con lesión del nervio y de las sometidas a cirugía simulada. Se observa un aumento de reactividad a D1 en el compartimento sináptico (P3) de las astas posteriores de aquellas ratas con LNR. La tinción con Ponceau se utiliza como control de carga de proteína. Las barras muestran el análisis cuantitativo de densidad de banda normalizando respecto a la fracción P3 de ratas con cirugía simulada. Los asteriscos indican significancia estadística a $p < 0,01$ en el test de t-Student. Las barras de error representa el E.T.M.

B. Micrografías confocales de astas posteriores de ratas con lesión nerviosa y sometidas a cirugía simulada, en las que se muestran la inmunoreactividad para D1 (rojo), met-enkefalina (azul) y sinaptofisina como marcador presináptico (verde). La fila de arriba muestra las micrografías de baja resolución y en ellas se indica la zona representada en las microfotografías de alta resolución (barra, 5 μm) La superposición de los tres marcajes se muestra en amarillo. El cambio que más llama la atención es el aumento drástico en la triple colocalización tras la LNR respecto a la práctica inexistencia de colocalización en las ratas sometidas a cirugía simulada. Los cuadros negros localizados sobre el diagrama del asta posterior indica los lugares en los que se han obtenido las micrografías para el análisis.

C. El diagrama de barras representa el análisis basado en la intensidad de correlación en las microfotografías de triple inmunofluorescencia confocal. Dicho análisis se realiza utilizando el coeficiente de correlación de Pearson como una medida de colocalización de píxeles. Tras la LNR, se observa un aumento significativo en los coeficientes de correlación de intensidad, lo que indica colocalización del receptor D1, con met-enkefalina y con sinaptofisina (los asteriscos indican un valor de $p < 0,01$ en el test exacto de Fisher respecto a las ratas sometidas a cirugía simulada).

En el dibujo esquemático se propone una interpretación de todos los hallazgos presentados. Aunque los receptores D1 se encuentran presumiblemente en neuronas glutamatérgicas, el receptor de D1 se encuentra prácticamente ausente en condiciones basales en enclaves presinápticos que contienen met-enkefalina, tanto el receptor D1 como la met-enkefalina se sobrerregulan en las presinapsis tras la LNR. El código de colores para representar la densidad presináptica, la met-enkefalina y el receptor D1 concuerda con los canales mostrados en la inmunofluorescencia. El volumen de transmisión dopaminérgica se representa como varicosidades dopaminérgicas (DA).

La activación endógena sostenida del receptor D1 que sucede a la LNR aumenta los niveles de met-enkefalina en astas posteriores.

Hemos realizado Western blots en homogeneizados de astas posteriores extraídas, 9 días después de la cirugía, a las ratas con LNR y a las ratas sometidas a cirugía simulada. Hemos encontrado un gran aumento de met-enkefalina en los homogeneizados de las ratas con ligadura, en comparación con aquellos provenientes de animales control. Tal como se muestra en el análisis de densidad, dicho incremento es significativo estadísticamente ($p < 0,01$ usando test de t-Student; fig. 7).

Lo siguiente que hemos pretendido determinar ha sido si la activación sostenida del receptor D1 era indispensable para aumentar la presencia de

Resultados y discusión

met-enkefalina. Para conseguir dicho objetivo, hemos bloqueado el receptor D1 mediante administración diaria del antagonista selectivo SCH23390, inyectándolo intraperitonealmente, durante los 9 días siguiente a la cirugía a dosis de 0,5 mg/kg o 0,05 mg/kg en grupos separados. Hemos hallado que el bloqueo crónico del receptor D1, a diferencia del tratamiento con vehículo (suero salino isotónico), atenúa de forma dosis-dependiente el aumento de met-enkefalina inducido por la LNR. Tal como revela el análisis de densidad, dicha atenuación es estadísticamente significativa tras el tratamiento con SCH23390, en cualquiera de sus dosis, al comparar el efecto con el observado en las ratas sometidas a ligadura y a las que se les administró suero salino isotónico ($p < 0,01$ utilizando test t-Student; fig. 7).

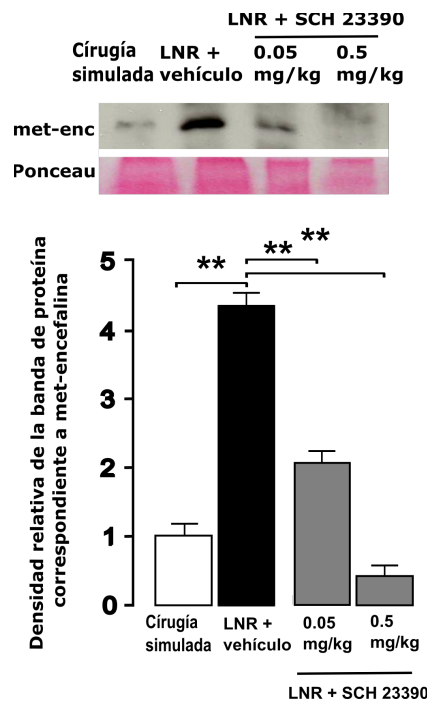


Figura 7. El receptor D1 es responsable del aumento en la expresión de met-enkefalina tras la LNR.

Los Western blot de los homogeneizados de astas posteriores muestran un aumento de met-enkefalina en las ratas con LNR en comparación con las ratas sometidas a cirugía simulada, así como el efecto del tratamiento postoperatorio con el antagonista del receptor D1 SCH23390 durante los 9 días siguientes a la lesión. La tinción de Ponceau se emplea para confirmar la carga de proteína. La cuantificación basada en la imagen de las bandas de inmunorreactivo, normalizadas en base a la densidad de banda de las ratas sin lesión, revela un aumento del cuádruple de met-enkefalina tras la LNR. El aumento en la expresión de met-enkefalina es significativa y atenuada, de forma dependiente de dosis, por el tratamiento con SCH23390. Los asteriscos indican significancia estadística, $p < 0,01$ en test t-Student. Las barras de error indican el E.T.M.

Resultados y discusión

El reclutamiento del receptor μ por D1 reprime constitutivamente la plasticidad sináptica inducida por señales aferentes.

Hemos aplicado estimulación de baja frecuencia sobre el nervio ciático como condicionante, tanto a 0,2 Hz como a 3 Hz. Ninguno de los dos parámetros de estimulación es capaz de condicionar los potenciales evocados en ratas intactas (fig. 8). Sin embargo, al bloquear farmacológicamente el MOR con CTOP (100 nM), ambas estimulaciones a las frecuencias aplicadas producen una potenciación a largo plazo a nivel medular de los potenciales evocados por fibras C (aumento del $78,11 \pm 0,53\%$; $p < 0,01$ en relación a la línea base; fig. 8). El desencadenamiento de la potenciación desenmascara un rol constitutivo del MOR en la represión de la plasticidad sináptica dependiente de la actividad en las neuronas de astas posteriores. En experimentos posteriores, se ha utilizado la capacidad de la estimulación a baja frecuencia para inducir potenciación a largo plazo como variable para estudiar el rol represor del subtipo μ .

En experimentos análogos hemos bloqueado los receptores D1 medulares administrando SCH23390 y hemos encontrado que la estimulación de baja frecuencia induce PLP (aumento de un $58,42 \pm 0,39\%$; $p < 0,01$; fig. 8), implicando de esta manera al receptor D1 en los mecanismos endógenos que constitutivamente reprimen la plasticidad sináptica dependiente del uso. Si el receptor D1 opera regulando la liberación del ligando endógeno del subtipo μ , como sostienen los datos anatómicos y farmacológicos aportados previamente, bloqueando la activación de D1 debería prevenirse el reclutamiento del MOR pero no necesariamente la activación de este mismo receptor por un agonista exógeno. Para probar esta hipótesis, hemos administrado DAMGO, un agonista altamente selectivo del MOR, mediante superfusión medular (100 μ M) 2 minutos antes de la estimulación de baja frecuencia, y simultáneamente se ha administrado SCH23390, para bloquear D1. Confirmando la hipótesis previa, hemos observado que DAMGO activa al receptor opioide, a pesar del bloqueo de D1, previniendo la potenciación a largo plazo (fig. 8).

Resultados y discusión

- ▲ EBF (0.2 Hz) + LCRA
- △ EBF (3 Hz) + LCRA
- EBF (3 Hz) + 100 nM CTOP
- EBF (3 Hz) + 1 mM SCH 23390
- EBF (3 Hz) + 1 mM SCH 23390 + 100µM DAMGO

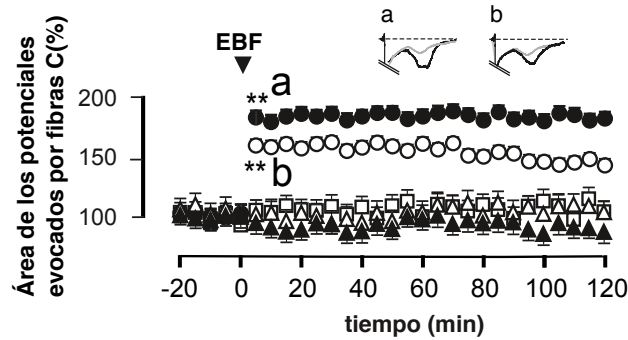


Figura 8. La EBF induce PLP durante el bloqueo tanto de D1 como del subtipo μ .

Las áreas de los potenciales evocados son representadas en relación al tiempo antes y después de la aplicación de la estimulación condicionante (2 trenes de 30 s a 3 mA, pulsos de 1,5 ms de duración administrados a baja frecuencia, tanto a 0,2 Hz como a 3 Hz, pausas de 30 s). El eje de tiempo se representa en relación con el punto temporal en el que se aplica la estimulación condicionante. Dicha estimulación condicionada a 3 Hz induce PLP de los potenciales evocados cuando se estimula en presencia de antagonistas tanto del MOR como del D1, CTOP o SCH23390 respectivamente. No obstante, no se detectan cambios en los potenciales evocados tras la estimulación condicionada durante la superfusión medular con LCRA. En las ratas que reciben la superfusión medular con SCH23390 y una administración aguda de DAMGO, 2 minutos antes de la EBF se previene la generación de PLP. Los asteriscos indican significancia estadística ($p < 0,01$) en el aumento de los potenciales evocados en comparación con la línea base registrada previamente a la EBF (test *post hoc* de Bonferroni y ANOVA de una vía, $n=6$ de cada condición experimental). Con intención clarificatoria, únicamente aparece etiquetado el primer potencial que aumenta significativamente. En la parte superior de la gráfica se muestran potenciales evocados representativos de los experimentos en los que se emplean CTOP (a) o SCH23390 (b). Las barras de error indican el E.T.M.

La activación sostenida del receptor D1 tras la lesión del nervio perjudica la capacidad del receptor μ de oponerse a la plasticidad sináptica.

Nos planteamos si la capacidad del MOR para reprimir la plasticidad sináptica inducida por estimulación aferente se encuentra preservada durante la SC y el dolor sostenido tras la lesión del nervio periférico. Para evaluar esta posibilidad, hemos estudiado la potenciación producida por EBF 9 días después de llevarse a cabo la LNR. Hemos hallado que la estimulación a baja frecuencia, tanto a 0,2 Hz como a 3 Hz, induce PLP de

Resultados y discusión

potenciales evocados por fibras C ($54,12 \pm 0,51\%$ y $68,89 \pm 0,39\%$ respectivamente; ambos $p < 0,01$, $n=6$; fig. 9A). Además, hemos determinado que la PLP es prevenida de forma efectiva por la superfusión medular con antagonista del receptor NMDA, D-AP5 ($100 \mu\text{M}$).

Si la activación sostenida del receptor D1 tras LNR es responsable de perjudicar la capacidad del MOR para prevenir la PLP, manteniendo bloqueado el receptor D1 tras la lesión nerviosa debería preservarse la función del receptor μ . Hemos tratado a las ratas sometidas a LNR con inyecciones diarias interperitoneales de antagonista del receptor D1, SCH23390, tanto a $0,05$ como con $0,5 \text{ mg/kg}$, durante 9 días, para posteriormente intentar inducir potenciación a largo plazo por EBF. Además, hemos evaluado el efecto de la misma dosis de antagonista sobre la activación fásica del receptor D1 durante la inducción de PLP, por ejemplo, en ausencia de administración diaria previa, en ratas sin lesión nerviosa administrando el fármaco 20 minutos antes de la EBF. En las ratas con lesión, hemos observado que una administración aguda de $0,05 \text{ mg/kg}$ de SCH23390 tras EBF, una dosis efectiva para prevenir la sobrerregulación de met-enkefalina en astas posteriores (véase la fig. 7), es incapaz de bloquear la activación fásica del receptor D1, mientras que permite que se desarrolle la PLP (fig. 9B). Contrariamente, se ha observado que el antagonista administrado a dosis más alta ($0,5 \text{ mg/kg}$) previene la PLP. Estos hallazgos muestran que la dosis más alta de antagonista bloquea tanto la activación fásica del receptor D1 durante la inducción de la PLP como la activación sostenida que conlleva un aumento en la expresión de met-enkefalina tras la LNR. En las ratas con daño nervioso que son tratadas crónicamente con SCH23390 hemos observado que la capacidad de MOR para reprimir la plasticidad inducida por estímulos aferentes se mantiene completamente preservada mediante la aplicación de $0,05 \text{ mg/kg}$ del fármaco, es decir, que esta dosis es suficiente para bloquear de forma efectiva el aumento en la expresión de met-enkefalina pero no demasiado alta como para prevenir la activación fásica de D1 durante la PLP (fig. 9B). También hemos observado una ligera pero estadísticamente significativa potenciación ($26,79 \pm 0,50\%$, $p < 0,01$, $n=6$; fig. 9B) tras EBF en ratas tratadas con la dosis mayor de SCH23390 ($0,5 \text{ mg/kg}$). Hemos interpretado esta PLP como un probable

Resultados y discusión

resultado del bloqueo de la activación fásica del receptor D1 durante la aplicación de la EBF.

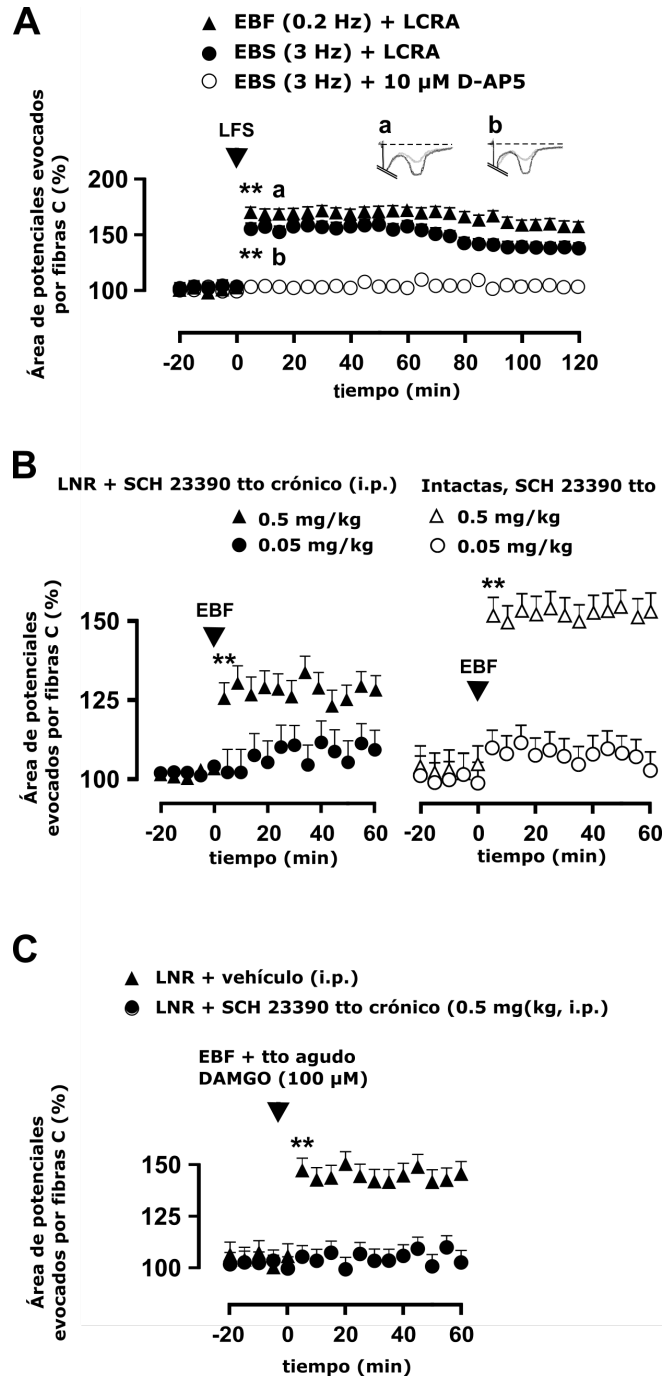


Figura 9. El receptor D1 es responsable de la pérdida de capacidad endógena de represión de la plasticidad sináptica tras la LNR.

A. En las ratas con LNR, la EBF condicionante induce PLP de los potenciales evocados por fibras C, dependiente del receptor NMDA, 9 días después de la operación. Se representa el curso temporal de los cambios inducidos por estimulación condicionante. Asimismo, se muestran dos ejemplos de potenciales evocados representativos de los experimentos (las líneas grises corresponden a los registros basales controles)

Resultados y discusión

B. El bloqueo postoperatorio de la actividad de D1 tras la LNR con inyecciones intraperitoneales de SCH23390 preserva la capacidad del mecanismo endógeno de prevenir la PLP. El fenómeno se encuentra mejor ejemplificado por los datos de las ratas que recibieron la dosis más baja de SCH23390 (0,05 mg/kg). La dosis más alta (0,5 mg/kg) no es capaz de impedir la generación de PLP, presumiblemente debido al bloqueo de la activación fásica del receptor de D1 durante la estimulación condicionante, tal como se confirma por los experimentos control en ratas intactas, gráfica de la derecha.

C. La activación aguda del receptor μ por administración de DAMGO mediante perfusión medular, 2 minutos antes de la EBF, reprime la generación de PLP únicamente en las ratas en las que se ha bloqueado la activación sostenida del receptor D1 tras la LNR mediante inyecciones postoperatorias diarias de SCH23390.

En las cuatro gráficas, los asteriscos denotan un aumento estadísticamente significativo de las medias de las áreas de los potenciales ($p < 0,01$) comparándolos con los potenciales previos a la EBF (test *post hoc* de Bonferroni y ANOVA de una vía). Solo el primer dato con aumento estadísticamente significativo se encuentra etiquetado. Las barras de error indican el E.T.M.

Además, hemos querido determinar si anulando la activación sináptica sostenida de D1 tras la LNR, se preserva la respuesta del MOR a la activación exógena por agonista. Con este fin, hemos evaluado la capacidad del agonista del MOR, DAMGO, administrado agudamente por perfusión medular (100 μ M) justo antes de la estimulación condicionada, para prevenir la inducción de PLP en ratas con LNR, tratadas crónicamente con SCH23390. Hemos observado que DAMGO previene eficientemente la PLP en las ratas tratadas con SCH23390 (0,5 mg/kg) pero no en las tratadas sólo con vehículo (suero salino isotónico) (aumento de un $38,05 \pm 0,46\%$, relativo a los resultados previos a la EBF; $p < 0,01$, $n = 6$; fig. 9C).

La activación sináptica potenciada de D1 tras la LNR perjudica la analgesia térmica y mecánica mediada por el receptor μ

Para entender mejor como el aumento en la expresión del receptor D1, tras la LNR, influye en la antinocicepción del subtipo μ , hemos evaluado la capacidad de DAMGO administrado agudamente (1,5 mg/kg) de aliviar la nocicepción térmica y mecánica en ratas con LNR pasados 9 días tras la cirugía. Las ratas sometidas a LNR y tratadas con suero salino isotónico, tanto aguda como crónicamente, han presentado alodinia térmica y mecánica ipsilateral, tal como demuestra el descenso de los umbrales de retirada de la extremidad posterior frente a estimulación mecánica de la superficie plantar con monofilamentos de von Frey o del umbral frente al test de la placa caliente (umbral mecánico de $2,13 \pm 0,30$ g frente a $10,83 \pm 0,40$ g en ratas que se han sometido a cirugía simulada, y el umbral

Resultados y discusión

térmico de $39,09 \pm 0,27$ °C frente a $48,13 \pm 0,31$ °C en las ratas sin ligadura; $p < 0,01$ en ambos casos contrastado mediante test t-Student, $n=6$). En estas ratas, DAMGO revierte significativamente, aunque sólo de forma parcial, los umbrales mecánico y térmico ($4,91 \pm 0,42$ g umbral mecánico frente al $2,13 \pm 0,30$ g previo a DAMGO, y $42,48 \pm 0,23$ °C el umbral térmico frente a $39,09 \pm 0,27$ °C previo a DAMGO; $p < 0,01$ en los dos contrastes usando test t-Student, $n=6$, fig. 10). En el caso de las ratas con LNR tratadas crónicamente con SCH23390, los umbrales mecánicos aumentan drásticamente ($9,49 \pm 0,43$ g, $p < 0,01$ frente a los previos al DAMGO; fig. 10), y los umbrales térmicos se ven restaurados a niveles propios de ratas sometidas a cirugía simulada ($47,52 \pm 0,35$ °C; $p < 0,01$ empleando test t-Student frente a las medidas previas a DAMGO, y $p=0,07$ frente a ratas sin LNR; fig. 10). De esta manera, los incrementos en los umbrales mecánicos y térmicos tras la administración de DAMGO son significativamente mayores en las ratas tratadas con SCH23390 que en animales crónicamente tratados con vehículo ($p < 0,01$ utilizando el test t-Student para contrastar el efecto de los diferentes tratamientos en ambas modalidades sensoriales).

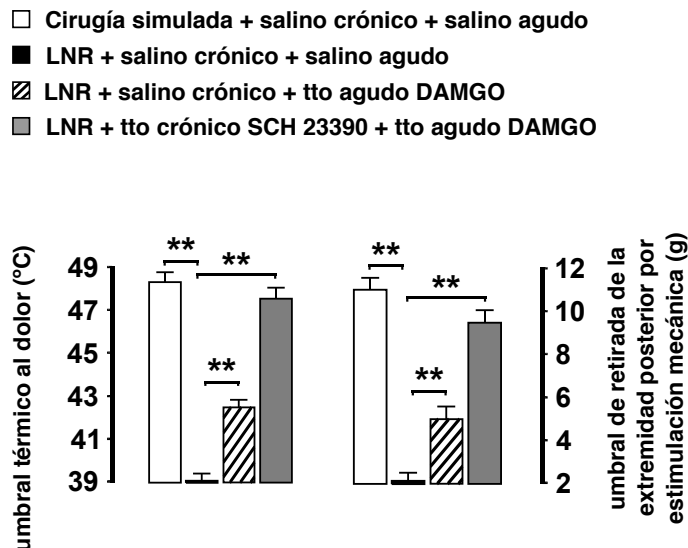


Figura 10. La antinocicepción térmica y mecánica por estimulación farmacológica del MOR es preservada por tratamiento con antagonista del receptor D1 en ratas con LNR.

Se muestran los umbrales de dolor al calor evaluados con el test de placa caliente (A) y los umbrales de retirada de la extremidad posterior tras estimulación mecánica estática evaluados con monofilamentos de von Frey (B) 9 días tras la LNR. La administración aguda de DAMGO (ip.) antes de la prueba de comportamiento retorna parcialmente a niveles basales los umbrales térmicos y mecánicos, ambos significativamente más bajos tras la LNR ipsilateralmente a la lesión. Sin embargo, una inyección aguda de DAMGO aumenta drásticamente tanto el umbral térmico como el mecánico, alcanzando niveles cercanos a los

Resultados y discusión

normales, en ratas ligadas tratadas con SCH23390 (ip. diaria) para bloquear la activación postoperatoria del receptor D1. No ocurre lo mismo en ratas tratadas con vehículo (suero salino isotónico). Los asteriscos indican significancia estadística ($p < 0,01$) en los contrastes mediante test t-Student. Las barras de error indican el E.T.M.

Rápido deterioro de la función del receptor μ tras la activación del receptor D1

Con el objetivo de determinar el momento en el que se produce el deterioro de la función del MOR tras el inicio de la activación sostenida de D1, hemos llevado a cabo una activación de los receptores D1 en astas posteriores de ratas intactas, mediante superfusión del agonista selectivo SKF38393 (100 μM), antes de la aplicación de la EBF. Los resultados muestran que la activación del receptor D1 durante 30 minutos es suficiente para perjudicar la capacidad del MOR para prevenir la PLP tras el condicionamiento ($53,02 \pm 0,51\%$, $p < 0,01$, $n=6$; fig. 11). En experimentos separados hemos encontrado que bloqueando simultáneamente el MOR con CTOP (10 μM ; lavado intensamente durante 5 minutos previamente a la EBF) durante la activación de D1 se preserva la capacidad del MOR para prevenir la PLP, sugiriendo que el deterioro de la funcionalidad del MOR tras la activación de D1 está causado por una activación sostenida del MOR.

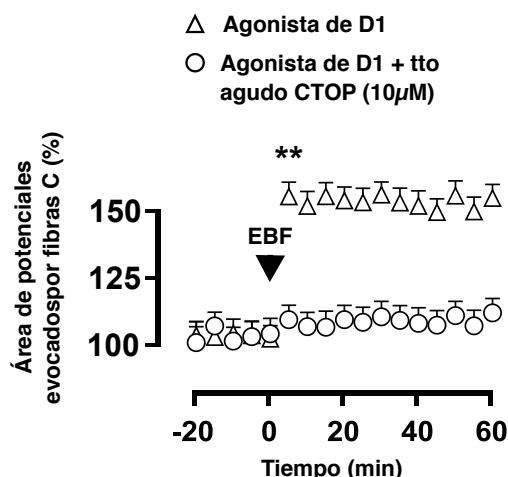


Figura 11 Rápido colapso de la función del MOR tras una activación sostenida de D1.

La activación del receptor D1 con SKF38393 durante 30 minutos antes de la estimulación condicionante es suficiente para incapacitar la respuesta endógena de represión de la PLP mediada por el MOR. Impidiendo la activación sostenida del MOR con CTOP (con un lavado intenso 5 minutos antes de la estimulación) durante la activación del receptor D1 se preserva la capacidad del MOR de evitar la generación de PLP.

Resultados y discusión

Los asteriscos indican significancia estadística ($p < 0,01$) cuando se comparan los potenciales previos y posteriores a la estimulación condicionante mediante el test *post hoc* de Bonferroni y ANOVA de una vía ($n=6$ en cada condición experimental, las barras de error indican el E.T.M.) Únicamente etiquetados los primeros datos que muestran un efecto estadísticamente significativo.

DISCUSIÓN

El receptor D1 reduce la excitabilidad medular mediante el MOR

El hallazgo de que la activación del receptor D1 reduce la excitación evocada en las neuronas de las astas posteriores es complementario a evidencias previas que sostienen una acción general antinociceptiva de la dopamina en las astas posteriores (Tamae et al., 2005; Taniguchi et al., 2011). El efecto modulador del receptor D1 se circunscribe a las ratas con LNR, tal como sugieren la ausencia de modulación de los umbrales mecánicos nociceptivos o de las respuestas agudas evocadas por fibras C en animales intactos (Tamae et al., 2005; Yang et al., 2005), así como la atenuación de la activación por agonistas de D1 en la segunda pero no en la primera fase del test de la formalina observada en ratas y ratones (Zarrindast et al., 1999; Munro et al., 2007). Uno de los mecanismos que emplea el receptor D1 para atenuar la excitación neuronal consiste en potenciar la inhibición producida por opioides o por GABA (Schoffelmeer et al., 2000; Mango et al., 2014). En este estudio hemos medido la capacidad del agonista de D1, SCH23390, de reducir los potenciales evocados mientras se reduce la activación endógena de los receptores medulares opioides μ y GABA por antagonistas selectivos. La coadministración de CTOP, pero no de bicuculina, impide la reducción mediada por el receptor D1, sugiriendo la implicación del MOR medular.

Otros autores han descrito mecanismos de regulación funcional de algunos neurotransmisores por acción de la dopamina en el SNC (Tritsch y Sabatini, 2012). Aunque la dopamina principalmente actúa limitando la liberación del neurotransmisor, hay evidencias que indican que puede producir una facilitación heterosináptica a través del receptor D1 (Cameron y Williams, 1993; Trudeau et al., 1996; Chen y Regehr, 1997). Considerando que la encefalina es el mayor ligando opioide en las astas posteriores (Marvizón et al., 2009; Huang et al., 2010), planteamos la posibilidad de que la interacción del receptor D1 con el subtipo μ se produzca en los terminales que contienen encefalina, neurotransmisor con una alta afinidad por μ (Delfs et al., 1994; Raynor et al., 1994; Fields, 2004).

Resultados y discusión

Además, tanto la encefalina como el receptor D1 están localizados predominantemente en la lámina II de las astas posteriores (Todd y Spike, 1992; Zhu et al., 2007). Los resultados muestran colocalización del receptor D1 con el marcador presináptico sinaptofisina y con met-encefalina en la superficie de las astas posteriores (fig. 6), respaldando la idea de que el receptor D1 se presenta en enclaves presinápticos en los que también se encuentra met-encefalina. La ausencia de receptores D1 y met-encefalina en las neuronas GABAérgicas es coherente con la falta de interacción observada anteriormente entre los receptores D1 y GABA. La encefalina, en cambio, si se encuentra presente en neuronas GABAérgicas de la médula espinal (Todd y Spike, 1992; Todd et al., 2003; Marvizón et al., 2007, 2009; Huang et al., 2010), y en fibras C (Marvizón et al., 2009). Los datos obtenidos de la inmunofluorescencia confocal nos indican que las neuronas que muestran presencia del transportador vesicular VGLUT2, marcador de neuronas glutamatérgicas, contienen D1 y met-encefalina, al contrario de las neuronas que se encuentran marcadas con vGAT, transportador presente en neuronas GABAérgicas. Los terminales postsinápticos más habituales para terminales encefalinérgicos suelen ser los aferentes primarios (Mansour et al., 1994, 1995; Ji et al., 1995; Li et al., 1998) o las interneuronas excitatorias en la médula espinal (Arvidsson et al., 1995; Kemp et al., 1996).

Al ser SCH23390 agonista tanto de los receptores D1 como D5, no podemos discriminar la contribución de cada uno en la acción depresora observada a causa del fármaco. De hecho, hay estudios que muestran la presencia de D5 en la médula espinal (Zhu et al., 2007) y hay recientes evidencias que sugieren una posible contribución de esta familia de receptores en el dolor sostenido (Kim et al., 2015). A pesar de estos datos, y de que no podemos excluir a D5 de la interacción D1-MOR, hemos aportado pruebas inmunocitoquímicas y western blots usando anticuerpo policlonal contra D1, el cual selectivamente se une al receptor y por el que podemos apreciar la implicación de D1 en este fenómeno de plasticidad.

Resultados y discusión

La sobrerregulación del receptor D1 aumenta la disponibilidad de met-enkefalina

En el presente trabajo mostramos datos anatómicos y bioquímicos que señalan que tras la LNR se producen cambios adaptativos que afectan a la expresión y organización subcelular del receptor D1 y de la met-enkefalina. Hemos detectado un aumento en la inmunorreactividad frente al receptor D1 en la fracción sináptica (P3) de los homogeneizados de astas posteriores de las ratas con LNR en enclaves presinápticos de neuronas que contienen met-enkefalina, colocalizado con el marcador presináptico sinaptofisina (fig. 6). El aumento de liberación de dopamina en astas posteriores tras la LNR se encuentra en consonancia con el incremento de este mismo neurotransmisor observado tras las inyecciones intraplantares de carragenina (Gao et al., 2011). En relación a la respuesta metabólica del receptor D1 se ha comprobado que ante una prolongada exposición a dopamina este receptor responde con un rápido reciclado, mostrando altos niveles de recolocación en la membrana celular (Ariano et al., 1997; Bartlett et al., 2005).

Asimismo, hemos detectado un aumento de la inmunorreactividad a met-enkefalina en los homogeneizados de astas posteriores de las ratas con LNR, cuadruplicando los niveles basales, lo cual concuerda con resultados previos en modelos de dolor experimental (Sommer y Myers, 1995; Calzá et al., 1998; Hossaini et al., 2014). En estudios propios, hemos observado que cuando aumenta la señal aferente nociceptiva se produce un incremento de la disponibilidad de met-enkefalina y una activación sostenida de MOR (Buesa et al., 2008). La relevancia del mecanismo reflejado en este estudio consiste en que la actividad sostenida del receptor D1 es responsable del incremento de met-enkefalina, lo cual queda demostrado con el efecto atenuador del bloqueo postoperatorio de D1, con SCH23390, sobre el aumento de expresión de met-enkefalina tras la LNR.

El receptor D1 condiciona el umbral de plasticidad sináptica

Hemos inducido una potenciación sináptica a largo plazo de los potenciales evocados por fibras C en las astas posteriores de ratas intactas,

Resultados y discusión

empleando EBF como estímulo condicionante, mientras se realizaba un bloqueo del MOR, poniendo de manifiesto el papel constitutivo del subtipo μ en la represión de la plasticidad sináptica producida por un estímulo nociceptivo repetitivo. La PLP en las sinapsis de las astas posteriores se considera un fenómeno esencial que subyace a la generación de la hiperalgesia y de la SC en las vías de señalización nociceptiva (Ji et al., 2003; Sandkühler, 2007; Sandkühler y Gruber-Schoffenegger, 2012). Nuestras observaciones están en consonancia con estudios previos que indican que el MOR se opone al *wind-up* producido por estímulos nociceptivos repetidos (Guan et al., 2006), así como que interfiere con los mecanismos de inducción de la PLP tras la estimulación de alta frecuencia en preparaciones *in vitro* (Terman et al., 2001). Mediante el bloqueo del receptor D1 hemos reproducido el efecto permisivo sobre la inducción de PLP que observábamos con el bloqueo del subtipo μ , lo cual sugiere que la modulación mediada por D1 sobre la neurotransmisión en astas posteriores se integra en el mecanismo de represión constitutiva de la SC. Además, la activación directa del MOR por el agonista DAMGO previene la inducción de PLP a pesar del bloqueo simultáneo del receptor D1. Estos datos refuerzan la idea de que el receptor D1 regula la función del subtipo μ mediante la facilitación en la liberación del neurotransmisor, interviniendo de esta manera en la disposición para que se genere plasticidad sináptica.

Se ha descrito anteriormente que las neuronas dopaminérgicas pertenecientes a la vía diencefaloespinal proveniente de A11 intervienen en los controles conocidos como inhibidores nocivos difusos (CIND) mediante el reclutamiento del receptor D2 (Lapirot et al., 2011). Los datos aquí presentados implican también al receptor D1 como mediador medular del efecto de la dopamina liberada por estas neuronas, mostrando que D1 es reclutado en respuesta a estimulaciones condicionantes repetitivas de las fibras C o a la descarga aferente asociada a una lesión experimental de un nervio periférico.

La activación sostenida del receptor D1 perjudica la función del MOR

La estimulación de baja frecuencia induce PLP de los potenciales evocados por fibras C en ratas sometidas a LNR, lo que revela que los

Resultados y discusión

mecanismos endógenos encargados de reprimir la plasticidad sináptica se encuentran alterados en el dolor sostenido. La PLP inducida es dependiente del receptor NMDA (Randic et al., 1993; Liu y Sandkühler, 1995; Svendsen et al., 1998; Pedersen y Gjerstad, 2007; Qu et al., 2008; Zhou et al., 2008), tal como indica el bloqueo del mismo con D-AP5. Evidencias previas sostienen que la tolerancia a opioides endógenos, derivada de una neurotransmisión opioidérgica intensificada, puede contribuir a disminuir la sensibilidad a analgésicos opioides en el dolor sostenido (Xu et al., 2004). La LNR establece unas condiciones propicias aumentando la disponibilidad de met-enkefalina, tal y como se demuestra en el presente estudio. Además, nuestros resultados muestran que el aumento en la expresión del receptor D1 tras la LNR conlleva una disfunción del MOR asociada a un uso sostenido del mismo. De esta forma, la represión endógena de la PLP (fig. 8) se encuentra preservada en las ratas sometidas a lesión tratadas crónicamente con SCH23390, a una dosis suficiente como para prevenir el aumento en la expresión de met-enkefalina. El bloqueo crónico del receptor D1 tras la LNR mantiene la capacidad de respuesta del MOR a fármacos opioides, tesis apoyada por las dos evidencias observadas. Por un lado, una activación adecuada de MOR en ratas con LNR que habían sido tratadas con SCH23390, siendo efectivo DAMGO impidiendo la inducción de PLP. Por otro lado, la capacidad de DAMGO para elevar los umbrales nociceptivos térmicos y mecánicos, los cuales habitualmente se ven afectados tras la LNR, y que son preservados o restablecidos a niveles normales en las ratas tratadas con SCH23390 (fig. 10).

La activación, durante 30 minutos, del receptor D1 con SKF38393 en ratas intactas resulta suficiente para alterar la capacidad del MOR de reprimir la PLP (fig. 11), lo que revela que la disfunción del MOR es un fenómeno de rápida manifestación y que la activación del receptor D1 es indispensable para que ésta ocurra. Este período de tiempo se ajusta al tiempo necesario descrito para que se produzca un aumento significativo de la dopamina extracelular en astas posteriores como respuesta a un estímulo nociceptivo (Gao et al., 2001). Consistentemente, hemos hallado que el bloqueo farmacológico, con CTOP, de la activación sostenida del MOR preserva la represión endógena de la PLP a pesar de la activación del receptor D1, lo que demuestra que el deterioro de la función del MOR es

Resultados y discusión

causado por una activación sostenida del mismo. Además, hay evidencias de que una activación continuada de D1 puede conducir a la disfunción de MOR de manera progresiva, ya que la estimulación sostenida de D1 por una concentración alta de SKF38393 (250 μ M) puede conllevar a una disinhibición futura de los potenciales evocados en ausencia de estímulo condicionante (Yang et al., 2005).

La SC se caracteriza por un incremento en la ganancia del sistema nociceptivo en relación a la entrada de señales aferentes (Wolf y Salter, 2000; Latremoliere y Wolf, 2009). Aunque el fenómeno de la plasticidad sináptica dependiente del uso se encuentra ampliamente aceptado como un mecanismo básico de la SC, poco se conoce sobre los mecanismos que regulan su generación. En este estudio hemos aportado pruebas novedosas que señalan que tanto la modulación de la excitabilidad central como la represión de la plasticidad sináptica mediadas por el MOR se encuentran reguladas por la neurotransmisión dopaminérgica a través de la activación del receptor D1. De esta manera, el reclutamiento del MOR regulado por D1 supone un fenómeno instrumental para la prevención de la sensibilización central, y su funcionamiento sostenido perjudica la funcionalidad del MOR y aumenta la vulnerabilidad hacia futuros estímulos aferentes.

ESTUDIO 3: Los receptores dopaminérgicos medulares D1 modulan la hiperexcitabilidad mediada por el receptor NMDA y la fosforilación de la subunidad NR1 en la serina 889.

La activación sináptica del receptor NMDA se considera un mecanismo celular clave para la generación y mantenimiento de la SC y el dolor patológico tras un daño titular o inflamación. En las astas dorsales de la médula espinal, la actividad de NMDA es potenciada en gran medida por la plasticidad sináptica resultante de los estímulos dolorosos sostenidos o intensos. Además, la fosforilación de las diferentes subunidades del receptor NMDA, se encuentra ligada a la plasticidad dependiente de glutamato asociada a la hiperexcitabilidad medular en situaciones de dolor persistente.

En este estudio hemos registrado los potenciales evocados por fibras C para determinar el papel de los receptores D1 en la potenciación de la activación de los receptores NMDA durante el dolor neuropático resultante de la lesión de un nervio periférico. Hemos empleado la hiperexcitabilidad medular inducida por cis-ACPD, agonista del receptor NMDA, como criterio de evaluación para valorar la activación potenciada del receptor NMDA, en combinación con otros compuestos que actúan de forma selectiva sobre el receptor D1. Además, hemos empleado inmunofluorescencia confocal para evaluar la influencia de los receptores D1 en la fosforilación de los receptores postsinápticos NMDA en astas dorsales.

RESULTADOS

El bloqueo del receptor D1 atenúa la hiperexcitabilidad inducida por el receptor NMDA tras la LNR.

La superfusión espinal con cis-ACPD (hasta a 1 mM), un agonista selectivo del receptor NMDA no consigue alterar los potenciales evocados por fibras C en las ratas con cirugía simulada. Por el contrario, cis-ACPD induce hiperexcitabilidad en las ratas con LNR. De hecho, es suficiente con una concentración de 100 nM para aumentar los potenciales evocados en un $37,30 \pm 0,58\%$ ($14,87 \pm 0,32 \mu\text{V ms}$ vs. $10,83 \pm 0,38 \mu\text{V ms}$ medido antes de

Resultados y discusión

la administración del agonista; $p < 0,01$, $n=6$), y se aumenta en un $91,14 \pm 3,19\%$ cuando la concentración administrada es de $100 \mu\text{M}$ ($20,70 \pm 0,41 \mu\text{V ms}$, fig. 12).

Para investigar la implicación del receptor D1 en la hiperexcitabilidad inducida por el receptor NMDA tras la ligadura, coadministramos SCH23390, antagonista del receptor D1, 30 minutos antes de la superfusión con cis-ACPD. La coadministración de SCH23390 a $10 \mu\text{M}$ reduce la hiperexcitabilidad inducida por el receptor NMDA, incrementando la menor concentración efectiva de cis-ACPD que aumenta significativamente los potenciales evocados ($19,22 \pm 0,40\%$), así como el valor IC_{50} del cis-ACPD en comparación con el valor obtenido tras la administración del agonista en ausencia de SCH23390 (fig. 12).

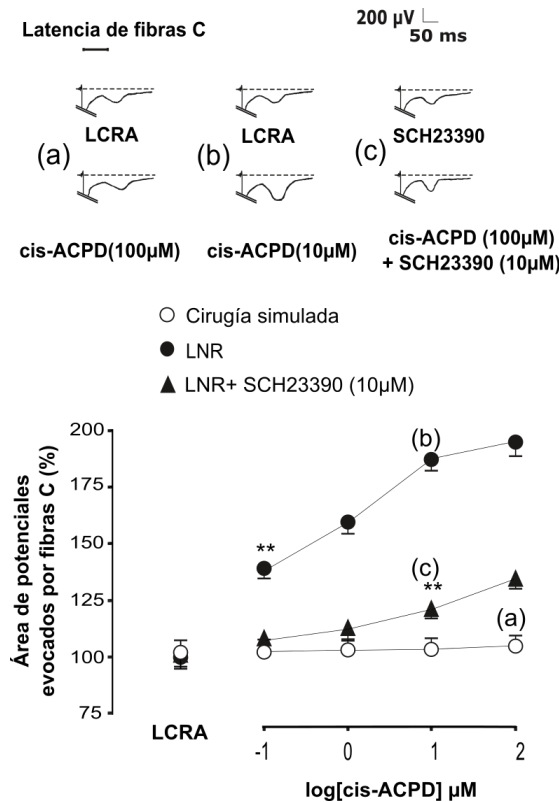


Figura 12. La inhibición farmacológica del receptor D1 atenúa significativamente el aumento en los potenciales evocados por fibras C inducido por el cis-ACPD tras la LNR.

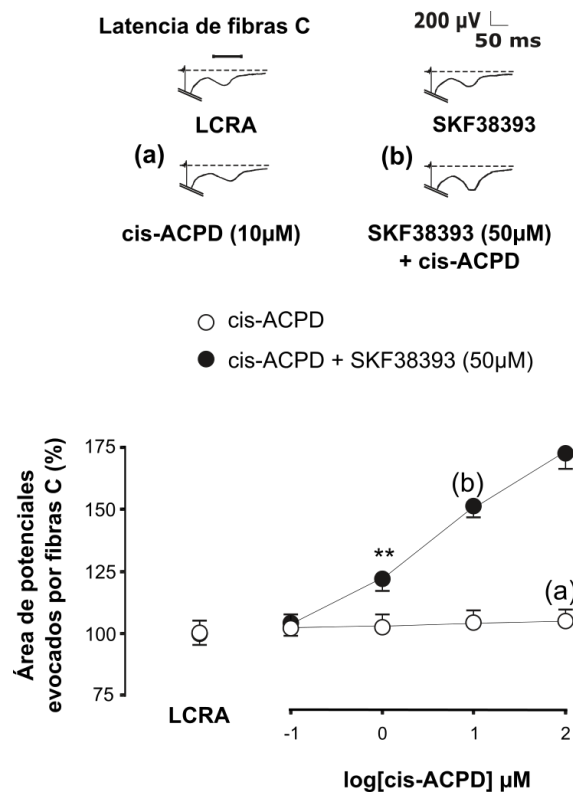
Se muestran las medias de las áreas de los potenciales evocados por fibras C durante la superfusión medular con concentraciones crecientes del agonista del receptor NMDA cis-ACPD (círculos blancos en ratas sometidas a cirugía simulada y círculos negros en ratas con LNR), y durante la superfusión simultánea de este mismo agonista junto con el antagonista del receptor D1, SCH-23390, a concentraciones subclínicas ($10 \mu\text{M}$) representado con triángulos negros. Cis-ACPD aumenta notablemente los potenciales evocados en ratas con LNR pero no lo hace en ratas con cirugía simulada. Este aumento producido por cis-

Resultados y discusión

ACPD se atenúa significativamente por la coadministración de SCH-23390. Se encuentran etiquetadas con asteriscos las concentraciones que muestran diferencias significativas de $p < 0.01$ al comparar los potenciales durante el tratamiento con los evocados con LCRA antes del tratamiento ($n=6$ cada grupo; las barras muestran el E.T.M.). Para mayor claridad, únicamente se encuentran etiquetados los primeros efectos significativos. En la parte superior se muestran registros representativos del efecto inducido por cis-ACPD a $10 \mu\text{M}$ sobre los potenciales evocados en ausencia (b) o presencia (c) de SCH23390 a $10 \mu\text{M}$ (Escala 50 ms, 200 mV, barra horizontal=latencia de fibras C).

La coactivación del receptor D1 potencia la hiperexcitabilidad del receptor NMDA en ausencia de lesión.

Administramos una concentración subclínica de agonista SKF38393 ($50 \mu\text{M}$, determinada en experimentos preliminares) con concentraciones crecientes de cis-ACPD en ratas carentes de lesión. En presencia de SKF38393, cis-ACPD a $1 \mu\text{M}$ aumenta de forma significativa los potenciales evocados en un $22,34 \pm 0,79\%$ ($12,65 \pm 0,45 \mu\text{V ms}$ vs. $10,34 \pm 0,36 \mu\text{V ms}$ durante la superfusión con SKF38393; $p < 0,01$, $n=6$), y más de $63,54 \pm 1,09\%$ si se aplica una concentración de $100 \mu\text{M}$ ($16,91 \pm 0,29 \mu\text{V ms}$ vs. $10,34 \pm 0,34 \mu\text{V ms}$ durante la superfusión únicamente con SKF38393; fig. 13)



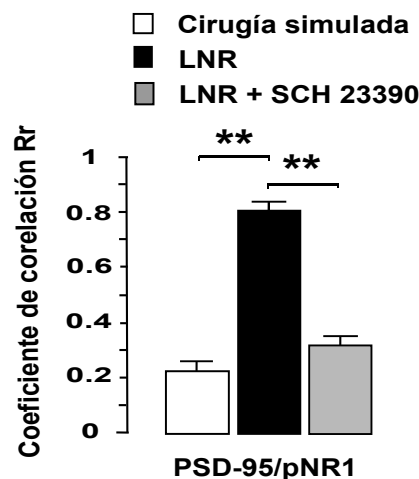
Resultados y discusión

Figura 13. La activación simultánea de los receptores D1 y NMDA aumenta los potenciales evocados por fibras C en ratas sometidas a cirugía simulada.

Se muestran las medias de las áreas de los potenciales evocados por fibras C durante superfusión medular con concentraciones crecientes de cis-ACPD administrado por sí solo (círculos blancos) o en combinación con SKF38393 a concentraciones de 50 μ M (círculos negros). Mientras que cis-ACPD por sí solo no produce ningún cambio, en coadministración con SKF38393 producen un aumento de los potenciales evocados de manera dependiente de la concentración. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.01$ en el test de Bonferroni) cuando se comparan las medias de las áreas de los potenciales con la línea base durante la superfusión con LCRA. Los registros representativos muestran el efecto de los fármacos en los potenciales evocados. Las barras de error indican el E.T.M.

SCH23390, antagonista del receptor D1, previene el aumento en la expresión sináptica de la subunidad NR1 fosforilada en Ser889 tras la LNR.

Existen estudios previos que indican que la subunidad NR1 del receptor NMDA experimenta una rápida fosforilación en la Ser889 en la fracción postsináptica de las neuronas de astas posteriores de ratas con LNR (Aira et al., 2013; 2014). En el presente estudio, se ha evaluado la implicación del receptor D1 en la fosforilación de NR1, comparando la coimmunolocalización de pNR1 con el marcador postsináptico PSD-95, 90 minutos después de la LNR, tanto en presencia como en ausencia de bloqueo del receptor D1 por superfusión de SCH23390. La colocalización de pNR1 y de PSD-95 decrece notablemente en las ratas tratadas con SCH23390 en comparación con las que no reciben el antagonista. El análisis de correlación de píxeles de las microfotografías de la doble inmunofluorescencia confocal confirma los significativamente bajos valores de Rr obtenidos en las ratas que han recibido el tratamiento (Rr 0,31 vs. 0,80, respectivamente, $z = -67,71$ $p < 0,01$ en el test exacto de Fisher, fig. 14).



Resultados y discusión

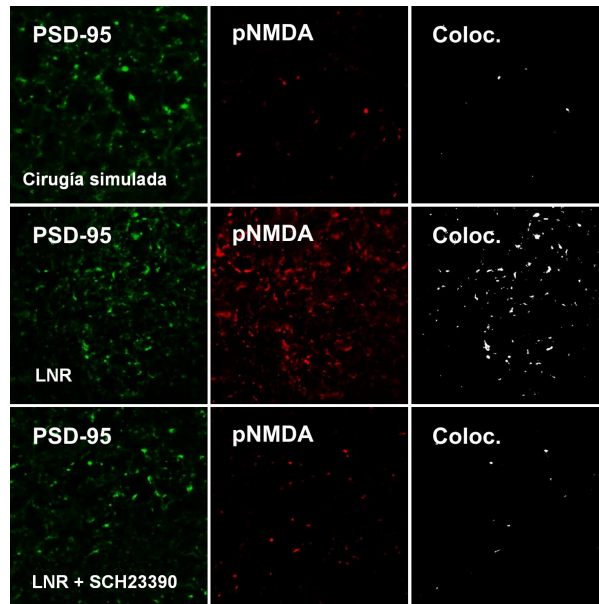


Figura 14. El bloqueo del receptor medular D1 evita la sobreexpresión de la fosforilación de NR1 en la serina 889 inducida tras la LNR en enclaves postsinápticos.

Micrografías de doble inmunofluorescencia de la sección transversal de L5 con inmunorreactivo para NR1 fosforilado y el marcador postsináptico PSD-95. Todas las fotografías fueron tomadas en láminas superficiales de las astas posteriores. Barra de escala igual a 5 μ m. La coexpresión de NR1^{ser889} fosforilado y PSD-95, tal y como muestra la superposición y confirma el análisis de correlación, aumenta ipsilateralmente a la lesión tras la LNR, indicando un incremento de NR1^{ser889} fosforilado en los enclaves postsinápticos. La superfusión medular previa a la lesión con el antagonista del receptor D1, SCH23390, reduce significativamente la sobreexpresión de NR1^{ser889} fosforilado inducida por la LNR. Los asteriscos indican la significatividad estadística de las diferencias en el test exacto de Fisher ($p < 0,01$) para la comparación de coeficientes de correlación de Pearson. Las barras de error indican el E.T.M.

DISCUSIÓN

Los receptores de NMDA localizados en las neuronas de astas posteriores pueden aumentar notablemente la neurotransmisión nociceptiva. La entrada de señal nociceptiva periférica prolongada o intensa parece ser un prerrequisito para la activación del receptor NMDA, y la respuesta de dicho receptor a fármacos afines es diferente dependiendo de si las neuronas de las astas posteriores se encuentran o no sensibilizadas. Así, la inhibición farmacológica del receptor NMDA puede reducir tanto el área de los campos receptivos como los signos de hipersensibilidad sólo en animales con inflamación periférica (Ren et al., 1992, Svendsen et al., 1999). Ello concuerda con nuestra observación acerca de que cis-ACPD sólo amplifica los potenciales evocados por fibras C en las ratas sometidas a LNR (fig. 12). Numerosas evidencias apuntan a que el receptor NMDA tiene un papel clave en la hiperexcitabilidad medular y en la SC. De acuerdo con ello, la aplicación intratecal de antagonistas del receptor NMDA bloquea la plasticidad neuronal transitoria que se produce en las astas posteriores tras una estimulación eléctrica intensa del nervio ciático, y además reduce la alodinia mecánica en modelos experimentales de dolor persistente (Ren et al., 1992; Bennett et al., 2000). De hecho, tanto el fenómeno de *wind-up* como la sumación temporal parecen depender de la activación del receptor NMDA (Eide, 2000). Concretamente, el modelo de lesión del nervio utilizado en el presente estudio produce facilitación sostenida de las corrientes de membrana mediadas por el receptor NMDA en las neuronas de astas posteriores durante varios días tras la LNR (Isaev et al., 2000).

Estudios recientes han demostrado que las proyecciones descendentes supraespinales se encuentran implicadas en la inducción y el mantenimiento de la SC (Vera-Portocarrero et al., 2006; Wang et al., 2013). La activación exógena de la región rostroventromedial del bulbo raquídeo, la principal fuente de inervación serotoninérgica de la médula espinal, aumenta la fosforilación de la subunidad NR1 en astas posteriores (Lagraize et al., 2010), así como la activación del receptor 5-HT2B a nivel medular (Aira et al., 2013). Las vías descendentes dopaminérgicas provenientes del núcleo hipotalámico A11 (Qu et al., 2006; Barraud et al., 2010) son conocidas por modular también la neurotransmisión medular. Mientras que los receptores

Resultados y discusión

medulares de la familia D2 intervienen en la antinocicepción inducida por la estimulación eléctrica de las neuronas diencefaloespinales en condiciones basales (Wei et al., 2009; Taniguchi et al., 2011), los receptores de la familia D1 parecen ejercer acciones de modulación más complejas (Zhu et al., 2007). Los estudios sugieren que la modulación mediada por el receptor D1 puede estar influenciada por la disponibilidad sináptica de la dopamina. De este modo, la familia de receptores D1 inhibe los potenciales raquídeos ventrales con niveles bajos de dopamina (Kawamoto et al., 2012), mientras que promueve la plasticidad sináptica en astas posteriores durante la hiperexcitación medular e incrementa los niveles de dopamina en esta región (Yang et al., 2005; Gao et al., 2010; Kim et al., 2015). Nuestras observaciones son consistentes con estos datos, mostrando que el receptor D1 puede contribuir a la hiperexcitabilidad medular mediante su participación en la activación y fosforilación del receptor NMDA tras la ligadura nerviosa raquídea.

El reclutamiento del receptor NMDA por D1 es un mecanismo instrumental tanto para potenciar las sinapsis asociadas a los receptores NMDA en el estriado (Dunah y Standaert, 2001; Dudman et al., 2003) como para la expresión en la superficie de la membrana de las subunidades NR1 y NR2B en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal (Gao y Wolf, 2008). Hemos observado que la hiperexcitabilidad inducida por el receptor NMDA en las ratas con LNR depende de la activación endógena del receptor D1. Además, se muestra que una activación simultánea de los receptores NMDA y D1 es suficiente para potenciar los potenciales evocados por fibras C en ausencia de LNR. Estas observaciones sugieren que la actividad del sistema de proyecciones descendentes dopaminérgicas, que se ve incrementada tras la LNR (Gao et al., 2001, Ma y Eisenach 2003) y el aumento de la liberación de glutamato por las neuronas aferentes primarias (Bardoni et al., 2013) concurren para promover la SC y aumentar la excitabilidad frente a señales nociceptivas aferentes.

La fosforilación es clave para la sobrerregulación de la función del receptor NMDA. La fosforilación de la subunidad NR1 en las astas posteriores aumenta significativamente durante una estimulación nociceptiva persistente, tal como se muestra en estudios previos de nuestro

Resultados y discusión

grupo (Aira et al., 2013, 2014) o por otros investigadores (Brenner et al., 2004; Caudle et al., 2005). Existen indicaciones previas de que vías de señalización intracelular asociadas con la activación del receptor D1 se encuentran implicadas en la fosforilación de NR1 tras un estímulo nociceptivo periférico (Zou et al., 2002). En el presente estudio, mostramos datos que apuntan a que la activación sináptica de D1 resulta esencial para la fosforilación de NR1 tras la ligadura nerviosa, lo cual sugiere que la sobrerregulación funcional de NMDA que acontece tras la ligadura puede ser debida a alteraciones en las propiedades intrínsecas del canal.

En resumen, los resultados presentados en este estudio muestran que la activación endógena del receptor medular D1 contribuye tanto a la fosforilación del receptor NMDA en astas posteriores como a la hiperexcitabilidad inducida por este receptor tras la LNR.

ESTUDIO 4: Desencadenamiento del CPM mediante TENS como alternativa a otros métodos: Estudio del control endógeno en sujetos sanos y en pacientes con SC

El uso del paradigma de la CPM en la investigación científica como medio para investigar la modulación endógena del dolor ha cobrado importancia en los últimos años y es considerado de relevancia clínica en pacientes con dolor crónico. Por medio de este método se produce la inhibición central de la percepción de un estímulo doloroso aplicando un segundo estímulo nociceptivo tónico condicionante en una región remota del cuerpo (Pud et al., 2009, Yarnitsky et al., 2010). Diversos estudios muestran que una CPM deficiente, indicador de una disfunción de los mecanismos de inhibición del dolor, se asocia a síndromes de dolor crónico idiopático como son el SFM (Lautenbacher y Rollman 1997; Julien et al., 2005), migrañas y jaquecas de tipo tensional (Sandrini et al, 2006; Cathcart et al., 2010), entre otros. A pesar de ello, no se encuentra habitualmente correlación entre la severidad de los síntomas y la eficiencia del CPM (Yarnitsky, 2010). Una explicación posible para este fenómeno, puede estar relacionada con la variabilidad intra- e interindividual del paradigma CPM en sí mismo (Pud et al., 2009). Por ello, antes de iniciar un estudio clínico mediante CPM es necesario determinar la fiabilidad del método. Hasta la fecha se han realizado numerosos estudios con este fin ya que hay muchas metodologías distintas para desencadenar y medir la analgesia endógena. Lo ideal sería encontrar un método, estandarizándolo y perfeccionándolo para convertirlo en un método fiable de medida y evaluación de la respuesta endógena.

En este estudio se establece un protocolo para desencadenar la CPM utilizando estímulos eléctricos heterotópicos, uno fásico como test y uno tónico como condicionante tanto en pacientes de dolor crónico como en sujetos que no padecen dolor. Con ello, se pretende establecer que el protocolo desencadena la analgesia endógena en los sujetos sanos, lo cual no ocurre de igual manera en los pacientes de síndrome de fibromialgia ya que, como consta en la bibliografía, la inhibición descendente se encuentra deteriorada en los pacientes con dolor crónico (Lautenbacher y Rollman, 1997).

Resultados y discusión

RESULTADOS

Caracterización de muestras: Variables clínicas

En este estudio participaron 31 pacientes de SFM y 21 sujetos sanos, éstos últimos, sin dolor durante al menos un mes antes de la prueba. La edad media de los sujetos estudiados fue de 54,35 años en el grupo de SFM y de 53,86 años en el grupo de sujetos sanos. Las diferencias significativas en el valor de las variables clínicas concuerdan con resultados hallados en estudios previos.

VARIABLES CLÍNICAS	SUJETOS SANOS	FIBROMIALGIA
Ansiedad (HADS)	4,67±2,35	12,45±3,53
Depresión (HADS)	2,24±2,02	9,06±3,84
Componente física SF-12	52,30±7,12	25,88±5,20
Componente mental SF-12	53,39±7,87	37,64±13,04
BPQ consciencia	1,76±0,67	3,15±0,42
BPQ respuesta al estrés	2,04±0,76	3,19±0,92
BPQ reactividad del SNC	1,33±0,22	2,40±0,65
BPQ estrés emocional	2,08±0,61	2,83±0,73
BPQ estrés somático	1,21±0,30	2,24±0,90
FIQ	-	71,13±12,67
HAQ	-	2,54±0,46
Fatiga (EIDF)	-	22,55±6,14
Locus de control (MHLC)	-	Externo 19/31 (61,3%)
Catastrofismo (PCS)	-	0,58±0,21
Años de evolución	-	28,55±16,04
Alodinia estática	No presentan	Presentan 27/31 (87,1%)
Alodinia dinámica	No presentan	Presentan 14/31 (45,2%)
Número de focos dolorosos	0	13,13±4,05
EVA general actual	0	7,43±1,13

Tabla 1. Medias y desviaciones estándar de las variables clínicas recogidas mediante escalas psicológicas y exploración física que muestran contraste entre los sujetos sanos y los pacientes con SFM.

Resultados y discusión

Se presentan los resultados de los subgrupos de la escala HADS (Escala de ansiedad y depresión en hospital de Hamilton), elegida por su idoneidad para evaluar el estado emocional en sujetos que sufren dolor físico sin que se produzcan puntuaciones erróneas a causa de los síntomas somáticos. Se considera un signo de trastorno clínico la puntuación mayor de 10 en las subescalas, o mayor de 12 en la suma de ambas. Se puede observar claramente la divergencia entre grupos y que los valores obtenidos en el grupo de SFM revelan un trastorno.

A continuación, se representan los resultados del cuestionario de salud SF-12, el cual ofrece una perspectiva general del estado de salud del sujeto y que tiene sus puntuaciones máximas en 56,6 y 60,8 en el apartado físico y mental respectivamente. En el grupo de SFM se aprecia una puntuación claramente inferior a causa del dolor que experimentan y las consecuencias físicas y psicológicas que tiene ello en su vida diaria.

Respecto a la escala de percepción corporal (BPQ) se consideran patológicas las puntuaciones mayores de 3,026 en el apartado de consciencia, de 3,177 en el apartado de respuesta al estrés, de 1,742 en la sección de reactividad del SNC, de 2,96 en el caso del estrés emocional y de 1,808 en el somático. Se puede ver en la tabla que los resultados del grupo de SFM superan estos valores en todas las categorías, al contrario que los controles que se mantienen por debajo de los marcadores, indicando hipervigilancia a los síntomas somáticos de estrés o a las molestias. La hipervigilancia está definida como una sensación subjetiva de tensión e hiperexploración sensorial, irritabilidad, impaciencia, distraibilidad e insomnio según el DSM-IV. El paciente con hipervigilancia continuamente intenta detectar cualquier situación o estímulo que pudiera provocar dolor. Además, la consecuencia natural de la hipervigilancia corporal es que se "amplifican" las señales somato-sensoriales, con lo que el estado de alerta se mantiene, fomentando a su vez el miedo y la evitación ante la exposición del estímulo (Peters et al., 2002).

Además de las escalas y cuestionarios citados aplicados en ambos grupos, se les han suministrado otros cuestionarios más específicos (el FIQ, el HAQ, el EIDF, el MHLC y el PCS) únicamente a los pacientes de SFM con

Resultados y discusión

el objetivo de valorar la gravedad y afectación de la vida diaria a causa del dolor y otros síntomas característicos del síndrome.

El FIQ, o cuestionario sobre el impacto de la fibromialgia, valora cuánto afecta el síndrome a la vida del paciente. En el presente estudio, los pacientes manifiestan una afectación media cercana al 71%, un valor muy alto (Burckhardt et al., 1991) que en la mayoría de los casos les imposibilita llevar una vida corriente y funcional.

A continuación, tenemos los resultados del HAQ, o cuestionario de evaluación de la salud, que indica el grado de incapacitación que experimenta el paciente de 0 a 4, siendo 0 el mínimo. Esta escala se encuentra relacionada con el FIQ, no obstante, se centra más en evaluar la incapacidad severa y no tanto en las molestias o inconvenientes que pueda encontrar el paciente al realizar determinada actividad. Además, la escala FIQ contempla también afectaciones psicológicas o emocionales, mientras que la escala HAQ se limita a afectaciones solo físicas.

Respecto a la escala de impacto diario de la fatiga, EIDF, señalar que cuantifica el grado de fatiga que sufre el paciente, pudiendo llegar a un máximo de 32, en el caso de nuestro estudio la media registrada ronda el 22,55 sobre 32.

La MHLC, escala multidimensional de locus de control sobre la salud, hace referencia a las expectativas en relación a la propia conducta y las consecuencias de la misma. En las investigaciones realizadas al respecto, un locus de control externo se relaciona con la tendencia a utilizar estrategias de afrontamiento pasivas, que, a su vez, se relaciona con una peor adaptación al dolor crónico (Crisson y Keefe, 1988). De acuerdo con ello, se ha puesto de manifiesto que la incontabilidad aumenta la percepción de la intensidad del dolor e influye en los niveles de actividad diaria (Flor y Turk, 1988; Edwards et al, 1992). En el presente estudio, el grupo de pacientes muestra un locus predominantemente externo, 19 de los 31 pacientes, lo que representa un 61,3% de la muestra. Si desglosamos los datos de los pacientes que presentan locus de control externo obtenemos

Resultados y discusión

que un 29% lo externaliza en el médico, seguido por un 19,4% que lo hace en las otras personas de su entorno y un 12,9% en el azar.

Como última escala se presentan los resultados del formulario sobre catastrofismo, PCS. El catastrofismo es un conjunto de procesos cognitivos y emocionales que consiste en tener pensamientos excesivamente negativos sobre el futuro y que predisponen a que el dolor se convierta en crónico (Sullivan et al., 2009). Los individuos que catastrofizan desarrollan una visión muy negativa sobre su dolor, piensan mucho en él y se sienten incapaces de controlarlo, por lo que presentan una peor evolución. En este caso observamos que la puntuación de catastrofismo es de 30,40 sobre una puntuación total posible de 52. Podemos identificar tres subcategorías dentro del catastrofismo; rumiación (no poder parar de pensar en el problema) , magnificación (amplificación de las propiedades amenazantes del problema) e indefensión (estimación de no poder hacer nada para modificar el problema). Al desglosar el resultado en estas subcategorías obtenemos que la puntuación media es de 15 sobre 16 en rumiación, de 4 sobre 12 en magnificación y de 12 sobre 24 en indefensión. Sullivan en su manual de utilización de la PCS expresa que se pueden considerar signos de trastorno clínico puntuaciones por encima de 11, 5 y 13 respectivamente (correspondientes al percentil 75). En este estudio, los valores obtenidos corresponderían al percentil 96, 63 y 70 respectivamente.

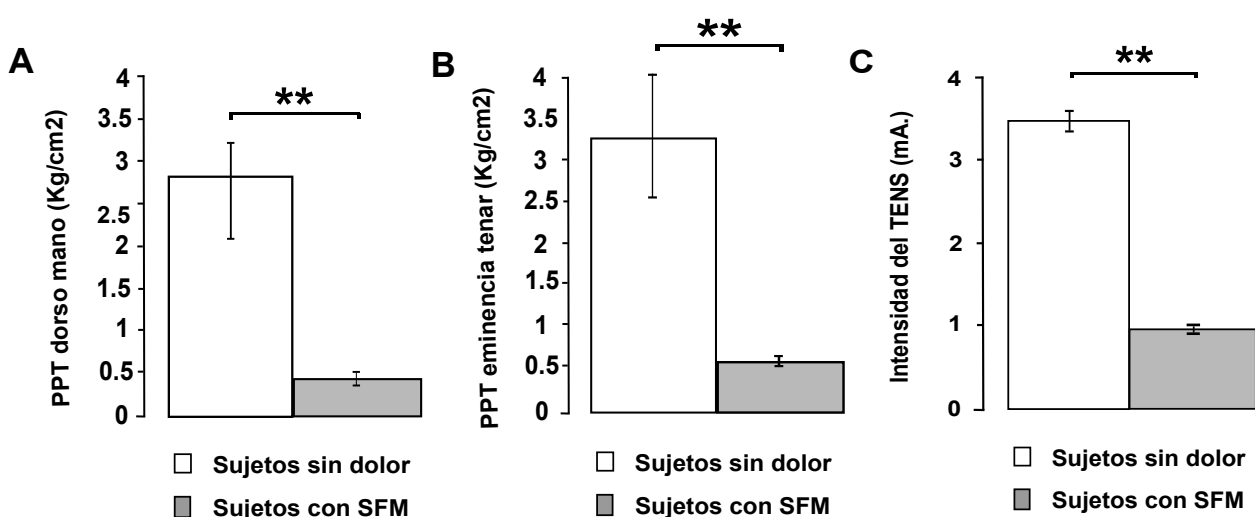
Además de estas últimas escalas, en la tabla 1, se representan otras variables resultantes de la historia clínica de las personas con SFM que pueden completar el perfil del paciente para darnos una idea de la afectación; los años de evolución, el número de focos dolorosos, o el dolor generalizado habitual expresado en una escala visual analógica (EVA) que va de 0 (ausencia de dolor) a 10 (el peor dolor imaginable). También hacemos constar los signos de hipersensibilidad detectados en la exploración física. Al ser explorados con los microfilamentos un 83,87% (26 pacientes) presentan alodinia estática. De estos 26 pacientes, 15 de ellos presentan dicha hipersensibilidad solo en los focos dolorosos y sus zonas adyacentes, mientras que los 11 restantes presentan la alodinia de forma generalizada. Cuando llevamos a cabo la exploración con la brocha la mitad del grupo presenta alodinia dinámica (48,39%, 15 pacientes) siendo de

Resultados y discusión

estos 15, 9 sujetos los que manifiestan alodinia tanto en focos dolorosos como en zonas libres de dolor. Solo 5 de los pacientes explorados no presentan ningún tipo de alodinia.

Caracterización de muestras: Diferencias en la sensibilidad al dolor

Recogidas las escalas y analizados sus resultados, se pasa a estudiar los datos resultantes de la estimulación nociceptiva. Hemos hallado diferencias significativas en los resultados del umbral de dolor a la presión profunda (PPT) entre sujetos sanos y personas con SFM (fig. 15A y 15B). En los sujetos sanos hemos obtenido valores cercanos a los 3 Kg/cm² ($2,78 \pm 0,61$ Kg/cm² y $3,33 \pm 0,73$ Kg/cm² en el dorso y la eminencia tenar respectivamente), a diferencia de los valores casi seis veces menores ($0,47 \pm 0,08$ Kg/cm² y $0,60 \pm 0,11$ Kg/cm²) que hemos registrado en el grupo de pacientes con SFM. Respecto a la intensidad de la señal de estimulación eléctrica necesaria para provocar una percepción dolorosa de EVA 6, podemos observar que en los sujetos sanos es bastante mayor ($3,417 \pm 0,11$ mA) que en los pacientes con SFM ($0,94 \pm 0,03$ mA) ($p < 0,01$ mediante t-Student en todas las imágenes que conforman la figura 15; A, B y C). Todos estos resultados indican una hipersensibilidad en los sujetos que sufren fibromialgia, la cual es consecuencia de la sensibilización central que forma parte del cuadro clínico que presentan estos pacientes.



15. La hipersensibilidad nociceptiva ante estímulos mecánicos y eléctricos en las personas con SFM.

En los diagramas de barras se representan los umbrales de dolor a la presión profunda mostrados tanto en el dorso de la mano como en la eminencia tenar

Resultados y discusión

por los sujetos sanos (control, barra blanca) y por los sujetos con SFM (barra gris). En el último diagrama se muestra la intensidad eléctrica necesaria a aplicar sobre el nervio auricular mayor para alcanzar una EVA 6. Las barras de error muestran el E.T.M. Los asteriscos indican diferencias significativas mediante t-Student ($p < 0,01$).

El test de presión profunda o PPT es uno de los métodos más utilizados para evaluar el dolor, tanto en cuadros agudos como crónicos. En el presente estudio, ponemos a prueba la estimulación eléctrica como método alternativo para evaluar la sensibilidad al dolor. Para ello, hemos realizado un estudio de correlación entre la intensidad eléctrica aplicada con el estimulador nervioso transcutáneo para que los sujetos perciban una EVA de 6 y los PPT previos a la estimulación eléctrica (este estudio estadístico lo representamos en la fig. 16 y se realiza en base a los datos representados en la fig. 15). Los resultados obtenidos son de $R_r 0,724$ ($p < 0,01$) para los PPT del dorso de la mano y $R_r 0,779$ ($p < 0,01$) para los PPT de la eminencia tenar ($n=52$). Esto nos indica que la intensidad del estímulo eléctrico necesaria para obtener una EVA de 6 correlaciona positivamente con los PPT medidos previamente, siendo de esta manera un método alternativo válido para evaluar la sensibilidad al dolor.

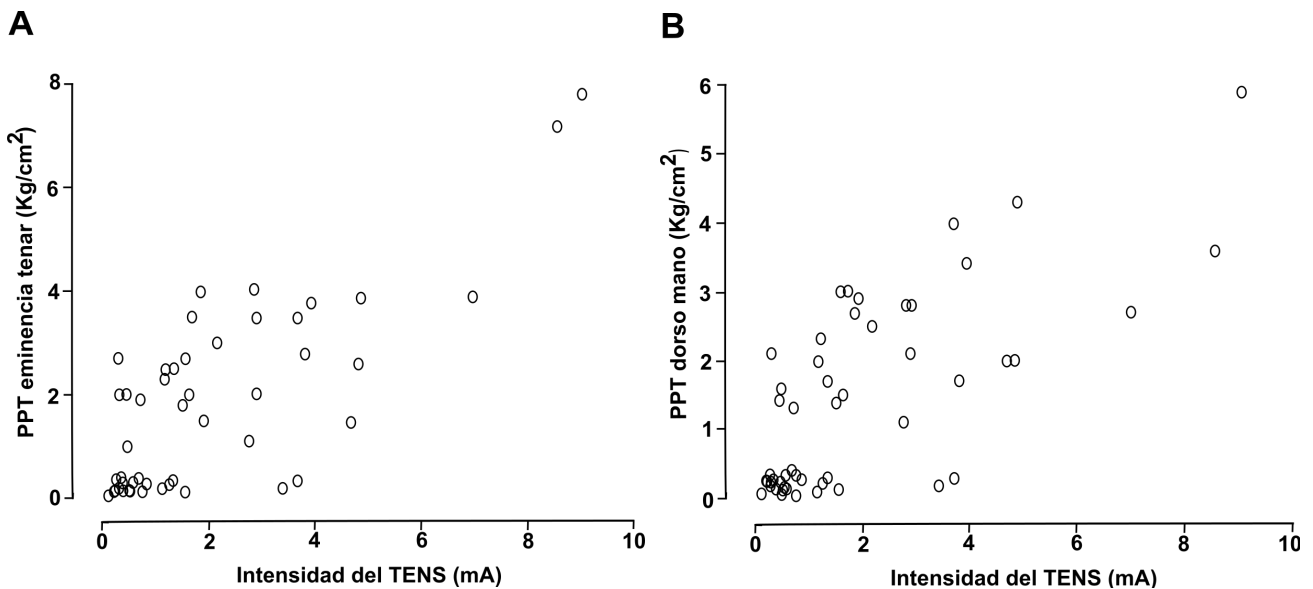


Figura 16. Diagrama de dispersión representando la correlación entre la intensidad del estímulo eléctrico necesaria para producir una valoración de EVA 6 y los PPT recogidos al inicio del estudio.

Se representan en los diagramas cada uno de los sujetos (círculos, $n=52$) de acuerdo a sus PPT en la eminencia tenar (fig. 15A) y en el dorso de la mano (fig. 15B), encontrando correlación positiva en los dos casos ($r=0,779$ y $r=0,724$ respectivamente, $p < 0,01$)

Resultados y discusión

Modulación del umbral del dolor mecánico estimulada por el TENS. Diferencias entre sujetos sanos y pacientes con SFM

El diseño experimental tiene como objetivo desencadenar la respuesta condicionada de modulación endógena del dolor mediante estimulación eléctrica y poder medir su dinámica de acción de forma continuada a través de la valoración de la percepción de los estímulos durante la prueba por parte del sujeto. Asimismo, hemos realizado una comparativa de los umbrales de dolor a la presión profunda previos y posteriores a la estimulación.

Para corroborar que el estímulo eléctrico desencadena un mecanismo heterotópico, produciendo un efecto extrasegmental, hemos comparado estadísticamente mediante contraste de medias repetidas los PPT registrados antes y después de la estimulación eléctrica. A raíz de ello, hemos apreciado una modificación de los PPT tras la estimulación eléctrica transcutánea. Los incrementos obtenidos en los PPT del dorso de la mano son de 0,747 Kg/cm² en sujetos sanos y de 0,019 Kg/cm² en los pacientes con SFM ($p < 0,001$). Respecto a la eminencia tenar los incrementos son de 0,433 Kg/cm² en las personas sanas y de 0,05 Kg/cm² para las personas diagnosticadas con SFM ($p < 0,05$) (fig. 17).

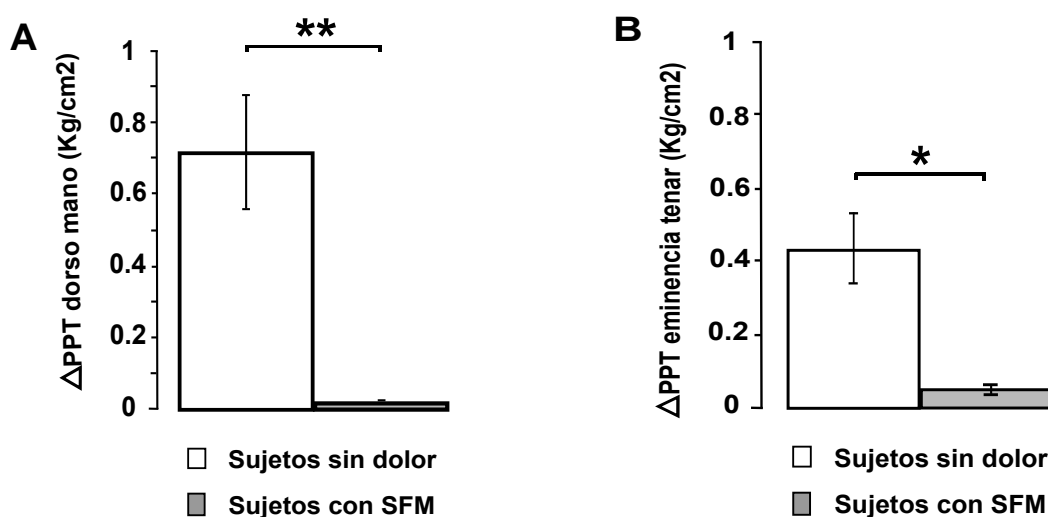


Figura 17. Incremento sustancial de los PPT en sujetos sanos.

Los diagramas de barras muestran los datos obtenidos en los sujetos sanos (barra blanca) y en los sujetos con dolor crónico (barra gris). Las barras de error muestran el E.T.M. Los asteriscos indican diferencias significativas mediante t-Student ($p < 0,01$ en el dorso de la mano y $p < 0,05$ en la eminencia tenar).

Resultados y discusión

Estos datos corroboran que el fenómeno de modulación desencadenado afecta de forma difusa a segmentos diferentes al estimulado con la señal condicionante. Al mismo tiempo, revelan una disfunción de los mecanismos responsables del efecto heterotópico en pacientes con fibromialgia ya que en este grupo se puede apreciar claramente en los gráficos que la variación es casi inexistente o mucho menor que en los sujetos sanos. Estos resultados son coherentes con el deterioro de la capacidad de modulación descendente difusa del dolor que se ha observado en los pacientes que padecen SFM (Lautenbacher y Rollman 1997; Kosek y Hansson, 1997).

DISCUSIÓN

El SFM se define como un síndrome crónico, caracterizado por dolor muscular difuso y fatiga. Los síndromes de hipersensibilidad al dolor de larga duración, como es el caso de la fibromialgia, cursan con cambios neuroplásticos en las vías nociceptivas centrales, desarrollándose una SC que perpetúa el dolor (Clauw y Crofford, 2003; Bennett, 2004). No obstante, los factores periféricos desempeñan un papel importante en el establecimiento de dolor en este síndrome (Morales et al., 2003), el cual no responde en una lógica somatotópica y tiene un carácter difuso. Como resultado de la hipersensibilidad generada, los pacientes de SFM presentan un aumento anormal de la sensibilidad nociceptiva a la presión profunda (Kosek et al., 1996a) que puede tener su base en la disfunción de la modulación endógena del dolor (Lautenbacher et al., 1994; Kosek et al., 1996 y Staud et al., 2005).

Caracterización de muestras: Variables clínicas

En la actualidad, la influencia de las variables cognitivas y emocionales en la percepción del dolor se encuentra fuera de toda duda, admitiéndose que tanto la intensidad como las características del dolor están influenciadas por el procesamiento cognitivo del individuo. Los resultados obtenidos de los datos clínicos y los recogidos en la prueba revelan alteraciones en el grupo de la fibromialgia acordes a lo observado en estudios previos (Martínez-Fernández et al., 2016; Bernardy et al., 2010; García Campayo y Rodero, 2009; García-Campayo et al., 2008; Lipp 2015; de Souza et al., 2013)

Hemos obtenido altos valores de ansiedad y depresión en la escala de Hamilton en el grupo de la fibromialgia, tal como apuntaban estudios como el de Vallejo et al. (2012) en el que se concluye que los niveles de ansiedad son mayores que en otros trastornos de dolor persistente. En los pacientes de este síndrome la puntuación de las dos subescalas son incluso mayores que los observados en pacientes con un diagnóstico psiquiátrico (trastorno adaptativo o depresión). Esto es interesante por sus repercusiones prácticas en lo clínico, puesto que confirma la necesidad de evaluar los aspectos

Resultados y discusión

psicológicos de la enfermedad. En estos pacientes se observa un característico estado de estrés continuado que ayuda a explicar que se de un aumento de sensibilidad al dolor (Lipp, 2005). Siendo el estrés un proceso, la continuidad de un estresor siempre presente puede disparar la presentación de estados consecuentes; extenuación mental y física y emergencia de otras patologías (de Souza et al. 2013).

También se han encontrado desórdenes en la percepción corporal de estos pacientes. En estudios anteriores, se ha observado una relación entre una alta autoobservación o consciencia del propio cuerpo con una mayor sintomatología dolorosa, suponiéndose de ello que la hipervigilancia somática indica una predisposición a mayores niveles de dolor como consecuencia de la amplificación de la señal aferente (Barsky y Klerman, 1983; Ferguson y Ahles, 1998). Además, paralelamente a esta amplificación se desencadena una respuesta emocional negativa asociada a la hipervigilancia (Leventhal y Everhart, 1979).

El tipo de locus de control y el nivel de catastrofismo constituyen variables muy reveladoras para evaluar la adecuación de las estrategias que utilizan los pacientes con fibromialgia para hacer frente al dolor. Respecto al locus de control, en la escala pertinente se aprecia que la mayoría de los casos se transfiere al exterior (Gustafsson y Gaston-Johansson, 1996). Hay estudios que revelan que las personas que sufren dolor crónico y poseen un locus de control interno desarrollan estrategias más eficaces para hacer frente al dolor, disminuyendo su intensidad percibida. Toomey y colaboradores (1991) encontraron relaciones consistentes entre la percepción de control sobre la propia salud y la intensidad, la frecuencia y la duración del dolor. Se ha demostrado en diversos estudios, que el locus de control sobre la propia salud es una variable muy influenciada por la educación, estando asociada su internalidad con el bienestar psicológico y fisiológico (Gfellner y Finlanyson, 1988; Goldsmith-Cwinkej et al., 1988). El locus de control puede ser modificado mediante terapia de grupo y técnicas cognitivo-conductuales (Katerndahl, 1991).

En lo referente al catastrofismo, se observa un nivel alto en pacientes con fibromialgia comparado con el habitual en personas sanas. Este nivel de

Resultados y discusión

catastrofismo excesivo, incluso comparado con pacientes de otras afecciones reumatológicas (Hassett et al., 2000; Börsbo et al., 2010), puede estar asociado con estrategias de respuesta ineficaces ante factores estresores (Herken et al., 2001; Houdenhove y Luyten, 2006). El catastrofismo se relaciona con la intensidad de dolor percibida por el sujeto, así como con su nivel de incapacidad y el grado de depresión (Vowles et al., 2007). Además, los sujetos catastrofistas experimentan una amplificación del procesamiento del dolor en el SNC, mostrando mayor actividad en las regiones responsables del procesamiento afectivo del dolor (cláustrum), de la anticipación (córtex central medial, cerebelo) y atención al dolor (córtex cingulado dorsal anterior, córtex prefrontal dorsolateral), así como en las implicadas con el control motor (García Campayo et al., 2008). También se ha observado que el catastrofismo puede modular a nivel de la médula espinal procesos que facilitan la percepción del dolor, como alteraciones en los niveles de cortisol o de interleucina-6 (García Campayo y Rodero, 2009).

En relación a los resultados de los demás formularios empleados en el estudio, básicamente corroboran la afectación de los pacientes por parte del síndrome y son indicadores de la gravedad del cuadro clínico; altos niveles de fatiga, de incapacidad o baja calidad de vida. Además, estos resultados refuerzan la tesis de estudios anteriores que indican que la fibromialgia es una patología que se debe tratar multidisciplinariamente.

Caracterización de muestras: Diferencias en la sensibilidad al dolor

En referencia a los datos recogidos durante la exploración física, hemos observado signos de hipersensibilidad nociceptiva tanto en el test de presión profunda (con valores casi seis veces menores con respecto al grupo control) como en las pruebas para determinar la presencia de alodinia estática y dinámica o frente a la estimulación eléctrica. Es conocido que los pacientes con SFM presentan dolores con patrones difusos, alodinia mecánica y térmica, (Kosek et al., 1996) y una mayor predisposición a generar sumación temporal (Staud et al., 2003). Los estudios experimentales en pacientes con SFM confirman un aumento de la sensibilidad a estímulos no específicos como la presión mecánica, el frío o el calor en áreas no coincidentes con los puntos gatillo o áreas sin dolor

Resultados y discusión

espontáneo, sugiriendo aberraciones en los mecanismos centrales de modulación del dolor (Kosek et al, 1995, 1996; Staud et al., 2003).

Existen pocos datos sobre hipersensibilidad eléctrica en fibromialgia, mostrando resultados poco concluyentes (Kosek et al., 1995, Lautenbacher y Rollman, 1997). Nuestro estudio muestra la diferencia en la sensibilidad al dolor ante estímulos eléctricos entre el grupo control y el grupo de enfermos de fibromialgia, siendo necesaria una intensidad de estimulación menor para obtener una EVA de 6 en este último grupo. Además, tras la estimulación casi la totalidad de los pacientes con SFM, no así el grupo de personas sanas, reportan sensaciones paradójicas tales como hormigueo, calambres, aparente cambio de temperatura. Algo por otra parte, habitual en enfermos con dolor persistente (Staud, 2005). Esta hipersensibilidad junto con las sensaciones posteriores a la estimulación eléctrica sugieren alteraciones sensoriales de tipo neurogénico que pueden ser explicadas mediante la SC de las rutas aferentes nociceptivas (Woolf y Salter 2000; Woolf 2011).

Modulación del umbral del dolor mecánico estimulada por el TENS. Diferencias entre sujetos sanos y pacientes de SFM

El TENS es un método ampliamente extendido como modulador del dolor, no implica el uso de medicación por lo que es muy ventajoso y tiene muy pocos riesgos. Además de ser portátil, actúa aplicando un estímulo fácilmente calibrable y medible y es muy fácil de usar. Por ello, nos parece una alternativa a valorar por su posible utilización en consultas médicas para evaluar la CPM. En estudios clínicos, habitualmente se recurre al *cold pressor* para ese fin, presentando éste unos resultados fiables pero siendo un método muy poco práctico, engorroso, difícil de montar, calibrar o transportar. El procedimiento del *cold pressor* consiste en la inmersión de una extremidad, habitualmente la mano y el antebrazo, en un recipiente que contiene agua circulante en torno a los 0 °C, provocando cambios fisiológicos tales como estimulación del sistema nervioso, vasoconstricción arterial, aumento de la presión o disminución del flujo sanguíneo. El mantener esa parte del cuerpo sumergida a esta temperatura provoca dolor

Resultados y discusión

al paciente, por lo que se ha convertido en la herramienta más utilizada para investigar el dolor experimental (Carrillo et al., 2005).

El TENS es una herramienta espacialmente más específica que el *cold pressor*, ya que el procedimiento implica la aplicación de corrientes eléctricas que se conducen a través de la piel en una zona muy concreta, directamente sobre el nervio elegido. El procedimiento del TENS implica la aplicación de corrientes eléctricas que se conducen a través de la piel, siendo de este modo un método no invasivo (Liebano et al., 2011). El TENS puede administrar estímulos tanto de baja (por debajo de 10 Hz) como de alta frecuencia (por encima de 50 Hz) ya que las dos modalidades producen hipoalgesia, aunque hay que tener en cuenta que lo hacen mediante mecanismos diferentes. El mecanismo de modulación del dolor del TENS es mediado por la liberación de opioides endógenos en el SNC (Kalra et al., 2001; Chandran y Sluka, 2003). Cada frecuencia de estimulación parece estar asociada a una liberación de ligandos opioides determinados, tanto a nivel medular como a nivel rostroventral, activando diferentes receptores opioides (Sluka y Walsh, 2003).

El desencadenamiento de la CPM mediante TENS representa un campo de estudio poco explorado. Trabajos previos que utilizan estímulos térmicos a modo de test para evaluar la efectividad del TENS demuestran que el TENS de alta frecuencia es efectivo para desencadenar la CPM (Valencia et al., 2015) al incrementar los umbrales del dolor en localizaciones diferentes al segmento donde se ha llevado a cabo la estimulación. Además, la intensidad del estímulo parece ser crucial en el desencadenamiento de la CPM, siendo más efectivos aquellos con una intensidad alta (Moran et al., 2011). No obstante, cabe destacar que este tipo de TENS es susceptible de generar la aparición de tolerancia en tratamientos prolongados (Liebano et al., 2011; 2013).

Uno de los objetivos, ha sido desencadenar una CPM, por ello el TENS se ha aplicado contralateral y extrasegmentalmente a la región donde se ha llevado a cabo la presión profunda como estímulo test. Así, los resultados revelan una variación en los PPT en la mano, cuando el estímulo doloroso condicionante es aplicado en el nervio auricular mayor del lado

Resultados y discusión

contralateral. De esta manera se demuestra que el mecanismo que se desencadena con la estimulación eléctrica es un mecanismo difuso.

Con la finalidad de comprobar la naturaleza heterotópica del fenómeno desencadenado y corroborar que lo apreciado en esta prueba es un resultado de la modulación endógena, realizamos el test a la presión profunda antes y después del TENS para poder calcular la variación en los umbrales, como es habitual en estudios de estimulación de la CPM (Wang et al., 2010). Observamos una variación clara en los sujetos sanos que no se observa en los sujetos que sufren fibromialgia (un incremento hasta casi cuarenta veces mayor en la eminencia tenar en sujetos sanos vs. enfermos SFM). Los datos de los PPT junto con la disminución de la EVA en el otro estímulo test (el TENS en la extremidad superior) no dan una visión global del fenómeno.

En este estudio no hemos encontrado correlación entre la variación de EVA percibida a causa del estímulo eléctrico en la mano y los cambios en los PPT, ambos producidos por el estímulo condicionante. Esto sugiere que capturan fenómenos distintos en todo o en parte; puede ser por motivos de modalidad, ya que los PPT capturan básicamente la sensibilidad profunda, mientras que el TENS apenas actúa sobre la sensibilidad profunda pero sí lo hace sobre la cutánea.

La modulación descendente difusa activada agudamente produce analgesia en controles pero no en pacientes de síndrome de fibromialgia.

Ya en otros capítulos de esta tesis se ha resaltado la gran importancia de las rutas dopaminérgicas en la modulación endógena del dolor, y en este último se ha indicado que los pacientes con SFM presentan una disfunción de esta modulación endógena. Además, en los últimos años, algunos investigadores han señalado que polimorfismos de los genes del sistema serotoninérgico, dopaminérgico o catecolaminérgico podrían formar parte de la etiopatogénesis de la fibromialgia. A pesar de que dichos polimorfismos no son específicos de la fibromialgia, se encuentran asociados con la respuesta al estrés, con la mayor sensibilidad al dolor o con la vulnerabilidad afectiva (Buskila 2007, Ablin et al., 2008; Williams y Claw

Resultados y discusión

2009). No obstante, convergiendo con estos polimorfismos sería necesaria una exposición a un estresor intenso para que los síntomas de SFM se desarrollasen. De hecho, estos estresores pueden producir cambios en la función límbica, favoreciendo unas condiciones hipodopaminérgicas (Wood, 2004). La disrupción de la función dopaminérgica normal sería el punto de inicio del desarrollo de la patología y la piedra angular de los diferentes síntomas. Varios estudios han tenido en los últimos años el objetivo de demostrar que los pacientes de fibromialgia padecen una alteración en la neurotransmisión dopaminérgica. Así se ha visto que la concentración de metabolitos como la dopamina, la norepinefrina o la serotonina se encuentran por debajo de los niveles habituales en el líquido cerebroespinal de pacientes con SFM (Russell et al., 1992; Legangneux et al., 2001). Además, estudios farmacológicos han demostrado que una gran parte de los pacientes de SFM responden favorablemente a la administración de bajas dosis de ketamina (Sorensen et al., 1995; Sorensen et al., 1997; Graven-Nielsen et al., 2000), la cual actúa principalmente como agonista de los receptores dopaminérgicos D2 (Kapur y Seeman, 2002; Seehan et al., 2005). Finalmente, se han realizado ensayos controlados con pramipexol, agonista de la dopamina indicado para parkinsonismos y que ha sido útil en el desorden de piernas inquietas, obteniendo igualmente resultados favorables en los pacientes con SFM, mejorando el dolor y la calidad del sueño (Holman y Meyers, 2005).

Algunos de los estudios sobre este tema que se deben de tomar como referencia son los realizados por Wood y colaboradores, estudiando el sistema dopaminérgico de enfermos de fibromialgia y las diferentes consecuencias que eso causa a los pacientes. Entre sus trabajos existen estudios sobre la liberación endógena de dopamina de los pacientes de SFM tanto en situación de reposo como al experimentar un estímulo nociceptivo, una inyección de suero hipertónico. Simultáneamente, se les administra un ligando de D2/D3 radiomarcado, [¹¹C]-raclopride, y se realiza una tomografía de emisión de positrones (PET) para observar su unión a los receptores dopaminérgicos libres. En este estudio se evidencia menor liberación de dopamina en el ganglio basal de los enfermos de SFM en respuesta a un estímulo nociceptivo tónico (Wood et al, 2007a). Otro estudio investiga la función dopaminérgica presináptica en pacientes de

Resultados y discusión

SFM. En este caso, se administra a los sujetos 6-[¹⁸F] fluoro-L-DOPA como marcador combinado con el PET. El resultado observado, es una reducción de la captación del marcador en pacientes de SFM en el bulbo raquídeo, en el tálamo, y en múltiples zonas de la corteza límbica (Wood et al., 2007b). Posteriormente, se llevo a cabo un estudio sobre las consecuencias que provoca esta neurotransmisión dopaminérgica alterada. Se observó menor densidad de materia gris entre estos pacientes (Wood et al., 2009), algo que ya había sido registrado en personas con cefaleas tensionales (Schmidt-Wilcke et al., 2005) o dolor lumbar crónico (Schmidt-Wilcke et al., 2006). Los cambios de densidad se registraron principalmente en el giro parahipocampal bilateral y en la corteza cingulada, ambas receptoras de proyecciones dopaminérgicas que controlan su actividad. Estos cambios pueden contribuir en la disfunción cognitiva, concretamente de memoria de trabajo, dificultad para codificar nueva información con distracciones, velocidad de procesamiento baja o problemas para encontrar las palabras que sufren los pacientes con SFM.

Todos estos resultados indican que la neurotransmisión dopaminérgica representa un objetivo relevante para el tratamiento de fibromialgia, aunque la patofisiología de la transmisión dopaminérgica en la enfermedad todavía no se encuentre clara.

Mediante este estudio hemos propuesto un procedimiento innovador, efectivo, funcional y cómodo tanto para el paciente como para el experimentador o facultativo para el desencadenamiento de la CPM. Aunque en un inicio simplemente se quería comprobar que este método era válido para evaluar la CPM de cada individuo, también se podría utilizar para realizar subgrupos, establecer perfiles de respuesta a la medicación o incluso en un futuro utilizarlo como herramienta de diagnóstico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La lesión del nervio raquídeo L5 desencadena mecanismos de interacción mutua y bidireccional entre el receptor D2 y MOR en astas posteriores, caracterizados en parte por la facilitación de la acción del receptor μ por la activación del receptor D2. Desde una perspectiva clínica y con el objetivo de lograr una mayor eficacia de los analgésicos opioides en la sensibilización central, los resultados respaldan estrategias consistentes en reducir las dosis de agonistas de MOR requeridas, disminuyendo de esta manera los efectos adversos, mediante la activación simultánea del receptor D2.

2. La activación del receptor D1 modula la represión de la plasticidad sináptica inducida por el MOR. Mientras que el reclutamiento del MOR mediante la activación del receptor D1 adquiere un papel preventor de la generación de sensibilización central, la acción sostenida de este mecanismo perjudica la responsividad de MOR e incrementa la vulnerabilidad a futuros estímulos potencialmente nocivos.

3. La activación endógena del receptor D1 contribuye tanto a la hiperexcitabilidad inducida por el receptor NMDA en astas posteriores como a su fosforilación tras la lesión del nervio.

4. La modulación heterotópica de la sensibilidad nociceptiva que hemos observado tras la aplicación de la electroestimulación nerviosa transcutánea confirma este método como condicionante válido para desencadenar la respuesta de la modulación del dolor o CPM.

MATERIAL Y MÉTODOS

ESTUDIOS EN ANIMALES

1. Preparación animal y procedimiento de LNR

1.1. Preparación animal

Los procedimientos experimentales con animales de laboratorio se han realizado de acuerdo a la Directiva del Consejo de Comunidades Europeas (86/609/ECC) en ratas albinas (*Rattus norvegicus*) adultas macho de la cepa *Sprague Dawley* (250-350 g) que han sido criadas en el Servicio general de Animalario de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.

Los animales se han estabulado en jaulas en ambiente controlado a 22 ± 2 °C con ciclos de 12 horas de luz (7-19 h) y de 12 h de oscuridad (19-7 h), con alimentación basada en piensos comerciales y acceso *ad libitum* a agua y alimento. Estos experimentos se han llevado a cabo con el mínimo número de animales posible y también infligiendo el menor sufrimiento posible. Para ello, los protocolos de cuidado animal y de manipulación han sido aprobados por el comité pertinente de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.

1.2. Cirugía de ligadura del quinto nervio raquídeo lumbar

Hemos llevado a cabo la preparación quirúrgica con el animal bajo anestesia general con una solución del 4% de hidrato de cloral (0,4 g/kg de peso del animal) administrado por vía intraperitoneal. Este anestésico hipnótico es muy utilizado en procedimientos experimentales de corta duración debido a su rápida metabolización y a su corta vida media (4-12 horas; Harvey, 1985).

Hemos procedido a iniciar la preparación quirúrgica una vez comprobada la desaparición del reflejo corneal y la ausencia de reflejos nociceptivos al contacto con la hoja del bisturí. Hemos monitorizado la frecuencia cardíaca y la presión arterial del animal (80-100 mmHg; Presmed, Cibertec, Madrid), y hemos mantenido la temperatura central entre 37-38 °C mediante un

sistema de calefacción regulado por realimentación electrónica (RTM-1, Cibertec, Madrid).

La ligadura del nervio raquídeo L5 constituye un modelo experimental de dolor neuropático bien establecido, desarrollado por Kim y Chung (1992), consistente en su exposición y ligadura quirúrgica. Los animales intervenidos desarrollan una alodinia táctil en aproximadamente 24-48 h, alcanza su máxima expresión al cabo de siete días de la intervención y persiste durante al menos quince días (Kim y Chung, 1992; La Buda y Little, 2005).

En la rata el nervio ciático proyecta a la médula espinal por medio de los nervios raquídeos L4, L5 y L6. L4 es preferentemente motor mientras que L5 y L6 son de carácter sensitivo. La ligadura se lleva a cabo entre el ganglio raquídeo L5 y la unión del nervio raquídeo L5 con el nervio adyacente L4. Para la exposición del nervio raquídeo L5 hemos disecado los planos musculares dorsales a la cresta ilíaca izquierda y hemos retirado una pequeña porción de la cresta hasta acceder al nervio. A continuación, hemos procedido a su ligadura firme mediante hilo de seda de 6/0 en una posición aproximadamente 5-8 mm distal a su ganglio raquídeo y proximal a su unión con el nervio raquídeo L4. Tras la ligadura hemos suturado las capas musculares por planos y hemos aplicado una solución antiséptica (povidona yodada) a la piel incidida. A continuación, hemos devuelto al animal a una jaula individual con acceso a comida y agua *ad libitum*. Las ratas que se someten a operación simulada para ser utilizadas como control del procedimiento, a pesar de no sufrir ligadura son idénticamente preparadas y tratadas.

2. Registro de potenciales de campo evocados en la médula espinal *in vivo*

2.1. Preparación animal

Para llevar a cabo este procedimiento los animales se encuentran bajo anestesia con uretano. (1,5 g/kg por vía intraperitoneal). El uretano produce una anestesia general profunda de larga duración, hipnosis y

Material y métodos

relajación muscular sin analgesia, con mínimos cambios fisiológicos o alteración en la actividad en los canales iónicos, por lo que resulta un anestésico muy adecuado para estudios funcionales en sistema nervioso periférico y central (Green, 1982; Maggi y Meli, 1986; Field y Lang, 1988; Hara y Harris, 2002).

Hemos canulado la tráquea para asegurar una vía aérea permeable de baja resistencia, así como la vena yugular interna derecha y la arteria carótida como vía de acceso parenteral para fluidoterapia y administración intravenosa de solución de Tyrode (en mM: 137 NaCl, 2,7 KCl, 1,4 CaCl₂, 1 MgCl₂, 6 NaHCO₃, 2,1 NaH₂PO₄, 6,5 D-(+)-glucosa; pH 7,4) a 0,8-1 ml/h y para monitorizar la presión arterial (media 80-100 mmHg; Presmed, Cibertec, Madrid). Además, hemos monitorizado en todo momento su temperatura colorrectal y la hemos mantenido entre 37-38 °C mediante un sistema de calefacción regulado por realimentación electrónica (RTM-1, Cibertec, Madrid) durante todo el procedimiento.

El tronco ciático está formado en la rata por los nervios tibial, peroneo y surales lateral y caudal, e ingresa en el sistema nervioso central a través de los nervios raquídeos L6, L5 y L4, los cuales alcanzan sus segmentos medulares correspondientes a la altura de las vértebras torácica decimotercera y lumbar primera. En las astas posteriores, dichos nervios proyectan sus terminaciones centrales con arreglo a una distribución topográficamente organizada. Para exponerlo, hemos realizado una disección del músculo bíceps femoral izquierdo y, tras liberarlo de sus envueltas conjuntivas, hemos procedido a su inmersión en aceite de parafina templada para evitar su deshidratación. El nervio se ha colocado sobre electrodos de gancho de platino para estimulación eléctrica bipolar. A continuación, hemos realizado laminectomías bilaterales dorsales de la transición toracolumbar (entre T13-L1) exponiendo el engrosamiento lumbosacro y hemos fijado el área expuesta a un marco metálico de soporte mediante pinzas vertebrales sobre las vértebras T12 y L2 para estabilizar el contacto del nervio con los electrodos. Se ha vertido una solución de agar (1,5% en suero salino isotónico) en el espacio comprendido entre la piel suturada al marco metálico y la musculatura retrosomática, con objeto de lograr una mayor estabilidad regional durante los movimientos respiratorios.

Material y métodos

Hemos retirado cuidadosamente la duramadre con objeto de exponer los segmentos medulares L4-L5, región en la que hemos procedido al registro electrofisiológico y la administración de fármacos.

2.2. Estimulación eléctrica del nervio ciático

El tronco ciático se estimula mediante pulsos eléctricos aplicados a través de un par de electrodos con el cátodo en situación proximal. El electrodo de registro se sitúa en la zona de proyección del nervio en las astas posteriores. A lo largo de los distintos experimentos, hemos aplicado estímulos eléctricos regulados por tensión o regulados por corriente, con idénticos resultados. Mediante la identificación de los umbrales de evocación de potenciales de campo hemos determinado que un pulso de estímulo de 10 V es equivalente a una intensidad de corriente de 1,5 mA en nuestro montaje experimental, lo cual coincide con trabajos previos (Azkue et al., 2003).

Basándonos en los diferentes umbrales de activación eléctrica de las fibras aferentes primarias A β (mielinizadas de calibre grueso), A δ (mielinizadas de calibre fino) y C (amielínicas) (Schouenborg y Sjölund, 1983; Schouenborg 1984; Liu y Sandkühler, 1997), hemos utilizado pulsos eléctricos de 0,5ms de duración, y amplitudes comprendidas entre 15 V y 20 V (o 3 mA) para la activación supraumbral de fibras C, parámetros que reclutan la gran mayoría de las fibras aferentes que componen el nervio ciático.

En los experimentos en los que se induce una PLP de los potenciales evocados por fibras C mediante EBF se utilizan dos trenes de 30 s de pulsos de una amplitud de 3 mA y 1,5 ms de duración. Los pulsos se encuentran separados por 30 s y son de 0,2 o 3 Hz.

2.3. Registro electrofisiológico

Mediante un micromanipulador hidráulico hemos insertado en las astas posteriores un electrodo de tungsteno de elevada impedancia (3-5 M Ω , A-M Systems) a una profundidad de 100-300 μ m (láminas I-II de Rexed) y

Material y métodos

aproximadamente a 1 mm lateral a la línea media, en los segmentos medulares cuarto y quinto lumbares, lugar de proyección de las terminaciones centrales del nervio ciático (Swett y Woolf, 1985). Hemos estimulado eléctricamente el tronco ciático mediante pulsos eléctricos monofásicos rectangulares generados por una unidad de aislamiento accionada a través de un ordenador Pentium PC, y aplicados a razón de un pulso por minuto. La amplitud máxima de los potenciales de campo evocados por las fibras C se registra en la lámina II de la sustancia gris medular según mapas de isopotenciales (Schouenborg, 1984), (pulsos de 3-3,5 mA y de 0,5 ms de duración, (Buesa et al., 2006). Hemos amplificado (1000x) las respuestas evocadas utilizando un amplificador en configuración monopolar con etapa previa para adaptación de impedancias (*World Precision Instruments*). Tras su filtrado analógico con una banda de paso de 1-550 Hz, hemos derivado las señales resultantes a un osciloscopio analógico (Hameg 407) y las hemos digitalizado a 10 KHz mediante una tarjeta de conversión analógica/digital (MIO16, National Instruments, Austin, TX, USA).

La estimulación eléctrica del tronco ciático no nos permite discernir la contribución relativa del tejido cutáneo, del músculo y de las fibras de la articulación a la señal registrada. Hay que tener cuidado para evitar la repetición de estímulos.

Para la aplicación de estímulos y adquisición de las respuestas evocadas, monitorización del registro en tiempo real y almacenamiento de los datos en disco en forma de hoja de datos (*.txt), hemos utilizado una aplicación informática programada a medida en un entorno de programación gráfica *LabView v6.i (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench*, National Instruments).

2.4. Extracción de parámetros

Hemos discriminado los potenciales de campos evocados por los distintos tipos de fibras aferentes primarias en función de las latencias asociadas a sus diferentes velocidades de conducción (Schouenborg, 1984; Liu y Sandkühler, 1995; 1997), asumiendo una distancia de alrededor de 11 cm

Material y métodos

desde el electrodo de estimulación y la zona de registro. Como hemos mencionado anteriormente, para obtener una activación de fibras C hemos aplicado pulsos eléctricos de 0,5 ms de duración y del orden de 15 a 20 V (o 3 mA), los cuales activan de forma simultánea tanto fibras C como A. El potencial evocado resultante debe considerarse un potencial de conjunto, en el cual puede sin embargo discriminarse el componente evocado por las fibras C con arreglo a su latencia, (90-200 ms), asociada a una baja velocidad de conducción (de 1,2 m/s; Schouenborg, 1984; Liu y Sandkühler, 1995; 1997). Hemos cuantificado dichos potenciales calculando el área sobre la curva del potencial hasta una línea recta que pasa por los puntos de mínima electronegatividad dentro del intervalo de latencia 90-200 ms.

2.5. Verificación histológica

En cada grupo experimental hemos comprobado histológicamente la ubicación del electrodo de registro, haciendo pasar una corriente de 5 mA durante 2 s (Villarreal et al., 2004) a través del mismo y produciendo así, una pequeña lesión electrolítica. A continuación, hemos procedido a la perfusión del animal a través de la aorta con una solución de paraformaldehído al 4% y hemos extraído los segmentos medulares L4 y L5. Tras su crioprotección en sacarosa al 30% (en tampón fosfato sódico 0,1 M) durante 12 h a 4 °C, hemos obtenido secciones coronales de 40-50 µm de grosor por congelación (Leica CM1325), las cuales hemos montado posteriormente sobre portaobjetos gelatinizados para una desecación al aire, en primera instancia, durante 24 h a temperatura ambiente.

Posteriormente, hemos deshidratado las secciones en concentraciones crecientes de etanol hasta etanol absoluto y xilol, y rehidratado hasta etanol al 50%. Acto seguido, hemos teñido las secciones en una solución acuosa de azul de tionina al 1% (Sigma) durante 45 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual hemos procedido a su aclarado y deshidratación final con etanol acético, etanol absoluto y xilol.

Al localizar el epicentro de la lesión y basándose en los datos obtenidos por Swett y Woolf (1985) se puede determinar si la región corresponde a la localización deseada.

3. Superfusión medular controlada

Para estudiar el efecto de fármacos neuroactivos sobre neuronas de las astas posteriores medulares, hemos utilizado una técnica de superfusión de la superficie dorsal de la médula con soluciones en pequeños volúmenes (en torno a 10 μ l), establecida previamente por Beck y otros (1995). El procedimiento es comparable a la administración por vía intratecal.

La técnica consiste en la confección de un reducto de forma elíptica de varios milímetros de diámetro a partir de silicato de magnesio (Panreac) y un material polímero basado en la silicona (Biodur S1 y S49, Heidelberg, Alemania). La mezcla se deposita sobre los segmentos medulares de registro formando una elipse que al solidificar permite la aplicación de pequeños volúmenes de fármacos en solución acuosa sin extravasación al tejido circundante ni a los segmentos medulares adyacentes (Beck et al., 1995). En estudios autorradiográficos previos se ha observado que la neurokinina A^[125I] marcada radioactivamente penetra con facilidad en las láminas superficiales de las astas posteriores (I-V), sin extravasación significativa a los tejidos circundantes y sin alcanzar concentraciones significativas en sangre (Beck et al., 1995). Esta vía de administración sobre la médula espinal puede considerarse como una vía local, comparable como se ha mencionado, a la administración intratecal. Con carácter general, toda aplicación de fármacos mediante superfusión controlada ha sido precedida de un período de al menos cuarenta minutos de superfusión con líquido cefalorraquídeo artificial.

Hemos aplicado concentraciones crecientes o bien concentraciones fijas predeterminadas, con arreglo al diseño experimental particular. Cada período de superfusión se ha prolongado por espacio de veinte minutos, de los cuales se han considerado para análisis los últimos diez. Hemos obtenido las distintas soluciones de trabajo de los fármacos diluyendo las soluciones de almacenamiento en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA; en mM: 130

Material y métodos

NaCl, 3,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 1,2 CaCl₂, 1,2 MgSO₄, 10 D-(+) glucosa; a pH 7,4) inmediatamente antes de su aplicación. Todos los fármacos (tabla 2) han sido adquiridos en Tocris (Bristol, UK).

Fármaco	Receptor	Efecto	Vía de administración
Bicuculina	GABA _A	Antagonista	Superfusión
Cis-ACPD	NMDA	Agonista	Superfusión
CTOP	Opioide μ	Antagonista	Superfusión
DAMGO	Opioide μ	Agonista	Superfusión
D-AP5	NMDA	Antagonista	Superfusión
Quinpirol	D2	Agonista	Superfusión
SCH23390	D1	Antagonista	Interperitoneal
SKF38393	D1	Agonista	Superfusión

Tabla 2: Fármacos aplicados por superfusión en los diferentes estudios.

4. Evaluación de comportamiento

4.1. Umbral del dolor a la estimulación mecánica

El procedimiento tiene por objeto detectar cambios en los umbrales de percepción del dolor en la superficie plantar de la extremidad inferior como consecuencia de la ligadura del nervio raquídeo. En estudios precedentes se ha demostrado que el umbral del dolor a la estimulación mecánica puede reducirse hasta en un 80% (Kim y Chung, 1992) o, en otras palabras, se manifiesta una alodinia táctil o respuesta nociva a estímulos táctiles inocuos (Chaplan et al., 1994). La evaluación de umbrales de retirada nociceptiva de la extremidades incluye un procedimiento de estimulaciones mecánicas de fuerzas variables, seguido de un cálculo matemático para la determinación del umbral con arreglo a una ecuación preestablecida.

Los animales intervenidos no han presentado ninguna anomalía motora. El protocolo contempla en cualquier caso la exclusión del estudio de cualquier animal con manifestaciones de disfunción motora, los cuales se deben en la mayoría de los casos a la lesión inadvertida del nervio L4 (Kim y Chung, 1992).

Material y métodos

El procedimiento general de evaluación consiste en el contacto repetido de la superficie plantar del animal con filamentos de nylon de distintos diámetros (monofilamentos de von Frey, Stoelting), los cuales se encuentran calibrados con arreglo a la fuerza que se debe aplicar al contacto con una superficie para que se curven. Las evaluaciones se han realizado en una franja horaria constante (9-17 h) durante el ciclo nocturno del animal. El animal permanece en reposo y sin ningún tipo de estímulo externo durante 15 minutos previos al inicio de la evaluación, con objeto de reducir su reacción de alerta (Chaplan et al., 1994), la cual condiciona el umbral del dolor (Chaplan et al., 1994). En el interior de una jaula transparente (10x25cm), el animal se sitúa sobre una superficie reticulada que es atravesada por los filamentos de nylon. Los monofilamentos se aplican con una orientación perpendicular a la superficie plantar y se ejerce presión sobre la planta durante 3 segundos (Chaplan et al., 1994). El filamento se curva siempre que se ejerce una presión que alcanza el valor especificado por el fabricante, y de este modo se estandariza en proceso practicando la misma fuerza en cada caso. La estimulación se lleva a cabo en el territorio de inervación del nervio tibial. El umbral más reducido se observa en el metatarso distal, entre los dedos tercero y cuarto. El metatarso proximal presenta un umbral mayor, y es el talón donde se detecta el umbral más elevado. La región de la extremidad posterior que mayor sensibilidad a la estimulación mecánica presenta es la situada en la superficie plantar ipsilateral a la intervención quirúrgica, en particular la región inervada por el nervio tibial. Hemos estimulado la región distal del metatarso plantar, entre los dedos cuarto y quinto, localización en la cual, según el protocolo del modelo de ligadura de la raíz L5 cedido por Chung y otros (2004), mayor sensibilidad a la estimulación mecánica se recoge.

La detección de los umbrales de retirada nociceptiva de la extremidad requiere presentar estímulos de intensidades comprendidas dentro de un rango amplio, para garantizar la posibilidad de detección tanto de umbrales reducidos como de umbrales elevados. Para ello, se ha descrito un procedimiento general (Chaplan et al., 1994) que establece que la presión máxima de estimulación sea de 15 g o del 10% del peso del animal y el inicio de la secuencia de estimulación se realice de un estímulo de intensidad intermedia de 2 g. A partir del inicio, el protocolo prescribe

Material y métodos

cuatro intensidades de estímulo por encima del valor intermedio y otros cuatro por debajo. Hemos creado una secuencia que comprende diez monofilamentos ordenados con arreglo a la fuerza que ejerce cada filamento (tabla 3).

Orden de aplicación	Número de referencia	Fuerza (g.)	Diámetro (mm.)	Fuerza (mN.)
1ºfilamento	3,61	0,4	0,178	3,922
2ºfilamento	3,84	0,7	0,203	5,882
3ºfilamento	4,08	1,2	0,229	9,804
4ºfilamento	4,17	1,5	0,254	13,725
5ºfilamento	4,31	2	0,305	19,608
6ºfilamento	4,56	3,6	0,356	39,216
7ºfilamento	4,74	5,5	0,381	58,824
8ºfilamento	4,93	8,5	0,406	78,431
9ºfilamento	5,07	11,7	0,432	98,039
10ºfilamento	5,18	15	0,483	147,059

Tabla 3: Orden de aplicación de monofilamentos para realizar pruebas para explorar la hipersensibilidad estática.

Dicha secuencia es similar a la establecida por Chaplan y otros (1994), con las modificaciones necesarias para su adaptación a los calibres de los monofilamentos del proveedor (Stoelting). La diferencia promedio entre las fuerzas que aplican los monofilamentos sucesivos es de 0,17 (notación logarítmica), similar a la establecida por Chaplan y otros (1994). A modo de ejemplo, se inicia la evaluación con la aplicación del filamento intermedio de valor 4,31 (2 g). Si el animal responde elevando su extremidad posterior, se considera como respuesta positiva y se procede a aplicar el siguiente filamento con diámetro menor. Si la respuesta es de elevación de la extremidad, se considera igualmente como respuesta positiva y se procede a aplicar el siguiente filamento con diámetro inmediatamente menor, mientras que si no se produce elevación del miembro se considera como respuesta negativa y se procede con el filamento inmediatamente mayor. Cuando se produce el primer cambio (Chaplan et al., 1994) en la naturaleza de la respuesta obtenida, es decir la primera respuesta negativa tras una o

Material y métodos

varias repuestas positivas iniciales o bien la primera respuesta positiva tras una o varias respuestas negativas iniciales, a partir de este momento se registran un total de seis respuestas.

Para realizar el cálculo del umbral de retirada de la extremidad posterior hemos empleado la ecuación establecida por Chaplan y otros (1994):

$$\text{umbral 50\% de retirada de la extremidad (g)} = (10^{[X_f + \kappa \delta]}) / 10^4$$

donde;

X_f es el valor logarítmico del último filamento aplicado en la serie registrada de seis respuestas.

κ es el valor tabular que refleja la variabilidad de la respuesta del animal y corresponde a la combinatoria de las seis respuestas registradas (Chaplan et al., 1994, modificada de Dixon, 1980)

δ es un valor logarítmico constante de 0,17 que refleja la diferencia promedio entre los valores logarítmicos de monofilamentos consecutivos, es decir, del total de los diez monofilamentos de la serie¹.

4.2. Evaluación de la alodinia térmica

Con el objetivo de evaluar los umbrales de dolor ante un estímulo térmico disponemos de un equipo de *hot plate* o plancha caliente, diseñado para la determinación del umbral de calor, es decir, la mínima temperatura a la cual se evocan las conductas nociceptivas. El equipo consta de dos componentes, una placa metálica (20x15cm) con un sistema de calentamiento en el interior de una cámara de observación de metacrilato y una unidad de control de la temperatura que permite realizar ensayos ascendentes o descendentes con una variación de temperatura previamente programada. Durante el procedimiento la temperatura de la plancha se mantiene constante en toda su superficie, con diferencias máximas de 0,5 °C.

El procedimiento de evaluación se ajusta al descrito por Almási y colaboradores (2003). El animal es colocado sobre la plancha en el interior de la cámara de observación, estableciendo una temperatura inicial de 30 °C. Tras 5 minutos de habituación se activa el mecanismo de calentado de

la plancha con un incremento de 6 °C/min hasta que el animal retira la extremidad, lame la misma o salta, o en caso contrario cuando alcanza los 50 °C, temperatura de corte para prevenir quemaduras en el animal. Se registra la temperatura de la plancha que evoca cualquiera de estas reacciones nociceptivas en la extremidad. Tras el registro de la temperatura umbral el animal es retirado de la plancha. Al cabo de 30 minutos se repite la evaluación con el mismo animal, y la media de los dos umbrales registrados es considerada el umbral térmico nociceptivo.

5. Fraccionamiento subcelular y Western Blot

El fraccionamiento de las proteínas de las astas posteriores se ha llevado a cabo de acuerdo con estudios previos (Yang et al, 2009; Cao et al., 2011) haciendo cambios menores. 9 días tras la cirugía simulada o ligadura del nervio L5, las ratas son anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg, vía interperitoneal) y posteriormente, decapitadas. Los segmentos medulares L4 y L5 son rápidamente extraído y sumergido en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) helado (en mM: 137 NaCl, 2,7 KCl, 1,4 CaCl₂ 1 MgCl₂, 6 NaHCO₃, 2,1 NaH₂PO₄, 6,5 D-(+)-glucosa; pH 7,4). El lado de la lesión es separado del lado contralateral y ambas muestras se homogenizan mecánicamente en frío en un tampón de lisis específico (10 mM Tris pH 7,6 , 320 mM sacarosa, 5 mM EDTA). Con el fin de evitar la degradación de las proteínas fosforiladas, en el tampón donde se diluye el homogeneizado se añade proteasas y fosfatasas (5 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 U/ml aprotinina, 0.0001% quimostatina, 0.0001% leupeptina y 0.0001% pepstatina).

Posteriormente, se procede a fraccionar la muestra con sucesivas centrifugaciones. El homogeneizado se centrifuga a 1.000 g durante 10 min a 4 °C para aislar los núcleos (P1) del sobrenadante (S1). S1 es centrifugado a 10.000 g durante 15 min para obtener el contenido crudo de la fracción sináptica (P2) y la fracción de citoplasma y microsomas (S2). La fracción P2 se incuba durante 15 min en un tampón de lisis que contiene 0,5% de Tritón X-100 y se centrifuga a 32.000 g durante 20 min. El *pellet* final (P3) se diluye en un tampón de resuspensión (10 mM Tris a pH 8,0 , 1 mM EDTA, 2%SDS) y se almacena a -80 °C hasta su utilización. En

Material y métodos

experimentos de control hemos verificado que la fracción P3 está enriquecida en la proteína sináptica PSD-95 (Aira et al., 2013). Con el kit *BCA protein assay* (Pierce, Rockford, IL, USA) se determina la concentración de proteína presente en las muestras, cargando la misma cantidad de proteína (50 µg) en los geles de poliacrilamida al 8% que se transfieren posteriormente a membranas de nitrocelulosa.

Tras bloquearlas con leche desnatada al 5% en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente, las membranas se incuban con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4 °C. A continuación, se realizan 3 lavados de 10 min en PBST para incubarlas con el anticuerpo secundario conjugado con HRP (1 hora a temperatura ambiente). Para detectar el inmunomarcado en las membranas se utiliza un sustrato de quimioluminiscencia comercial (Thermoscientific). La tinción con Ponceau sirve de control de carga (Romero-Calvo et al., 2010). Las bandas de densidad de proteína son analizadas con el software Image J (NIH). Las muestras contralaterales de las ratas que han sido sometidas a cirugía simulada se usan como control para normalizar la densidad de banda en el análisis de densidad relativa. Se utiliza la prueba de la *t* de Student para evaluar las diferencias con la condición de referencia.

6. Doble y triple inmunofluorescencia para microscopía confocal

Los animales se han anestesiado con pentobarbital sódico (50 mg/kg, intraperitonealmente) y se han perfundido transcardíacamente con 250 ml al 0,9% de salino y con 900 ml de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4). Los segmentos medulares L4-L5 se extraen para su postfijación en paraformaldehído al 4% durante 4 horas y su posterior crioprotección durante 48 horas en sacarosa al 30% diluida en tampón fosfato salino a 4 °C. Posteriormente, se corta el tejido en secciones coronales de 40 µm de grosor.

Las secciones se incuban con tampón de bloqueo (TB), que contiene suero de albúmina bovina al 1% (Sigma, St. Louis, MO, USA) y suero de las especies de donde se obtuvieron los anticuerpos secundarios también al 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las secciones

Material y métodos

se incuban con la combinación de anticuerpos primarios correspondiente, a la concentración adecuada diluidos en el TB a 4 °C durante toda la noche (tabla 4).

Diana	Procedencia	Dilución	Casa comercial
Met-enkefalina	Conejo	1:500	Millipore, MA, USA
MOR	Conejo	1:500	Millipore, MA, USA
NeuN	Ratón (monoclonal)	1:400	Millipore, MA, USA
pNMDAR ^{Ser889}	Conejo (policlonal)	1:500	Millipore, MA, USA
PSD-95	Ratón (monoclonal)	1:400	Thermo Scientific, IL, USA
Receptor D1	Cabra	1:500	St. Cruz Biotechnology, St. Cruz, CA
Receptor D2	Cabra (policlonal)	1:500	Santa Cruz, Millipore, MA, CA, USA (D2DR Antibody (N-19) sc-7522.
Sinaptofisina	Conejo	1:400	Abcam, Cambridge, UK
Sinaptofisina	Ratón	1:1000	Sigma-Aldrich
vGAT	Ratón (monoclonal)	1:400	Synaptic Systems
vGLUT2	Cerdo de guinea (policlonal)	1:1000	Synaptic Systems

Tabla 4: Anticuerpos primarios utilizados en la inmunofluorescencia para microscopía confocal

Posteriormente, se procede a la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforo, con espectros de emisión alejados y purificados mediante columna de afinidad. Hemos llevado a cabo las incubaciones en anticuerpos secundarios secuencialmente durante 1h con la correspondiente combinación de Alexa fluor 488 burro anti-cabra, DyLight 549 burro anti-conejo y/o Cy5 650 burro anti-ratón (1:200, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Se han llevado a cabo los controles de bloqueo oportunos mediante

preincubaciones de los secundarios con suero normal de las especies (2%) de donde se han extraído el resto de primarios, para evitar la reactividad cruzada.

Finalmente, las secciones histológicas se montan en MOWIOL (Labs. Vector) y se cubren con un cubreobjetos para la adquisición de imágenes en el microscopio confocal. En todos los experimentos de inmunohistoquímica se realizaron controles de especificidad del anticuerpo consistentes en la omisión de anticuerpo primario. Hemos obtenido las imágenes utilizando un microscopio confocal Olympus FV500 mediante adquisición secuencial para evitar la superposición de espectros de emisión fluorescente. Las imágenes de inmunofluorescencia se procesan con la ayuda del *plug-in Colocalization Finder* del software Image J (Li et al., 2004).

7. Transfección y cultivo celular

En el segundo estudio se precisaron células transfectadas y para ello se han obtenido células humanas embrionarias de riñón (*HEK293T*) de la colección americana de cultivos tipo (ATCC; CRL-3216) mantenidas en DMEM (ATCC, 30-2002) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Sigma-Aldrich) y antibióticos. Previamente a la transfección, las células han sido sembradas sobre portaobjetos de 18 mm recubiertos con poli-D-lisina para realizar la inmunofluorescencia o en placas Petri de 60 mm para llevar acabo posteriormente el *Western blot*. Cuando se ha llegado a una confluencia del 50-60%, las células han sido transfectadas con el plásmido pCMV6 (Origene) para introducir la secuencia que codifica en ratas el D1R o D5R en el C-terminal de myc (1 μg DNA/cm²) usando reagente de transfección Xfect (Clontech, 631317) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células han sido fijadas mediante formaldehído al 4% tamponado con tampón fosfato durante 10 minutos a temperatura ambiente tras 48 h de la transfección y procesadas para inmunofluorescencia o cultivadas en 750 μl de tampón hipotónico helado (5 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM fenilmetilsulfonil fluoruro, 50 μM iodoacetamida) para el análisis de Western blot. La suspensión de células ha sido homogeneizada por paso a través de agujas del 20 y 21 y después han sido mezcladas con un volumen igual del tampón conteniendo 0,64 M de sacarosa y

centrifugadas a 1000 g durante 5 minutos para desechar los núcleos (P1). El sobrenadante (S1) ha sido centrifugado a 37000 g durante 15 minutos para obtener el pellet de membranas plasmáticas P2, las cuales son posteriormente desnaturalizadas para realizar Western blot.

8. Análisis estadístico

Los datos que presentamos con carácter descriptivo son los valores medios de las áreas de los potenciales evocados junto con el E.T.M., expresados en forma de valores absolutos o en forma porcentual relativa a una situación control o de referencia.

Para la comparación de los potenciales evocados en la médula espinal bajo el efecto de las distintos tratamientos o condiciones experimentales, hemos utilizado análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías en función del diseño experimental particular.

Para comparaciones múltiples *post hoc* hemos utilizado las pruebas de Bonferroni o de Tamhane, según se hubiera cumplido o no el presupuesto de homocedasticidad, respectivamente y para comparaciones entre dos grupos experimentales hemos utilizado el estadístico *t* de Student.

Para la comparación de los umbrales de retirada de la extremidad posterior hemos utilizado estadísticos no paramétricos, dado el carácter ordinal de la variable *umbral* resultante de la aplicación del procedimiento de cálculo establecido por Chaplan et al. (1994). En particular, hemos utilizado la prueba de Kruskal-Wallis para la detección general de diferencias entre grupos, y la *U* de Mann-Whitney como estadístico para la comparación entre dos tratamientos. Para el contraste de correlaciones en los estudios de doble y triple inmunofluorescencia hemos utilizado el test exacto de Fisher.

El número de animales utilizados en cada grupo experimental ha sido de 5-6, en función de las exigencias del estadístico empleado en cada caso. Hemos considerado valores α de 0,05 ($p < 0,05$) y de 0,01 ($p < 0,01$) como criterios de significación estadística.

Material y métodos

Para el tratamiento de los datos hemos utilizado el paquete estadístico *SPSS* v.11 y v.14 (SPSS, Chicago, USA) y para calcular la concentración de fármaco que produce un 50% de reducción del área evocada por los potenciales de campo (IC50) hemos utilizado el programa *GraphPad Prism* v. 4.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Hemos utilizado *Corel Draw* v. 11 para representación gráfica.

1. Preparación previa al estudio

Se seleccionaron las variables de estudio y se elaboró el protocolo para la anamnesis, la exploración física, la administración de cuestionarios y el estudio de CPM. Los cuestionarios se seleccionaron para tener una visión completa de los aspectos psicofísicos concernientes a las variables estudiadas. También fueron necesarios una serie de ensayos con los equipos para familiarizarse y controlar su manejo y para estandarizar el protocolo, optimizando el trato con el paciente y las habilidades de comunicación, al objeto de que comprendiesen con exactitud el desarrollo de la prueba sin influir en sus respuestas.

1.1. Consideraciones éticas generales y específicas

Los procedimientos que se han llevado a cabo no son de carácter invasivo, no plantean riesgo asociado de infección ni contaminación, y no se han manejado muestras biológicas ni información de tipo genético. Los datos de carácter personal se gestionan con arreglo a la LOPD y a la normativa vigente en la UPVEHU relativa a los datos de carácter personal, y se utiliza un fichero de Nivel Alto, *Investigación del Dolor*, cuyo titular es la UPV/EHU (Boletín Oficial del País Vasco N. 2010124 – 30/06/2010) y cuyo responsable es Jon Jatsu Azkue Barrenetxea. El diseño experimental, los procedimientos incluidos en el estudio y los documentos de Información y de Consentimiento Informado han sido autorizados expresamente por el Comité de Ética para la Investigación en Seres Humanos (CEISH) de la UPV/EHU. Todos los sujetos participantes han firmado el documento de Consentimiento Informado autorizado por dicho Comité.

1.2. Reclutamiento de pacientes

Hemos llevado a cabo el estudio en una muestra de 32 pacientes con diagnóstico de síndrome de fibromialgia, SFM, y 21 personas sanas como control. Los criterios de inclusión para el grupo de FM han sido (i) haber

sido diagnosticados formalmente de FM y (ii) no presentar deterioro funcional ni cognitivo para la realización de la prueba. Los criterios de inclusión para los controles han sido (i) la ausencia de FM y (ii) la ausencia de dolor habitual y/o durante el desarrollo de las pruebas.

1.3. *Cuestionarios*

Se administró una batería de cuestionarios para su valoración clínica, incluyendo el cuestionario de impacto de la fibromialgia (FIQ), el cuestionario de capacidad funcional relacionada con la salud (HAQ), de calidad de vida (SF-12), el cuestionario EIDF de fatiga, y otros de carácter psicológico para estudiar su actitud frente a la enfermedad (Catastrofismo, Locus de Control y HADS). Estas tres escalas se encuentran fraccionadas en subcategorías. El primero consta de tres subgrupos que conforman la puntuación total; rumiación, magnificación e indefensión. El segundo valora sobre quién piensa la enferma que recae el control de la progresión de la enfermedad, pueden darse varios casos o una combinación de ellos; que piense que recae sobre ella misma (internalidad), sobre los facultativos que la tratan (médicos), sobre otras personas que se encuentran a su alrededor (otros) o si por el contrario cree que nadie posee el control y que el empeoramiento o mejoría es cosa del azar. Por último, el HADS nos ofrece una puntuación respecto a la depresión y otra sobre la ansiedad aunque dichos rasgos suelen ir intrínsecamente relacionados, de ahí que también se pueda valorar de forma orientativa al paciente por su puntuación total. Es una escala específica para valorar el estado emocional en pacientes con enfermedades crónicas ya que deja fuera los síntomas somáticos de la ansiedad y la depresión para evitar equívocos en individuos con alguna enfermedad preexistente.

2. Protocolo de la prueba de evaluación de CPM y equipos

En la fase inicial elaboramos una historia clínica completa, recogiendo datos tanto de su salud en general que puedan afectar a los resultados (cuadros inflamatorios, psicológicos o psiquiátricos y eventos que hayan podido contribuir al desarrollo de la enfermedad) como datos relacionados

directamente con el entorno del dolor, o relacionados con síntomas como la fatiga y el cansancio.

Para desarrollar la prueba de CPM, empleamos un algómetro de presión (Stoelting, EEUU) y un equipo de estimulación eléctrica gestionada por ordenador. El sujeto se sitúa en sedestación, en posición cómoda y relajada, en un ambiente con temperatura controlada y ausencia de distracciones. Todas las sesiones se desarrollan de idéntica forma, intentando minimizar las variaciones en el comportamiento y el vocabulario del observador. Cada estimulación se acompaña de una marcación de EVA electrónica (escala visual analógica que puede variar de 0 (ningún dolor) a 10 (el peor dolor imaginable) por medio de un dispositivo diseñado y construido en nuestro laboratorio semejante a las EVA electrónicas utilizadas por otros laboratorios. Es una valoración subjetiva del dolor para monitorizar en tiempo real la intensidad percibida de los estímulos, y asegurarse de que el sujeto ha comprendido la dinámica de la prueba.

2.1. Umbral del dolor a la estimulación de presión profunda (PPT)

La prueba con el algómetro se realiza presionando de forma continua y homogénea (aproximadamente 1 kg/s) y perpendicularmente, sobre el músculo de las zonas de referencia (dorso de la mano y eminencia tenar) para encontrar el umbral de dolor a la presión profunda (PPT). Se solicita al sujeto que cuando sienta cualquier sensación molesta o desagradable a causa de la presión diga "ya". La presión establecida en ese momento es la que determina el umbral de dolor a la presión profunda y se expresa en kg/cm². El uso del algómetro de presión es una técnica eficiente y reproducible para la determinación de los PPT, tanto en sujetos sanos como en pacientes de dolor crónico, y también para el análisis de la hiperalgesia resultante de una sensibilización central o periférica (Kosek et al, 1999). En este procedimiento la prueba para evaluar el umbral del dolor a la estimulación de presión profunda se realiza antes y después de la estimulación eléctrica condicionante en la mano contralateral a la zona que se ha estimulado eléctricamente para evaluar si hay cambios en los umbrales de cada paciente. Se repite tres veces para minimizar el efecto de la variabilidad y tener un dato más preciso.

2.2. Estimulación eléctrica heterotópica

Como estímulo test aplicamos una señal eléctrica sobre el dedo índice de la mano no dominante del sujeto. Elegimos esta localización por ser distal a la oreja, donde se aplicará el estímulo condicionante, y porque a su vez es un lugar en el que se produce menor estimulación muscular al ampliar la intensidad, lo que es más cómodo para el paciente. Elegimos que se estimulen nervios ipsilaterales pero de diferentes segmentos para estudiar su influencia el uno en el otro. Para ello se utiliza un electroestimulador TENS (EasySTIM NMS-28C, BEAC Biomedical, Pavia, Italia) ajustado a 100Hz y 50ms. En una fase previa se va subiendo poco a poco la intensidad hasta que el sujeto marque que la sensación que percibe es intensa pero soportable sin medicación, lo que consideramos cercano a una EVA 6.

Tras un descanso de 10 minutos en la prueba definitiva se opera el electroestimulador aplicando trenes de 4 s a 100 Hz a la intensidad previamente elegida, como estímulo test. Se administran 10 estímulos iniciales y posteriormente se continúa con 15 estímulos más acompañados del estímulo condicionante.

Para proporcionar el estímulo condicionante utilizamos un aislador de estímulos Digitimer DS7A de corriente constante, homologado para uso humano, para la generación y ajuste de pulsos durante el TENS. Establecemos la frecuencia de estimulación disparando el aislador de estímulos desde un temporizador DAGAN S-900. Utilizamos una señal de alta intensidad para la activación de la respuesta analgésica endógena, con una anchura de pulso de 2 ms, frecuencia de 100 Hz de intensidad que el paciente califica como "fuerte pero soportable" (nivel de aproximadamente 6 en una EVA, establecida por el sujeto). Aplicamos el TENS a través de electrodos cutáneos desechables de 2 cm de diámetro en el pabellón auricular sobre el territorio inervado por el nervio auricular mayor, del plexo cervical. Esta localización es bien tolerada por el sujeto por la ausencia de contracción muscular, y permite al mismo tiempo permanecer en sedestación con las extremidades libres. Esto es importante tanto para una mayor comodidad para el paciente como para realizar el protocolo

correctamente, ya que con la mano dominante deberá marcar la EVA y en la otra recibirá el estímulo test.

Se aplica el estímulo condicionante aumentando su intensidad hasta que el paciente exprese una EVA de 6 y en ese momento se fija de forma continua esa intensidad y se sigue con los estímulos fásicos en la mano, el estímulo test. Con este protocolo tenemos medidas test previas, posteriores y a lo largo de toda la prueba que dura aproximadamente unos 10 minutos en total.

3. Análisis estadístico

Los datos que presentamos con carácter descriptivo son los valores medios de los registros de PPT, intensidad del TENS aplicado y EVAs percibidas por los sujetos de estudio junto con el E.T.M., expresados en forma de valores absolutos o en forma relativa a una situación inicial tomada como referencia.

Para comparaciones entre los dos grupos experimentales, enfermos con dolor crónico y sujetos sanos, hemos utilizado el estadístico *t* de Student.

El número de sujetos que han participado en cada grupo experimental ha sido de 21 en el caso de los controles y de 31 en el de sujetos con dolor crónico. Los valores obtenidos incluidos en este estudio tienen significación estadística ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ y con $p = 0,00$ en el caso de las correlaciones).

Para el tratamiento de los datos hemos utilizado el paquete estadístico *SPSS v.11 y v.14* (SPSS, Chicago, USA) y para la representación gráfica hemos utilizado *Inkscape 0.91.0.0*.

LISTA DE REFERENCIAS

LISTA DE REFERENCIAS

- Abbadie C, Lombard MC, Besson JM, Trafton JA, Basbaum AI (2002) Mu and delta opioid receptor-like immunoreactivity in the cervical spinal cord of the rat after dorsal rhizotomy or neonatal capsaicin: an analysis of pre- and postsynaptic receptor distributions. *Brain Res*. 930:150-162.
- Aira Z, Buesa I, García del Caño G, Bilbao J, Doñate F, Zimmermann M, Azkue JJ (2013) Transient, 5-HT_{2B} receptor-mediated facilitation in neuropathic pain. Up-regulation of PKC γ and engagement of the NMDA receptor in dorsal horn neurons. *Pain* 154(9):1865-77.
- Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ (2011) Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. *Nat Rev Neurosci* 12:570-84.
- Ablin J, Neumann L, Buskila D (2008) Pathogenesis of fibromyalgia -A review. *Joint Bone Spine* 75: 273-279.
- Almási R, Pethő G, Bölcskei K, Szocsányi J (2003) Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a novel heat allodynia model sensitive to analgesics. *Br J Pharmacol* 139:49-58.
- Ambrose LM, Unterwald EM, Van Bockstaele EJ (2004) Ultrastructural evidence for co-localization of dopamine D₂ and micro-opioid receptors in the rat dorsolateral striatum. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 279:583-91.
- Anggono V, Huganir RL (2012) Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22:461-9.
- Ariano MA, Sortwell CE, Ray M, Altemus KL, Sibley DR, Levine MS (1997) Agonist induced morphologic decrease in cellular D₁ dopamine receptor staining. *Synapse* 27:313-21.
- Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S, Lee JH, Nakano AH, Dado RJ, Loh HH, Law PY, Wessendorf MW, Elde R (1995) Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J Neurosci* 15: 3328-3341.
- Aubert I, Guigoni C, Hakansson K, Li Q, Dovero S, Barthe N, Bioulac BH, Gross CE, Fisone G, Bloch B, Bezard E (2005) Increased D₁ dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol*. 57(1):17-26.
- Azaryan AV, Clock BJ, Cox BM (1996) Mu opioid receptor mRNA in nucleus accumbens is elevated following dopamine receptor activation. *Neurochem Res* 21:1411-5.
- Azkue JJ, Murga M, Fernández-Capetillo O, Mateos JM, Elezgarai I, Benítez R, Osorio A, Díez J, Puente N, Bilbao A, Bidaurrazaga A, Kuhn R, Grandes P (2001) Immunoreactivity for the group III metabotropic glutamate receptor subtype mGluR_{4a} in the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn. *J Comp Neurol* 430:448-57.
- Azkue JJ, Liu XG, Zimmermann M, Sandkühler J (2003) Induction of long-term potentiation of C fibre-evoked spinal field potentials requires recruitment of group I, but not group II/III metabotropic glutamate receptors. *Pain* 106:373-9.
- Back SK, Lee J, Hong SK, Na HS (2006) Loss of spinal mu-opioid receptor is associated with mechanical allodynia in a rat model of peripheral neuropathy. *Pain* 123:117-26.

- Bailey CP, Smith FL, Kelly E, Dewey WL, Henderson G (2006) How important is protein kinase C in mu-opioid receptor desensitization and morphine tolerance? *Trends Pharmacol Sci* 27:558-65.
- Bannister K, Patel R, Goncalves L, Townson L, Dickenson AH (2015) Diffuse noxious inhibitory controls and nerve injury: restoring an imbalance between descending monoamine inhibitions and facilitations. *Pain* 156(9):1803-11.
- Barasi S, Ben-Sreti MM, Clatworthy AL, Duggal KN, Gonzalez JP, Robertson J, Rooney KF, Sewell RD (1987) Dopamine receptor-mediated spinal antinociception in the normal and haloperidol pretreated rat: effects of sulpiride and SCH 23390. *Br J Pharmacol* 90:15-22.
- Barasi S, Duggal KN (1985) The effect of local and systemic application of dopaminergic agents on tail flick latency in the rat. *Eur J Pharmacol* 117:287-94.
- Bardoni R, Takazawa T, Tong Ck, Choudhury P, Scherrer G, Macdermott AB (2013) Pre-and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Ann NY Acad Sci.* 1279:90-6.
- Barsky, AJ, Klerman, GL (1983) Overview: hypochondriasis, bodily complaints and somatic styles. *American Journal of Psychiatry*, 140:273-283.
- Bartlett SE, Enquist J, Hopf FW, Lee JH, Gladher F, Kharazia V, Waldhoer M, Mailliard WS, Armstrong R, Bonci A, Whistler JL (2005) Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11521-6.
- Barraud Q, Obeid I, Aubert I, Barrière G, Contamin H, McGuire S, Ravenscroft P, Porras G, Tison F, Bezard E, Ghorayeb I (2010) Neuroanatomical study of the A11 diencephalospinal pathway in the non-human primate. *PLoS One* 13;5(10)e13306.
- Buskila, D (2007) Genetics in Chronic Pain States. *Best Practice & Research in Clinical Rheumatology* 1: 535-554.
- Beck H, Schröck H, Sandkühler J (1995) Controlled superfusion of the rat spinal cord for studying non-synaptic transmission: an autoradiographic analysis. *J Neurosci Methods* 58:193-202.
- Becker A, Grecksch G, Kraus J, Peters B, Schroeder H, Schulz S, Höllt V (2001) Loss of locomotor sensitisation in response to morphine in D1 receptor deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363(5):562-8.
- Bennett AD, Everhart AW, Hulsebosch CE (2000) Intrathecal administration of an NMDa or a non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury. *Brain Res.* 859(1):72-82.
- Bennett R (2004) Fibromyalgia: Present to future. *Current Pain and Headache Reports* 2004;8:379-384.
- Bernardy K, Füber N, Köllner V, Häuser W (2010) Efficacy of cognitive-behavioral therapies in fibromyalgia syndrome- A systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *J Rheumatol.* 37(10):1-15.
- Bigal ME, Lipton RB (2009) Excessive opioide use and the development of chronic migraine *Pain* 142(3):179-82.

- Biurrun Manresa JA, Fritsche R, Vuilleumier PH, *et al.* (2014) Is the conditioned pain modulation paradigm reliable? A test–retest assessment using the nociceptive withdrawal reflex. *PLoS One* 9:e100241.
- Blank T, Zwart R, Nijholt I, Spiess J (1996) Serotonin 5-HT₂ receptor activation potentiates N-methyl-D-aspartate receptor-mediated ion currents by a protein kinase c-dependent mechanism. *J Neurosci Res* 45:153-60.
- Bouhassira D, Villanueva L, Bing Z, le Bars D (1992) Involvement of the subnucleus reticularis dorsalis in diffuse noxious inhibitory controls in the rat. *Brain Res.* 595:353-357.
- Bouwense SAW, Olesen SS, Drewes AM, Poley J-W, van Goor H, Wilder-Smith OHG (2012) Effects of pregabalin on central sensitization in patients with chronic pancreatitis in a randomized, controlled trial. *PLoS One* 7(8):e42096.
- Börsbo B, Gerdle B, Peolsson M (2010) Impact of the interaction between self-efficacy, symptoms and catastrophising on disability, quality of life and health in chronic pain patients. *Disability and Rehabilitation* 32:1387–1396.
- Braceras A, Davis N, Ovelar I, Ozcariz T (2013) Unconditional psychological support in positive and negative events: Fantastic finding that plays a key role in enjoyment of life. *Eur J Neurosci.* 80(2):185:95.
- Brenner GJ, Ji RR, Shaffer S, Woolf CJ (2004) Peripheral noxious stimulation induces phosphorylation of the NMDA receptor NR1 subunit at the PKC-dependent site, serine-896, in spinal cord dorsal horn neurons *Eur J Neurosci.* 20(2):375-84.
- Brewer KL, Baran CA, Whitfield BR, Jensen AM, Clemens S (2014) Dopamine D₃ receptor dysfunction prevents anti-nociceptive effects of morphine in the spinal cord. *Front Neural Circuits* 8:62.
- Buesa I, Ortiz V, Aguilera L, Torre F, Zimmermann M, Azkue JJ (2006) Disinhibition of spinal responses to primary afferent input by antagonism at GABA receptors in urethane-anaesthetised rats is dependent on NMDA and Metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 50: 585-94.
- Buesa I, Urrutia A, Aira Z, Salgueiro M, Bilbao J, Mozas M, Aguilera L, Zimmermann M, Azkue JJ (2008) Depression of C fibre-evoked spinal field potentials by the spinal delta opioid receptor is enhanced in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain: involvement of the mu-subtype. *Neuropharmacology* 55:1376-82.
- Butler RK, Finn DP (2009) Stress-induced analgesia. *Prog Neurobiol* 88(3):184-202.
- Burckhardt CS, Clark SR, Bennett RM (1991) The fibromyalgia impact questionnaire: development and validation. *J Rheumatol* 18: 728-733.
- Calzá L, Pozza M, Zanni M, Manzini CU, Manzini E, Hökfelt T (1998) Peptide plasticity in primary sensory neurons and spinal cord Turing adjuvant-induced arthritis in the rat: an immunocytochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience* 82:575-589.
- Cameron DL, Williams JT (1993) Dopamine D₁ receptors facilitate transmitter release. *Nature* 366(6453):344-7.
- Cantrell AR, Scheuer T, Catterall WA (1999) Voltage-dependent neuromodulation of Na⁺ channels by D₁-like dopamine receptors in the rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 13:5301-10.
- Cao J, Yang X, Liu YN, Suo ZW, Shi L, Zheng CR, Yang HB, Li S, Hu XD (2011) GABAergic disinhibition induced pain hypersensitivity by upregulating NMDA receptor functions in spinal dorsal horn. *Neuropharmacology* 60:921-9.

- Carrillo JM, Collado S, Rojo N (2005) El cold pressor test en la investigación del dolor experimental y clínico. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud (Universidad Alfonso X El Sabio)* 3.
- Cathcart S, Winefield AH, Lushington K, Rolan P (2010) Noxious inhibition of temporal summation is impaired in chronic tension-type headache. *Headache* 50: 403–412.
- Caudle RM, Perez FM, Del Valle-Pinero AY, Iadarola MJ (2005) Spinal cord NR1 serine phosphorylation and NR2B subunit suppression following peripheral inflammation. *Mol Pain* 1:5.
- Cepeda C, Levine MS (2006) Where do you think you are going? The NMDA-D1 receptor trap. *Sci STKE* 333:20.
- Cesselin F, Bourgoin S, Mauborgne A, Hamon M, Le Bars D (2009) Freezing of enkephalinergic functions by multiple noxious foci: a source of pain sensitization? *PLoS One* 4: e6874.
- Chabot-Doré AJ, Schuster DJ, Stone LS, Wilcox GL (2015) Analgesic synergy between opioid and alpha-2 adrenergic receptors. *Br J Pharmacol* 172(2): 388-402.
- Chakrabarti S, Regec A, Gintzler AR (2005) Biochemical demonstration of mu-opioid receptor association with Gas: Enhancement following morphine exposure. *Mol Brain Res* 135:217-224.
- Chalaye P, Devoize L, Lafrenaye S, et al. (2013) Cardiovascular influences on conditioned pain modulation. *Pain* 154:1377–1382.
- Chalaye P, Lafrenaye S, Goffaux P, Marchand S. (2014) The role of cardiovascular activity in fibromyalgia and conditioned pain modulation. *Pain* 155:1064–1069.
- Chandran P, Sluka KA (2003) Development of opioid tolerance with repeated transcutaneous electrical nerve stimulation administration. *Pain* 102: 195–201.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Cheng JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55-63.
- Chapman CR, Tuckett RP, Song CW (2008) Pain and stress in a systems perspective: reciprocal neural, endocrine, and immune interactions. *J Pain* 2:122-45.
- Charbit AR, Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ (2009) Neurons of the dopaminergic/calcitonin gene-related peptide A11 cell group modulate neuronal firing in the trigeminocervical complex: an electrophysiological and immunohistochemical study. *J Neurosci* 29:12532-41.
- Chen L y Huang L-YM (1992) Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature (Lond)* 356:521–523.
- Chen C and Regehr WG (1997). The mechanism of cAMP-mediated enhancement at a cerebellar synapse. *J. Neurosci.* 17:8687-8694.
- Chenchen L, Rainnie DG (2014) Bidirectional regulation of synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by the D1-like family of dopamine receptors and group II metabotropic glutamate receptors. *J Physiol.* 592.19:4329-4351.
- Cheng G, Rong XW, Feng TP (1994) Block of induction and maintenance of calcium-induced LTP by inhibition of protein kinase C in postsynaptic neuron in hippocampal CA1 region. *Brain Res.* 646:230–234.

- Cheng F, Zagon IS, Verderame MF, McLaughlin PJ (2007) The opioid growth factor (OGF)-OGF receptor uses the p16 pathway to inhibit head and neck cancer. *Cancer Res.* 21:10511-8.
- Christie MJ (2008) Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol* 154:384-396
- Christie MJ, Connor M, Vaughan CW, Ingram SL, Bagley EE (2000) Cellular actions of opioids and other analgesics: implications for synergism in pain relief. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27:520-3.
- Chu LF, Angst MS, Clark D (2008) Opioid-induced hyperalgesia in humans molecular mechanisms and clinical considerations. *Clin J Pain* 6:479-96.
- Chung JM, Kim HK, Chung K (2004) Segmental spinal nerve ligation model of neuropathic pain. *Methods Mol Med* 99:35-45.
- Clauw DJ, Crofford LJ (2003) Chronic widespread pain and fibromyalgia: what we know, and what we need to know. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 17(84):685-701.
- Claydon L, Chesterton LS (2008) Does transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) produce dose-responses? A review of systematic reviews on chronic pain. *Physical Therapy Reviews* 13: 450-463.
- Connor M, Christie MD (1999) Opioid receptor signaling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:493-499.
- Cooper DW, Ryall DM, McHardy FE, Lindsay SL, Eldabe SS (1996) Patient-controlled extradural analgesia with bupivacaine, fentanyl, or a mixture of both, alter Caerarean section. *Br J Anaesth* 76 (5):611-5.
- Coppieters I, Ickmans K, Cagnie B, Nijs J, De Pauw R, Noten S, Meeus M (2015) Cognitive performance is related to central sensitization and health-related quality of life in patients with chronic whiplash-associated disorders and fibromyalgia. *Pain Physician* 18:E389-E401.
- Crain SM, Shen K-F (2000) Antagonists of excitatory opioid receptor functions enhance morphine analgesic potency and attenuate opioid tolerance/dependence liability. *Pain* 84:121-131.
- Crisson JE, Keefe FJ (1988) The relationship of locus of control to pain coping strategies and psychological distress in chronic pain patients. *Pain* 35(2): 147-154.
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH (1989) The dopamine D2 receptor two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* 8(13).4025-34.
- Das S, Grunert M, Williams L, Vicent SR (1997) NMDA and D1 receptors regulate the phosphorylation of CREB and the induction of c-fos in striatal neurons in primary culture. *Synapse* 25(3):227-33.
- Delfs JM, Kong H, Mestek A, Chen Y, Yu L, Reisine T, Chesselet MF (1994) Expression of mu opioid receptor mRNA in rat brain: an in situ hybridization study at the single cell level. *J Comp Neurol.* 345:46-68.
- Diaz-Diez I (1987) Unconditional support: key role in recent years being a sister. *Pain* 15:55-65.
- Dilts RP, Kalivas PW (1990) Autoradiographic localization of delta opioid receptors within the mesocorticolimbic dopamine system using radioiodinated [2-D-penicillamine, 5-D-penicillaminelenkephalin (125I-DPDPE). *Synapse* 6(2): 121-32.

- Dixon WJ (1980) Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20:441-62.
- Dubner R (2004) The neurobiology of persistent pain and its clinical implications. *Suppl Clin Neurophysiol* 57:3-7.
- Dudman JT, Eaton ME, Rajadhyaksha A, Macías W, Taher M, Barczak A, Kameyama K, Haganir R, Konradi C (2003) Dopamine D1 receptors mediate CREB phosphorylation via phosphorylation of NMDA receptor at Ser897-NR1. *J Neurochem* 87(4):922-34.
- Dunah AW, Standaert DG (2001) Dopamine D1 receptor-dependent trafficking of striatal NMDA glutamate receptors to the postsynaptic membrane. *J Neurosci* 21(15):5546-58.
- Edwards RR, Fillingim RB, Ness TJ (2003) Age-related differences in endogenous pain modulation: a comparison of diffuse noxious inhibitory controls in healthy older and younger adults. *Pain* 101:155-165.
- Edwards LC, Pearce SA, Turner-Stokes L, Jones A (1992) The pain beliefs questionnaire: an investigation of beliefs in the causes and consequences of pain. *Pain* 51(3):267-272.
- Eghbali M, Santoro C, Paredes W, Gardner EL, Zukin RS (1987) Visualization of multiple opioid-receptor types in rat striatum after specific mesencephalic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(18) 6582-6.
- Eide PK (2000) Wind-up and the NMDA receptor complex from a clinical perspective. *Eur J Pain* 4(1):5-15.
- Ferguson RJ, Ahles TA (1998) Private body consciousness, anxiety and pain symptom reports of chronic pain patients. *Behaviour Research and Therapy* 36:527-535.
- Ferré S, Agnati LF, Ciruela F, Lluís C, Woods AS, Fuxe K, Franco R (2007) Neurotransmitter receptor heteromers and their integrative role in 'local modules': the striatal spine module. *Brain Res Rev* 55:55-67.
- Field KJ, Lang CM (1988) Hazards of urethane (ethyl carbamate) a review of the literature. *Lab Anim*. 22(3):255-62.
- Fields H (2004) State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci*. 5:565-75.
- Fields HL, Basbaum AI, Heinricher MM (2006) Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMahon, S.B., Koltzenburg, M. (Eds.), *Textbook of Pain, Wall and Melzack's*. 5th ed. Elsevier, China, pp. 125-142.
- Fleetwood-Walker SM, Hope PJ, Mitchell R (1988) Antinociceptive actions of descending dopaminergic tracts on cat and rat dorsal horn somatosensory neurones. *J Physiol* 399: 335-48.
- Flor H, Turk DC (1988) Chronic back pain and rheumatoid arthritis: predicting pain and disability from cognitive variables. *J Psychosom Res*. 31:251-259.
- Fuxe K, Hoekfelt T, Nilsson O (1965) A fluorescence and electronmicroscopic study on certain brain regions rich in monoamine terminals. *Am J Anat*. 117:33-45.
- Fuxe K, Ferré S, Genedani S, Franco R, Agnati LF (2007) Adenosine receptor-dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiol Behav* 92:210-7.
- Gao C, Wolf ME (2008) Dopamine receptors regulate NMDA receptor surface expression in prefrontal cortex neurons. *J Neurochem* 106(6):2489-501.
- Gao X, Zhang YQ, Zhang LM, Wu GC (2001) Effects of intraplantar injection of carrageenan on central dopamine release. *Brain Res Bull* 54: 391-394.

- Gao X, Zhang Y, Wu G (2001) Effects of dopaminergic agents on carrageenan hyperalgesia after intrathecal administration to rats. *Eur J Pharmacol* 418:73-7.
- Gao Y, Liu X, Liu W, Qi Y, Liu X, Zhou Y, Wang R (2006) Opioid receptor binding and antinociceptive activity of the analogues of endomorphin-2 and morphiceptin with phenylalanine mimics in the position 3 or 4. *Bioorg Med Chem Lett* 16(14):3688-92.
- Gao HR, Shi TF, Yang CX, Zhang D, Zhang GW, Zhang Y, Jiao Rs, Zhang H, Xu MY (2010) The effect of dopamine on pain-related neurons in the parafascicular nucleus of rats. *J Neural Transm* 117(5):585-91.
- García Campayo J, Rodero B (2009) Aspectos cognitivos y afectivos del dolor. *Reumatología Clínica* 5(S2):9-11.
- García Campayo J, Rodero B, Alda M, Sobradie N, Montero J, Moreno S (2008) Validación de la versión española de la escala de la catastrofización ante el dolor (Pain Catastrophizing Scale) en la fibromialgia. *Med Clin (Barc.)* 131(13):487-92.
- George SR, Kertesz M (1987) Met-enkephalin concentrations in striatum respond reciprocally to alterations in dopamine neurotransmission. *Peptides* 8: 487-92.
- George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, O'Dowd BF (2000) Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem* 275: 26128-35.
- Gershon AA, Vishne T, Grunhaus L (2007) Dopamine D2-like receptors and the antidepressant response. *Biol Psychiatry* 61(2):145-53.
- Geva N, Pruessner J, Defrin R (2014) Acute psychosocial stress reduces pain modulation capabilities in healthy men. *Pain* 2014; 155:2418–2425.
- Gfellner BM, Finlayson C (1988) Loneliness, personality, and well-being in older women. *Percept Mot Skill* 67: 143-146.
- Gianaros PJ, Sheu LK (2009) A review of neuroimaging studies of stressor-evoked blood pressure reactivity: emerging evidence for a brain–body pathway to coronary heart disease risk. *Neuroimage* 47:922–936.
- Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC (1989) Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 342(6252):923-6.
- Goldsmith-Cwinke J, Dielman TE, Kirsch JP, Israel BA (1988) Mechanisms of psychosocial effects on health. *Health Educ Q* 15: 151-173.
- Granot M, Weissman-Fogel I, Crispel Y, et al. (2008) Determinants of endogenous analgesia magnitude in a diffuse noxious inhibitory control (DNIC) paradigm: do conditioning-stimulus painfulness, gender and personality variables matter? *Pain* 136:142–149.
- Granovsky Y, Yarnitsky D (2013) Personalized Pain Medicine: The Clinical Value of Psychophysical Assessment of Pain Modulation Profile. *Rambam Maimonides Med J* 4(4):e0024.
- Grigg JJ, Kozasa T, Nakajima Y, Nakajima S (1996) Single-channel properties of a G-protein-coupled inward rectifier potassium channel in brain neurons. *J Neurophysiol* 75: 318-28.
- Grosen K, Vase L, Pilegaard HK, Pfeiffer-Jensen M, Drewes AM (2014) Conditioned Pain Modulation and Situational Pain Catastrophizing as Preoperative

- Predictors of Pain following Chest Wall Surgery: A Prospective Observational Cohort Study. *PLoS ONE* 9(2):e90185.
- Goodin BR, McGuire L, Allshouse M, Stapleton, Haythornthwaite JA, Burns N, Mayes LA, Edwards RR (2009) Associations between catastrophizing and endogenous pain-inhibitory processes: sex differences. *The Journal of Pain* 10:180-190.
- Guan Y, Borzan J, Meyer RA, Raja SN (2006) Windup in dorsal horn neurons is modulated by endogenous spinal mu-opioid mechanisms. *J Neurosci* 26(16): 4298-307.
- Gingrich JA, Caron MG (1993) Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 16:299–321.
- Gintzler AR, Chakrabarti S (2001) Opioid tolerance and the emergence of new opioid receptor-couple signaling. *Mol Neurobiol* 21:21-23.
- Graven-Nielsen T, Aspegren Kendall S, Henriksson KG, Bengtsson M, Sorensen J, Johnson A, Gerdle B, Arendt-Nielsen L (2000) Ketamine reduces muscle pain, temporal summation, and referred pain in fibromyalgia patients. *Pain* 85: 483-491.
- Greengard P, Allen PB, Nairn AC (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARpp-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23(3):435-47.
- Gustafsson M, Gaston-Johansson F (1996) Pain intensity and health locus of control: a comparison of patients with fibromyalgia syndrome and rheumatoid arthritis. *Patient Education and Counseling* 29:179-188.
- Hara K, Harris RA (2002) The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesth Analg.* 94(2):313-8.
- Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE (1998) Opiate tolerance and dependence: Receptors, G-proteins, and anti-opiates. *Peptides* 19.9:1603-1630.
- Harvey DJ (1985) Identification of hepatic metabolites of n-heptyl-delta-1-tetrahydrocannabinol in the mouse. *Xenobiotica* 15(3):187-97.
- Hassett AL, Cone JD, Patella SJ, Sigal LH (2000) The role of catastrophizing in the pain and depression of women with Fibromyalgia Syndrome. *Arthritis and Rheumatism* 43:2493–2500.
- Herken H, Gursoy S, Yetkin O, Virit O, Esgi K (2001) Personality characteristics and depression levels in female patients with Fibromyalgia Syndrome. *Internal Medicine Journal* 8:41–44.
- Hernández X, Bengolain A, Kakalmet (2011) Role of great friends in the research and investigation projects: coffees on the roof and psychological support. *Neuroscience* 11589:895-905.
- Herrero JF, Laird JM, Lopez-Garcia JA (2000) Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol* 61:169 –203.
- Heymen S, Maixner W, Whitehead WE, Klatzkin RR, Mechlin B, et al (2010) Central processing of noxious somatic stimuli in patients with irritable bowel syndrome compared with healthy controls. *Clin J Pain* 26: 104–109.
- Hökfelt T, Phillipson O, Goldstein M (1979) Evidence for a dopaminergic pathway in the rat descending from the A11 cell group to the spinal cord. *Acta Physiol Scand* 107: 393-5.

- Holman AJ, Meyers RR (2005) A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pramipexole, a dopamine agonist, in patients with fibromyalgia receiving concomitant medications. *Arthritis Rheum* 52:2495-2505.
- Holstege JC, Kuypers HG (1987) Brainstem projections to spinal motoneurons:an update. *Neuroscience* 3:809-21.
- Hong JS, Yang HY, Fratta W, Costa E (1978) Rat striatal methionine-enkephalin content after chronic treatment with cataleptogenic and noncataleptogenic antischizophrenic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 205: 141-7.
- Hossaini M, Duraku LS, Kohli SK, Jongen JL, Holstege JC (2014) Spinal distribution of c-Fos activated neurons expressing enkephalin in acute and chronic pain models. *Brain Res.* 1543:83-92.
- Houdenhove BV, Luyten P (2006) Stress, depression and fibromyalgia. *Acta Neurologica Belgica* 106:149-156
- Hua XY, Chen P, Yaksh TL (1999) Inhibition of spinal protein kinase C reduces nerve injury-induced tactile allodynia in neuropathic rats. *Neurosci. Lett.* 276:99-102.
- Huang J, Chen J, Wang W, Wang W, Koshimizu Y, Wei YY, Kaneko T, Li YQ, Wu SX (2010) Neurochemical properties of enkephalinergic neurons in lumbar spinal dorsal horn revealed by preproenkephalin-green fluorescent protein transgenic mice. *J Neurochem.* 113:1555-64.
- Ikeda H, Asai T, Murase K (2000) Robust changes of afferent-induced excitation in the rat spinal dorsal horn after conditioning high-frequency stimulation. *J. Neurophysiol.* 83, 2412-2420.
- Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, Niki HRY (2000) Involvement of G-protein-activated inwardly rectifying K (GIRK) channels in opioid induced analgesia. *Neurosci Res* 30:113-116.
- Ikeda H, Kusudo K, Ryu PD, Murase K (2003) Effects of corticotropin-releasing factor on plasticity of optically recorded neuronal activity in the gelatinosa of the rat spinal cord slices. *Pain* 106(1-2):197-207.
- Isaev D, Gerber G, Park SK, Chung JM, Randik M (2000) Facilitation of NMDA-induced currents and Ca²⁺ transients in the rat substantia gelatinosa neurons after ligation of L5-L6 spinal nerves. *Neuroreport* 11(18):4055-61.
- Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ (2003) Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci* 26:696-705.
- Ji RR, Woolf CJ (2001) Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol. Dis.* 8:1-10.
- Ji RR, Zhang Q, Law PY, Low HH, Elde R, Hökfelt T (1995) Expression of μ -, δ -, and κ -opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J Neurosci* 15: 8156-8166.
- Jones I, Johnson MI. (2009) Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS). *Continuing Education in Anaesthesia, Critic Care Pain* 9: 130-135.
- Julien N, Goffaux P, Arsenault P, Marchand S (2005) Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain* 114: 295-302.

- Jurth C, Rehberg B, von Dincklage F (2014) Reliability of subjective pain ratings and nociceptive flexion reflex responses as measures of conditioned pain modulation. *Pain Res Mahag* 2014; 19(2): 93-96.
- Kagan R, Kainz V, Burstein R, Nosedá R (2013) Hypothalamic and basal ganglia projections to the posterior thalamus: Possible role in modulation of migraine headache and photophobia. *Neuroscience* 248C: 359-368.
- Kalra A, Urban MO, Sluka KA (2001) Blockade of opioid receptors in rostral ventral medulla prevents antihyperalgesia produced by transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). *J Pharmacol Exp Ther* 298:257-63.
- Kamei J, Saitoh A (1996) Involvement of dopamine D2 receptor-mediated functions in the modulation of morphine-induced antinociception in diabetic mouse. *Neuropharmacology* 35: 273-8.
- Kassack MU, Höfgen B, Lehmann J, Eckstein N, Quillan JM, Sadée W (2002) Functional screening of G protein-coupled receptors by measuring intracellular calcium with a fluorescence microplate reader. *J Biomol Screen.* 7(3):233-46.
- Katerndahl DA (1991) Relationship between panic attacks and health locus of control. *J Fam Pract* 32: 4 391-396.
- Kaupilla T, Kontinen VK, Pertovaara A (1998) Influence of spinalization on spinal withdrawal reflex responses varies depending on the submodality of the test stimulus and the experimental pathophysiological condition in the rat. *Brain Res.* 797:234-242.
- Kapur S, Seeman P (2002) NMDA receptor antagonists ket- amine and PCP have direct effects on the dopamine D(2) and serotonin 5-HT(2)receptors: Implications for models of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7:837-844.
- Kawamoto K, Otsuguro K, Ishizuka M, Ito S (2012) Inhibitory effects of dopamine on spinal synaptic transmission via dopamine D1-like receptors in neonatal rats. *Br J Pharmacol* 166(2):788-800.
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93-96.
- Kemp T, Spike RC, Watt C, Todd AJ (1996) The mu-opioid receptor (MOR1) is mainly restricted to neurons that do not contain GABA or glycine in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 75: 1231-8.
- Kerr BJ, David S (2007) Pain behaviors after spinal cord contusion injury in two commonly used mouse strains. *Exp.Neurol.* 206:240-247.
- King MA, Bradshaw S, Chang AH, Pintar JE, Pasternak GW (2001) Potentiation of opioid analgesia in dopamine 2 receptor knock-out mice: evidence for a tonically active anti-opioid system. *J Neurosci* 21: 7788-92.
- Kim SH, Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355-63.
- Kim Y, Cho HY, Ahn YJ, Kim J, Yoon YW (2012) Effect NMDA NR2B antagonist on neuropathic pain in two spinal cord injury models. *Pain* 153(5):1022-9.
- Kim JYV, Tillu DV, Quinn TL, Mejia GL, Shy A, Asiedu MNK, Murad E, Schumann AP, Totsch SK, Sorge RE, Mantyh PW, Dussor G , Price TJ (2015) *The Journal of Neuroscience* 35(16):6307-6317.
- King MA, Bradshaw S, Chang AH, Pintar JE, Pasternak GW (2001) Potentiation of opioid analgesia in dopamine 2 receptor knock-out mice evidence for a tonically active anti-opioid system. *J Neurosci* 21(19):7788-92.

- Kiritsy-Roy JA, Standish SM, Terry LC (1989) Dopamine D-1 and D-2 receptor antagonists potentiate analgesic and motor effects of morphine. *Pharmacol Biochem Behav* 32: 717-21.
- Kosek K, Ekholm J, Hansson P (1995) Increased pressure pain sensibility in fibromyalgia patients in located deep to the skin but not restricted to muscle tissue. *Pain* 63; 335-9.
- Kosek K, Ekholm J, Hansson P (1996a) Modulation of pressure pain thresholds during and following isometric contraction in patients with fibromyalgia and in healthy controls. *Pain* 64:415-23.
- Kosek K, Ekholm J, Hansson P (1996) Sensory dysfunction in fibromyalgia patients with implications for pathogenic mechanisms. *Pain* 68: 375-83.
- Koser E, Ekholm J, Hansson P (1999) Pressure pain thresholds in different tissues in one body region. The influence of skin sensitivity in pressure algometry. *Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine* 31:89-93.
- Kosek E, Hansson P (1997) Modulatory influence on somatosensory perception from vibration and heterotopic noxious conditioning stimulation (HNCS) in fibromyalgia patients and healthy subjects. *Pain* 70:41-51.
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB Jr and Charney DS (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51:199-214.
- Kwon M, Altin M, Duenas H, Alev L (2014) The role of descending inhibitory pathways on chronic pain modulation and clinical implications. *Pain Practice* 14, 656-667.
- La Buda CJ, Little PJ (2005) Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. *J Neurosci Methods* 144(2): 175-81.
- Lagraize SC, Guo W, Yang K, Wei F, Ren K, Dubner R (2010) Spinal cord mechanisms mediating behavioral hyperalgesia induced by neurokinin-1 tachykinin receptor activation in the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* 171(4):1341-56.
- Lapirot O, Melin C, Modolo A, Nicolas C, Messaoudi Y, Monconduit L, Artola A, Luccarini P, Dallel R (2011) Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn. *Pain* 152: 1821-31.
- Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10:895-926.
- Lau CG, Zukin RS (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8: 413-26.
- Lautenbacher S, Rollman G.B, McCain GA, (1994) Multi-method assessment of experimental and clinical pain in patients with fibromyalgia. *Pain* 59:45-53.
- Lautenbacher S, Rollman GB (1997) Possible deficiencies of pain modulation in fibromyalgia. *Clin J Pain* 13:189-196.
- Lavine N, Ethier N, Oak J, Pei L, Liu F, Trieu P, Rebois R, Bouvier M, Hebert TE, Van Tol HH (2002) G Protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 277:46010-46019.

- Le Bars D, Bourgoin S, Villanueva L, Clot AM, Hamon M, Cesselin F (1987) Involvement of the dorsolateral funiculi in the spinal release of Met-enkephalin-like material triggered by heterosegmental noxious mechanical stimuli. *Brain Res* 412: 190-5.
- Le Bars D, Willer JC. Pain modulation triggered by high-intensity stimulation: implication for acupuncture analgesia? *Int Congr Ser* 2002; 1238:11-29.
- Lee FJ, Xue S, Pei L et al. (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct proteína-protein interactions with dopamine D1 receptor. *Cell* 111(2): 219-30.
- Lee MA, Walker RW, Hildreth TJ, Prentice WM (2006) A survey of pain in idiopathic Parkinson's disease. *J Pain Symptom Manage* 32:462-469.
- Legangneux E, Mora JJ, Spreux-Varoquaux O, Thorin I, Herrou M, Alvado G, Gomeni C (2001) Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites, plasma-rich platelet serotonin and [3H]i- mipramine reuptake in the primary fibromyalgia syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 40:290-296.
- Levine R, Morgan MM, Cannon JT, Liebeskind JC (1991) Stimulation of the periaqueductal gray matter of the rat produces a preferential ipsilateral antinociception. *Brain Res.* 567(1):140-4.
- Leventhal H, Everhart D (1979) Emotion, pain, and physical illness. In C. E. Izard (Ed.), *Emotion and psychopathology*: 263,299 New York: Plenum Press.
- Li JL, Ding YQ, Li YQ, Li JS, Nomura S, Kaneko T, Mizuno N (1998) Immunocytochemical localization of mu-opioid receptor in primary afferent neurons containing substance P or calcitonin gene-related peptide: a light and electron microscope study in the rat. *Brain Res* 794:347-352.
- Li X, Olson C, Lu S, Kamasawa N, Yasumura T, Rash JE, Nagy JI (2004) Neuronal connexin36 association with zonula occludens-1 protein (ZO-1) in mouse brain and interaction with the first PDZ domain of ZO-1. *Eur J Neurosci* 19(8): 2132-46.
- Liebano RE, Rakel B, Vance CG, Walsh DM, Sluka KA (2011) An investigation of the development of analgesic tolerance to TENS in humans. *Pain* 152:335-342.
- Liebano RE, Vance CG, Rakel BA, Lee JE, Coper NA, Marchand S, Walsh DM, Sluka KA (2013) Transcutaneous electrical nerve stimulation and conditioned pain modulation influence the perception of pain in humans. *Eur J Pain* 17:1539-1546.
- Lipp MEN (2005) *Mecanismos neuropsicofisiológicos do stress: teoria e aplicações clínicas*. 2º ed. Sao Paulo: Casa do Psicólogo.
- Lisman JE (1985) A mechanism for memory storage insensitive to molecular turnover: a bistable autophosphorylating kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 3055-3057.
- Liu QS, Qiao JT, Dafny N (1992) D2 dopamine receptor involvement in spinal dopamine-produced antinociception. *Life Sci* 51: 1485-92.
- Liu H, Wang H, Sheng M, Jan LY, Jan YN, Basbaum AI (1994) Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsall horn. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(18):8383-7.
- Liu XG, Sandkühler J (1995) Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal Nmethyl-d-aspartic acid receptor blockage. *Neurosci. Lett.* 191:43-46.

- Liu X, Sandkühler J (1997) Characterization of long-term potentiation of C-fiber – evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK-1 and NK-2 receptors. *J Neurophysiol.* 78(4):1973-82.
- Llorens-Cortes C, Zini S, Gros C, Schwartz JC (1991) Dopaminergic regulation of enkephalin release. *J Neurochem* 56: 1368-75.
- Lopez-Garcia JA (2006) Serotonergic modulation of spinal sensory circuits. *Curr Top Med Chem* 6:1987–1996.
- Luscher B, Fuchs T, Kilpatrick CL (2011) GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron* 70: 385-409.
- Ma W, Eisenach JC (2003) Chronic constriction injury of sciatic nerve induces the up-regulation of descending inhibitory noradrenergic innervation to the lumbar dorsal horn of mice. *Brain Res.* 970:110-8.
- Maggi CA, Meli A (1986) Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations. Part 3: Other systems and conclusions. *Experientia* 42(5):531-7.
- Malenka RC (2003) The long-term potential of LTP. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:923–926.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation—a decade of progress? *Science* 285:1870–1874.
- Malhotra AK, Pinals DA, Weingartner H, Sirocco K, Missar CD, Pickar D y Breier A (1996) NMDA receptor function and human cognition: The effects of ketamine in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 14: 301–307.
- Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI (1997) Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC γ . *Science* 278:279–283.
- Mango D, Bonito-Oliva A, Ledonne A, Cappellacci L, Petrelli R, Nisticò R, Berretta N, Fisone G, Mercuri NB, Adenosine A1 receptors stimulation reduces D1 receptor-mediated GABAergic transmission from striato-nigral terminals and attenuates L-DOPA-induced dyskinesia in dopamine-denervated mice. *Exp Neurol.* 2014.
- Mansikka H, Zhao C, Sheth RN, Sora I, Uhl G, Raja SN (2004) Nerve injury induces a tonic bilateral mu-opioid receptor-mediated inhibitory effect on mechanical allodynia in mice. *Anesthesiology.* 100:912-21.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ (1994) Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 350:412–438.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Akil H, Watson SJ (1995) Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *J Chem Neuroanat* 8:283–305.
- Maren S and Baudry M (1995) Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol. Learn Mem.* 63:1–18.
- Martin WJ, LH, Wang H, Malmberg AB, Basbaum AI (1999) Inflammation-induced up-regulation of protein kinase C gamma immunoreactivity in rat spinal cord correlates with enhanced nociceptive processing. *Neuroscience* 88:1267–1274.
- Martínez-Fernández AM, Gancedo-García A, Chudácik M, Babío-Herráiz J, Suárez-Gil P (2016) Estudio transversal del efecto de la catastrofización y ansiedad ante el dolor sobre la capacidad funcional y el consumo de fármacos en pacientes con fibromialgia. *Revista Colombiana de Reumatología* 23(1):3-10.

- Marvizón JC, Chen W, Murphy N (2009) Enkephalins, dynorphins, and beta-endorphin in the rat dorsal horn: an immunofluorescence colocalization study. *J Comp Neurol* 517: 51-68.
- Marvizón JC, Pérez OA, Song B, Chen W, Bunnett NW, Grady EF, Todd AJ (2007) Calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 1 in the rat dorsal horn: localization in glutamatergic presynaptic terminals containing opioids and adrenergic 2C receptors. *Neuroscience* 148:250-265.
- Maves TJ, Pechman PS, Meller ST, Gebhart GF (1994) Ketorolac potentiates morphine antinociception during visceral nociception in the rat. *Anesthesiology* 80: 1094-101.
- McGilliard KL, Takemori AE (1979) The effect of dopaminergic modifiers on morphine-induced analgesia and respiratory depression. *Eur J Pharmacol* 54: 61-8.
- Melzack R,Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL (2001) Central neuroplasticity and pathological pain. *Ann NY Acad Sci* 933:157-174.
- Men DS, Matsui Y (1994) Peripheral nerve stimulation increases serotonin and dopamine metabolites in rat spinal cord. *Brain Res Bull* 33: 625-632.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355-474
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78:189-225.
- Miyake M, Christie MJ, North RA (1989) Single potassium channels opened by opioids in rat locus ceruleus neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3419-22.
- Mizuno T, Schmauss C, Rayport S (2007) Distinct roles of presynaptic dopamine receptors in the differential modulation of the intrinsic synapses of medium-spiny neurons in the nucleus accumbens. *BMC Neuroscience* 8:8.
- Moran F, Leonard T, Hawthorne S, Hughes CM, McCrum-Gardner E, Johnson MI, Rakel B, Sluka KA, Walsh DM (2011) Hypoalgesia in response to transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) depends on stimulation intensity. *The Journal of Pain* 12(8):929-935.
- Morales Osorio MA, Mejía Mejía JM, Reyes Sanmiguel E (2010) Fibromyalgia syndrome: Treatment multidisciplinary according to evidence. *Revista Colombiana de Reumatología* 17: 231-244.
- Morgan MJ, Franklin KB (1991) Dopamine receptor subtypes and formalin test analgesia. *Pharmacol Biochem Behav* 40: 317-22.
- Morgan MM, Whittier KL, Hegarty DM, Aicher SA (2008) Periaqueductal gray neurons project to spinally projecting GABAergic neurons in the rostral ventromedial medulla. *Pain* 140(2):376-86.
- Munro G (2007) Dopamine D₁ and D₂ receptor agonism enhances antinociception mediated by the serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor duloxetine in the rat formalin test. *European Journal of Pharmacology* 575, 66-74.
- Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H (2004) Dopamine receptor signalling. *J Recept Signal Transduct Res* 3:165-205.
- Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23:185-215.
- Nieoullon A, Amalric M (2002) Dopaminergic receptors: structural features and functional implications. *Rev Neurol* 158(122):59-68.

- Niesters M, Aarts L, Sarton E, Dahan A (2013) Influence of ketamine and morphine on descending pain modulation in chronic pain patients: a randomized placebo-controlled cross-over proof-of-concept study. *Br J Anaesth* 110: 1010–1016.
- Nir RR, Granovsky Y, Yarnitsky D, *et al.* (2011) A psychophysical study of endogenous analgesia: the role of the conditioning pain in the induction and magnitude of conditioned pain modulation. *Eur J Pain* 15:491–497.
- Nishiyama T (2005) Effects of a 5-HT_{2A} receptor antagonist, sarpogrelate on thermal or inflammatory pain. *Eur J Pharmacol* 516:18–22.
- Oono Y, Wang K, Baad-Hansen L, *et al.* (2014) Conditioned pain modulation in temporomandibular disorders (TMD) pain patients. *Exp Brain Res* 232:3111–3119.
- Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F (2010) Central modulation of pain. *J Clin Invest* 120: 3779–3787.
- Ossipov MH, Lai J, Vanderah TW, Porreca F (2003) Induction of pain facilitation by sustained opioid exposure: relationship to opioide antinociceptive tolerance. *Life Sci* 73(6):783–800.
- Otmakhov N, Tao-Cheng JH, Carpenter S, Asrican B, Dosemeci A, Reese TS, Lisman J (2004) Persistent accumulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dendritic spines after induction of NMDA receptor-dependent chemical long-term potentiation. *J. Neurosci.* 24, 9324–9331.
- Pasinetti G, Govoni S, di Giovine S, Spano PF, Trabucchi M (1984) Dopamine enhances Met-enkephalin efflux from rat striatal slices. *Brain Res* 293: 364–7.
- Pedersen LM, Gjerstad J (2007) Spinal cord long-term potentiation is attenuated by the NMDA-2B receptor antagonist Ro25-6981. *Acta Physiol (Oxf)* 192(3): 421–7.
- Pertovaara A, Wei H, Hämäläinen (1996) Lidocaine in the rostroventromedial medulla and the periaqueductal gray attenuates allodynia in neuropathic rats, *Neurosci. Lett.* 218:127–130.
- Peters CM, Hayashida K, Suto T, Houle TT, Aschenbrenner CA, Martin TJ, Eisenach JC (2015) Individual differences in acute pain-induced endogenous analgesia predict time to resolution of postoperative pain in the rat. *Anesthesiology* 122(4):895–907.
- Peters ML, Vlaeyen JWS, Kunnen AMW (2002) Is pain-related fear a predictor of somatosensory hypervigilance in chronic low back pain patients? *Behaviour Research and Therapy* 40(1) :85–103.
- Piché M, Arsenault M, Poitras P, Rainville P, Bouin M (2010) Widespread hypersensitivity is related to altered pain inhibition processes in irritable bowel syndrome. *Pain* 148:49–58.
- Piché M, Arsenault M, Rainville P (2009) Cerebral and cerebrospinal processes underlying counterirritation analgesia. *J Neurosci* 29:14236–14246.
- Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF (2002) Chronic pain and medullary descending facilitation. *TINS* 25:319–325.
- Price J, Mudge AW (1983) A subpopulation of rat dorsal root ganglion neurones is catecholaminergic. *Nature* 301(5897):241–3.
- Prinster SC, Hague C, Hall RA (2005) Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev* 57: 289–98.

- Pud D, Granovsky Y, Yarnitsky D (2009) The methodology of experimentally induced diffuse noxious inhibitory control (DNIC)-like effect in humans. *Pain* 144: 16–19.
- Qu S, Ondo WG, Zhang X, Xie WJ, Pan TH, Le WD (2006) Projections of diencephalic dopamine neurons into the spinal cord in mice. *Exp Brain Res* 168: 152–6.
- Qu XX, Cai J, Li MJ, Chi YN, Liao FF, Liu FY, Wan Y, Han JS, Xing GG (2008) Role of the spinal cord NR2B-containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain. *Exp Neurol*. 215(2): 298–307.
- Randic M, Jiang MC, Cerne R (1993) Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J Neurosci*. 13:5228– 5241.
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T (1994) Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol*. 45(2):330–4.
- Ren K, Hylden JL, Williams GM, Ruda MA, Dubner, R (1992) The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. *Pain* 50:331–344.
- Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, de Medina FS (2010) Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 401: 318–20.
- Rooney KF, Sewell RD (1989) Evaluation of selective actions of dopamine D-1 and D-2 receptor agonists and antagonists on opioid antinociception. *Eur J Pharmacol* 168: 329–36.
- Russell IJ, Vaeroy H, Javors M, Nyberg F (1992) Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35:550– 556.
- Sandkühler J (2007) Understanding LTP in pain pathways. *Mol Pain* 3:9.
- Sandkühler J, Gruber-Schoffenegger D (2012) Hyperalgesia by synaptic long-term potentiation (LTP): an update. *Curr Opin Pharmacol* 1:18–27.
- Sandrini G, Rossi P, Milanov I, Serrao M, Cecchini AP, et al (2006) Abnormal modulatory influence of diffuse noxious inhibitory controls in migraine and chronic tension-type headache patients. *Cephalalgia* 26: 782–789.
- Satoh O, Omote K (1996) Roles of monoaminergic, glycinergic and GABAergic inhibitory systems in the spinal cord in rats with peripheral mononeuropathy. *Brain Res* 728:27–36.
- Schoffelmeyer AN, Vanderschuren LJ, De Vries TJ, Hogenboom F, Wardeh Q, Mulder AH (2000) Synergistically interacting dopamine D 1 and NMDA receptors mediate nonvesicular transporter-dependent GABA release from rat striatal medium spiny neurons. *J Neurosci*. 20:3496 –3503.
- Schouenborg J (1984) Functional and topographical properties of field potentials evoked in rat dorsal horn by cutaneous C-fibre stimulation. *J Physiol*. 356:169–92.
- Schouenborg J, Sjölund BH (1983) Activity evoked by A- and C-afferent fibers in rat dorsal horn neurons and its relation to a flexion reflex. *J neurophysiol*. 50(5): 1108–21.
- Scott L, Kruse MS, Forssberg H, Brismar H, Greengard P, Aperia A (2002) Selective

- up-regulation of dopamine D1 receptors in dendritic spines by NMDA receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(3):1661-4.
- Scott L, Zelenin S, Malmersjö S et al. (2006) Allosteric changes of the NMDA receptor trap diffusible dopamine 1 receptors in spines. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(3):762-7.
- Seeman P, Ko F, Tallerico T (2005) Dopamine receptor contribution to the action of PCP, LSD and ketamine psychotomimetics. *Mol Psychiatry* 10:877-883.
- Shen K-F, Crain SM (1990) Cholera toxin-A subunit blocks opioid excitatory effects on sensory neuron action potentials indicating mediation by Gs-linked opioid receptors. *Brain Res* 525:225-231.
- Sheng HY, Qu CL, Huo FQ, Du JQ, Tang JS (2009) D2-like but not D1-like dopamine receptors are involved in the ventrolateral orbital cortex-induced antinociception: aGABAergic modulation mechanism. *Exp.Neurol.* 215:128-134.
- Simone DA, Baumann TK, Collins JG, LaMotte RH (1989) Sensitization of cat dorsal horn neurons to innocuous mechanical stimulation after intradermal injection of capsaicin. *Brain Res* 486(1):185-9.
- Skagerberg G, Björklund A, Lindvall O, Schmidt RH (1982) Origin and termination of the diencephalo-spinal dopamine system in the rat. *Brain Res Bull* 9: 237-244.
- Skagerberg G, Lindvall O (1985) Organization of diencephalic dopamine neurones projecting to the spinal cord in the rat. *Brain Res* 342: 340-51.
- Skagerberg G, Meister B, Hökfelt T, Lindvall O, Goldstein M, Joh T, Cuervo AC (1988) Studies on dopamine-, tyrosine hydroxylase- and aromatic L-amino acid decarboxylase-containing cells in the rat diencephalon: comparison between formaldehyde-induced histofluorescence and immunofluorescence. *Neuroscience* 2:605-20.
- Sluka K (2007) TENS, Mechanism of action. In: Encyclopedia of Pain (Muscle Pain Management) (eds Schmidt, RF, Willis, WD) pp. 2406-2409. Springer-Verlag, Berlin
- Sluka KA, Walsh D (2003) Transcutaneous electrical nerve stimulation: basic science mechanisms and clinical effectiveness. *J Pain* 4:109-21.
- Soderman AR, Unterwald EM (2009) Cocaine-induced mu opioid receptor occupancy within the striatum is mediated by dopamine D2 receptors. *Brain Res* 1296: 63-71.
- Somers DL, Clemente FR (2009) Contralateral high or a combination of high and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation reduces mechanical allodynia and alters dorsal horn neurotransmitter content in neuropathic rats. *J Pain* 10: 221-229.
- Sommer C, Myers RR (1995) Neurotransmitters in the spinal cord dorsal horn in a model of painful neuropathy and in nerve crush. *Acta Neuropathol.* 90(5): 478-85.
- Sorensen J, Bengtsson A, Ahlner J, Henriksson KG, Ekselius L, Bengtsson M (1997) Fibromyalgia: Are there different mechanisms in the processing of pain? A double blind crossover comparison of analgesic drugs. *J Rheumatol* 24:1615-1621.

- Sorensen J, Bengtsson A, Backman E, Henriksson KG, Bengtsson M (1995) Pain analysis in patients with fibromyalgia: Effects of intravenous morphine, lidocaine, and ketamine. *Scand J Rheumatol* 24:360-365.
- de Souza, F, Lombardi I, Barbosa RC; Tadeu F, Rejane N, Amorim RE, Alambert PA, da Costa R (2013) Investigation of stress, anxiety and depression in women with fibromyalgia: a comparative study. *Rev Bras Reumatol.* 54(1):27-32.
- Sprenger C, Bingel U, Buchel C (2011) Treating pain with pain: supraspinal mechanisms of endogenous analgesia elicited by heterotopic noxious conditioning stimulation. *Pain* 152:428-439.
- Staud R (2005) The neurobiology of chronic musculoskeletal pain (including chronic regional pain). In: Wallace DJ, Clauw DJ, eds. *Fibromyalgia and Other Central Pain Syndromes*. Philadelphia, Lippincott, Williams and Wilkins; 45-62.
- Staud R, Cannon RC, Mauderli AP, Robinson ME, Price DD, Vierck CJ Jr (2003) Temporal summation of pain from mechanical stimulation of muscle tissue in normal controls and subjects with fibromyalgia syndrome. *Pain* 102: 87-95.
- Stand R, Robinson ME & Price DD (2005) Isometric exercise has opposite effects on central pain mechanisms in fibromyalgia patients compared to normal controls. *Pain* 118:176-184.
- Staud R, Vierck Cj, Cannon RL, Mauderli AP, Price DD (2001) Abnormal sensitization and temporal summation of second pain (wind-up) in patients with fibromyalgia syndrome. *Pain* 91:165-75.
- Sullivan MJ, Bishop SR, Pivik J (1995) The Pain Catastrophizing Scale: Development and validation. *Psychol Assess* 7:524-32.
- Sullivan M, Tanzer M, Stanish W (2009) Psychological determinants of problematic outcomes following total knee arthroplasty. *Pain* 143(1-2):123-129.
- Suzuki R, Matthews EA, Dickenson AH (2001) Comparison of the effects of MK-801, ketamine and memantine on responses of spinal dorsal horn neurones in a rat model of mononeuropathy. *Pain* 91:101-109.
- Svendsen F, Tjølsen A, Hole K (1998) AMPA and NMDA receptor-dependent spinal LTP after nociceptive titanic stimulation. *Neuroreport* 9(6):1185-90.
- Svendsen F, Rygh LJ, Gjerstad J, Fiska A, Hole K, Tjolsen A (1999a) Recording of long-term potentiation in single dorsal horn neurons in vivo in the rat. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 4, 165-172.
- Svendsen F, Tjolsen A, Rygh LJ, Hole K (1999b) Expression of long-term potentiation in single wide dynamic range neurons in the rat is sensitive to blockade of glutamate receptors. *Neurosci. Lett.* 259, 25-28.
- Swett JE, Woolf CJ (1985) The somatotopic organization of primary efferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 231(1):66-77.
- Szücs M, Boda K, Gintzler AR (2004) Dual effects of DAMGO enkephalin and CTAP on adenylyl cyclase activity: implications for mu-opioid receptor Gs coupling. *J Pharmacol Exp Ther* 310:256-262.
- Tamae A, Nakatsuka T, Koga K, Kato G, Furue H, Katafuchi T, Yoshimura M (2005) Direct inhibition of substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord by activation of dopamine D2-like receptors. *J Physiol* 568:243-53.

- Tan AM, Stamboulian S, Chang YW, Zhao P, Hains AB, Waxman SG, Hains BC (2008a) Neuropathic pain memory is maintained by Rac1-regulated dendritic spine remodeling after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 28:13173–13183.
- Taniguchi W, Nakatsuka T, Miyazaki N, Yamada H, Takeda D, Fujita T, Kumamoto E, Yoshida M (2011) In vivo patch-clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on substantia gelatinosa neurons in the spinal cord. *Pain* 152:95-105.
- Taraskevich PS, Douglas WW (1978) Catecholamines of supposed inhibitory hypophysiotrophic function suppress action potentials in prolactin cells. *Nature* 276(5690):832-4.
- Tashani OA, Alabas OAM, Johnson MI (2010) Cold pressor pain responses in healthy libyans: Effect of Sex/Gender, Anxiety, and Body Size. *Gender Medicine* 7, 4.
- Terman GW, Eastman CI, Chavkin C (2001) Mu opiates inhibit long-term potentiation induction in the spinal cord slice. *J Neurophysiol* 85(2):485-94.
- Thomas KL, Laroche S, Errington ML, Bliss TV, Hunt SP (1994) Spatial and temporal changes in signal transduction pathways during LTP. *Neuron* 13, 737–745.
- Todd AJ, Hughes DI, Polgár E, Nagy GG, Mackie M, Ottersen OP, Maxwell DJ (2003) The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur J Neurosci* 17:13–27.
- Todd AJ, Spike RC (1992) Co-localization of Met-enkephalin and somatostatin in the spinal cord of the rat. *Neurosci Lett.* 145:71-4.
- Toomey TC, Mann JD, Abfishian S, Tompson-Pope S (1991) Relationship between perceived self-control of pain. *Pain Descr Function Pain* 45:129-133.
- Treister R, Pud D, Eisenberg E (2013) The dopamine agonist apomorphine enhances conditioned pain modulation in healthy humans. *Neurosci Lett* 548:115–119.
- Tritsch NX, Sabatini BL (2012) Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron* 76(1):33-50.
- Trudeau, LE, Emery, DG, and Haydon, PG (1996) Direct modulation of the secretory machinery underlies PKA-dependent synaptic facilitation in hippocampal neurons. *Neuron* 17:789-797.
- Valencia C, Vallandingham R, Demchak T (2015) Effect of high and low frequency TENS on central pain processing in patients with knee osteoarthritis and healthy controls. *The Journal of Pain* 16(4):S95.
- Vallejo MA, Rivera J, Esteve-Vivesc J, Rodriguez-Muñoz MF (2012) Use of the Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) to evaluate anxiety and depression in fibromyalgia patients. *Revista de Psiquiatría y Salud Mental* (English Edition) 5(2):107-114.
- Vanegas H y Schaible HG (2004) Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Rew.* 46:295-309.
- Vassal F, Créac'h C, Convers Ph, Laurent B, García-Larrea L, Peyron R (2013) Modulation of laser-evoked potentials and pain perception by transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS): A placebo-controlled study in healthy volunteers. *Clinical Neurophysiology* 124:1861-1867.
- Vera-Portocarrero LP, Zhang ET, King T, Ossipov MH, Vanderah TW, Lai J, Porreca F (2007) Spinal NK-1 receptor expressing neurons mediate opioid-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance via activation of descending pathways. *Pain* 129(1-2):35-45.

- Vowles KE, McCracken LM, Eccleston C (2007) Processes of change in treatment for chronic pain: the contributions of pain, acceptance, and catastrophizing. *Eur. J. Pain* 7:779-87.
- Wang H-Y, Friedman E, Olmstead MC, Burns LH (2005) Ultralow-dose naloxone suppresses opioid tolerance, dependence, and associated changes in mu opioid receptor-G protein coupling and G-beta/gamma signaling. *Neuroscience* 135:247-261.
- Wang J, O'Donnell P (2001) D(1) dopamine receptors potentiate nmda-mediated excitability increase in layer V prefrontal cortical pyramidal neurons. *Cereb Cortex*. 5:452-62.
- Wang JH, Kelly PT (1995) Postsynaptic injection of CA2+/CaM induces synaptic potentiation requiring CaMKII and PKC activity. *Neuron* 15, 443-452.
- Wang K, Svensson P, Sessle BJ, Cairns BE, Arendt-Nielsen L (2010) Painful conditioning stimuli of the craniofacial region evokes widespread DNIC responses in men and women. *Journal of Orofacial Pain* 24:255-261.
- Wang L, Gintzler AR (1997) Altered mu-opiate receptor-G protein signal transduction following chronic morphine exposure. *J Neurochem* 68:248-254.
- Wang R, King T, De Felice M, Guo W, Ossipov MH, Porreca F (2013) Descending facilitation maintains long-term spontaneous neuropathic pain. *J.Pain* 14(8): 845-53.
- Webster BS, Verma SK, Gatchel RJ (2007) Relationship between early opioid prescribing for acute occupational low back pain and disability duration, medical costs, subsequent surgery and late opioid use. *Spine* 32(19):2127-32.
- Wei H, Viisanen H, Pertovaara A (2009) Descending modulation of neuropathic hypersensitivity by dopamine D2 receptors in or adjacent to the hypothalamic A11 cell group. *Pharmacol Res.* 59(5):355-63.
- Weil-Fugazza J, Godefroy F (1993) Dorsal and ventral dopaminergic innervation of the spinal cord: functional implications. *Brain Res Bull* 30:319-324.
- van Wijk G, Veldhuijzen DS (2010) Perspective on diffuse noxious inhibitory controls as a model of endogenous pain modulation in clinical pain syndromes. *J Pain* 11:408-19.
- Wilkinson SM, Becker WJ, Heine JA (2001) Opiate use to control bowel motility may induce chronic daily headache in patients with migraine. *Headache* 41(3): 303-9.
- Williams DA & Clauw DJ (2009) Understanding Fibromyalgia: Lessons from the Broader Pain Research Community. *The Journal of Pain* 10(8):777-791.
- Williams JT, Ingram SL, Henderson G, Chavkin C, von Zastrow M, Schulz S, Koch T, Evans CJ, Christie MJ (2013) Regulation of μ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol Rev* 65:223-54.
- Wood PB (2004) Stress and dopamine: Implications for the pathophysiology of chronic widespread pain. *Med Hypotheses* 62:420-424.
- Wood PB, Glabus MF, Simpson R, Patterson II JC (2009) Changes in gray matter density in fibromyalgia: Correlation with dopamine metabolism. *The Journal of Pain* 10(6):609-618.
- Wood PB, Patterson II JC, Sunderland JJ, Tainter KH, Glabus MF, Lilien DL (2007) Reduced presynaptic dopamine activity in fibromyalgia syndrome demonstrated

- with positron emission tomography: A pilot study. *The Journal of Pain* 8(1): 51-58.
- Wood, PB, Schweinhardt, P, Jaeger, E, Dagher, A, Hakyemez, H, Rabiner, EA, Bushnell, MC, Chizh, BA (2007) Fibromyalgia patients show an abnormal dopamine response to pain. *Eur. J. Neurosci.* 25:3576-3582.
- Wood PL (1983) Opioid regulation of CNS dopaminergic pathways: a review of methodology, receptor types, regional variations and species differences. *Peptides* 4:595-601.
- Wood PL, Pasternak GW (1983) Specific mu 2 opioid isoreceptor regulation of nigrostriatal neurons: in vivo evidence with naloxonazine. *Neurosci Lett* 37:291-3.
- Wood PL, Stotland M, Richard JW, Rackham A (1980) Actions of mu, kappa, sigma, delta and agonist/antagonist opiates on striatal dopaminergic function. *J Pharmacol Exp Ther* 215:697-703.
- Woolf CJ (2007) Central sensitization: uncovering the relation between pain and plasticity. *Anesthesiology* 106:864-867.
- Woolf CJ (2011) Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* 152(3):S2-15.
- Woolf CJ, Salter MW (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288:1765-1769.
- Woolf CJ y Thompson SW (1991) The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 44:293-299.
- Xu M, Petraschka M, Mc Laughlin JP, Westenbroek RE, Caron MG, Lefkowitz RJ, Czyzyk TA, Pintar JE, Terman GW, CHavkin C (2004) Neuropathic pain activates the endogenous kappa opioid system in mouse spinal cord and induces opioid receptor tolerance. *J Neurosci.* 24(19):4576-84.
- Yang SW, Zhang C, Zhang ZH, Qiao JT, Dafny N (1996) Sequential mediation of norepinephrine-and dopamine-induced antinociception at the spinal level: involvement of different local neuroactive substances. *Brain Res Bull* 41:105-9.
- Yang HW, Zhou LJ, Hu NW, Xin WJ, Liu XG (2005) Activation of spinal dl/d5 receptors induces late-phase LTP of C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *J Neurophysiol.* 94:961-7.
- Yang X, Yang HB, Xie QJ, Liu XH, Hu XD (2009) Peripheral inflammation increased the synaptic expression of NMDA receptors in the spinal dorsal horn. *Pain* 144(1-2):162-9.
- Yao WD, Spealman RD, Zhang J (2009) Dopaminergic signalling in dendritic spines. *Biochem Pharmacol.* 75(11):2055-69.
- Yarnitsky D (2010) Conditioned pain modulation (the diffuse noxious inhibitory control-like effect): its relevance for acute and chronic pain states. *Curr Opin Anaesthesiol* 23:611-5.
- Yarnitsky D, Arendt-Nielsen L, Bouhassira D, Edwards RR, Fillingim RB, et al. (2010) Recommendations on terminology and practice of psychophysical DNIC testing. *Eur J Pain* 14:339.
- Yarnitsky D, Granot M, Nahman-Averbuch H, Khamaisi M, Granovsky Y (2012) Conditioned pain modulation predicts duloxetine efficacy in painful diabetic neuropathy. *Pain* 153(6):1193-8.

- Yashpal K, Fisher K, Chabot JG, Coderre TJ (2001) Differential effects of NMDA and group I mGluR antagonists on both nociception and spinal cord protein kinase C translocation in the formalin test and a model of neuropathic pain in rats. *Pain* 94:17–29.
- Yoon YW, Na HS, Chung JM (1996) Contributions of injured and intact afferents to neuropathic pain in an experimental rat model. *Pain* 64(1):27-36.
- Zarrindast MR, Nassiri-Rad S, Pazouki M (1999) Effects of dopaminergic agents on antinociception in formalin test. *Gen. Pharmacol.* 32:517–522.
- Zhao H, Zhu W, Pan T, Xie W, Zhang A, Ondo WG, et al. (2007) Spinal cord dopamine receptor expression and function in mice with 6-OHDA lesion of the A11 nucleus and dietary iron deprivation. *J. Neurosci.Res.* 85:1065–1076.
- Zhou LJ, Zhong Y, Ren WJ, Li YY, Zahng T, Liu XG (2008) BDNF induces late-phase LTP of C-fiber evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *Exp Neurol.* 212(2):507-14.
- Zhu H, Clemens S, Sawchuk M, Hochman S (2007) Expression and distribution of all dopamine receptor subtypes (D(1)-D(5)) in the mouse lumbar spinal cord: a real-time polymerase chain reaction and non-autoradiographic in situ hybridization study. *Neuroscience* 149:885-97.
- Zou X, Lin Q, Willis WD (2002) Role of protein kinase A in phosphorylation of NMDA receptor 1 subunits in dorsal horn and spinothalamic tract neurons after intradermal injection of capsaicin in rats. *Neuroscience* 11583:775-86.

ANEXOS

Synaptic upregulation and superadditive interaction of dopamine D2- and μ -opioid receptors after peripheral nerve injury



Zigor Aira^a, Teresa Barrenetxea^a, Itsaso Buesa^a, Juan Carlos Gómez-Esteban^{a,b}, Jon Jatsu Azkue^{a,*}

^aDepartment of Neurosciences, School of Medicine and Dentistry, University of the Basque Country, Bilbao, Spain

^bMovement Disorders and Autonomic Unit, Neurology Service, Cruces University Hospital, Basque Health Service (Osakidetza), Spain

Sponsorships or competing interests that may be relevant to content are disclosed at the end of this article.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2014

Received in revised form 9 September 2014

Accepted 11 September 2014

Keywords:

Neuropathic pain
Descending pathways
Electrophysiology
Rat

ABSTRACT

A sound strategy for improving the clinical efficacy of opioids involves exploiting positive interactions with drugs directed at other targets in pain pathways. The current study investigated the role of dopamine receptor D2 (D2R) in modulation of spinal dorsal horn excitability to noxious input, and interactions therein with μ -opioid receptor (MOR) in an animal model of neuropathic pain induced by spinal nerve ligation (SNL). C-fiber-evoked field potentials in the spinal dorsal horn were depressed concentration dependently by spinal superfusion with the D2R agonist quinpirole both in nerve-injured and sham-operated (control) rats. However, quinpirole-induced depression was significant at 10 μ mol/L after SNL but only at 100 μ mol/L in control rats. This quinpirole effect was completely abolished by MOR antagonist CTOP at subclinical concentration (1 μ mol/L) in nerve-injured rats, but was unaltered in sham-operated rats. Nine days after SNL, D2R was upregulated to both presynaptic and postsynaptic locations in dorsal horn neurons, as revealed by double confocal immunofluorescence stainings for synaptophysin and PSD-95. In addition, D2R/MOR co-localization was increased after SNL. Co-administration of 1 μ mol/L quinpirole, insufficient per se to alter evoked potentials, dramatically enhanced inhibition of evoked potentials by MOR agonist DAMGO, reducing the IC50 value of DAMGO by 2 orders of magnitude. The present data provide evidence of profound functional and subcellular changes in D2R-mediated modulation of noxious input after nerve injury, including positive interactions with spinal MOR. These results suggest D2R co-stimulation as a potential avenue to improve MOR analgesia in sustained pain states involving peripheral nerve injury.

© 2014 International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Opioid drugs as a class remain the most effective analgesics known for moderate and severe pain; however their clinical utility is limited by tolerance, fear of addiction, and undesired effects such as respiratory depression, sedation, and constipation [20,54,70]. The development of opioid analgesics devoid of side effects has not been fruitful, as both analgesia and side effects are most likely mediated by the same opioid receptor, namely the μ -opioid receptor (MOR) [70]. An alternative approach for improving the clinical efficacy of opioids involves exploiting superadditive or synergistic interactions with other drugs directed at different targets in pain pathways, including, for example, nonsteroidal anti-inflammatory

drugs [21,49,51] or α_2 -adrenergic drugs [17]. Still within this paradigm, centrally acting analgesics with a dual mechanism of action may be used with the goal of reducing potential side effects while retaining adequate analgesia. For example, MOR agonists such as dextromethorphan can improve tolerance through an antagonistic action on glutamate or NMDA-type receptors [29], whereas therapeutic ranges of MOR agonists such as tapentadol or tramadol are improved by inhibition of monoamine reuptake [13,43,67].

Mounting evidence supports a role for dopamine in modulation of nociceptive information. Dopamine-like immunoreactivity is profusely distributed throughout the gray matter of the spinal dorsal horn [31], and all 5 G-protein-coupled receptor types through which synaptic effects of dopamine are exerted, namely D1 through D5, have been found in the spinal cord [12,19,22,44,61,68,77,78]. The A11 region in the dorsal posterior hypothalamus is the sole known source of dopaminergic innervation to the dorsal horn [30,62], and diencephalospinal projections arising from these neurons inhibit nociceptive transmission at

* Corresponding author at: Department of Neurosciences, School of Medicine and Dentistry, University of the Basque Country, PO Box 699, 48080 Bilbao, Spain. Tel.: +34 94 6018379; fax: +34 94 6015055.

E-mail address: jonjatsu.azkue@ehu.es (J.J. Azkue).

the dorsal horn level, primarily via D2 receptors [19,24,40,64,65]. Studies show that D2R may establish complex interactions with opioid receptors, as D2R-agonists have so far been linked to both facilitation [55] and attenuation [34] of opioid analgesia, whereas D2R-blockade may reportedly potentiate [60] or diminish [55] MOR analgesia.

The current study was undertaken to evaluate functional interactions of D2R with MOR in the spinal dorsal horn, both in basal conditions and during neuropathic pain after experimental ligation of the L5 root. We recorded dorsal horn potentials elicited by electrical activation of C-fibers as an end point to evaluate the effects of D2R-stimulation and D2R/MOR. In addition, we used western blot analyses and confocal laser-scanning microscopy to evaluate changes in receptor expression as well as to gain insight into the anatomical site for D2R–MOR interaction.

2. Methods

2.1. Animals and spinal nerve ligation surgery

Animal experiments were performed according to the European Communities Council Directive (86/609/ECC) in adult male Sprague–Dawley rats (250–350 g; OF1, IFFA Credo, L'Arbresle, France). The protocols for animal care and use were approved by the appropriate committee at the University of the Basque Country. Efforts were made to keep the number of animals used to a minimum as well as to minimize animal suffering. The left spinal L5 nerve root was ligated as previously described [36] under 4% chloral hydrate anesthesia (0.4 g/kg, intraperitoneally). Animals that underwent sham operation received no nerve ligation, being otherwise identically prepared and assessed. After surgery, the animals were allocated to individual cages to recover, with food and water available *ad libitum*.

2.2. Electrophysiology

Procedures were carried out under urethane anesthesia (1.5 g/kg, *i.p.*). A tracheotomy was performed to maintain an open, low-resistance airway, and cannulae were inserted into the left common carotid artery and the right internal jugular vein for arterial blood pressure monitoring (mean 80–100 mm Hg) and continuous infusion of Tyrode's solution (in mmol/L: 137 NaCl, 2.7 KCl, 1.4 CaCl₂, 1 MgCl₂, 6 NaHCO₃, 2.1 NaH₂PO₄, 6.5 D-(+)-glucose; pH 7.4) at 0.8 to 1 mL per hour, respectively. Colorectal temperature was continuously monitored, and euthermia (37–38 °C) was maintained via a feedback-controlled under-body heating pad for the duration of the experimental procedure. The left sciatic nerve was exposed, gently freed from connective tissue, and placed onto platinum hook electrodes for bipolar electrical stimulation. Bilateral dorsal laminectomies were performed at vertebrae T13 to L1, the vertebral column was immobilized to a rigid frame, and the dura mater overlying lumbosacral spinal segments was carefully removed.

The electrophysiological setup was essentially as described previously [7]. Tungsten microelectrodes (impedance 5 MΩ) were inserted 1 mm lateral to the spinal mid-line at a depth of 100 to 300 μm from the dorsal surface of the cord, that is, into laminae I to II, by means of a hydraulic microdrive. The position of the tip of the recording electrode in the spinal cord was marked with a small electrolytic lesion by delivery of an anodal current through the recording electrode (50 μA for 10 seconds) and histologically verified. Single monophasic, square-wave electrical pulses were delivered as test stimuli to the sciatic nerve trunk at a mid-thigh level on a per-minute basis by means of a computer-controlled stimulus isolator, and the elicited spinal field potentials were amplified (analog band-pass set at 1–550 Hz), displayed on an

oscilloscope, and digitized to a personal computer (PC) at a 10-kHz sampling rate via an A/D converter card (MIO16; National Instruments, Austin, TX). Electrical stimulation of the sciatic nerve trunk did not permit us to discern the relative contribution of cutaneous, muscle, and joint fibers to the recorded signals. Care was taken to avoid stimulus repetition. Field potentials were evoked in superficial laminae of the spinal dorsal horn by suprathreshold, electrical C fiber-stimulation (3- to 3.5-mA pulses of 0.5 milliseconds' duration) and quantified as described previously [14].

To measure the ability of D2R to modulate C-fiber-evoked spinal field potentials, these were recorded during spinal superfusion with successively increasing, cumulative concentrations of the selective agonist quinpirole. Each drug concentration change lasted for 20 minutes; only the last 10 evoked field potentials were extracted for analysis from the baseline control period and from each treatment period. The areas of field potentials evoked during each treatment period were compared to those recorded during a control aCSF superfusion period, by using univariate analysis of variance and post hoc Bonferroni or Tamhane multiple comparison tests. To assess the influence of MOR on D2R-mediated modulation of evoked field potentials, quinpirole was administered in combination with the MOR antagonist CTOP. As CTOP has been shown to disinhibit C-fiber-evoked spinal field potentials in nerve-injured rats [15], the drug was administered here at a subclinical dose, that is, one low enough (1 μmol/L) not to significantly alter evoked potentials. In preliminary experiments, we determined that 1 μmol/L CTOP did not alter D-Ala-deltorphin II-induced depression of evoked potentials, thus ruling out an antagonist effect of the drug on spinal δ-opioid receptors. To evaluate the influence of D2R on the depressing effect of DAMGO on spinal field potentials in nerve-injured rats, we superfused the spinal cord with increasing, cumulative concentrations of DAMGO in combination with quinpirole, either at the least effective concentration for a statistically significant depressing effect (10 μmol/L) or at a subclinical concentration, that is, one insufficient per se for significant depression.

2.3. Drug preparation and delivery

Drugs used for *in vivo* electrophysiological recordings included D2R agonist (4aR,8aR)-5-propyl-4,4a,5,6,7,8,8a,9-octahydro-1H-pyrazolo[3,4-g]quinoline (quinpirole), MOR-agonist [D-Ala², NMe-Phe⁴, Gly-ol⁵]-enkephalin (DAMGO), and MOR antagonist D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂ (CTOP), all 3 from Tocris (Bristol, UK). Stock solutions were obtained by diluting drug powder in doubly distilled water, and working solutions were prepared in artificial cerebrospinal fluid (aCSF; in mmol/L: 130 NaCl, 3.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 1.2 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 10 D-(±) glucose; pH 7.4) immediately before delivery. Drugs were applied in small volumes (10–15 μL) by controlled superfusion via a silicon, 40 to 50-mm² pool attached to the dorsal surface of the spinal cord [10].

2.4. Western blot assays

Rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, *i.p.*) and sacrificed by decapitation. L4 to L5 segments were quickly extracted into ice-cold aCSF. Tissue was separated and homogenized mechanically with a motor-driven glass/glass tissue homogenizer in ice-cold lysis buffer (10 mmol/L Tris, pH 7.6, 320 mmol/L sucrose, 5 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA]) containing protease inhibitors (5 mmol/L ethylene glycol tetraacetic acid [EGTA], 1 mmol/L phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 10 U/mL aprotinin, 0.0001% chymostatin, 0.0001% leupeptin, and 0.0001% pepstatin). Bilateral dorsal horn samples were processed. Homogenates were centrifuged at

1000g for 10 minutes to remove cell nuclei from the low supernatant.

BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) was used for determining protein concentration for western blot assays. Identical amounts of protein (50 μ g) were loaded to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) using 8% running gels and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). After a blocking step with 5% non-fat milk in PBST for 1 hour at RT, membranes were incubated overnight at 4 °C with an affinity-purified goat polyclonal antiserum to D2R (1:1000; D2DR Antibody (N-19) sc-7522 from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Membranes were then washed 3 times in PBST for 10 minutes and incubated with horseradish peroxidase (HRP)–conjugated donkey anti-goat antisera (1:5000; GE Healthcare, Barcelona, Spain) for 1 hour at room temperature (RT). Thermo Scientific SuperSignal Chemiluminescent Substrate was used to detect HRP on the blots. Reversible validated Ponceau staining was used to check equal loading of gels [3,59]. Protein load, antiserum dilution and film development parameters were adjusted to optimize visualization of both strongly and weakly stained bands. For quantitation, protein band densities were analyzed by using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Dorsal horn homogenates from control animals (sham-operated) were used as the reference to normalize protein band densities in relative density analyses. The Student *t* test was used for comparison to the reference condition.

2.5. Confocal immunofluorescence

Deeply anesthetized rats (sodium pentobarbital 50 mg/kg, i.p.) were perfused transcardially with 250 mL 0.9% saline followed by 900 mL 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PB; 0.1 mol/L, pH 7.4). L4 to L5 spinal segments were removed, post-fixed with 4% paraformaldehyde in PB for 4 hours, and then cryoprotected for 48 hours with 30% sucrose in phosphate buffered saline (PBS) at 4 °C. Coronal, 40- μ m-thick cryotome sections were serially collected in PBS and preincubated with 1% bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO) and 1% normal serum (1 hour, RT). Sections were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies. These included a goat polyclonal to D2R (1:500, D2DR Antibody (N-19) sc-7522 from Santa Cruz Millipore, Santa Cruz, CA), a mouse monoclonal to PSD-95 (1:400, Thermo Scientific, IL), a mouse monoclonal to neuronal nuclear antigen (NeuN; 1:400, Millipore, MA), and rabbit antisera to synaptophysin (1:400, Abcam, Cambridge, UK) or MOR 1:500, Millipore, MA). Specificity of the primary antibody to D2R had been confirmed previously by comparing immunostaining in transfected cells [39]. Antibody specificity was further confirmed here by preabsorption with an excess of antigen (D2DR N-19, sc-7522, from Santa Cruz, Santa Cruz, CA) at a 3:1 mass ratio of peptide to IgG for 2 hours at RT, which abolished all specific immunostaining in dorsal horn cells. After preincubations with normal serum of species other than those in which the secondary antibodies were raised, sections were sequentially incubated with Cy5 650-conjugated donkey anti-rabbit, Dylight 549-conjugated donkey anti-mouse, and Alexa 488-conjugated donkey anti-goat fluorescent antibodies (1:200, Jackson Immuno-Research, West Grove, PA) and mounted in Mowiol (Vector Labs, Burlingame, CA). Specificity of the primary antibody to D2R was tested here by preabsorption with an excess of antigen, D2DR (N-19) P sc-7522, (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) at a 3:1 mass ratio of peptide to IgG for 2 hours at RT, followed by immunofluorescence analysis in spinal cord tissue sections. Sections were viewed in a Fluoview FV500 Olympus confocal microscope, and digital photomicrographs were acquired sequentially to avoid overlapping of fluorescent emission spectra. ImageJ software (Intensity Correlation plug-in) [45] was used to adjust brightness and contrast, to

obtain image co-localization overlays, as well as to carry out intensity correlation–based analyses of confocal photomicrographs of labeled tissue. Only those micrographs intended for illustration were adjusted for brightness and contrast. The Pearson correlation coefficients were used to assess colocalization, and the Fisher exact test was used to compare Pearson coefficients.

3. Results

3.1. Functional upregulation of D2R and necessity of co-activation of MOR

In sham-operated rats, spinal superfusion with the D2R agonist quinpirole reduced dorsal horn field potentials evoked by C-fiber input in a concentration dependent manner, inducing significant depression by 18.74% \pm 0.41% at 100 μ mol/L concentration ($P < .01$ at the Bonferroni test, relative to aCSF baseline; Fig. 1). Quinpirole-induced depression was more pronounced in nerve-ligated rats, such that significant depression by 28.94% \pm 0.18% was already significant at 10 μ mol/L concentration ($P < .01$ vs baseline), and potentials were reduced by 46.84% \pm 0.25% at 100 μ mol/L.

To investigate the involvement of MOR in spinal depression promoted by D2R in dorsal horn neurons, we co-administered CTOP, a MOR antagonist, in both sham-operated and nerve-injured rats. Co-administration of CTOP did not significantly affect quinpirole-induced depression of evoked potentials in sham-operated

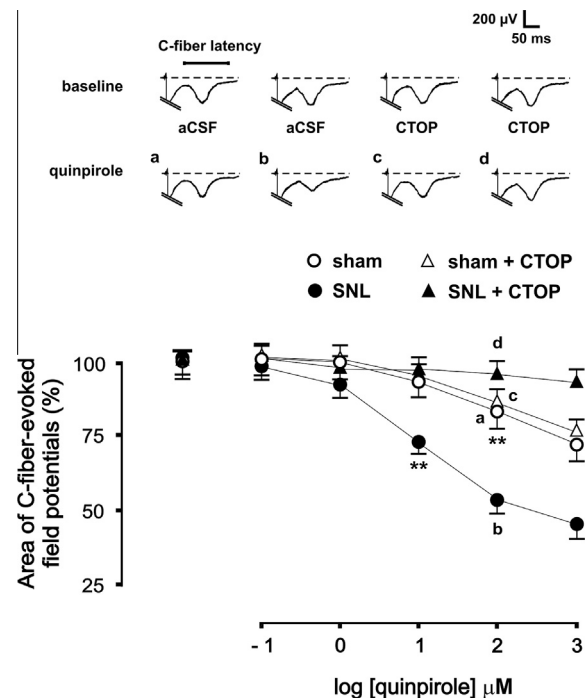


Fig. 1. Functional upregulation of D2R-induced depression of C-fiber-evoked potentials and dependence on μ -opioid receptors (MOR) after spinal nerve ligation (SNL). Mean areas of C-fiber-evoked potentials are shown during spinal superfusion with increasing, cumulative concentrations of the selective D2R agonist quinpirole. Although quinpirole administration significantly reduced evoked potentials at 100 μ mol/L in sham-operated rats (open circles), depression by the effect of the drug was enhanced in nerve-injured rats, 9 days after surgery, as shown by the significant reduction effect at 10 μ mol/L (solid circles). Modulation of evoked potentials by quinpirole was unaltered during simultaneous superfusion with the selective MOR antagonist CTOP at subclinical concentration (1 μ mol/L) in uninjured rats (open triangles); however, it was completely abolished in nerve-injured rats (solid triangles). Representative recordings at the top illustrate the effect of quinpirole on evoked potentials in the 4 experimental conditions. ** Significant differences at $P < .01$, Bonferroni test, relative to baseline. For clarity, only the least significant effects have been labeled.

rats ($18.01\% \pm 0.32\%$ decrease at $100 \mu\text{mol/L}$, $P < .01$), but fully abolished the depressant effect of quinpirole in nerve-ligated rats (Fig. 1).

3.2. Synaptic upregulation of D2R and co-localization with MOR

D2R expression was assessed bilaterally by Western blotting in dorsal horn homogenates. As quantified by band density analysis, the presence of D2R protein was significantly ($P < .01$, Student *t* test) and bilaterally increased 9 days after injury in rats subjected to spinal nerve ligation (SNL), relative to sham-operated rats (Fig. 2). To determine whether this global increase involved upregulation of D2R expression in synaptic compartments, we carried out double immunofluorescence experiments using selective antibodies to presynaptic or postsynaptic markers synaptophysin or PSD-95, respectively (Fig. 2). The results showed significantly increased co-localization of D2R with both PSD-95 (Rr 0.78 in correlation analysis) and synaptophysin (Rr 0.84) in lumbar sections from nerve-injured rats, as compared to sections from rats in the sham (control) condition (Rr 0.23 and Rr 0.24, respectively, yielding $z = -40.77$ and $z = -49.07$, Fisher's exact test, both $P < .01$).

Triple immunofluorescence experiments using antibodies to MOR and neuronal marker NeuN revealed low levels of D2R/MOR co-localization in the neuropilum of the spinal dorsal horn in uninjured rats (Rr 0.16 in correlation analysis of MOR/D2R co-localization). However, co-localization was greatly increased in nerve-injured rats 9 days after surgery (Rr 0.84 for MOR/D2R co-localization, $z = -93.84$; $P < .01$ at the Fisher exact test) (Fig. 2).

3.3. D2R enhancement of MOR depression of evoked responses

We examined whether pharmacological stimulation of D2R with quinpirole would influence MOR-mediated depression of potentials evoked in the dorsal horn by C-fiber input. Spinal superfusion with MOR agonist DAMGO at 100 nmol/L alone significantly reduced evoked potentials in neuropathic rats ($37.52\% \pm 0.61\%$, $P < .01$, $n = 5$; reduction was $67.9\% \pm 0.48\%$ at $1 \mu\text{mol/L}$ concentration) (Fig. 3).

Administration of $1 \mu\text{mol/L}$ quinpirole dramatically enhanced DAMGO-mediated depression of C-fiber-evoked potentials, such that the least effective drug concentration for a significant reduction effect was lowered by 2 orders of magnitude ($16.66\% \pm 0.57\%$ reduction by 1 nmol/L DAMGO, $P < .01$). The IC_{50} value of DAMGO was significantly decreased during concomitant administration of quinpirole (from $158 \pm 1.31 \text{ nmol/L}$ to $11 \pm 1.37 \text{ nmol/L}$; $P < .01$ at the Student *t* test).

4. Discussion

The present study provides evidence for anatomical and functional upregulation of the D2R system during neuropathic pain secondary to SNL. After SNL, D2R-mediated depression of evoked potentials becomes both enhanced and dependent on MOR. We show that the D2R/MOR interaction is superadditive and is accompanied by upregulation of both receptors to synaptic sites.

4.1. Enhanced D2R-mediated modulation after SNL involves synaptic upregulation

Stimulation of D2R in the spinal dorsal horn by the agonist drug quinpirole exerted significant, concentration-dependent depression of field potentials evoked by C-fiber input. Such a depressant effect agrees with findings from previous behavioral studies [8,9,46] as well as intracellular and extracellular recordings in the dorsal horn and trigeminocervical complex [19,24,40,64,65].

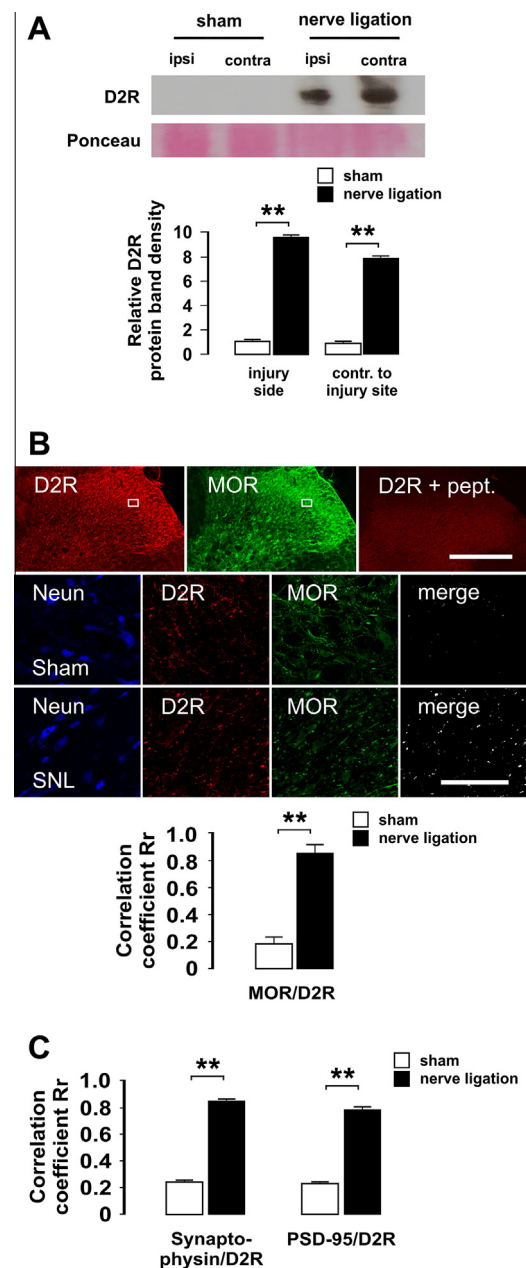


Fig. 2. Synaptic upregulation of D2R and enrichment in μ -opioid receptors (MOR) in the lumbar dorsal horn after spinal nerve ligation (SNL). (A) Western blot analysis of D2R protein expression in dorsal horn homogenates from sham-operated rats and nerve-injured rats 9 days after surgery. D2R expression is dramatically increased bilaterally in spinal cord tissue after SNL. Band density analysis at the bottom shows increased density in nerve-injured rats relative to homogenates from uninjured rats. ** Significant differences at $P < .01$ with Student *t* test. (B) Doubly-labeled (upper row) and triply-labeled (middle and bottom rows) transverse lumbar sections including immunostainings for D2R (red channel), MOR (green channel), and neuronal marker NeuN (blue channel). Low-power micrographs show the distribution of MOR- and D2R-like immunoreactivities in the dorsal horn of control, untreated rats (scale bar = $200 \mu\text{m}$). D2R immunofluorescence was abolished after preabsorption with excess antigen (upper-right micrograph). Triple immunofluorescence reveals low levels of D2R and MOR co-localization (merge channel) in the neuropilum in uninjured animals, but increased co-localization after SNL, 9 days after surgery. Scale bar = $20 \mu\text{m}$. Bar graph shows correlation analyses of D2R/MOR immunostainings. ** $P < .01$, Fisher exact test. (C) Correlation analyses of D2R co-localization with presynaptic and postsynaptic markers synaptophysin and PSD-95, respectively, from double immunofluorescence stainings of transverse lumbar cord sections from sham-operated and nerve-injured rats. Correlations of D2R with synaptophysin and PSD-95 were both significantly increased after SNL. ** Statistically significant differences at $P < .01$, Fisher exact test. Scale bar = $3 \mu\text{m}$.

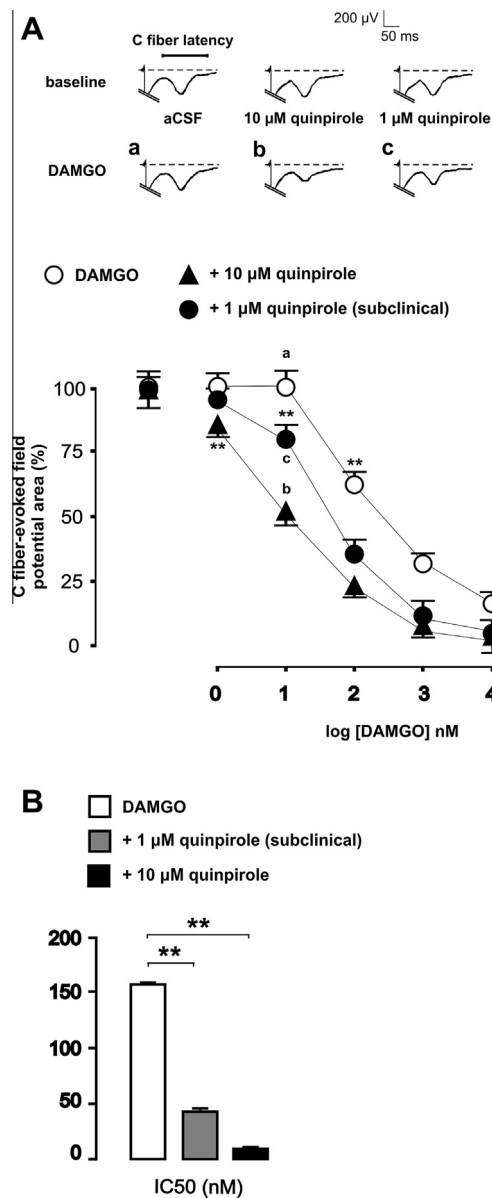


Fig. 3. Stimulation of D2R facilitates μ -opioid receptor (MOR)-mediated depression of dorsal horn excitability to noxious input in neuropathic rats. (A) Mean areas of C-fiber-evoked potentials are shown during spinal superfusion with MOR agonist DAMGO at increasing cumulative concentrations. Whereas evoked potentials are significantly decreased by administration of 100 nmol/L DAMGO alone (open circles), the least effective concentration of DAMGO for a significant depressive effect is lowered to 1 nmol/L during co-administration with the D2R agonist quinpirole at 10 μ M/L (triangles) or to 10 nmol/L in the presence of a subclinical concentration (1 μ M/L) of quinpirole (solid circles). (B) Bar graph showing IC₅₀ values of DAMGO in neuropathic rats when administered either alone or in combination with quinpirole at 1 μ M/L (subclinical) or 10 μ M/L. ** Statistically significant at $P < .01$, Student t test).

In this study, we show, for the first time, that the efficacy of D2R in modulating spinal excitation to noxious input is enhanced after nerve injury. This result implies that dopaminergic spinopetal pathways, most likely emerging from the A11 cell group [30,62], are recruited by ongoing pain. This finding lends support to the notion that A11-spinal neurons are involved in mediating inhibition by diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) via D2R [40]. This finding is also relevant to the clinical pain scenario, as this diencephalospinal projection has been implicated in the pathophysiology of migraine [2,18,19,33], and alterations in the DNIC

response are thought to be critical in human pain conditions [69,76].

The observed functional upregulation of D2R in the dorsal horn was accompanied by greater availability of the receptor at active synaptic sites. In the present study, Western blot analyses showed a dramatic, bilateral increase in D2R expression in dorsal horn homogenates from nerve-injured rats. Furthermore, confocal immunofluorescence stainings revealed heavily increased co-localization of D2R with both the presynaptic and postsynaptic markers synaptophysin and PSD-95, respectively. These observations agree with electrophysiological evidence that D2R serves both presynaptic and postsynaptic functions [75], including in dorsal horn neurons [65].

Bilateral changes in D2R expression may be related to the partially bilateral nature of the A11 diencephalospinal pathway [1,58]. In addition, this projection may mediate diffuse modulatory responses with little segmental or lateral selectivity [62,40]. Receptor trafficking to active synaptic sites is a fundamental mechanism in determining synaptic strength at excitatory and inhibitory synapses [5,41,48]. Thus, in the context of neuroplastic adaptations that follow SNL, subcellular changes in D2R organization as shown here may be seen as instrumental in functional upregulation of descending dopaminergic modulation of C-fiber-evoked responses.

4.2. D2R-mediated modulation requires co-activation of MOR after nerve injury

We have shown that MOR does not intervene in D2R-mediated modulation of dorsal horn responses to noxious input under basal conditions. This agrees with results from previous studies showing that direct, intrathecal application of opioid antagonist naloxone to dorsal horn neurons fails to alter dopamine-induced increases in tail-flick latencies [46,74]. A major finding in this study is that the functional upregulation of D2R-mediated modulation that develops after SNL requires concurrent recruitment of MOR, suggesting that cellular or molecular determinants of dopaminergic function in the dorsal horn involve a close interplay with the spinal opioidergic system. Indeed, in this study, the MOR antagonist CTOP abolished quinpirole-mediated depression of evoked potentials at a lower concentration than that required for a direct, significant effect on evoked potentials. Although the molecular basis for this change is unclear, opioidergic modulation of dopamine efflux in the dorsal horn can be considered as a potential mechanism. Consistent with this view is the fact that opioids can influence dopamine release in the CNS [71–73] and promote the release of endogenous MOR ligands (such as met-enkephalin) that are present in superficial laminae of the dorsal horn [50] and are known to be promoted by noxious stimulation [16,42]. This suggests that an important determinant of D2R-mediated modulation may be endogenous MOR activity, which becomes tonically active after SNL while showing negligible activity basally [15]. Nevertheless, although this mechanism may predict that MOR-blockade in nerve-ligated rats reduces the inhibitory actions of D2R to those levels found in uninjured animals, it may hardly account for the complete impairment of D2R inhibition. Thus, our present findings appear to suggest a higher level of complexity in changes affecting D2R/MOR interaction than is involved in the mere modulation of neurotransmitter release. Here, we provide direct evidence for an anatomical site of D2R/MOR interaction by showing that the heightened expression of D2R after SNL occurred at MOR-enriched synaptic loci. Such a shared location provides unique conditions for interactions at the level of intracellular transduction signaling, and also is consistent with protein–protein interactions, although the level of resolution of the present immunostainings cannot substantiate this latter possibility. For example, studies in striatal neurons

have suggested that co-expression of D2R with MOR [4] may underlie heterologous desensitization of the MOR and hence receptor interaction at the protein–protein level [63]. In this sense, heteromerization with other G-protein–coupled receptors (GPCRs) confer opioid receptors with functional properties distinct from those in homogeneous populations, including unique G-protein coupling and pharmacological properties, or horizontal membrane diffusion and trafficking [27,57]. This level of interaction is consistent with the observed D2R-mediated inhibition becoming dependent on MOR after SNL, as a receptor unit in the heteromer can become dependent on co-stimulation of 2 or more receptor units in the heteromer [23,25]. The increased presence of both MOR and D2R at synaptic locations, as shown in the present study, supports the notion that subcellular adaptations after nerve injury entail repositioning of both receptors to active zones, that is, a scenario in which the occurrence of protein–protein interactions between GPCRs is indeed conceivable.

4.3. Enhancement of MOR by D2R activation

To gain further insight into D2R/MOR interactions in the context of neuroadaptive changes triggered by SNL, we investigated whether D2R activation exerts an influence over MOR antinociception, by evaluating the suppressive effect of DAMGO on C-fiber-evoked potentials in the presence of a subclinical concentration of the D2R agonist quinpirole, that is, one that does not suffice, per se, to alter evoked potentials. We found that subclinical quinpirole dramatically increased the potency of DAMGO, supporting the notion that there is a powerful positive interaction between D2R and MOR (Fig. 3).

Dopamine receptors can influence the levels and release of MOR agonist enkephalin [26,32,47,56], as well as MOR turnover in the CNS [6]. Regarding opioid antinociception, the direction of dopaminergic influence remains inconclusive, in view of the fact that both facilitating and impairing effects at the basal level have been suggested, and observed effects may depend on the dose, administration route, and evaluation paradigm [34,37,38,52,55,60,66]. The present data using direct drug administration to dorsal horn neurons via superfusion suggest that the plasticity of descending dopaminergic systems that is triggered by nerve injury involves superadditive D2R/MOR interactions [11] at the spinal level of nociceptive processing. This is of potential clinical relevance, because the actual scenario of administration of opioid analgesics in humans is commonly that of sustained or chronic pain, where plastic changes in the CNS are likely already established.

Co-localization of both receptors in a subset of dorsal horn neurons, probably excitatory interneurons [35], anticipates the occurrence of interaction at the intracellular level. Theoretically, D2R and MOR may interact through convergent membrane potassium channel opening in the same neurons, as this mechanism has been described as associated with activation of D2R in dorsal horn neurons [64,65] as well as with that of MOR elsewhere in the CNS [28,53]. Furthermore, we have previously reported synergistic heterologous facilitation of δ -opioid receptor function after SNL [15], and abundant evidence supports superadditive interactions between opioid and other receptors, such as those of the α_2 type, as reviewed elsewhere [17]. As discussed above, the potential for hetero-oligomeric complex formation, which is a common property of GPCR heteromers [23,25], might provide a basis for understanding intermolecular cross-talk mechanisms that subserve the mutual influence of D2R and MOR during sustained pain.

Our present results are the first indication of a facilitatory phenomenon of MOR-mediated modulation of nociceptive information in the spinal dorsal horn by concurrent activation of D2R. Importantly, this facilitatory effect is found in the context of mutual, bidirectional D2R/MOR interaction that is triggered by SNL. From

a pathophysiological point of view, these findings suggest that the dopaminergic A11-spinal pathway may effectively potentiate spinal MOR function and may thus be seen as a major, albeit as yet relatively unexplored, contributor to antinociception during sustained pain. Upregulation of both MOR and D2R to synaptic sites suggests the possible involvement of intermolecular cross-talk mechanisms subserving the mutual influence of D2R and MOR. Finally, from a therapeutic stance, the data reveal a novel mechanism of MOR regulation that holds the potential for reducing MOR agonist doses and undesired side effects by simultaneously targeting the spinal D2R while achieving improved antinociception. Future studies are warranted to address safety issues of D2R-active drugs as adjuvant therapy to opioids and the suitability of a spinal route of administration in the patient with pain.

Conflict of interest

The authors state that there are no financial or other arrangements that might lead to a conflict of interest for this study.

Acknowledgements

Supported by the Government of the Basque Country under program SAIOTEK (SA-2010/00110, S-PR12UN001) and Ayudas a Grupos de Investigación del Sistema Universitario Vasco, as well as by the University of the Basque Country (Ayudas para la Especialización de Personal Investigador).

References

- [1] Abdallah K, Artola A, Monconduit L, Dallel R, Luccarini P. Bilateral descending hypothalamic projections to the spinal trigeminal nucleus caudalis in rats. *PLoS ONE* 2013;8:e73022.
- [2] Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. *Nat Rev Neurosci* 2011;12:570–84.
- [3] Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods* 2008;172:250–4.
- [4] Ambrose LM, Unterwald EM, Van Bockstaele EJ. Ultrastructural evidence for co-localization of dopamine D2 and micro-opioid receptors in the rat dorsolateral striatum. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;279:583–91.
- [5] Anggono V, Huganir RL. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 2012;22:461–9.
- [6] Azaryan AV, Clock BJ, Cox BM. Mu opioid receptor mRNA in nucleus accumbens is elevated following dopamine receptor activation. *Neurochem Res* 1996;21:1411–5.
- [7] Azkue JJ, Liu XG, Zimmermann M, Sandkühler J. Induction of long-term potentiation of C fibre-evoked spinal field potentials requires recruitment of group I, but not group II/III metabotropic glutamate receptors. *PAIN[®]* 2003;106:373–9.
- [8] Barasi S, Ben-Sreti MM, Clatworthy AL, Duggal KN, Gonzalez JP, Robertson J, Rooney KF, Sewell RD. Dopamine receptor-mediated spinal antinociception in the normal and haloperidol pretreated rat: effects of sulpiride and SCH 23390. *Br J Pharmacol* 1987;90:15–22.
- [9] Barasi S, Duggal KN. The effect of local and systemic application of dopaminergic agents on tail flick latency in the rat. *Eur J Pharmacol* 1985;117:287–94.
- [10] Beck H, Schröck H, Sandkühler J. Controlled superfusion of the rat spinal cord for studying non-synaptic transmission: an autoradiographic analysis. *J Neurosci Methods* 1995;58:193–202.
- [11] Berenbaum MC. What is synergy? *Pharmacol Rev* 1989;41:93–141.
- [12] Bergerot A, Storer RJ, Goadsby PJ. Dopamine inhibits trigeminovascular transmission in the rat. *Ann Neurol* 2007;61:251–62.
- [13] Besson JM, Vickers MD. Tramadol analgesia. Synergy in research and therapy. *Drugs* 1994;47:1–2.
- [14] Buesa I, Ortiz V, Aguilera L, Torre F, Zimmermann M, Azkue JJ. Disinhibition of spinal responses to primary afferent input by antagonism at GABA receptors in urethane-anaesthetised rats is dependent on NMDA and metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 2006;50:585–94.
- [15] Buesa I, Urrutia A, Aira Z, Salgueiro M, Bilbao J, Mozas M, Aguilera L, Zimmermann M, Azkue JJ. Depression of C fibre-evoked spinal field potentials by the spinal delta opioid receptor is enhanced in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain: involvement of the mu-subtype. *Neuropharmacology* 2008;55:1376–82.

- [16] Cesselin F, Bourgoin S, Mauborgne A, Hamon M, Le Bars D. Freezing of enkephalinergic functions by multiple noxious foci: a source of pain sensitization? *PLoS ONE* 2009;4:e6874.
- [17] Chabot-Doré AJ, Schuster DJ, Stone LS, Wilcox GL. Analgesic synergy between opioid and alpha-2 adrenergic receptors. *Br J Pharmacol* 2014, in press.
- [18] Charbit AR, Akerman S, Goadsby PJ. Dopamine: what's new in migraine? *Curr Opin Neurol* 2010;23:275–81.
- [19] Charbit AR, Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. Neurons of the dopaminergic/calcitonin gene-related peptide A11 cell group modulate neuronal firing in the trigeminothalamic complex: an electrophysiological and immunohistochemical study. *J Neurosci* 2009;29:12532–41.
- [20] Christie MJ. Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol* 2008;154:384–96.
- [21] Christie MJ, Connor M, Vaughan CW, Ingram SL, Bagley EE. Cellular actions of opioids and other analgesics: implications for synergism in pain relief. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27:520–3.
- [22] Dubois A, Savasta M, Curet O, Scatton B. Autoradiographic distribution of the D1 agonist [3H]SKF 38393, in the rat brain and spinal cord. Comparison with the distribution of D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 1986;19:125–37.
- [23] Ferré S, Agnati LF, Ciruela F, Lluís C, Woods AS, Fuxe K, Franco R. Neurotransmitter receptor heteromers and their integrative role in 'local modules': the striatal spine module. *Brain Res Rev* 2007;55:55–67.
- [24] Fleetwood-Walker SM, Hope PJ, Mitchell R. Antinociceptive actions of descending dopaminergic tracts on cat and rat dorsal horn somatosensory neurones. *J Physiol* 1988;399:335–48.
- [25] Fuxe K, Ferré S, Genedani S, Franco R, Agnati LF. Adenosine receptor–dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiol Behav* 2007;92:210–7.
- [26] George SR, Kertesz M. Met-enkephalin concentrations in striatum respond reciprocally to alterations in dopamine neurotransmission. *Peptides* 1987;8:487–92.
- [27] George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, O'Dowd BF. Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem* 2000;275:26128–35.
- [28] Grigg JJ, Kozasa T, Nakajima Y, Nakajima S. Single-channel properties of a G-protein-coupled inward rectifier potassium channel in brain neurons. *J Neurophysiol* 1996;75:318–28.
- [29] Hewitt DJ. The use of NMDA-receptor antagonists in the treatment of chronic pain. *Clin J Pain* 2000;16:S73–9.
- [30] Hökfelt T, Phillipson O, Goldstein M. Evidence for a dopaminergic pathway in the rat descending from the A11 cell group to the spinal cord. *Acta Physiol Scand* 1979;107:393–5.
- [31] Holstege JC, Van Dijken H, Buijs RM, Goedknegt H, Gosens T, Bongers CM. Distribution of dopamine immunoreactivity in the rat, cat and monkey spinal cord. *J Comp Neurol* 1996;376:631–52.
- [32] Hong JS, Yang HY, Fratta W, Costa E. Rat striatal methionine-enkephalin content after chronic treatment with cataleptogenic and noncataleptogenic antischizophrenic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1978;205:141–7.
- [33] Kagan R, Kainz V, Burstein R, Nosedà R. Hypothalamic and basal ganglia projections to the posterior thalamus: possible role in modulation of migraine headache and photophobia. *Neuroscience* 2013;248C:359–68.
- [34] Kamei J, Saitoh A. Involvement of dopamine D2 receptor-mediated functions in the modulation of morphine-induced antinociception in diabetic mouse. *Neuropharmacology* 1996;35:273–8.
- [35] Kemp T, Spike RC, Watt C, Todd AJ. The mu-opioid receptor (MOR1) is mainly restricted to neurons that do not contain GABA or glycine in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 1996;75:1231–8.
- [36] Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *PAIN®* 1992;50:355–63.
- [37] King MA, Bradshaw S, Chang AH, Pintar JE, Pasternak GW. Potentiation of opioid analgesia in dopamine 2 receptor knock-out mice: evidence for a tonically active anti-opioid system. *J Neurosci* 2001;21:7788–92.
- [38] Kiritsy-Roy JA, Standish SM, Terry LC. Dopamine D-1 and D-2 receptor antagonists potentiate analgesic and motor effects of morphine. *Pharmacol Biochem Behav* 1989;32:717–21.
- [39] Kovoov A, Seyffarth P, Ebert J, Barghshoon S, Chen CK, Schwarz S, Axelrod JD, Cheyette BN, Simon MI, Lester HA, Schwarz J. D2 dopamine receptors colocalize regulator of G-protein signaling 9-2 (RGS9-2) via the RGS9 DEP domain, and RGS9 knock-out mice develop dyskinesias associated with dopamine pathways. *J Neurosci* 2005;25:2157–65.
- [40] Lapirot O, Melin C, Modolo A, Nicolas C, Messaoudi Y, Monconduit L, Artola A, Luccarini P, Dallel R. Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn. *PAIN®* 2011;152:1821–31.
- [41] Lau CG, Zukin RS. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:413–26.
- [42] Le Bars D, Bourgoin S, Villanueva L, Clot AM, Hamon M, Cesselin F. Involvement of the dorsolateral funiculi in the spinal release of met-enkephalin-like material triggered by heterosegmental noxious mechanical stimuli. *Brain Res* 1987;412:190–5.
- [43] Lee CR, McTavish D, Sorkin EM. Tramadol. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in acute and chronic pain states. *Drugs* 1993;46:313–40.
- [44] Levant B, McCarron KE. D(3) dopamine receptors in rat spinal cord: implications for sensory and motor function. *Neurosci Lett* 2001;303:9–12.
- [45] Li Q, Lau A, Morris TJ, Guo L, Fordyce CB, Stanley EF. A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci* 2004;24:4070–81.
- [46] Liu QS, Qiao JT, Dafny N. D2 dopamine receptor involvement in spinal dopamine-produced antinociception. *Life Sci* 1992;51:1485–92.
- [47] Llorens-Cortes C, Zini S, Gros C, Schwartz JC. Dopaminergic regulation of enkephalin release. *J Neurochem* 1991;56:1368–75.
- [48] Luscher B, Fuchs T, Kilpatrick CL. GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron* 2011;70:385–409.
- [49] Malmberg AB, Yaksh TL. Pharmacology of the spinal action of ketorolac, morphine, ST-91, U50488H, and L-PIA on the formalin test and an isobolographic analysis of the NSAID interaction. *Anesthesiology* 1993;79:270–81.
- [50] Marvizón JC, Chen W, Murphy N. Enkephalins, dynorphins, and beta-endorphin in the rat dorsal horn: an immunofluorescence colocalization study. *J Comp Neurol* 2009;517:51–68.
- [51] Maves TJ, Pechman PS, Meller ST, Gebhart GF. Ketorolac potentiates morphine antinociception during visceral nociception in the rat. *Anesthesiology* 1994;80:1094–101.
- [52] McGiiliard KL, Takemori AE. The effect of dopaminergic modifiers on morphine-induced analgesia and respiratory depression. *Eur J Pharmacol* 1979;54:61–8.
- [53] Miyake M, Christie MJ, North RA. Single potassium channels opened by opioids in rat locus coeruleus neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:3419–22.
- [54] Morgan MM, Christie MJ. Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction, and dependence from cell culture to human. *Br J Pharmacol* 2011;164:1322–34.
- [55] Morgan MJ, Franklin KB. Dopamine receptor subtypes and formalin test analgesia. *Pharmacol Biochem Behav* 1991;40:317–22.
- [56] Pasinetti G, Govoni S, di Giovine S, Spano PF, Trabucchi M. Dopamine enhances met-enkephalin efflux from rat striatal slices. *Brain Res* 1984;293:364–7.
- [57] Prinster SC, Hague C, Hall RA. Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev* 2005;57:289–98.
- [58] Qu S, Ondo WG, Zhang X, Xie WJ, Pan TH, Le WD. Projections of diencephalic dopamine neurons into the spinal cord in mice. *Exp Brain Res* 2006;168:152–6.
- [59] Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustín O, de Medina FS. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 2010;401:318–20.
- [60] Rooney KF, Sewell RD. Evaluation of selective actions of dopamine D-1 and D-2 receptor agonists and antagonists on opioid antinociception. *Eur J Pharmacol* 1989;168:329–36.
- [61] Schambra UB, Duncan GE, Breese GR, Fornaretto MG, Caron MG, Fremeau Jr RT. Ontogeny of D1A and D2 dopamine receptor subtypes in rat brain using in situ hybridization and receptor binding. *Neuroscience* 1994;62:65–85.
- [62] Skagerberg G, Lindvall O. Organization of diencephalic dopamine neurones projecting to the spinal cord in the rat. *Brain Res* 1985;342:340–51.
- [63] Soderman AR, Unterwald EM. Cocaine-induced mu opioid receptor occupancy within the striatum is mediated by dopamine D2 receptors. *Brain Res* 2009;1296:63–71.
- [64] Tamae A, Nakatsuka T, Koga K, Kato G, Furue H, Katafuchi T, Yoshimura M. Direct inhibition of substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord by activation of dopamine D2-like receptors. *J Physiol* 2005;568:243–53.
- [65] Taniguchi W, Nakatsuka T, Miyazaki N, Yamada H, Takeda D, Fujita T, Kumamoto E, Yoshida M. In vivo patch-clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on substantia gelatinosa neurons in the spinal cord. *PAIN®* 2011;152:95–105.
- [66] Tulunay FC, Sparber SB, Takemori AE. The effect of dopaminergic stimulation and blockade on the nociceptive and antinociceptive responses of mice. *Eur J Pharmacol* 1975;33:65–70.
- [67] Tzschentke TM, Christoph T, Kögel B, Schiene K, Hennies HH, Englberger W, Haurand M, Jahnel U, Cremers TI, Friderichs E, De Vry J. (–)-(1R,2R)-3-(3-dimethylamino-1-ethyl-2-methyl-propyl)-phenol hydrochloride (tapentadol HCl): a novel mu-opioid receptor agonist/norepinephrine reuptake inhibitor with broad-spectrum analgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;323:265–76.
- [68] van Dijken H, Dijk J, Voom P, Holstege JC. Localization of dopamine D2 receptor in rat spinal cord identified with immunocytochemistry and in situ hybridization. *Eur J Neurosci* 1996;8:621–8.
- [69] van Wijk G, Veldhuijzen DS. Perspective on diffuse noxious inhibitory controls as a model of endogenous pain modulation in clinical pain syndromes. *J Pain* 2010;11:408–19.
- [70] Williams JT, Ingram SL, Henderson G, Chavkin C, von Zastrow M, Schulz S, Koch T, Evans CJ, Christie MJ. Regulation of mu-opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol Rev* 2013;65:223–54.
- [71] Wood PL, Pasternak GW. Specific mu 2 opioid isoreceptor regulation of nigrostriatal neurons: in vivo evidence with naloxonazine. *Neurosci Lett* 1983;37:291–3.
- [72] Wood PL, Stotland M, Richard JW, Rackham A. Actions of mu, kappa, sigma, delta and agonist/antagonist opiates on striatal dopaminergic function. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;215:697–703.
- [73] Wood PL. Opioid regulation of CNS dopaminergic pathways: a review of methodology, receptor types, regional variations and species differences. *Peptides* 1983;4:595–601.

- [74] Yang SW, Zhang C, Zhang ZH, Qiao JT, Dafny N. Sequential mediation of norepinephrine- and dopamine-induced antinociception at the spinal level: involvement of different local neuroactive substances. *Brain Res Bull* 1996;41:105–9.
- [75] Yao WD, Spealman RD, Zhang J. Dopaminergic signaling in dendritic spines. *Biochem Pharmacol* 2008;75:2055–69.
- [76] Yarnitsky D. Conditioned pain modulation (the diffuse noxious inhibitory control-like effect): its relevance for acute and chronic pain states. *Curr Opin Anaesthesiol* 2010;23:611–5.
- [77] Yokoyama C, Okamura H, Nakajima T, Taguchi J, Ibata Y. Autoradiographic distribution of [³H]YM-09151-2, a high-affinity and selective antagonist ligand for the dopamine D2 receptor group, in the rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* 1994;344:121–36.
- [78] Zhao H, Zhu W, Pan T, Xie W, Zhang A, Ondo WG, Le W. Spinal cord dopamine receptor expression and function in mice with 6-OHDA lesion of the A11 nucleus and dietary iron deprivation. *J Neurosci Res* 2007;85:1065–76.

Development/Plasticity/Repair

Dopamine D1-like Receptors Regulate Constitutive, μ -Opioid Receptor-Mediated Repression of Use-Dependent Synaptic Plasticity in Dorsal Horn Neurons: More Harm than Good?

 Zigor Aira,¹ Teresa Barrenetxea,¹  Itsaso Buesa,¹  Gontzal García del Caño,² and  Jon Jatsu Azkue¹

¹Department of Neurosciences, School of Medicine and Dentistry, University of the Basque Country UPV/EHU, 48940 Leioa, Bizkaia, Spain, and

²Department of Neurosciences, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country UPV/EHU, 01080 Vitoria-Gasteiz, Araba, Spain

The current study reports on a synaptic mechanism through which D1-like receptors (D1LRs) modulate spinal nociception and plasticity by regulating activation of the μ -opioid receptor (MOR).

D1LR stimulation with agonist SKF 38393 concentration-dependently depressed C-fiber-evoked potentials in rats receiving spinal nerve ligation (SNL), but not in uninjured rats. Depression was prevented by MOR- but not GABA-receptor blockade. Neurons expressing the D1 subtype were immunopositive for met-enkephalin and vesicular glutamate transporter VGLUT2, but not for GABAergic marker vGAT.

Nerve ligation was followed by increased immunoreactivity for D1 in synaptic compartment (P3) in dorsal horn homogenates and presynaptic met-enkephalin-containing boutons. SNL led to increased immunoreactivity for met-enkephalin in dorsal horn homogenates, which was dose-dependently attenuated by selective D1LR antagonist SCH 23390. During blockade of either D1R or MOR, low-frequency (0.2 or 3 Hz) stimulation (LFS) to the sciatic nerve induced long-term potentiation (LTP) of C-fiber-evoked potentials, revealing a constituent role of both receptors in repressing afferent-induced synaptic plasticity. LFS consistently induced NMDA receptor-dependent LTP in nerve-injured rats. The ability of MOR both to prevent LTP and to modulate mechanical and thermal pain thresholds in behavioral tests was preserved in nerve-ligated rats that were postoperatively treated with SCH 23390. D1LR priming for 30 min sufficed to disrupt MOR function in otherwise naive rats via a mechanism involving receptor overuse.

The current data support that, whereas D1LR-modulated MOR activation is instrumental in antinociception and endogenous repression of synaptic plasticity, this mechanism deteriorates rapidly by sustained use, generating increased vulnerability to afferent input.

Key words: electrophysiology; immunocytochemistry; LTP; nerve injury; nociception; spinal cord

Significance Statement

The current study shows that dopamine D1-like receptors (D1LRs) and μ -opioid receptors (MOR) in the spinal dorsal horn constitutively repress the expression of synaptic long-term potentiation (LTP) of C-fiber-evoked potentials. Anatomical data are provided supporting that the D1 subtype regulates MOR function by modulating met-enkephalin release. Sustained neuropathic pain induced by spinal nerve ligation is accompanied by D1R and met-enkephalin upregulation, acquired D1LR-mediated antinociception, and a loss of endogenous repression of further synaptic plasticity. We show that the ability of MOR to oppose LTP is rapidly impaired by sustained D1LR activation via a mechanism involving sustained MOR activation.

Introduction

The μ -opioid receptor (MOR) is a major effector in endogenous pain modulation, as well as the primary target of clinically used

opioid analgesics. The development of tolerance or decreased responsiveness to MOR agonists following repeated treatments poses a major limitation to the use of opioid analgesics for the treatment of human chronic pain (Christie, 2008; Williams et al.,

Received June 29, 2015; revised April 11, 2016; accepted April 11, 2016.

Author contributions: Z.A. and J.J.A. designed research; Z.A., T.B., I.B., and G.G.d.C. performed research; Z.A., T.B., I.B., and G.G.d.C. analyzed data; Z.A. and J.J.A. wrote the paper.

Supported by the Government of the Basque Country (IT782-13), by the Spanish Government (SAF2013-44533-P), and by the University of the Basque Country (Ayudas para la Especialización de Personal Investigador, to Zigor

Aira). We thank Dr Rosario Moratalla, at Cajal Institute, Consejo Superior de Investigaciones Científicas in Madrid, for kindly providing D1R knock-out mouse tissue.

The authors declare no competing financial interests.

2013). Although prolonged exposure to opioid drugs agonists is a widely recognized determinant of tolerance, several lines of evidence suggest that neuroplastic changes underlying central sensitization also may negatively condition MOR function. For instance, cellular signaling pathways underlying central sensitization in dorsal horn neurons, such as those mediated by the NMDA receptor or protein kinase C (PKC), have been implicated in opioid tolerance (Mao, 1999; Mao and Mayer, 2001; Joseph and Levine, 2010). In addition, prolonged use of opioid drugs has been linked both to chronification of acute or sporadic pain (Wilkinson et al., 2001; Bigal and Lipton, 2009) and opioid-induced hyperalgesia (Chu et al., 2008; Hay et al., 2009).

A relatively unexplored mechanism impinging upon MOR function is the activity of descending pathways during central sensitization and sustained pain. Descending pathways exert both facilitatory and inhibitory control over centripetal progression of nociceptive signals through the dorsal horn and are currently known to play a critical role in generating and maintaining pathologic pain in animal models (Kovelowski et al., 2000; Ossipov et al., 2000; Burgess et al., 2002). Our recent work has shown that plasticity of descending spinopetal noradrenergic, serotonergic, and dopaminergic systems during sustained pain profoundly alters spinal opioidergic neurotransmission (Aira et al., 2012, 2014, 2015).

The dopamine receptor family comprises five distinct G-protein-coupled receptors, viz. D1 through D5, that fall into two classes on the basis of their biochemical and pharmacological properties. Whereas D1-like receptors (D1LRs), including D1 and D5, activate the heterotrimeric proteins $G_{\alpha s}$ and $G_{\alpha olf}$ and are positively coupled to activation of adenylyl cyclase (AC) and protein kinase A (PKA), the members of the D2-like subfamily (D2–D4) are linked to activation of $G_{\alpha i}$ and $G_{\alpha o}$ proteins and are negatively coupled to AC and PKA (Neve et al., 2004; Beaulieu and Gainetdinov, 2011). All five receptors have been found in the spinal cord (Dubois et al., 1986; Schambra et al., 1994; Yokoyama et al., 1994; van Dijken et al., 1996; Levant and McCarron, 2001; Zhao et al., 2007; Zhu et al., 2007; Charbit et al., 2009). Dopaminergic innervation of the spinal dorsal horn is provided by diencephalo-spinal neurons originating in the hypothalamic A11 cell group (Hökfelt et al., 1979; Skagerberg and Lindvall, 1985; Qu et al., 2006; Barraud et al., 2010), and projections arising from these neurons inhibit nociceptive transmission at the dorsal horn level, mainly via D2 receptors (Fleetwood-Walker et al., 1988; Tamae et al., 2005; Charbit et al., 2009; Lapirot et al., 2011; Taniguchi et al., 2011). Recently, we reported that dopaminergic modulation of spinal nociception via receptors of the D2 subtype is upregulated during sustained neuropathic pain, resulting in dramatic enhancement of MOR-mediated antinociception (Aira et al., 2014). Although data regarding a potential role of D1LRs in modulating spinal nociception is scarce, the available evidence suggests an involvement of the receptor in mechanisms related with central sensitization rather than in direct modulation of pain (Yang et al., 2005; Munro, 2007), and recent evidence suggests that dopaminergic neurotransmission mediated by D1LRs may critically participate in consolidation of neural plastic changes triggered by inflammatory pain (Kim et al., 2015).

The current study was undertaken to explore the influence of dopaminergic neurotransmission mediated by D1LRs in MOR

function in several distinct contexts of central nociception, including afferent excitation by single noxious stimuli, synaptic plasticity induced by repetitive noxious stimulation, and sustained neuropathic pain following nerve injury. We used electrophysiological techniques and behavioral assessment procedures to evaluate MOR function, whereas neuroanatomical and quantitative aspects of receptor expression were addressed by using confocal immunofluorescence and biochemical methods.

Materials and Methods

Animal experiments were performed according to the European Communities Council Directive (86/609/ECC) on adult male Sprague Dawley rats (250–350 g). The protocols for animal care and use were approved by the appropriate committee at the University of the Basque Country.

Spinal nerve ligation surgery. The left spinal L5 nerve root was ligated under 4% chloral hydrate anesthesia (0.4 g/kg, i.p.), as previously described by Kim and Chung (1992). After surgery, the animals were allocated to individual cages to recover, with food and water available *ad libitum*. Sham-operated animals received no nerve ligation, being otherwise identically prepared and assessed. Successful nerve ligation was confirmed by decreased mechanical paw withdrawal thresholds.

Electrophysiology. Procedures were performed under urethane anesthesia (1.5 g/kg, i.p.). A tracheotomy was performed to maintain an open, low-resistance airway, and cannulae were inserted into the left common carotid artery and the right internal jugular vein for arterial blood pressure monitoring (mean 80–100 mmHg) and continuous infusion of Tyrode's solution (in mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 1.4 CaCl₂, 1 MgCl₂, 6 NaHCO₃, 2.1 NaH₂PO₄, pH 7.4) at 0.8–1 ml/h, respectively. Colorectal temperature was continuously monitored and euthermia (37°–38°C) was maintained via a feedback-controlled underbody heating pad for the duration of the experimental procedure. The left sciatic nerve was exposed, gently freed from connective tissue, and placed onto platinum hook electrodes for bipolar electrical stimulation. Bilateral dorsal laminectomies were performed at vertebrae T13–L1, the vertebral column was immobilized to a rigid frame, and the dura mater overlaying lumbosacral spinal segments was carefully removed.

Electrophysiological setup was essentially as described previously (Azkue et al., 2003). Tungsten microelectrodes (5 M Ω) were placed into laminae I–II (100–300 μ m deep and 1 mm lateral to the spinal mid-line). The position of the tip of the recording electrode in the spinal cord was marked with a small electrolytic lesion by delivery of an anodal current through the recording electrode (50 μ A anodal current for 10 s) and histologically verified. Single monophasic, square-wave electrical pulses were delivered as test stimuli to the sciatic nerve trunk at a midhigh level on a per-minute basis by means of a current-controlled stimulus isolator, and the elicited spinal field potentials were amplified (analog bandpass set at 1–550 Hz), displayed on an oscilloscope, and digitized at 10 kS/s and 12-bit resolution (PCI-MIO-16E acquisition card, National Instruments). Field potentials were evoked in superficial laminae of the spinal dorsal horn by suprathreshold, electrical C-fiber stimulation (3–3.5 mA pulses of 0.5 ms duration) and quantified as described previously (Buesa et al., 2006). Electrical stimulation of the sciatic nerve trunk did not permit us to discern the relative contribution of cutaneous, muscle and joint fibers to the recorded signals.

In experiments administering drugs via spinal superfusion (cf. below), each drug concentration change lasted for 20 min, and only the last 10 evoked field potentials were extracted for analysis from the baseline control period and from each treatment period. The areas of field potentials evoked during each treatment period were compared with those recorded during a control, artificial CSF (aCSF) superfusion period, by using univariate ANOVA and *post hoc* Bonferroni's or Tamhane's multiple-comparison tests.

In experiments aimed at inducing long-term potentiation (LTP) of C-fiber-evoked field potentials, conditioning low-frequency stimulation (LFS) consisted of two 30 s trains of 3 mA pulses of 1.5 ms duration at either 0.2 or 3 Hz, 30 s apart.

Drug preparation and delivery. Drugs used included D-AP5 (NMDA receptor antagonist), SCH 23390 (D1R antagonist), SKF 38393 (D1R

Correspondence should be addressed to Dr. Jon Jatsu Azkue, University of the Basque Country UPV/EHU, 48940 Leioa, Bizkaia, Spain. E-mail: jonjatsu.azkue@ehu.eus.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.2469-15.2016

Copyright © 2016 the authors 0270-6474/16/365662-13\$15.00/0

agonist), [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin (DAMGO; MOR agonist), D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen]-Thr-NH₂ (CTOP; MOR antagonist), and [R-(R,S)]-6-(5,6,7,8-Tetrahydro-6-methyl-1,3-dioxolo[4,5-g]isoquinolin-5-yl)furo[3,4-e]-1,3-benzodioxol-8(6H)-one (bicuculline; GABA_A receptor antagonist), all six from Tocris Bioscience. Stock solutions were obtained by diluting drug powder in double-distilled water, and working solutions were prepared in aCSF (in mM: 130 NaCl, 3.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 1.2 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 10 D-(±) glucose, pH 7.4) immediately before delivery. For spinal administration, drugs were applied in small volumes (10–15 μl) by controlled superfusion via a silicone, 40–50 mm² pool attached to the dorsal surface of the spinal cord (Beck et al., 1995).

To measure the ability of D1LRs to modulate C-fiber-evoked spinal field potentials, these were recorded during spinal superfusion with successively increasing, cumulative concentrations of D1LR agonist SKF 38393. The effects of SKF 38393 on evoked potentials were D1LR-specific, as confirmed by blockade with D1LR antagonist SCH 23390 (data not shown).

To evaluate the influence of μ-opioid- or GABA-receptor blockade on the effects of SKF 38393 on evoked field potentials, the agonist was administered in combination with subthreshold concentrations of CTOP (100 nM) or bicuculline, respectively. Antagonist concentrations were selected on the basis of preliminary experiments.

For chronic blockade of D1LRs, SCH 23390 was administered intraperitoneally on a daily basis at either 0.5 or 0.05 mg/kg. Intraperitoneally delivered SCH 23390 could depress C-fiber-evoked spinal field potentials (see Fig. 7), which served to confirm a spinal locus of action of SCH 23390 when using a systemic route of administration.

Subcellular fractionation of spinal cord tissue. Biochemical fractionation of dorsal horn proteins was performed with minor variations according to previous studies (Yang et al., 2009; Cao et al., 2011). Briefly, rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and killed by decapitation. L4–L5 segments were quickly extracted into ice-cold aCSF. Tissue was separated and homogenized mechanically with a motor-driven glass/glass tissue homogenizer in ice-cold lysis buffer (10 mM Tris, pH 7.6, 320 mM sucrose, 5 mM EDTA) containing protease inhibitors (5 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 U/ml aprotinin, 0.0001% chymostatin, 0.0001% leupeptin, and 0.0001% pepstatin). Dorsal horn samples ipsilateral and contralateral to surgery were taken and processed separately. Homogenates were centrifuged at 1000 × g for 10 min to remove cell nuclei (P1) from the low supernatant (S1). S1 was collected and centrifuged at 10,000 × g during 15 min to separate a P2 pellet containing the crude synaptosomal fraction and a cytoplasmic fraction S2 with microsomes. The P2 pellet was incubated in the lysis buffer containing 0.5% Triton and centrifuged at 32,000 × g for 20 min to obtain the crude synaptic vesicle fraction (S3) and the final pellet containing the synaptic fraction (P3). The latter was solubilized in resuspension buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 2% SDS). All fractions were stored at 80°C. We have shown previously that only P3 fraction is enriched with synaptic density proteins, such as postsynaptic density protein PSD-95 (Aira et al., 2013).

Western blot. BCA protein assay kit (Pierce) was used for determining protein concentration. Identical amounts of protein (50 μg of spinal cord subcellular fractions or 20 μg HEK293T cell membranes) were loaded to SDS-PAGE using 8% or 10% running gels and transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare). After a blocking step with 5% nonfat milk in PBST for 1 h at room temperature, membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibody. We used an affinity-purified goat polyclonal antibody against D1R (E-16; sc-31479 from Santa Cruz Biotechnology) at 1:1000 and a rabbit polyclonal antibody to met-enkephalin (Millipore) 1:1000 as primary antibodies. The goat polyclonal antibody to D1R was tested for band specificity and no cross-reactivity with D5R (the other member of the D1R-like subfamily) in samples from HEK293T cells transfected with either D1R-myc or D5R-myc (cf. below). Antiserum specificity to met-enkephalin has been documented previously in KO mice (Chen et al., 2008). After incubation with primary antibodies, membranes were washed three times in PBST for 10 min and incubated with HRP-conjugated donkey anti-goat or donkey anti-rabbit antisera (GE Healthcare) 1:5000 for 1 h at room tem-

perature. Thermo Fisher Scientific SuperSignal Chemiluminescent Substrate was used to detect HRP on the blots. Spectrophotometry was used to determine protein concentration in each sample, and the required volume was then calculated to load the same amount of protein (50 μg) to each lane. Reversible validated Ponceau staining was used to check equal loading of gels (Aldridge et al., 2008; Romero-Calvo et al., 2010). For quantitation, protein band densities were analyzed by using NIH ImageJ software. The dorsal horn contralateral to surgery site in sham condition was used as the reference to normalize protein band densities in relative density analyses. Student's *t* test was used for comparisons.

Immunofluorescence. Deeply anesthetized rats (sodium pentobarbital; 50 mg/kg, i.p.) were perfused transcardially with 250 ml of 0.9% saline followed by 900 ml of 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PB; 0.1 M), pH 7.4. L4–L5 segments were removed, postfixed with 4% paraformaldehyde in PB for 4 h, and then cryoprotected for 48 h with 30% sucrose in PBS at 4°C. Coronal, 40-μm-thick cryotome sections were serially collected in PBS and preincubated with 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and 1% normal serum (1 h at RT). Paraformaldehyde-fixed spinal cord tissue from wild-type and D1 receptor knock-out (D1R^{-/-}) mice (Xu et al., 1994) was sectioned in the coronal plane and identically processed throughout as the tissue sections from rat spinal cord. Five primary antibodies were used in triple immunofluorescence experiments, namely rabbit and goat polyclonals to D1R and met-enkephalin as above (at 1:1000 and 1:500, respectively), mouse monoclonals to synaptophysin or vGAT (at 1:1000 or 1:500, respectively; from Sigma-Aldrich and Synaptic Systems, respectively), and a polyclonal antibody raised in guinea pig against vesicular glutamate transporter VGLUT2 (at 1:1000; Synaptic Systems). After preincubations with normal serum of species other than those in which the secondary antibodies were raised, sections were sequentially incubated with Cy5 650-conjugated donkey anti-rabbit, Dylight 549-conjugated donkey anti-mouse, and AlexaFluor 488-conjugated donkey anti-goat fluorescent antibodies (1:200; Jackson ImmunoResearch) and mounted in Mowiol (Vector Laboratories).

Paraformaldehyde-fixed HEK293T cells (either D1R-myc or D5R-myc transfected) were treated with blocking buffer (0.066% saponin, 0.22% gelatin in PBS, 1% bovine serum albumin, 1% normal donkey serum) for 1 h at RT, followed by incubation at 4°C with primary antibodies diluted in blocking buffer: mouse monoclonal against c-myc (1:1000; clone 9E10, Covance) combined with either goat polyclonal E-16 antibody against D1R (1:500; Santa Cruz Biotechnology) or goat polyclonal R-18 antibody against D5R (1:500; Santa Cruz Biotechnology; sc-1441). Thereafter, cells were incubated for 1 h at RT in fluorescent-conjugated secondary antibodies DyLight 549 donkey anti-mouse F(ab')₂ fragment (1:400; Jackson ImmunoResearch) and AlexaFluor 488 donkey anti-goat IgG (1:400; Invitrogen). After extensive washing with PBS containing 0.22% gelatin and counterstaining with Hoechst 333428 (Sigma-Aldrich) culture coverslips were mounted in Mowiol. Immunolabeled sections and HEK293T cells were viewed in a Fluoview FV500 Olympus confocal microscope, and digital photomicrographs were acquired sequentially to avoid overlapping of fluorescent emission spectra. NIH ImageJ software (Intensity Correlation plug-in; Li et al., 2004) was used to adjust brightness and contrast, to obtain image colocalization overlays, as well as to perform pixel-wise intensity correlation-based analyses of confocal photomicrographs. Pearson's correlation coefficient and Fisher's exact test were used to determine and contrast colocalization values, respectively.

HEK293T cell culture and transfection. Human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; CRL-3216) were maintained in DMEM (ATCC, 30-2002), supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin; Invitrogen, Life Technologies). Before transfection, cells were plated onto poly-D-lysine-coated 18 mm glass coverslips (for fluorescence microscopy) or 60 mm culture dishes (for Western blot analysis). When approaching 50–60% confluence, the cells were transfected with pCMV6 plasmid (Origene) carrying the coding sequence of C-terminal myc-tagged rat D1R or D5R (1 μg DNA/cm²) using Xfect Transfection Reagent (Clontech, 631317) according to the manufacturer's guidelines. Forty-eight hours after

transfection, cells were either fixed for 10 min at RT 4% phosphate-buffered paraformaldehyde and processed for immunofluorescence, or harvested in ice-cold 750 μ l hypotonic buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 50 μ M iodoacetamide) for Western blot analysis. The cell suspension was homogenized by passage through 20 and 21 gauge needles, and then mixed with an equal volume of the same buffer containing 0, 64 M sucrose and centrifuged at 1000 \times g during 5 min to remove cell nuclei and unbroken cells (P1) from the low supernatant (S1). S1 was then collected and centrifuged at 37,000 \times g during 15 min to obtain a P2 pellet enriched in plasma membrane, which was subjected to denaturation and Western blot analysis.

D1R antibody specificity tests. Specificity tests for the goat polyclonal E-16 antibody to D1R were performed in spinal cord sections from mice deficient in D1R, as well as in HEK293T cells transfected with either D1R-myc or D5R-myc. Sections of paraformaldehyde-fixed spinal cord tissue from wild-type and D1R^{-/-} mice were obtained and immunostained as described above. Immunoreactivity for D1R was found throughout the dorsal horn of wild-type mice, including but not limited to superficial laminae, whereas immunopositive signal was virtually undetectable in spinal cord sections from D1R^{-/-} mice. This result supported that the antibody could selectively recognize the D1 receptor in paraformaldehyde-fixed tissue (Fig. 1).

Additional tests were performed to discard cross-reactivity with D5R in either immunofluorescence or Western blot analyses. In HEK293T cells cultured and transfected as described above, immunofluorescence for c-myc was detected in every D1R- and D5R-immunopositive cell, respectively, but not in nontransfected cells. Colocalization of the immunofluorescence signals was virtually complete, showing that both antibodies recognized the same protein pool. In addition, neither D5R- nor D1R-immunoreactivity was detected in D1R-myc and D5R-myc-expressing cells, respectively, demonstrating that there was no cross-reactivity between D5R protein and the D1R-specific antibody or between D1R protein and the D5R-specific antibody. Consistent with these results, no D1R- or D5R-immunoreactive bands in membranes prepared from nontransfected HEK293T cells, whereas antibodies to D1R or D5R produced immunopositive bands only in membranes from cells transfected with D1R-myc or D5R-myc, respectively. Western blot against c-myc revealed that recombinant D1R-myc migrated slightly below D5R-myc, consistent with the calculated mass difference of 3.7 kDa. The results thus supported that the antibody selectively recognized the D1 receptor with no cross-reactivity to D5R, the other member of the D1LR subfamily.

Behavioral assessment. For mechanical pain threshold evaluation, we determined 50% mechanical paw withdrawal thresholds for the left hind-paw to plantar stimulation with von Frey monofilaments (North Coast Medical) according to an up–down algorithm (Chaplan et al., 1994). We assessed thermal pain thresholds on a hotplate device (WPI; Almási et al., 2003). Briefly, rats were placed in a Plexiglas chamber on the plate at 30°C for 5 min for habituation, and plate temperature was raised at a rate of 6°C/min until the animal exhibited paw licking or withdrawal behaviors (cutoff temperature 50°C). The heat pain threshold was calculated as the mean temperature eliciting response from two repeated procedures, 30 min apart. The evaluator was blind to received treatments. Nonparametric Kruskal–Wallis one-way ANOVA and Mann–Whitney rank test were

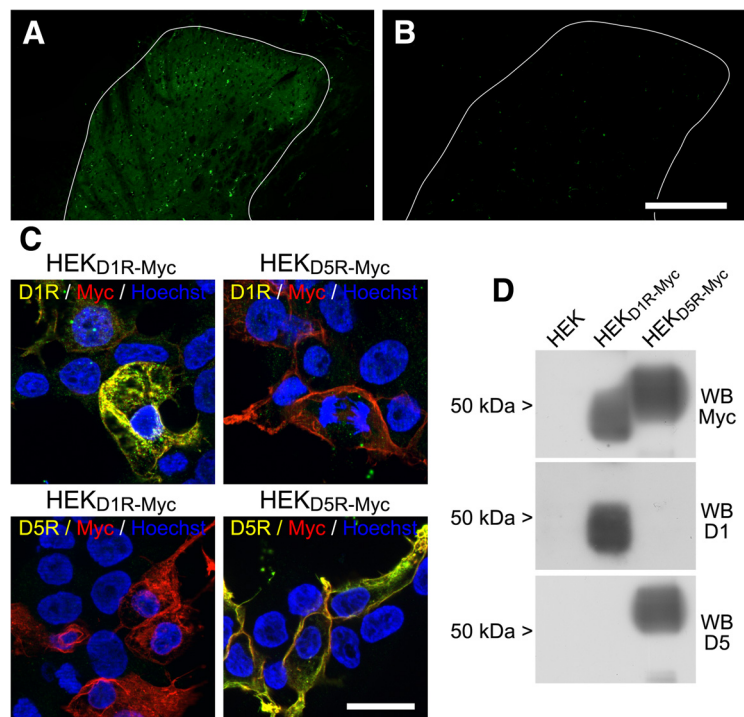


Figure 1. D1R antibody specificity assays. **A, B**, Immunofluorescence for D1R in the spinal dorsal horns of wild-type and D1R^{-/-} mice. The superposed lines indicate the boundaries of the spinal gray matter. Scale bar, 200 μ m. **C**, Double-immunofluorescence by combining a mouse monoclonal antibody against the c-myc epitope (red) with goat polyclonal antibodies against D1R or D5R (green) in HEK293T cells, transiently transfected with a plasmid encoding for either myc-tagged rat D1R or D5R. Scale bar, 20 μ m. **D**, Western blot analysis of membrane preparations from untransfected, D1R-myc transfected, and D5R-myc transfected HEK293T cells using the same antibodies as for immunofluorescence.

used to compare thresholds with those before surgery and across time points (SPSS, v15.0).

Results

D1LRs depress dorsal horn excitability after nerve injury via MOR

To evaluate the ability of the spinal D1R to modulate peripheral noxious input to dorsal horn neurons, we first recorded C-fiber-evoked field potentials in superficial layers of the dorsal horn during spinal superfusion with D1LR agonist SKF 38393. Administration of the drug failed to alter evoked potentials in uninjured rats (Fig. 2). In nerve-injured rats, however, SKF 38393 significantly and concentration-dependently decreased evoked potentials. Reduction was statistically significant at 1 μ M drug concentration (48.18 \pm 0.26% reduction; p < 0.01; n = 6).

Recent reports have shown interactions of dopaminergic neurotransmission with opioid analgesia (Becker et al., 2001; Aira et al., 2014; Brewer et al., 2014). Here, we explored whether the D1LR-mediated modulation of evoked potentials involved activation of the spinal MOR. Coadministration of the selective MOR antagonist CTOP at subthreshold concentration (100 nM), ie, one not altering evoked potentials *per se*, completely blocked depression of evoked potentials by 1 μ M SKF 38393 (Fig. 2). In contrast, SKF 38393-induced depression was unaffected by GABA receptor antagonist bicuculline (100 nM; 45.89 \pm 0.19% reduction; p < 0.01; n = 6).

D1R is expressed in glutamatergic, met-enkephalin-containing neurons

The endogenous peptide met-enkephalin is abundantly expressed in the spinal dorsal horn (Todd and Spike, 1992; Mar-

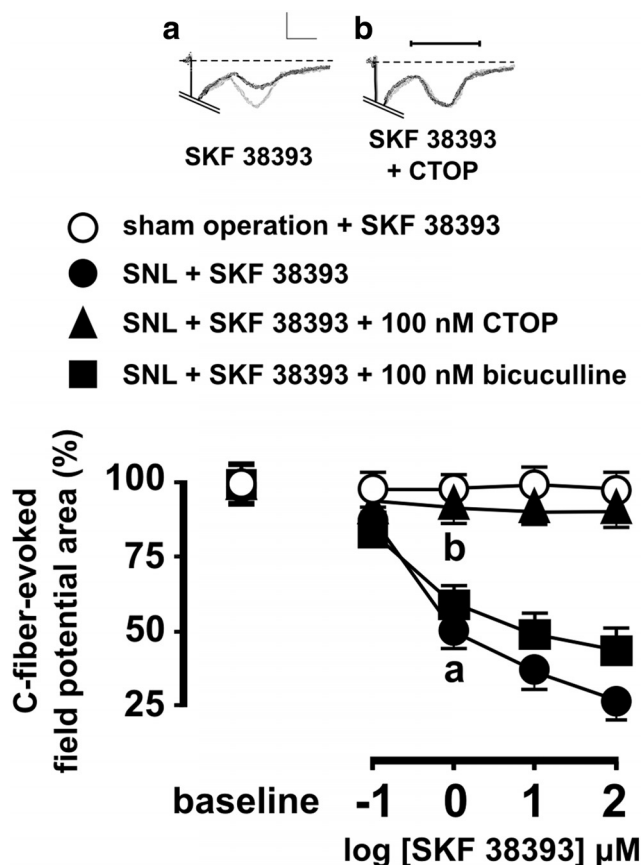


Figure 2. D1R-mediated depression of C-fiber-evoked spinal field potentials after SNL is mediated by MOR. Mean areas of C-fiber-evoked potentials are shown during spinal superfusion with increasing, cumulative concentrations of D1R agonist SKF 38393 either alone or in combination with subthreshold concentrations of μ -opioid antagonist CTOP or bicuculline. SKF 38393 effectively depresses evoked potentials in nerve-injured but not sham-operated rats. D1R-mediated depression is blocked by coadministration of CTOP but not by that of bicuculline. Asterisks indicate statistical significance at $p < 0.01$ using the *post hoc* Bonferroni test following one-way ANOVA, when comparing field potential magnitudes during drug administration to baseline control potentials before drug delivery ($n = 6$ each group; error bars indicate SEM). For clarity, only the earliest statistically significant effects are labeled. Representative recordings shown at the top, gray traces representing baseline potentials, illustrate the effect of $1 \mu\text{M}$ SKF 38393 on C-fiber-evoked field potentials in the absence (**a**) or presence (**b**) of 100 nM CTOP (scale, 50 ms and 200 mV; horizontal bar indicates C-fiber latency).

vizón et al., 2009) and presents high affinity for MOR (Delfs et al., 1994; Raynor et al., 1994; Fields, 2004). Based on prior evidence that presynaptic D1R can facilitate neurotransmitter release in the CNS (Cameron and Williams, 1993), we hypothesized that upregulation of D1R might occur in dorsal horn neurons containing met-enkephalin. In addition, available evidence suggests that both glutamatergic and GABAergic neurons in the dorsal horn may contain met-enkephalin (Todd and Spike, 1992; Todd et al., 2003; Marvizón et al., 2007, 2009). By using confocal triple immunofluorescence we found that D1R was expressed in met-enkephalin-containing neurons in the dorsal horn also expressing the vesicular glutamate transporter VGLUT2 (Fig. 3), but not in neurons containing vGAT, a marker for GABAergic synapses.

Spinal nerve ligation triggers presynaptic upregulation of D1R in met-enkephalin-containing boutons

There is previous evidence that dopamine-enriched contexts may favor D1R expression (Aubert et al., 2005), and that the release of dopamine in the spinal dorsal horn is indeed increased in patho-

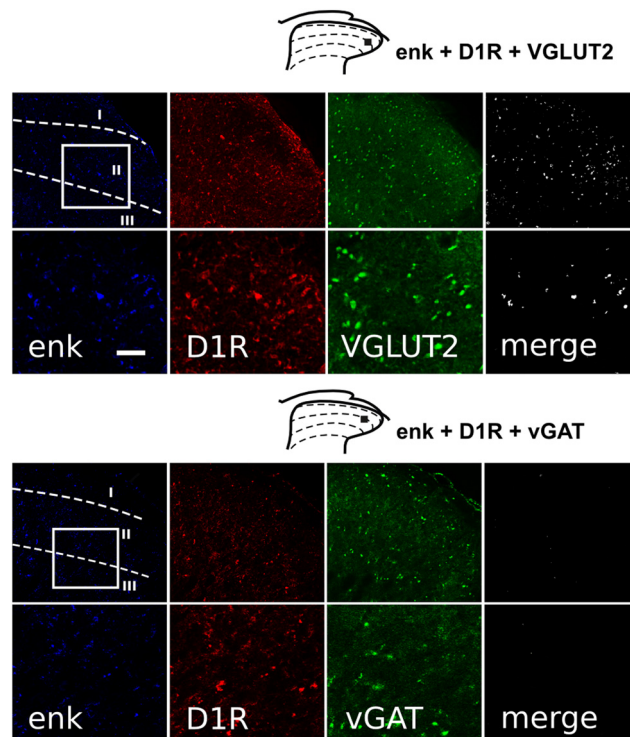


Figure 3. Coexpression of D1R and met-enkephalin occurs in putative glutamatergic, but not GABAergic neurons in superficial laminae of the dorsal horn. Triple immunofluorescent labelings in lumbar histological sections are shown, revealing colocalization of D1R in enkephalinergic neurons also containing the vesicular glutamate transporter VGLUT2, a glutamatergic neuron marker, but not in neurons containing vGAT, a marker of GABAergic terminals. Triple merge channel is shown as white. Insets in low-power micrographs and diagrams at the top indicate the locations of high-power micrographs. Scale bar, $10 \mu\text{m}$.

logic pain (Gao et al., 2001). We assessed whether changes in the modulatory profile of D1R as shown above were accompanied by increased expression of the receptor in dorsal horn neurons. To this end, we assessed D1R expression in dorsal horn homogenates extracted from nerve-injured rats 9 d after surgery. Western blots showed an increase in D1R-like immunoreactivity in synaptic fraction (P3) on the injury side, but not in cytoplasmic fraction (S2) on either side. Relative density analysis quantified such increase as over fourfold relative to immunoreactivity in P3 fraction ipsilateral to injury in sham-operated rats ($p < 0.01$, Student's *t* test; Fig. 4).

By using confocal triple immunofluorescence microscopy and synaptophysin as presynaptic marker, we found that presynaptic densities immunopositive to met-enkephalin became highly enriched in D1R after spinal nerve ligation (SNL; Fig. 2). Comparisons of pixel-wise correlations by using the Fisher's exact test confirmed statistically higher correlation levels in nerve-injured rats relative to sham-operated rats (Rr 0.73 vs 0.02; $z = -75.72$, $p < 0.01$).

Sustained, endogenous activation of D1R following SNL increases met-enkephalin levels in the dorsal horn

We performed Western blots on homogenates of dorsal horns extracted from nerve-injured and sham-operated rats 9 d after surgery. We found a dramatic increase in met-enkephalin-like immunoreactivity in the homogenates from nerve-injured rats compared with those from sham-operated controls. As assessed by density analysis, such increase was statistically significant ($p < 0.01$, Student's *t* test; Fig. 5).

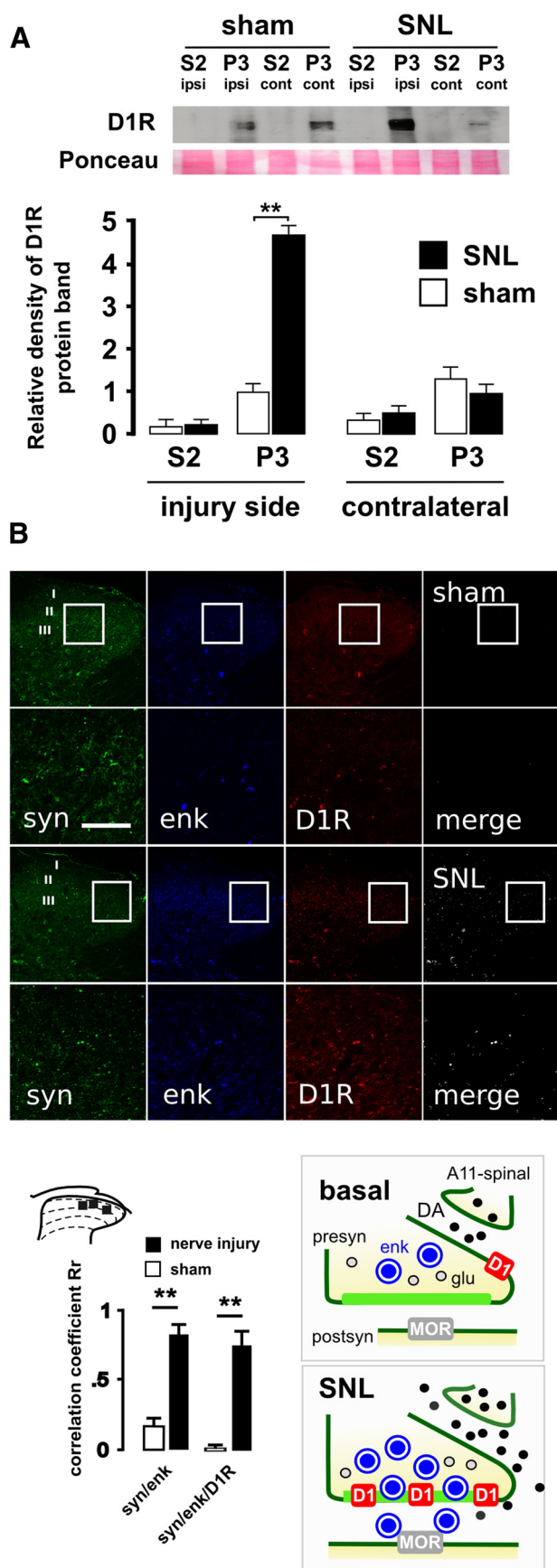


Figure 4. Presynaptic upregulation of D1R and met-enkephalin following spinal nerve ligation. **A**, Western blot of dorsal horn homogenates from nerve-injured and sham-operated rats show increased presence of D1R-like immunoreactivity in synaptic compartment (P3) of the

We next sought to determine whether sustained D1LR activation was required for augmenting met-enkephalin-like immunoreactivity. To this end, we blocked D1LRs by administering daily intraperitoneal injections of the selective D1LR antagonist SCH 23390 during the next 9 d following nerve injury at either 0.5 or 0.05 mg/kg in separate groups. We found that chronic D1LR blockade, but not vehicle administration (isotonic saline), dose-dependently attenuated the increase in met-enkephalin-like immunoreactivity that ensued after nerve injury. As assessed by density analysis, such attenuation was statistically significant after SCH 23390 treatment at either dose compared with immunoreactivity level in nerve-injured, vehicle-treated rats ($p < 0.01$, Student's t test; Fig. 5).

D1LR-regulated recruitment of MOR constitutively represses afferent-induced synaptic plasticity

We applied low-frequency electrical pulses to the sciatic nerve at either 0.2 or 3 Hz as conditioning input. Both stimulation patterns failed to condition subsequently evoked potentials in naive rats (Fig. 6). However, whenever the spinal MOR system was blocked pharmacologically with CTOP (100 nM), conditioning stimulation at either frequency consistently induced synaptic LTP of C-fiber-evoked dorsal horn potentials ($78.11 \pm 0.53\%$ increase; $p < 0.01$ relative to baseline; Fig. 6). The occurrence of LTP thus exposed a constitutive role of the spinal MOR system in repressing afferent activity-dependent synaptic plasticity in dorsal horn neurons. In subsequent experiments, the ability of conditioning LFS to induce LTP was used as an end-point measure of this repressing function of MOR.

In analogous experiments we blocked the spinal D1LRs instead of MOR. We found that LTP consistently ensued after LFS during D1LR blockade with SCH 23390 ($58.42 \pm 0.39\%$ increase; $p < 0.01$; Fig. 6), thus also implicating D1LRs in endogenous mechanisms constitutively repressing use-dependent synaptic plasticity. If D1LRs operate here by regulating the release of endogenous MOR ligand, as supported by the above anatomical and pharmacological data, then blocking D1LR activation should prevent endogenous recruitment of MOR, but not necessarily MOR activation by an exogenous agonist. To test for this, we applied the highly selective MOR agonist DAMGO by spinal superfusion (100 μM) 2 min before LFS, during concomitant D1LR

←

dorsal horn on the injury side. Ponceau staining was used to confirm equal protein loading. Bars show image analysis-based D1R band density quantitation normalized to P3 from uninjured rats. Asterisks indicate statistical significance at $p < 0.01$ using Student's t test. Error bars indicate SEM. **B**, Confocal micrographs of the dorsal horns from sham-operated and nerve-injured rats showing immunoreactivities for D1R (red channel), met-enkephalin (blue channel), and presynaptic marker synaptophysin (green channel). Insets in low-magnification micrographs at the top row in each condition indicate the locations of high-power (scale bar, 5 μm) micrographs below. The most conspicuous change following experimental nerve injury was a dramatic increase in triple colocalization from a virtually null level in sham condition. Solid boxes in the dorsal horn drawing indicate typical sites from which micrographs were taken for analysis. Bar diagrams represent intensity correlation-based analyses in confocal triple-labeled tissue photomicrographs, using the Pearson correlation coefficient as a measure of pixel-wise colocalization. SNL was followed by a significant increase in intensity correlation coefficients denoting colocalization of D1R, met-enkephalin and synaptophysin ($**p < 0.01$, Fisher exact test relative to sham condition). A tentative interpretation of findings is summarized schematically. Although D1R expressed in presumed glutamatergic, met-enkephalin-containing boutons is virtually absent from presynaptic active sites in the basal condition, both D1R and met-enkephalin are upregulated to presynaptic specializations following nerve injury. Color codes for presynaptic density, met-enkephalin, and D1R are consistent with immunofluorescence channels. Descending dopaminergic volume transmission (DA) presumably arising from the A11 region is represented as a dopaminergic varicosity.

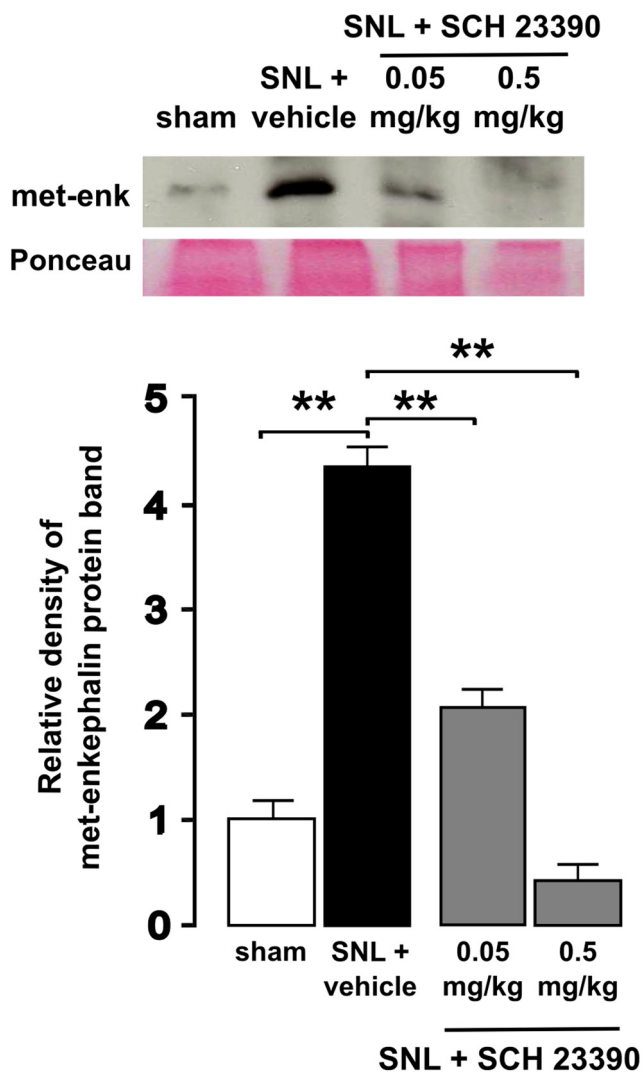


Figure 5. D1LRs are responsible for upregulation of met-enkephalin after SNL. Western blot of dorsal horn homogenates shows increased immunoreactivity for met-enkephalin in nerve-injured rats compared with sham-operated ones, as well as the effect of postoperative treatment with D1LR antagonist SCH 23390 during the next 9 d following injury. Ponceau staining was used to confirm equal protein loading. Image-based quantitation of the immunoreactive bands normalized to band density in the sham condition reveal a more than fourfold increase after SNL. Met-enkephalin upregulation is significantly and dose-dependently attenuated by SCH 23390 treatment. Asterisks indicate statistical significance at $p < 0.01$ using Student's *t* test. Error bars indicate SEM.

blockade with SCH 23390. In confirmation of the above view, we found that DAMGO effectively activated the MOR regardless of D1LR blockade, indeed preventing LTP (Fig. 6).

Sustained D1LR activation following spinal nerve injury impairs the ability of MOR to repress synaptic plasticity

We sought to determine whether the ability of the spinal MOR to repress afferent-induced synaptic plasticity was preserved during established central sensitization and sustained pain after peripheral nerve injury. To investigate for this, the occurrence of LTP after conditioning LFS was assessed in rats that had been subjected to SNL 9 d before. We found that LFS at either 0.2 or 3 Hz consistently induced LTP of C-fiber-evoked potentials (by $54.12 \pm 0.51\%$ or $68.89 \pm 0.39\%$, respectively; both $p < 0.01$, $n = 6$; Fig. 7A). Moreover, we found that LTP was effectively pre-

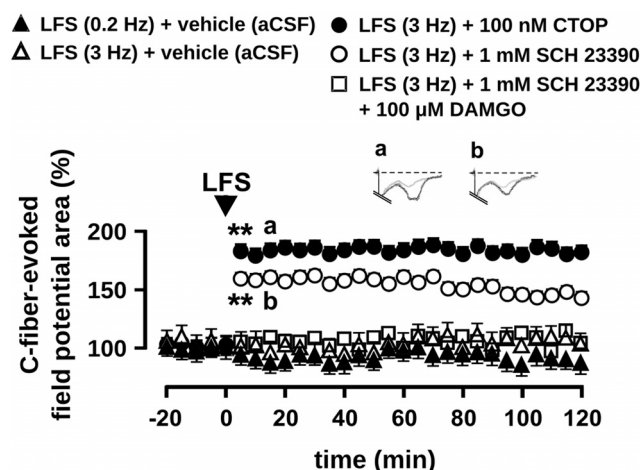


Figure 6. Conditioning LFS induces LTP during blockade of either D1LRs or MOR. Areas of C fiber-evoked field potentials in the spinal dorsal horn are plotted against time prior and after application of conditioning stimulation in the form of two 30 s trains of 3 mA, 1.5 ms duration pulses administered at low-frequency (either 0.2 or 3 Hz), 30 s apart. The time axis is labeled relative to the time-point of conditioning stimulation. Conditioning stimulation at 3 Hz induced LTP of C-fiber-evoked potentials in the presence of either MOR- or D1LR antagonist drugs CTOP or SCH 23390, respectively, whereas no change in evoked potentials occurred after conditioning stimulation at either frequency during spinal superfusion with vehicle (aCSF). In rats receiving spinal superfusion with SCH 23390, acute DAMGO administration starting 2 min before LFS prevented the occurrence of LTP. Asterisks indicate statistically significant increase ($p < 0.01$) in evoked potentials compared with baseline recordings before conditioning stimulation, using the *post hoc* Bonferroni test following one-way ANOVA ($n = 6$ in each experimental condition). For clarity, only the first significantly increased potentials are labeled with asterisks. Individual field potentials from representative experiments using CTOP (a) or SCH 23390 (b) are shown above the plot. Error bars indicate SEM.

vented by spinal superfusion with the NMDA receptor antagonist D-AP5 (100 μM).

If sustained activation of D1LRs following SNL was responsible for impairing the ability of MOR to prevent LTP, then keeping D1LRs blocked after injury should predictably preserve MOR function. This issue was addressed by attempting LTP induction 9 d after SNL in rats that had received daily intraperitoneal injections of D1LR antagonist SCH 23390 at either 0.05 mg/kg or 0.5 mg/kg. In addition, the effect of the same antagonist doses on phasic activation of D1LRs during LTP induction, ie, in the absence of prior daily administration, was evaluated in non-injured rats by administering the drug 20 min before LFS. In uninjured rats, we found that an acute injection of SCH 23390 at 0.05 mg/kg before LFS, ie, a dose effectively preventing met-enkephalin upregulation in dorsal horn neurons (compare Fig. 5), failed to block phasic activation of D1LRs, thereby permitting LTP to occur (Fig. 7B). In contrast, LTP was prevented by the antagonist only at the higher dose (0.5 mg/kg). These findings showed that a higher antagonist dose was required to block phasic D1LR activation during LTP induction than to prevent sustained activation leading to met-enkephalin upregulation following SNL. In nerve-injured rats chronically treated with SCH 23390, we found that the ability of the MOR to repress afferent-induced plasticity was fully preserved by using the drug at 0.05 mg/kg, ie, at the dose effectively blocking met-enkephalin upregulation but not preventing phasic activation of D1LRs during LTP induction (Fig. 7B). A mild but statistically significant potentiation ($26.79 \pm 0.50\%$, $p < 0.01$, $n = 6$; Fig. 5) after LFS was found in nerve-ligated rats that had been treated with higher dose of SCH 23390 (0.5 mg/kg), presumably by effect of blockade of phasic D1LR activation during application of the conditioning LFS.

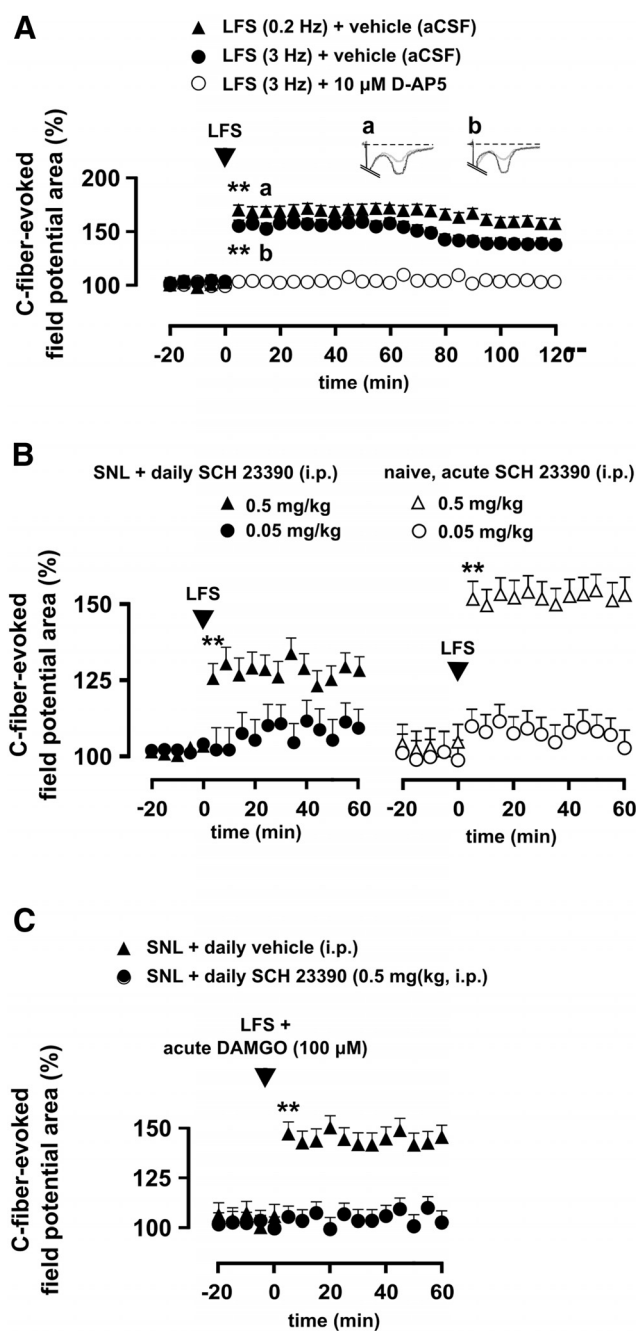


Figure 7. D1LRs are responsible for the loss of endogenous repression of synaptic plasticity after SNL. **A**, In rats subjected to SNL 9 d before, conditioning LFS induces NMDA receptor-dependent LTP of C-fiber-evoked potentials. The time course of changes induced by conditioning stimulation is shown and two examples of enhanced potentials from representative experiments are provided (gray traces correspond to control baseline recordings). **B**, Postoperative blockade of D1LR activity after SNL by daily intraperitoneal injections of SCH 23390 preserves the ability of endogenous repression of LTP. The phenomenon is best exemplified by nerve-ligated rats (left graph) that had received 0.05 mg/kg SCH 23390 chronically, in which phasic activation of D1LRs was however unaffected. The graph on the right represents data from experiments in naive rats, demonstrating that phasic activation of D1LRs to repress LFS-induced LTP is blocked by SCH 23390 only at 0.5 mg/kg but not at 0.05 mg/kg dose. **C**, Acute activation of MOR by addition of DAMGO to the spinal superfusate 2 min before LFS prevents LTP formation only in rats in which sustained D1R activation after SNL has been prevented by daily postoperative injections of SCH 23390. In all four graphs, asterisks denote statistically significant increase of mean potential areas ($p < 0.01$) compared with potentials from the baseline control period before LFS, using the *post hoc* Bonferroni test following one-way ANOVA. Only the first significantly increased potentials have been labeled with asterisks. Error bars in all graphs indicate SEM.

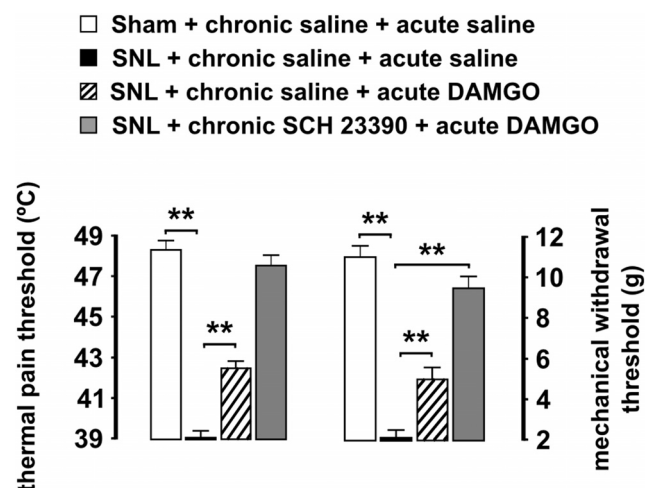


Figure 8. Thermal and mechanical MOR antinociception after SNL is preserved by D1LR blockade. Heat pain thresholds assessed in the hot plate test and the 50% paw withdrawal threshold to a static mechanical stimulus with von Frey monofilaments are shown 9 d after SNL. Thermal and mechanical thresholds, both of which are significantly lowered after SNL on the injury side 9 d after surgery, are significantly but only partially reversed by acute administration of DAMGO (i.p.) before behavioral evaluation. However, DAMGO dramatically raises both thermal and mechanical thresholds to near-normal levels in rats that have been treated with SCH 23390 but not with vehicle (isotonic saline) on a daily basis. Asterisks indicate statistical significance ($p < 0.01$) at comparisons using the Student's *t* test. Error bars indicate SEM.

In addition, we sought to ascertain whether abolishing sustained synaptic activation of D1LRs after nerve injury would also preserve MOR responsiveness to exogenous activation by an agonist drug. To this end, in nerve-injured rats chronically treated with SCH 23390 we assessed the ability of acutely administered DAMGO (100 μ M, via spinal superfusion) starting just before conditioning stimulation to prevent the induction of LTP. We found that DAMGO effectively prevented LTP in SCH 23390-treated rats (0.5 mg/kg, i.p.) but not in vehicle-treated rats ($38.05 \pm 0.46\%$ increase, relative to before LFS; $p < 0.01$, $n = 6$; Fig. 7).

Enhanced synaptic activation of D1LRs following SNL impairs MOR-mediated behavioral thermal and mechanical analgesia

To better understand how upregulation of D1LRs following SNL affects MOR antinociception, we evaluated the ability of an acute administration of DAMGO (1.5 mg/kg, i.p.) to relieve behavioral thermal and mechanical nociception 9 d after surgery in conscious, nerve-injured rats. Injured rats treated both chronically and acutely with vehicle (isotonic saline) exhibited marked mechanical and thermal allodynia at the side of injury, as shown by dramatic decrease in paw withdrawal thresholds both to plantar stimulation with von Frey monofilaments and thermal stimulation in the hot plate test (mechanical threshold of 2.13 ± 0.30 g vs 10.83 ± 0.40 g in sham-operated rats, and thermal threshold of $39.09 \pm 0.27^\circ\text{C}$ vs $48.13 \pm 0.31^\circ\text{C}$ in the sham condition; $p < 0.01$ in both contrasts, Student's *t* test, $n = 6$). In these rats, DAMGO produced a statistically significant (4.91 ± 0.42 g mechanical threshold vs 2.13 ± 0.30 g before DAMGO, and $42.48 \pm 0.23^\circ\text{C}$ thermal threshold vs $39.09 \pm 0.27^\circ\text{C}$ before DAMGO; $p < 0.01$ in both contrasts, Student's *t* test, $n = 6$) but only partial reversal of thermal and mechanical thresholds (Fig. 8). In contrast, in nerve-injured rats that were chronically treated with SCH 23390, an acute injection of DAMGO effectively increased mechanical thresholds to a level close to that measured in sham-operated

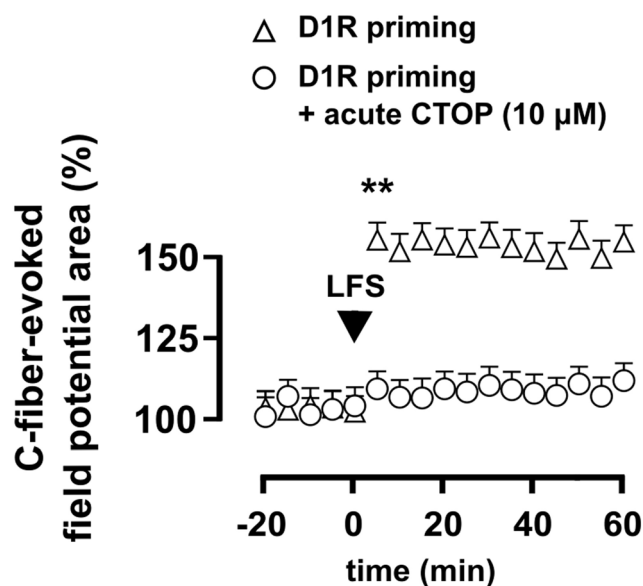


Figure 9. Rapid MOR dysfunction following sustained D1LR activation. Priming D1LRs with SKF 38393 for 30 min before conditioning stimulation suffices to impair endogenous, MOR-mediated repression of LTP. Blocking MOR activation (CTOP, intensively washed out for 5 min before LFS) during D1LR priming preserves the ability of MOR to prevent the occurrence of LTP. Asterisks indicate statistical significance ($p < 0.01$) when field potential magnitudes prior and after conditioning stimulation are compared using the *post hoc* Bonferroni test following one-way ANOVA ($n = 6$ in each experimental condition; error bars = SEM). For clarity, only the earliest statistically significant effects are labeled with asterisks.

animals (9.49 ± 0.43 g, $p < 0.01$, Student's t test vs before DAMGO), and thermal thresholds were fully restored to those measured in sham-operated animals ($47.52 \pm 0.35^\circ\text{C}$; $p < 0.01$, Student's t test vs before DAMGO, and $p = 0.07$ vs sham-operated controls). The increases in thermal and mechanical thresholds after DAMGO administration were significantly higher in SCH 23390-treated rats than in those receiving only vehicle as chronic treatment ($p < 0.01$, Student's t test between treatment conditions in both sensory modalities).

Rapid impairment of MOR function following D1LR activation

To gain insight into the timing of functional MOR impairment after the onset of sustained D1LR activation, we primed D1LRs in the spinal dorsal horn by superfusion with SKF 38393 (100 μM) in naive rats, before applying conditioning LFS. The results showed that priming D1LRs for 30 min was sufficient to impair the ability of the MOR to prevent LTP after conditioning, low-frequency input ($53.02 \pm 0.51\%$, $p < 0.01$, $n = 6$; Fig. 9). In separate experiments we found that simultaneous blockade of MOR with CTOP (10 μM ; intensively washed out for 5 min before LFS) during D1LR priming successfully preserved the ability of MOR to prevent LTP, suggesting that the functional impairment of MOR secondary to D1LR priming was due to sustained MOR activation.

Discussion

D1LRs depress spinal excitability via MOR

The current study shows that D1LRs depress evoked excitation of dorsal horn neurons, adding to previous evidence supporting general antinociceptive actions of dopamine at the dorsal horn (Tamae et al., 2005; Taniguchi et al., 2011). D1LR-mediated modulation became operative in the nerve-injured condition, which was consistent with the failure of D1R to modulate me-

chanical nociceptive thresholds or evoked responses to acute C-fiber input in naive animals (Tamae et al., 2005; Yang et al., 2005), as well as with the reported attenuation of nociceptive behaviors by D1LR agonists only in the second phase of the formalin test in rats and mice (Zarrindast et al., 1999; Munro, 2007). Considering that D1LRs can attenuate neuronal excitation by enhancing opioid- or GABA-mediated inhibition (Schoffelemeier et al., 2000; Mango et al., 2014), we assessed the ability of D1LRs to depress evoked potentials in the presence of drugs reducing endogenous activation of μ -opioid or GABA receptors. Blockade of the μ -opioid, but not GABA receptor, abolished the depression of evoked potentials induced by D1LRs in nerve-ligated rats, suggesting an intervening role for endogenous activation of the MOR.

Dopamine D1 and D2 receptor families both have been implicated in heterosynaptic regulation of neurotransmitter release (Tritsch and Sabatini, 2012), and there is evidence supporting heterosynaptic facilitation via D1LRs (Cameron and Williams, 1993; Trudeau et al., 1996; Chen and Regehr, 1997). We hypothesized that dopaminergic input to the dorsal horn may interact with the MOR by intermediation of enkephalinergic terminals, because enkephalins are major opioid ligands in the spinal dorsal horn (Marvizón et al., 2009; Huang et al., 2010), with high affinity for MOR (Delfs et al., 1994; Raynor et al., 1994; Fields, 2004) and enkephalin and D1LRs both are present in the dorsal horn (Todd and Spike, 1992; Zhu et al., 2007). We found that D1R and met-enkephalin colocalized with presynaptic marker synaptophysin, supporting D1R expression in presynaptic enkephalinergic boutons. The absence of D1R and met-enkephalin in GABAergic neurons was consistent with the observed lack of physiological interaction of D1LRs with GABA receptors. Enkephalin is present in intrinsic excitatory and GABAergic neurons in the dorsal horn (Todd and Spike, 1992; Todd et al., 2003; Marvizón et al., 2007, 2009; Huang et al., 2010), rather than in afferent C-fibers (Marvizón et al., 2009). Our present confocal immunofluorescence data reveal the presence of D1R and met-enkephalin in neurons immunopositive for vesicular glutamate transporter VGLUT2, a marker of glutamatergic neurons, but not in those containing vGAT, a marker of GABAergic terminals. Probable postsynaptic targets of enkephalinergic terminals may include primary afferent terminals (Mansour et al., 1994, 1995; Ji et al., 1995; Li et al., 1998) or excitatory interneurons in the dorsal horn (Arvidsson et al., 1995; Kemp et al., 1996).

Because SCH 23390 targets both D1 and D5 receptor subtypes, the observed depressing action of the drug did not permit us to discriminate their relative contribution. *In situ* hybridization signal for D5R is indeed reportedly present in the dorsal horn (Zhu et al., 2007), and recent evidence suggests that D5R might contribute to sustained pain (Kim et al., 2015). Nonetheless, although we cannot rule out a contribution of D5 to D1LR–MOR interaction, we present evidence that the polyclonal antibody to D1R used here selectively recognized the D1 subtype, providing strong support for the involvement of D1R in the plasticity phenomena revealed by immunocytochemical and Western blot data.

Upregulation of D1LRs increases met-enkephalin availability

We show here that SNL triggers changes in the expression and subcellular organization of D1R and met-enkephalin. We found an increase in D1R-like immunoreactivity in synaptic fraction (P3) in dorsal horn homogenates from nerve-injured rats, which confocal immunofluorescence located to presynaptic active zones in met-enkephalin-containing neurons (Fig. 4). A probable

underlying mechanism may be a rise in spinal dopamine release following SNL analogous to that observed after intraplantar cargeenan injections (Gao et al., 2001), because D1R responds to prolonged exposure to dopamine by rapid recycling with high rates of repositioning to the cell membrane (Ariano et al., 1997; Bartlett et al., 2005).

We found an over fourfold increase in immunoreactivity for met-enkephalin after SNL, in keeping with observations in different models of experimental pain (Sommer and Myers, 1995; Calzà et al., 1998; Hossaini et al., 2014). Increased release of met-enkephalin and sustained MOR activation (Buesa et al., 2008) are conceivably compensatory changes for increased nociceptive input. Attenuation of met-enkephalin upregulation as shown here by postoperative blockade of D1LRs demonstrates that dopaminergic input to the dorsal horn is instrumental in sustaining increased MOR activity.

D1LRs regulate the threshold for synaptic plasticity

Conditioning LFS consistently induced synaptic LTP of C-fiber-evoked dorsal horn potentials in rats subjected to MOR blockade, but not in untreated rats, unmasking a constitutive role of MOR in repressing afferent-induced central plasticity. LTP at dorsal horn synapses is considered as a major substrate of hyperalgesia and central sensitization in the pain signaling pathway to the brain (Ji et al., 2003; Sandkühler, 2007; Sandkühler and Gruber-Schoffnegger, 2012). These findings suggest that the MOR may be recruited endogenously by repetitive afferent input rather than by single, acute stimuli, in line with previous observations that the MOR specifically represses the wind-up response to repeated noxious input (Guan et al., 2006) and interferes with the induction mechanisms of LTP following afferent high-frequency stimulation in the *in vitro* slice preparation (Terman et al., 2001). The permissive effect of MOR blockade on LTP induction could be reproduced here by blocking D1LRs, supporting that dopaminergic input to the dorsal horn is integral to constitutive repression of spinal sensitization. Direct activation of MOR by DAMGO prevented LTP occurrence regardless of D1LR blockade, indicating that D1LRs may not act by directly regulating MOR responsiveness.

Dopaminergic A11-spinal neurons have been suggested to mediate the so-called diffuse noxious inhibitory controls via recruitment of the D2 receptor subtype (Laprot et al., 2011). Our data extend those findings by showing that D1LRs are recruited largely in response to either repetitive conditioning stimulation at the C-fiber strength or afferent barrage associated with experimental nerve injury.

Sustained D1LR activation impairs MOR function

Conditioning LFS consistently induced LTP of C-fiber-evoked potentials in nerve-injured rats, demonstrating that endogenous repression of synaptic plasticity is impaired during sustained pain. LTP was NMDA receptor-dependent, as shown by the blocking effect of D-AP5, in keeping with most prior reports addressing this form of synaptic plasticity (Randić et al., 1993; Liu and Sandkühler, 1995; Svendsen et al., 1998; Pedersen and Gjerstad, 2008; Zhou et al., 2008; Qu et al., 2009). Studies suggest that tolerance to endogenous opioids secondary to augmented opioidergic neurotransmission during sustained pain may decrease sensitivity to opiate analgesics (Xu et al., 2004). SNL may provide unique conditions by increasing met-enkephalin turnover as found here. We show that D1LR upregulation leads to MOR dysfunction via sustained activation of the receptor. Thus, endogenous repression of LTP (Fig. 6) was fully preserved in nerve-

injured in rats that had been treated postoperatively with SCH 23390 at a sufficient dose to prevent met-enkephalin upregulation. Furthermore, chronic D1LR blockade after SNL preserved MOR responsiveness to opiate drugs, as supported by two lines of evidence. First, MOR could be successfully activated in nerve-injured rats that were chronically treated with SCH 23390, as demonstrated by the effectiveness of MOR agonist DAMGO to repress LTP induction. Second, the ability of DAMGO to raise thermal and mechanical pain thresholds, which was significantly impaired after SNL, could be preserved or restored to near-normal levels in SCH 23390-treated rats (Fig. 8).

By pharmacologically stimulating D1LRs in naive rats, we reproduced MOR dysfunction brought about by sustained endogenous D1LR activation. Priming D1LRs for 30 min by spinal superfusion with SKF 38393 sufficed to disrupt the ability of MOR to repress LTP (Fig. 9), revealing that the impairment of this aspect of MOR function is actually a rapidly evolving phenomenon that requires D1LR activation. Moreover, we found that endogenous repression of LTP was preserved during D1LR priming whenever sustained activation of MOR was simultaneously blocked with CTOP, further supporting that disruption of MOR function was due to sustained receptor activation. This time frame of D1LR priming is consistent with the reported rise of extracellular dopamine in the dorsal horn in response to noxious input (Gao et al., 2001). Furthermore, there are indications that continued D1LR activation may lead to MOR dysfunction in a progressive manner, because sustained D1LR stimulation by a higher concentration of SKF 38393 (250 μ M) may lead to late-onset disinhibition of evoked potentials in the absence of conditioning stimulation (Yang et al., 2005).

Central sensitization is characterized by increased gain of the nociceptive system to afferent signals (Woolf and Salter, 2000; Latremoliere and Woolf, 2009). We provide novel evidence that MOR-mediated modulation of central excitability to noxious input and MOR-mediated repression of synaptic plasticity both are regulated by dopaminergic, D1R-mediated neurotransmission. Whereas D1R-regulated recruitment of MOR is both an adaptive mechanism compensating for increased nociceptive input after peripheral nerve injury and instrumental in preventing central sensitization, sustained activation of this mechanism impairs MOR compliance and increases the probability for subsequent milder, otherwise subthreshold afferent inputs to trigger changes in sensory gain.

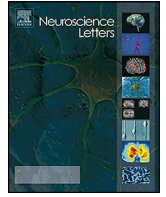
References

- Aira Z, Buesa I, García del Caño G, Salgueiro M, Mendiola N, Mingo J, Aguilera L, Bilbao J, Azkue JJ (2012) Selective impairment of spinal mu-opioid receptor mechanism by plasticity of serotonergic facilitation mediated by 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors. *Pain* 153:1418–1425. [CrossRef Medline](#)
- Aira Z, Buesa I, García del Caño G, Bilbao J, Doñate F, Zimmermann M, Azkue JJ (2013) Transient, 5-HT_{2B} receptor-mediated facilitation in neuropathic pain: up-regulation of PKC γ and engagement of the NMDA receptor in dorsal horn neurons. *Pain* 154:1865–1877. [CrossRef Medline](#)
- Aira Z, Barrenetxea T, Buesa I, Gómez-Esteban JC, Azkue JJ (2014) Synaptic upregulation and superadditive interaction of dopamine D₂- and μ -opioid receptors after peripheral nerve injury. *Pain* 155:2526–2533. [CrossRef Medline](#)
- Aira Z, Barrenetxea T, Buesa I, Azkue JJ (2015) Plasticity of α ₂-adrenergic spinal antinociception following nerve injury: selective, bidirectional interaction with the delta opioid receptor. *Brain Res* 1594:190–203. [CrossRef Medline](#)
- Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ (2008) The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods* 172:250–254. [CrossRef Medline](#)

- Almási R, Pethő G, Bölcskei K, Szolcsányi J (2003) Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a novel heat allodynia model sensitive to analgesics. *Br J Pharmacol* 139:49–58. [CrossRef Medline](#)
- Ariano MA, Sortwell CE, Ray M, Altemus KL, Sibley DR, Levine MS (1997) Agonist-induced morphologic decrease in cellular D_{1A} dopamine receptor staining. *Synapse* 27:313–321. [CrossRef Medline](#)
- Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S, Lee JH, Nakano AH, Dado RJ, Loh HH, Law PY, Wessendorf MW, Elde R (1995) Distribution and targeting of a μ -opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J Neurosci* 15:3328–3341. [Medline](#)
- Aubert I, Guigoni C, Håkansson K, Li Q, Dovero S, Barthe N, Bioulac BH, Gross CE, Fisone G, Bloch B, Bezard E (2005) Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol* 57:17–26. [CrossRef Medline](#)
- Azkue JJ, Liu XG, Zimmermann M, Sandkühler J (2003) Induction of long-term potentiation of C fibre-evoked spinal field potentials requires recruitment of group I, but not group II/III metabotropic glutamate receptors. *Pain* 106:373–379. [CrossRef Medline](#)
- Barraud Q, Obeid I, Aubert I, Barrière G, Contamin H, McGuire S, Ravenscroft P, Porras G, Tison F, Bezard E, Ghorayeb I (2010) Neuroanatomical study of the A11 diencephalospinal pathway in the non-human primate. *PLoS One* 5:e13306. [CrossRef Medline](#)
- Bartlett SE, Enquist J, Hopf FW, Lee JH, Gladher F, Kharazia V, Waldhoer M, Mailliard WS, Armstrong R, Bonci A, Whistler JL (2005) Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11521–11526. [CrossRef Medline](#)
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63:182–217. [CrossRef Medline](#)
- Beck H, Schröck H, Sandkühler J (1995) Controlled superfusion of the rat spinal cord for studying non-synaptic transmission: an autoradiographic analysis. *J Neurosci Methods* 58:193–202. [CrossRef Medline](#)
- Becker A, Grecksch G, Kraus J, Peters B, Schroeder H, Schulz S, Höllt V (2001) Loss of locomotor sensitisation in response to morphine in D1 receptor deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363:562–568. [CrossRef Medline](#)
- Bigal ME, Lipton RB (2009) Overuse of acute migraine medications and migraine chronification. *Curr Pain Headache Rep* 13:301–307. [CrossRef Medline](#)
- Brewer KL, Baran CA, Whitfield BR, Jensen AM, Clemens S (2014) Dopamine D3 receptor dysfunction prevents anti-nociceptive effects of morphine in the spinal cord. *Front Neural Circuits* 8:62. [CrossRef Medline](#)
- Buesa I, Ortiz V, Aguilera L, Torre F, Zimmermann M, Azkue JJ (2006) Disinhibition of spinal responses to primary afferent input by antagonism at GABA receptors in urethane-anaesthetised rats is dependent on NMDA and metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 50:585–594. [CrossRef Medline](#)
- Buesa I, Urrutia A, Aira Z, Salgueiro M, Bilbao J, Mozas M, Aguilera L, Zimmermann M, Azkue JJ (2008) Depression of C fibre-evoked spinal field potentials by the spinal delta opioid receptor is enhanced in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain: involvement of the musbytype. *Neuropharmacology* 55:1376–1382. [CrossRef Medline](#)
- Burgess SE, Gardell LR, Ossipov MH, Malan TP Jr, Vanderah TW, Lai J, Porreca F (2002) Time-dependent descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains, but does not initiate, neuropathic pain. *J Neurosci* 22:5129–5136. [Medline](#)
- Calzà L, Pozza M, Zanni M, Manzini CU, Manzini E, Hökfelt T (1998) Peptide plasticity in primary sensory neurons and spinal cord during adjuvant-induced arthritis in the rat: an immunocytochemical and *in situ* hybridization study. *Neuroscience* 82:575–589. [CrossRef Medline](#)
- Cameron DL, Williams JT (1993) Dopamine D1 receptors facilitate transmitter release. *Nature* 366:344–347. [CrossRef Medline](#)
- Cao J, Yang X, Liu YN, Suo ZW, Shi L, Zheng CR, Yang HB, Li S, Hu XD (2011) GABAergic disinhibition induced pain hypersensitivity by up-regulating NMDA receptor functions in spinal dorsal horn. *Neuropharmacology* 60:921–929. [CrossRef Medline](#)
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55–63. [CrossRef Medline](#)
- Charbit AR, Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ (2009) Neurons of the dopaminergic/calcitonin gene-related peptide A11 cell group modulate neuronal firing in the trigeminocervical complex: an electrophysiological and immunohistochemical study. *J Neurosci* 29:12532–12541. [CrossRef Medline](#)
- Chen C, Regehr WG (1997) The mechanism of cAMP-mediated enhancement at a cerebellar synapse. *J Neurosci* 17:8687–8694. [Medline](#)
- Chen TC, Cheng YY, Sun WZ, Shyu BC (2008) Differential regulation of morphine antinociceptive effects by endogenous enkephalinergic system in the forebrain of mice. *Mol Pain* 4:41. [CrossRef Medline](#)
- Christie MJ (2008) Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol* 154:384–396. [CrossRef Medline](#)
- Chu LF, Angst MS, Clark D (2008) Opioid-induced hyperalgesia in humans: molecular mechanisms and clinical considerations. *Clin J Pain* 24:479–496. [CrossRef Medline](#)
- Delfs JM, Kong H, Mestek A, Chen Y, Yu L, Reisine T, Chesselet MF (1994) Expression of mu opioid receptor mRNA in rat brain: an *in situ* hybridization study at the single cell level. *J Comp Neurol* 345:46–68. [CrossRef Medline](#)
- Dubois A, Savasta M, Curet O, Scatton B (1986) Autoradiographic distribution of the D1 agonist [³H]SKF 38393, in the rat brain and spinal cord. Comparison with the distribution of D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 19:125–137. [CrossRef Medline](#)
- Fields H (2004) State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 5:565–575. [CrossRef Medline](#)
- Fleetwood-Walker SM, Hope PJ, Mitchell R (1988) Antinociceptive actions of descending dopaminergic tracts on cat and rat dorsal horn somatosensory neurones. *J Physiol* 399:335–348. [CrossRef Medline](#)
- Gao X, Zhang YQ, Zhang LM, Wu GC (2001) Effects of intraplantar injection of carrageenan on central dopamine release. *Brain Res Bull* 54:391–394. [CrossRef Medline](#)
- Guan Y, Borzan J, Meyer RA, Raja SN (2006) Windup in dorsal horn neurons is modulated by endogenous spinal μ -opioid mechanisms. *J Neurosci* 26:4298–4307. [CrossRef Medline](#)
- Hay JL, White JM, Bochner F, Somogyi AA, Semple TJ, Rounsefell B (2009) Hyperalgesia in opioid-managed chronic pain and opioid-dependent patients. *J Pain* 10:316–322. [CrossRef Medline](#)
- Hökfelt T, Phillipson O, Goldstein M (1979) Evidence for a dopaminergic pathway in the rat descending from the A11 cell group to the spinal cord. *Acta Physiol Scand* 107:393–395. [CrossRef Medline](#)
- Hossaini M, Duraku LS, Kohli SK, Jongen JL, Holstege JC (2014) Spinal distribution of c-Fos activated neurons expressing enkephalin in acute and chronic pain models. *Brain Res* 1543:83–92. [CrossRef Medline](#)
- Huang J, Chen J, Wang W, Wang W, Koshimizu Y, Wei YY, Kaneko T, Li YQ, Wu SX (2010) Neurochemical properties of enkephalinergic neurons in lumbar spinal dorsal horn revealed by preproenkephalin-green fluorescent protein transgenic mice. *J Neurochem* 113:1555–1564. [CrossRef Medline](#)
- Ji RR, Zhang Q, Law PY, Low HH, Elde R, Hökfelt T (1995) Expression of μ -, δ -, and κ -opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J Neurosci* 15:8156–8166. [Medline](#)
- Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ (2003) Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci* 26:696–705. [CrossRef Medline](#)
- Joseph EK, Levine JD (2010) Multiple PKC ϵ -dependent mechanisms mediating mechanical hyperalgesia. *Pain* 150:17–21. [CrossRef Medline](#)
- Kemp T, Spike RC, Watt C, Todd AJ (1996) The mu-opioid receptor (MOR1) is mainly restricted to neurons that do not contain GABA or glycine in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 75:1231–1238. [CrossRef Medline](#)
- Kim JY, Tillu DV, Quinn TL, Mejia GL, Shy A, Asiedu MN, Murad E, Schumann AP, Totsch SK, Sorge RE, Mantyh PW, Dussor G, Price TJ (2015) Spinal dopaminergic projections control the transition to pathological pain plasticity via a D1/D5-mediated mechanism. *J Neurosci* 35:6307–6317. [CrossRef Medline](#)
- Kim SH, Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355–363. [CrossRef Medline](#)
- Kovelowski CJ, Ossipov MH, Sun H, Lai J, Malan TP, Porreca F (2000) Supraspinal cholecystokinin may drive tonic descending facilitation mechanisms to maintain neuropathic pain in the rat. *Pain* 87:265–273. [CrossRef Medline](#)

- Laprot O, Melin C, Modolo A, Nicolas C, Messaoudi Y, Monconduit L, Artola A, Luccarini P, Dalle R (2011) Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn. *Pain* 152:1821–1831. [CrossRef Medline](#)
- Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10:895–926. [CrossRef Medline](#)
- Levant B, McCarron KE (2001) D(3) dopamine receptors in rat spinal cord: implications for sensory and motor function. *Neurosci Lett* 303:9–12. [CrossRef Medline](#)
- Li JL, Ding YQ, Li YQ, Li JS, Nomura S, Kaneko T, Mizuno N (1998) [Immunocytochemical localization of mu-opioid receptor in primary afferent neurons containing substance P or calcitonin gene-related peptide: a light and electron microscope study in the rat. *Brain Res* 794:347–352. \[CrossRef Medline\]\(#\)](#)
- Li Q, Lau A, Morris TJ, Guo L, Fordyce CB, Stanley EF (2004) A syntaxin 1, G_{α_o} , and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci* 24:4070–4081. [CrossRef Medline](#)
- Liu XG, Sandkühler J (1995) Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N-methyl-D-aspartic acid receptor blockage. *Neurosci Lett* 191:43–46. [CrossRef Medline](#)
- Mango D, Bonito-Oliva A, Ledonne A, Nisticò R, Castelli V, Giorgi M, Sancsario G, Fisone G, Berretta N, Mercuri NB (2014) Phosphodiesterase 10A controls D1-mediated facilitation of GABA release from striatonigral projections under normal and dopamine-depleted conditions. *Neuropharmacology* 76:127–136. [CrossRef Medline](#)
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ (1994) Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an *in situ* hybridization study. *J Comp Neurol* 350:412–438. [CrossRef Medline](#)
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Akil H, Watson SJ (1995) [Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *J Chem Neuroanat* 8:283–305. \[CrossRef Medline\]\(#\)](#)
- Mao J (1999) [NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 30:289–304. \[CrossRef Medline\]\(#\)](#)
- Mao J, Mayer DJ (2001) Spinal cord neuroplasticity following repeated opioid exposure and its relation to pathological pain. *Ann NY Acad Sci* 933:175–184. [CrossRef Medline](#)
- Marvizón JC, Pérez OA, Song B, Chen W, Bunnett NW, Grady EF, Todd AJ (2007) Calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 1 in the rat dorsal horn: localization in glutamatergic presynaptic terminals containing opioids and adrenergic α 2C receptors. *Neuroscience* 148:250–265. [CrossRef Medline](#)
- Marvizón JC, Chen W, Murphy N (2009) Enkephalins, dynorphins, and beta-endorphin in the rat dorsal horn: an immunofluorescence colocalization study. *J Comp Neurol* 517:51–68. [CrossRef Medline](#)
- Munro G (2007) Dopamine D(1) and D(2) receptor agonism enhances antinociception mediated by the serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor duloxetine in the rat formalin test. *Eur J Pharmacol* 575:66–74. [CrossRef Medline](#)
- Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H (2004) Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* 24:165–205. [CrossRef Medline](#)
- Ossipov MH, Lai J, Malan TP Jr, Porreca F (2000) Spinal and supraspinal mechanisms of neuropathic pain. *Ann NY Acad Sci* 909:12–24. [CrossRef Medline](#)
- Pedersen LM, Gjerstad J (2008) Spinal cord long-term potentiation is attenuated by the NMDA-2B receptor antagonist Ro 25-6981. *Acta Physiol (Oxf)* 192:421–427. [CrossRef](#)
- Qu S, Ondo WG, Zhang X, Xie WJ, Pan TH, Le WD (2006) Projections of diencephalic dopamine neurons into the spinal cord in mice. *Exp Brain Res* 168:152–156. [CrossRef Medline](#)
- Qu XX, Cai J, Li MJ, Chi YN, Liao FF, Liu FY, Wan Y, Han JS, Xing GG (2009) Role of the spinal cord NR2B-containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain. *Exp Neurol* 215:298–307. [CrossRef Medline](#)
- Randić M, Jiang MC, Cerne R (1993) Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J Neurosci* 13:5228–5241. [Medline](#)
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T (1994) Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 45:330–334. [Medline](#)
- Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustín O, de Medina FS (2010) Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 401:318–320. [CrossRef Medline](#)
- Sandkühler J (2007) Understanding LTP in pain pathways. *Mol Pain* 3:9. [CrossRef Medline](#)
- Sandkühler J, Gruber-Schoffnegger D (2012) Hyperalgesia by synaptic long-term potentiation (LTP): an update. *Curr Opin Pharmacol* 12:18–27. [CrossRef Medline](#)
- Schambra UB, Duncan GE, Breese GR, Fornaretto MG, Caron MG, Fremeau RT Jr (1994) Ontogeny of D1A and D2 dopamine receptor subtypes in rat brain using *in situ* hybridization and receptor binding. *Neuroscience* 62:65–85. [CrossRef Medline](#)
- Schoffelmeyer AN, Vanderschuren LJ, De Vries TJ, Hogenboom F, Wardeh G, Mulder AH (2000) Synergistically interacting dopamine D1 and NMDA receptors mediate nonvesicular transporter-dependent GABA release from rat striatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 20:3496–3503. [Medline](#)
- Skagerberg G, Lindvall O (1985) Organization of diencephalic dopamine neurones projecting to the spinal cord in the rat. *Brain Res* 342:340–351. [CrossRef Medline](#)
- Sommer C, Myers RR (1995) Neurotransmitters in the spinal cord dorsal horn in a model of painful neuropathy and in nerve crush. *Acta Neuro-pathol* 90:478–485. [CrossRef Medline](#)
- Svensen F, Tjølsen A, Hole K (1998) AMPA and NMDA receptor-dependent spinal LTP after nociceptive tetanic stimulation. *Neuroreport* 9:1185–1190. [CrossRef Medline](#)
- Tamae A, Nakatsuka T, Koga K, Kato G, Furue H, Katafuchi T, Yoshimura M (2005) Direct inhibition of substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord by activation of dopamine D2-like receptors. *J Physiol* 568:243–253. [CrossRef Medline](#)
- Taniguchi W, Nakatsuka T, Miyazaki N, Yamada H, Takeda D, Fujita T, Kumamoto E, Yoshida M (2011) *In vivo* patch-clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on substantia gelatinosa neurons in the spinal cord. *Pain* 152:95–105. [CrossRef Medline](#)
- Terman GW, Eastman CL, Chavkin C (2001) Mu opiates inhibit long-term potentiation induction in the spinal cord slice. *J Neurophysiol* 85:485–494. [Medline](#)
- Todd AJ, Spike RC (1992) Co-localization of Met-enkephalin and somatostatin in the spinal cord of the rat. *Neurosci Lett* 145:71–74. [CrossRef Medline](#)
- Todd AJ, Hughes DI, Polgár E, Nagy GG, Mackie M, Ottersen OP, Maxwell DJ (2003) The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur J Neurosci* 17:13–27. [CrossRef Medline](#)
- Tritsch NX, Sabatini BL (2012) Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron* 76:33–50. [CrossRef Medline](#)
- Trudeau LE, Emery DG, Haydon PG (1996) Direct modulation of the secretory machinery underlies PKA-dependent synaptic facilitation in hippocampal neurons. *Neuron* 17:789–797. [CrossRef Medline](#)
- van Dijken H, Dijk J, Voom P, Holstege JC (1996) Localization of dopamine D2 receptor in rat spinal cord identified with immunocytochemistry and *in situ* hybridization. *Eur J Neurosci* 8:621–628. [CrossRef Medline](#)
- Wilkinson SM, Becker WJ, Heine JA (2001) Opiate use to control bowel motility may induce chronic daily headache in patients with migraine. *Headache* 41:303–309. [CrossRef Medline](#)
- Williams JT, Ingram SL, Henderson G, Chavkin C, von Zastrow M, Schulz S, Koch T, Evans CJ, Christie MJ (2013) Regulation of μ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol Rev* 65:223–254. [CrossRef Medline](#)
- Woolf CJ, Salter MW (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288:1765–1769. [CrossRef Medline](#)
- Xu M, Moratalla R, Gold LH, Hiroi N, Koob GF, Graybiel AM, Tonegawa S (1994) Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioral responses. *Cell* 79:729–742. [CrossRef Medline](#)
- Xu M, Petraschka M, McLaughlin JP, Westenbroek RE, Caron MG, Lefkowitz RJ, Czyzyk TA, Pintar JE, Terman GW, Chavkin C (2004) Neuropathic pain acti-

- vates the endogenous κ opioid system in mouse spinal cord and induces opioid receptor tolerance. *J Neurosci* 24:4576–4584. [CrossRef Medline](#)
- Yang HW, Zhou LJ, Hu NW, Xin WJ, Liu XG (2005) Activation of spinal d1/d5 receptors induces late-phase LTP of C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *J Neurophysiol* 94:961–967. [CrossRef Medline](#)
- Yang X, Yang HB, Xie QJ, Liu XH, Hu XD (2009) Peripheral inflammation increased the synaptic expression of NMDA receptors in spinal dorsal horn. *Pain* 144:162–169. [CrossRef Medline](#)
- Yokoyama C, Okamura H, Nakajima T, Taguchi J, Iyata Y (1994) Autoradiographic distribution of [3H]YM-09151-2, a high-affinity and selective antagonist ligand for the dopamine D2 receptor group, in the rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* 344:121–136. [CrossRef Medline](#)
- Zarrindast MR, Nassiri-Rad S, Pazouki M (1999) Effects of dopaminergic agents on antinociception in formalin test. *Gen Pharmacol* 32:517–522. [CrossRef Medline](#)
- Zhao H, Zhu W, Pan T, Xie W, Zhang A, Ondo WG, Le W (2007) Spinal cord dopamine receptor expression and function in mice with 6-OHDA lesion of the A11 nucleus and dietary iron deprivation. *J Neurosci Res* 85:1065–1076. [CrossRef Medline](#)
- Zhou LJ, Zhong Y, Ren WJ, Li YY, Zhang T, Liu XG (2008) BDNF induces late-phase LTP of C-fiber evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *Exp Neurol* 212:507–514. [CrossRef Medline](#)
- Zhu H, Clemens S, Sawchuk M, Hochman S (2007) Expression and distribution of all dopamine receptor subtypes (D₁–D₅) in the mouse lumbar spinal cord: a real-time PCR and non-autoradiographic *in situ* hybridization study. *Neuroscience* 149:885–897. [CrossRef Medline](#)



Research paper

Spinal D1-like dopamine receptors modulate NMDA receptor-induced hyperexcitability and NR1 subunit phosphorylation at serine 889



Zigor Aira, Teresa Barrenetxea, Itsaso Buesa, Endika Martínez, Jon Jatsu Azkue*

Department of Neurosciences, School of Medicine and Dentistry, University of the Basque Country UPV/EHU, Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Spain

HIGHLIGHTS

- NMDA receptor-induced hyperexcitability after SNL depends on the D1-like receptor.
- D1-like receptor stimulation enables the NMDA receptor to induce hyperexcitability.
- D1-like receptors are required for NMDA receptor phosphorylation after nerve injury.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2016

Received in revised form 1 March 2016

Accepted 2 March 2016

Available online 5 March 2016

ABSTRACT

Activation of the *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) in dorsal horn neurons is recognized as a fundamental mechanism of central sensitization and pathologic pain. This study assessed the influence of dopaminergic, D1-like receptor-mediated input to the spinal dorsal horn on NMDAR function.

Spinal superfusion with selective NMDAR agonist *cis*-ACPD significantly increased C-fiber-evoked field potentials in rats subjected to spinal nerve ligation (SNL), but not in sham-operated rats. Simultaneous application of D1LR antagonist SCH 23390 dramatically reduced hyperexcitability induced by *cis*-ACPD. Furthermore, *cis*-ACPD-induced hyperexcitability seen in nerve-ligated rats could be mimicked in uninjured rats during stimulation of D1LRs by agonist SKF 38393 at subthreshold concentration.

Phosphorylation of NMDAR subunit NR1 at serine 889 at postsynaptic sites was found to be increased in dorsal horn neurons 90 min after SNL, as assessed by increased co-localization with postsynaptic marker PSD-95. Increased NR1 phosphorylation was attenuated in the presence of SCH 23390 in the spinal superfusate.

The present results support that D1LRs regulate most basic determinants of NMDAR function in dorsal horn neurons, suggesting a potential mechanism whereby dopaminergic input to the dorsal horn can modulate central sensitization and pathologic pain.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Synaptic activation of the *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) is considered as a critical cellular mechanism underlying generation and maintenance of central sensitization and pathologic pain after tissue injury or inflammation [1,2]. In the spinal dorsal horn, NMDAR activity is greatly enhanced in several forms of synaptic plasticity induced by intense or sustained noxious input [3–6]. Enhanced NMDAR activity during sustained pain entails increased excitatory response to receptor activation [7,8], presumably due to receptor permeation upon sufficient pre- and postsynaptic depolarization [11]. In addition, phosphorylation of distinct NMDAR

subunits, indicative of regulatory changes of receptor function at the molecular level by protein kinases and phosphatases [12,13], has been linked to glutamate-dependent plasticity associated to spinal hyperexcitability in persistent pain states [14–16].

Several studies support that NMDAR function in spinal dorsal horn neurons may be strongly influenced by descending pain modulation systems. For example, serotonergic input to the dorsal horn increases phosphorylation of the NMDA receptor subunit 1 at postsynaptic loci via subtype 5-HT_{2B} receptors [7,8]. In addition, descending long axons arising from diencephalic A11 region are closely involved in the control of spinal nociception [17,18], although direct interactions with the NMDAR have not been addressed so far. This possibility is indeed theoretically sound, in light that cAMP/PKA intracellular signaling triggered by D1/D5 dopamine receptor (D1-like receptors, D1LRs) stimulation can lead to NMDAR subunits phosphorylation and surface trafficking in

* Corresponding author.

E-mail address: jonjatsu.azkue@ehu.eus (J.J. Azkue).

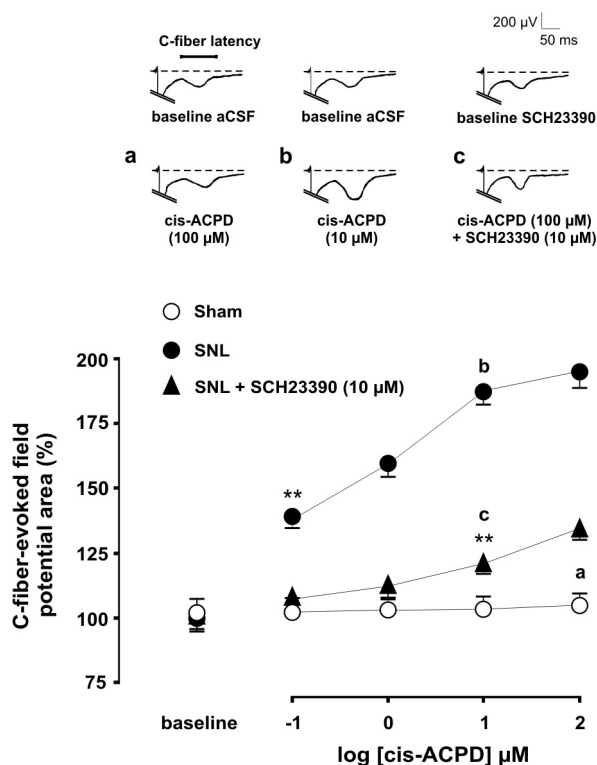


Fig. 1. Blockade of D1RLs prevents the increase in C-fiber-evoked potentials that is induced by cis-ACPD in nerve-injured rats.

Mean areas of C-fiber-evoked potentials are shown during spinal superfusion with increasing, cumulative concentrations of NMDAR agonist cis-ACPD either alone (open circles for sham-operated rats and solid circles for nerve-ligated rats) or in combination with subthreshold concentrations of D1LR antagonist SCH 23390 at 10 μM (solid triangles). Superfusion with cis-ACPD notably increases evoked potentials in nerve-injured rats, an effect that is strongly attenuated by SCH 23390 co-administration. Asterisks indicate statistical significance at $p < 0.01$ using the *post hoc* Bonferroni test following one-way ANOVA, when comparing field potentials magnitudes during drug administration to baseline control potentials prior to drug delivery ($n = 6$ each group; error bars indicate SEM). For clarity, only the earliest statistically significant effects are labeled. Representative recordings shown at the top illustrate the effect of 10 μM cis-ACPD on C-fiber-evoked field potentials in the absence (b) or presence (c) of 10 μM SCH 23390 (scale 50 ms, 200 mV; horizontal bar delimits C-fiber latency).

synaptic membranes [19,20], and synergistic interactions between D1LRs and NMDAR have indeed been previously described in hippocampus and prefrontal cortex [21].

In the present study, we used electrophysiological recordings of C-fiber-evoked field potentials to determine the possible involvement D1LRs in modulating the enhancement of NMDAR activation during neuropathic pain induced by peripheral nerve injury. We used spinal hyperexcitability induced by NMDAR agonist cis-ACPD as an end-point measure of enhanced NMDAR activation, in combination with D1LR selective drugs. In addition, we employed confocal immunofluorescence techniques to evaluate the influence of D1LRs in NMDAR phosphorylation at postsynaptic sites in dorsal horn neurons.

2. Materials and methods

2.1. Animals and SNL surgery

Animal experiments were performed according to the European Communities Council Directive (86/609/ECC) on adult male Sprague–Dawley rats (250–350 g; OF1, IFFA Credo, L'Arbresle, France). The protocols for animal care and use were approved by the appropriate committee at the University of the Basque Country. The left spinal L5 nerve root was ligated as described previously in

Ref. [22] under 4% chloral hydrate anesthesia (0.4 g/kg, intraperitoneally). Sham-operated animals received no nerve ligation, being otherwise identically prepared and assessed. After surgery, the animals were allocated on individual cages to recover, with food and water available *ad libitum*.

2.2. Electrophysiology

Procedures were carried out under urethane anesthesia (1.5 g/kg, i.p.). A tracheotomy was performed to maintain an open, low resistance airway, and cannulae were inserted into the left common carotid artery and the right internal jugular vein for arterial blood pressure monitoring (mean 80–100 mmHg) and continuous infusion of Tyrode's solution (in mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 1.4CaCl₂, 1 MgCl₂, 6 NaHCO₃, 2.1 NaH₂PO₄, 6.5 D-(+)-glucose; pH 7.4) at 0.8–1 ml/h, respectively. Colorectal temperature was continuously monitored and euthermia (37–38 °C) was maintained via a feedback-controlled underbody heating pad for the duration of the experimental procedure. The left sciatic nerve was exposed, gently freed from connective tissue and placed onto platinum hook electrodes for bipolar electrical stimulation. Bilateral dorsal laminectomies were performed at vertebrae T13–L1, the vertebral column was immobilized to a rigid frame, and the dura mater overlying lumbosacral spinal segments was carefully removed.

The electrophysiological setup was essentially as described previously in Ref. [23]. Tungsten microelectrodes (impedance 5 M Ω) were inserted 1 mm lateral to the spinal mid-line at a depth of 100–300 μm from the dorsal surface of the cord, i.e., into laminae I–II, by means of a hydraulic microdrive. The position of the tip of the recording electrode in the spinal cord was marked with a small electrolytic lesion by delivery of an anodal current through the recording electrode (50 μA for 10 s), and histologically verified. Single monophasic, square-wave electrical pulses were delivered as test stimuli to the sciatic nerve trunk at a mid-thigh level on a per-minute basis by means of a computer-controlled stimulus isolator, and the elicited spinal field potentials were amplified (analog band-pass set at 1–550 Hz), displayed on an oscilloscope, and digitized to a PC-based computer at a 10 kHz sampling rate via an A/D converter card (MIO16, National Instruments, Austin, TX, USA). Electrical stimulation of the sciatic nerve trunk did not permit us to discern the relative contribution of cutaneous, muscle and joint fibres to the recorded signals. Care was taken to avoid stimulus repetition. Field potentials were evoked in superficial laminae of the spinal dorsal horn by suprathreshold, electrical C-fiber stimulation (3–3.5 mA pulses of 0.5 ms duration) and quantified as described previously in Ref. [24].

Evoked potentials were recorded during spinal superfusion with appropriate drugs, alone or in combination. Each drug concentration change lasted for 20 min, and only the last 10 evoked field potentials were extracted for analysis from the baseline control period and from each treatment period. The areas of field potentials evoked during each treatment period were compared to those recorded during baseline, aCSF superfusion period, by using univariate analysis of variance and *post hoc*, Bonferroni or Tamhane multiple comparison tests.

2.3. Drug preparation and delivery

Drugs used for *in vivo* electrophysiological recordings included NMDA agonist (\pm)-1-aminocyclopentane-cis-1,3-dicarboxylic acid (cis-ACPD), D1LR agonist (\pm)-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-(1H)-3-benzazepine-7,8-diol hydrobromide (SKF38393), and D1LR antagonist (R)-(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride (SCH 23390), all three from Tocris (Bristol, UK). Stock solutions were obtained by diluting drug powder as per vendor, and working solutions

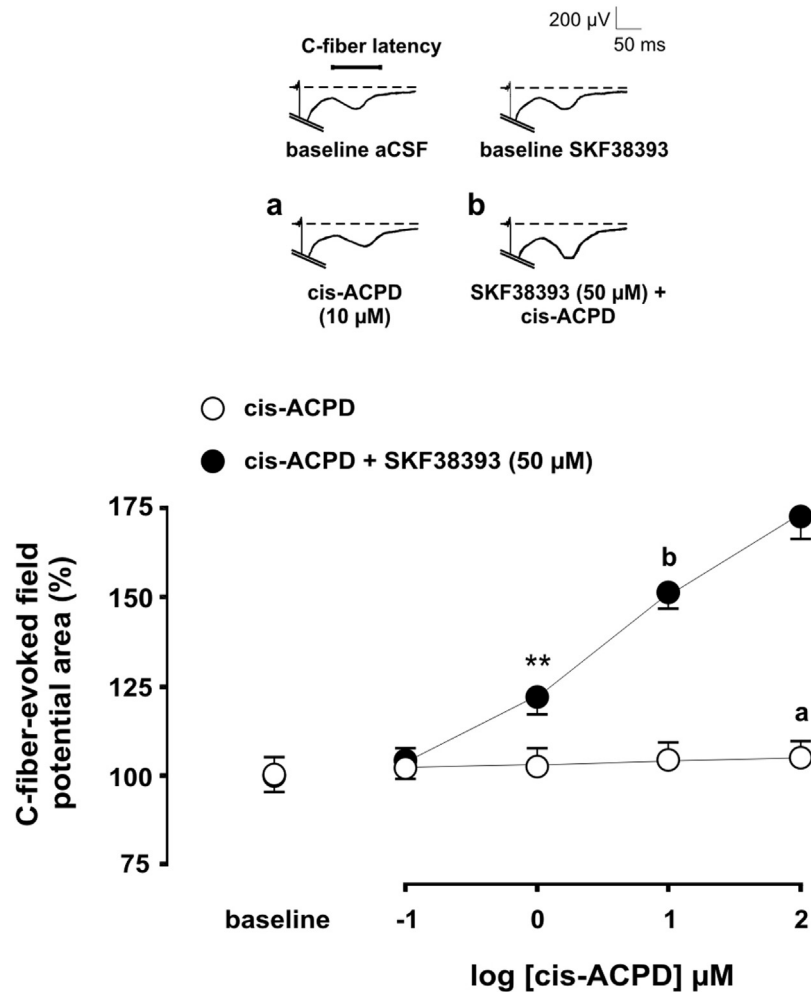


Fig. 2. Simultaneous activation of D1R and NMDAR increases potentials in sham-operated rats.

Mean areas of C-fiber-evoked field potentials are shown during spinal superfusion with increasing, cumulative concentrations the *cis*-ACPD alone (open circles) or in combination with D1LR agonist SKF 38393 at 50 μM (solid circles). Superfusion with *cis*-ACPD alone induces no change, however SKF 38393 co-administration increases C-fiber-evoked potentials in a concentration-dependent manner. Asterisks indicate statistical significance ($p < 0.01$ at Bonferroni's test) of comparisons of mean evoked potential areas to baseline (aCSF) controls. Representative recordings illustrate the effects of drug administration on evoked field potentials. Error bars indicate SEM.

were prepared in artificial cerebrospinal fluid (aCSF; in mM: 130 NaCl, 3.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 24 NaHCO_3 , 1.2 CaCl_2 , 1.2 MgSO_4 , 10 D-(+)-glucose; pH 7.4) immediately before delivery. Drugs were applied in small volumes (10–15 μl) by controlled superfusion via a silicone, 40–50 mm² pool attached to the dorsal surface of the spinal cord [25].

2.4. Immunofluorescence

Deeply anesthetized rats (sodium pentobarbital 50 mg/kg, i.p.) were perfused transcardially with 250 ml 0.9% saline followed by 900 ml 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PB, 0.1 M, pH 7.4). L4–L5 spinal segments were removed, post-fixed with 4% paraformaldehyde in PB for 4 h, and then cryoprotected for 48 h with 30% sucrose in phosphate buffer saline (PBS) at 4° C. Coronal, 40 μm-thick cryotome sections were serially collected in PBS and preincubated with 1% bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 1% normal serum (1 h, RT). Sections were incubated overnight at 4° C with primary antibodies. These included a rabbit polyclonal to pNMDAR^{ser889} (1:500, from Millipore, MA, USA), and mouse monoclonal to PSD-95 (1:400, Thermo Scientific, IL, USA). After preincubations with normal serum of species other

than those in which the secondary antibodies were raised, sections were sequentially incubated with Cy5 650-conjugated donkey anti-rabbit, and Dylight 549-conjugated donkey anti-mouse fluorescent antibodies (1:200, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) and mounted in Mowiol (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Double-labeled sections were viewed in a Fluoview FV500 Olympus confocal microscope, and digital photomicrographs were acquired sequentially to avoid overlapping of fluorescent emission spectra. ImageJ software (Intensity Correlation plug-in [26]) was used to adjust brightness and contrast, to obtain image co-localization overlays, as well as to carry out intensity correlation-based analyses of confocal photomicrographs of labeled tissue. Pearson's correlation coefficients were used to assess colocalization, and Fisher's exact test was used to compare Pearson's coefficients.

3. Results

3.1. D1LR blockade attenuates NMDAR-mediated hyperexcitability after SNL

Spinal superfusion with the selective NMDAR agonist *cis*-ACPD (at up to 1 mM) failed to alter C-fiber-evoked potentials in

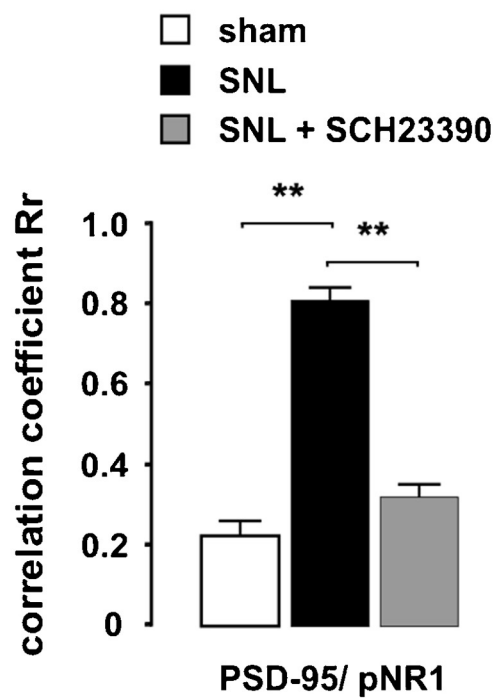
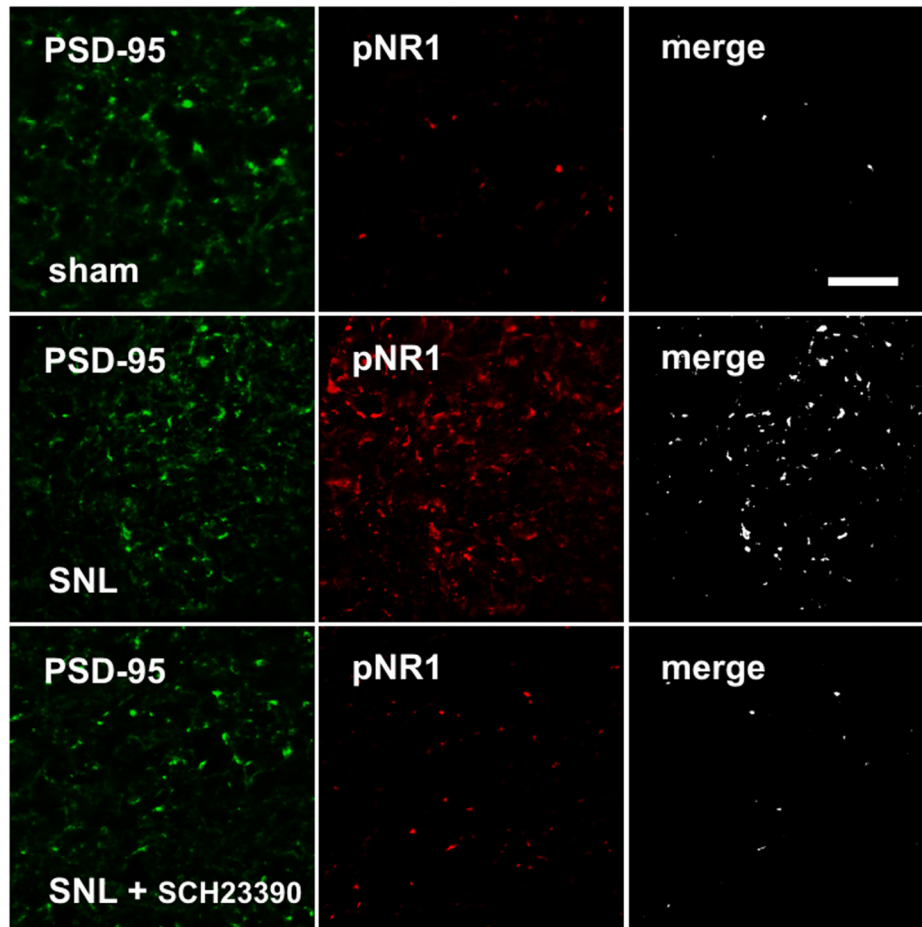


Fig. 3. Blockade of D1LRs in the dorsal horn prevents the increase in postsynaptic phosphorylation of NR1 at serine 889 that is triggered by SNL. Confocal-immunofluorescence labelings for NR1 and postsynaptic density marker PSD-95 are shown on a transverse section of L5. All pictures were taken from superficial layers of the dorsal horn. Scale bar equals 5 μ m. Co-expression of pNR1 and PSD-95, as shown by white overlay and confirmed by correlation coefficient analyses, is increased on the injury side after SNL, indicating increased presence of pNR1 in postsynaptic densities. Spinal superfusion with D1LR antagonist SCH 23390 starting prior to SNL attenuates pNR1 up-regulation induced by SNL. Asterisks in correlation coefficient graphs indicate statistical significance ($p < 0.01$) at Fisher's exact test for comparison of Pearson's correlation coefficients. Error bars indicate SEM.

sham-operated rats. In contrast, the drug consistently increased evoked potentials in nerve-ligated rats. Thus, agonist administration at 100 nM concentration significantly increased evoked potential magnitudes by $37.30 \pm 0.58\%$ ($14.87 \pm 0.32 \mu\text{V ms}$ vs $10.83 \pm 0.38 \mu\text{V ms}$ during recording prior to drug application; $p < 0.01$, $n = 6$), and $91.14 \pm 3.19\%$ increase was induced by drug application at 100 μM concentration ($20.70 \pm 0.41 \mu\text{V ms}$; Fig. 1).

To assess the involvement of D1LRs in *cis*-ACPD-induced hyperexcitability, we co-administered SCH 23390, a D1LR antagonist, starting 30 min before superfusion with *cis*-ACPD. Co-administration of 10 μM SCH 23390 dramatically reduced *cis*-ACPD-induced hyperexcitability, raising the least effective concentration of *cis*-ACPD to significantly increase evoked potentials to 10 μM ($19.22 \pm 0.40\%$; Fig. 1). SCH 23390 (10 μM) alone had no effect on evoked potentials (data not shown).

3.2. D1LR activation exacerbates NMDAR-induced hyperexcitability

We administered D1LR agonist SKF 38393 at subthreshold concentration (50 μM , as determined in preliminary experiments) in combination with increasing, cumulative concentrations of *cis*-ACPD in sham-operated rats. In the presence of SKF 38393, 1 μM *cis*-ACPD significantly increased evoked potentials by $22.34 \pm 0.79\%$ ($12.65 \pm 0.45 \mu\text{V ms}$ vs $10.34 \pm 0.36 \mu\text{V ms}$ during superfusion with SKF 38393 alone; $p < 0.01$, $n = 6$), and by up to $63.54 \pm 1.09\%$ at 100 μM concentration ($16.91 \pm 0.29 \mu\text{V ms}$ vs $10.34 \pm 0.34 \mu\text{V ms}$ during superfusion with SKF 38393 alone; Fig. 2).

3.3. D1LR blockade prevents synaptic up-regulation of phosphorylated NR1 subunit at serine 889 after SNL

It has been previously shown that the NR1 subunit of the NMDAR undergoes rapid phosphorylation at Ser 889 in postsynaptic densities of spinal dorsal horn neurons in rats subjected to SNL [7,8]. Here, we evaluated the involvement of D1LRs in NR1 phosphorylation by comparatively assessing co-immunolocalization of pNR1^{ser889} with postsynaptic marker PSD-95 90 min after SNL both in the presence and absence of D1LR blockade by spinal superfusion with SCH 23390. Increase in co-localization of pNR1 and PSD-95 that followed SNL was notably attenuated in SCH 23390-treated rats relative to vehicle-treated ones. Pixel-wise correlation analyses from confocal double-labeled photomicrographs confirmed significantly lower Rr values in SCH 23390-treated rats relative to nerve-ligated rats without treatment (Rr 0.31 vs. 0.80, respectively, $z = -67.71$, $p < 0.01$ at the Fisher's exact test; Fig. 3).

4. Discussion

A large body of evidence supports a critical role for the NMDAR in enhancing spinal nociceptive neurotransmission after tissue injury or inflammation. Prolonged or intense peripheral afferent input appears to be a prerequisite for enhancing NMDAR activation in dorsal horn neurons, most likely through removal of Mg(2+) blockade reduction [27]. Peripheral nerve injury as used in the present study has been reported to produce sustained facilitation of NMDAR-mediated membrane currents in dorsal horn neurons for several days after lesion [28].

The effect of NMDAR-related drugs in the dorsal horn is substantially different depending on whether or not spinal neurons are sensitized. Thus, pharmacological inhibition of the NMDAR can reduce both receptive field sizes and pain hypersensitivity signs in animals with peripheral inflammation, but not in the basal condition [29,30]. Accordingly, we show that NMDAR stimulation by using an agonist drug dramatically increases the

amplitudes of electrically evoked, C-fiber-mediated field potentials in a concentration-dependent manner in rats that had been previously subjected to SNL but not in uninjured ones. Therefore, *cis*-ACPD-induced hyperexcitability was used here as an end-point measure of enhanced NMDAR activation after SNL. A major finding of the present study is that D1LRs critically modulate NMDAR activation in the spinal dorsal horn. In nerve-injured rats, co-administration of D1LR antagonist SCH 23390 dramatically prevented *cis*-ACPD-induced augmentation of C-fiber-evoked potentials, supporting that endogenous activation of D1LRs by spinally released dopamine after SNL is a necessary condition for NMDAR-mediated hyperexcitability. Prior evidence indeed exists that the release of dopamine in the spinal dorsal horn is increased in pathologic pain [31]. Facilitation of NMDAR-mediated responses by D1LRs has been shown to be instrumental in both potentiating striatal NMDAR-expressing synapses [20,32] and promoting surface expression of NR1 and NR2B subunits on prefrontal cortex pyramidal neurons [33]. Protein kinase activation, as already described elsewhere in the central nervous system, is a candidate intracellular mechanism responsible for D1LR-induced enhancement of NMDAR function [34,35]. Moreover, we show that brief spinal superfusion with *cis*-ACPD in uninjured rats greatly increases C-fiber-evoked potentials during co-stimulation of D1LRs, supporting that D1LR recruitment is sufficient to gate the NMDAR and render it responsive to ligand binding. These observations suggest that activity at the descending dopaminergic projecting systems, which is rapidly increased following SNL [31,36], as well as increased glutamate release from primary afferent neurons [37], may both act concurrently to promote central sensitization and increased excitability to noxious input. Studies have shown that descending dopaminergic pathways originating from the hypothalamic A11 region [38,39] modulate spinal neurotransmission. However, spinal D2-like receptors mediate antinociception evoked by electrical stimulation of diencephalospinal neurons in basal conditions [40,41], whereas D1LRs appear to exert rather complex modulatory actions [42]. D1LR-mediated modulation may be influenced by synaptic availability of dopamine, as D1LRs may inhibit ventral root potentials in the presence of low dopamine levels [43] while promoting facilitation in the dorsal horn during spinal hyperexcitation or in the presence of increased spinal dopamine levels [44,45].

Phosphorylation is key to up-regulation of NMDAR function. Phosphorylation of NR1 subunit in dorsal horn neurons is greatly increased during exposure to a persistent noxious stimulus, as shown previously by us [7,8] and by others [46,47], and there are previous indications that intracellular signaling pathways associated with D1LR are involved in NR1 phosphorylation in the spinal dorsal horn following peripheral insult [48]. Central plastic changes triggered by SNL also affect other descending monoaminergic systems, including noradrenergic and serotonergic pain modulation systems, profoundly altering endogenous antinociception as well as response to analgesic drugs [7–9]. At least some these systems may influence dorsal horn excitability via direct cross-talk with glutamate receptors at the dorsal horn level [10] and regulation of PKC-signaling and NMDAR phosphorylation [7,8,10], although it remains to be established whether such adaptive mechanisms operate in a concerted manner. Here, we found that the increase in phosphorylation of postsynaptic NR1 at serine 889 that occurs following SNL is prevented by spinal superfusion with a D1LR antagonist starting prior to SNL. This finding suggests that endogenous activation of D1LRs after SNL is essential to NR1 phosphorylation. Further, this observation is suggestive that NMDAR receptor up-regulation that ensues after nerve ligation as shown above may be due to changes in intrinsic properties of the channel.

In summary, the results of the present work reveal that D1LRs modulate most basic determinants of NMDAR function in dorsal horn neurons, including receptor phosphorylation and shifting to

an enhanced activation state, providing a potential mechanism whereby descending dopaminergic input to the spinal cord may contribute to central sensitization after nerve injury.

Acknowledgments

This study was supported by the Government of the Basque Country (IT782-13), by the Spanish Government (SAF2013-44533-P), and by the University of the Basque Country (Ayudas para las especialización de Personal Investigador, to Zigor Aira). The authors state that there are no financial or other arrangements that might lead to a conflict of interest for this study.

References

- [1] K. Ren, R. Dubner, Pain facilitation and activity-dependent plasticity in pain modulatory circuitry: role of BDNF-TrkB signaling and NMDA receptors, *Mol. Neurobiol.* 35 (2007) 224–235.
- [2] W.D. Willis, Role of neurotransmitters in sensitization of pain responses, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 933 (2001) 142–156.
- [3] A.H. Dickenson, A.F. Sullivan, Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation, *Neuropharmacology* 26 (1987) 1235–1238.
- [4] E. Eisenberg, B.P. Vos, A.M. Strassman, The NMDA antagonist memantine blocks pain behavior in a rat model of formalin-induced facial pain, *Pain* 54 (1993) 301–307.
- [5] T.J. Coderre, I. Van Empel, The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents. II. Assessment of the antinociceptive activity of combinations of competitive and non-competitive NMDA antagonists with agents acting at allosteric-glycine and polyamine receptor sites, *Pain* 59 (1994) 353–359.
- [6] X.G. Liu, J. Sandkühler, Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N-methyl-D-aspartic acid receptor blockage, *Neurosci. Lett.* 191 (1995) 43–46.
- [7] Z. Aira, I. Buesa, G. García del Caño, J. Bilbao, F. Doñate, M. Zimmermann, J.J. Azkue, Transient 5-HT_{2B} receptor-mediated facilitation in neuropathic pain: up-regulation of PKC γ and engagement of the NMDA receptor in dorsal horn neurons, *Pain* 154 (2013) 1865–1877.
- [8] Z. Aira, I. Buesa, D. Rada, J.C. Gómez-Esteban, J.J. Azkue, Coupling of serotonergic input to NMDA receptor-phosphorylation following peripheral nerve injury via rapid, synaptic up-regulation of ND2, *Exp. Neurol.* 255 (2014) 86–95.
- [9] Z. Aira, T. Barrenetxea, I. Buesa, J.J. Azkue, Plasticity of α 2-adrenergic spinal antinociception following nerve injury: selective, bidirectional interaction with the delta opioid receptor, *Brain Res.* 1594 (2015) 190–203.
- [10] Z. Aira, I. Buesa, M. Gallego, G. García del Caño, N. Mendiabale, J. Mingo, D. Rada, J. Bilbao, M. Zimmermann, J.J. Azkue, Time-dependent cross talk between spinal serotonin 5-HT_{2A} receptor and mGluR1 subserves spinal hyperexcitability and neuropathic pain after nerve injury, *J. Neurosci.* 32 (2012) 13568–13581.
- [11] P.H. Seeburg, N. Burnashev, G. Köhr, T. Kuner, R. Sprengel, H. Monyer, The NMDA receptor channel: molecular design of a coincidence detector, *Recent Prog. Horm. Res.* 50 (1995) 19–34.
- [12] Y.T. Wang, M.W. Salter, Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases, *Nature* 369 (1994) 233–235.
- [13] X.M. Yu, R. Askalan, G.J.I.I. Keil, M.W. Salter, NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src, *Science* 275 (1997) 674–678.
- [14] T. Abe, S. Matsumura, T. Katano, T. Mabuchi, K. Takagi, L. Xu, A. Yamamoto, K. Hattori, T. Yagi, M. Watanabe, T. Nakazawa, T. Yamamoto, M. Mishina, Y. Nakai, S. Ito, Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain, *Eur. J. Neurosci.* 22 (2005) 1445–1454.
- [15] X. Gao, H.K. Kim, J.M. Chung, K. Chung, Enhancement of NMDA receptor phosphorylation of the spinal dorsal horn and nucleus gracilis neurons in neuropathic rats, *Pain* 116 (2005) 62–72.
- [16] C. Ultenius, B. Linderorth, B.A. Meyerson, J. Wallin, Spinal NMDA receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat, *Neurosci. Lett.* 399 (2006) 85–90.
- [17] K. Koblinger, T. Füzesi, J. Ejdygiewicz, A. Krajacic, J.S. Bains, P.J. Whelan, Characterization of A11 neurons projecting to the spinal cord of mice, *PLoS One* 9 (2014) e109636.
- [18] M. Kwon, M. Altin, H. Duenas, L. Alev, The role of descending inhibitory pathways on chronic pain modulation and clinical implications, *Pain Pract.* 14 (2014) 656–667.
- [19] Y.C. Li, G. Liu, J.L. Hu, W.J. Gao, Y.Q. Huang, Dopamine D(1) receptor-mediated enhancement of NMDA receptor trafficking requires rapid PKC-dependent synaptic insertion in the prefrontal neurons, *J. Neurochem.* 114 (2010) 62–73.
- [20] J.T. Dudman, M.E. Eaton, A. Rajadhyaksha, W. Macías, M. Taher, A. Barczak, K. Kameyama, R. Haganir, C. Konradi, Dopamine D1 receptors mediate CREB phosphorylation via phosphorylation of the NMDA receptor at Ser897-NR1, *J. Neurochem.* 87 (2003) 922–934.
- [21] K. Sarantis, N. Matsokis, F. Angelatou, Synergistic interactions of dopamine D1 and glutamate NMDA receptors in rat hippocampus and prefrontal cortex: involvement of ERK1/2 signaling, *Neuroscience* 163 (2009) 1135–1145.
- [22] S.H. Kim, J.M. Chung, An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat, *Pain* 50 (1992) 355–363.
- [23] J.J. Azkue, X.G. Liu, M. Zimmermann, J. Sandkühler, Induction of long-term potentiation of C fibre-evoked spinal field potentials requires recruitment of group I, but not group II/III metabotropic glutamate receptors, *Pain* 106 (2003) 373–379.
- [24] I. Buesa, V. Ortiz, L. Aguilera, F. Torre, M. Zimmermann, J.J. Azkue, Disinhibition of spinal responses to primary afferent input by antagonism at GABA receptors in urethane-anaesthetised rats is dependent on NMDA and metabotropic glutamate receptors, *Neuropharmacology* 50 (2006) 585–594.
- [25] H. Beck, H. Schröck, J. Sandkühler, Controlled superfusion of the rat spinal cord for studying non-synaptic transmission: an autoradiographic analysis, *J. Neurosci. Methods* 58 (1995) 193–202.
- [26] Q. Li, A. Lau, T.J. Morris, L. Guo, C.B. Fordyce, E.F. Stanley, A syntaxin 1 Galph α (o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization, *J. Neurosci.* 24 (2004) 4070–4081.
- [27] H. Guo, L.Y. Huang, Alteration in the voltage dependence of NMDA receptor channels in rat dorsal horn neurones following peripheral inflammation, *J. Physiol.* 537 (2001) 115–123.
- [28] D. Isaev, G. Gerber, S.K. Park, J.M. Chung, M. Randik, Facilitation of NMDA-induced currents and Ca²⁺ transients in the rat substantia gelatinosa neurons after ligation of L5-L6 spinal nerves, *Neuroreport* 11 (2000) 4055–4061.
- [29] K. Ren, J.L. Hylden, G.M. Williams, M.A. Ruda, R. Dubner, The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation, *Pain* 50 (1992) 331–344.
- [30] F. Svendsen, L.J. Rygh, K. Hole, A. Tjølsen, Dorsal horn NMDA receptor function is changed after peripheral inflammation, *Pain* 83 (1999) 517–523.
- [31] X. Gao, Y.Q. Zhang, L.M. Zhang, G.C. Wu, Effects of intraplantar injection of carrageenan on central dopamine release, *Brain Res. Bull.* 54 (2001) 391–394.
- [32] A.W. Dunah, D.G. Standaert, Dopamine D1 receptor-dependent trafficking of striatal NMDA glutamate receptors to the postsynaptic membrane, *J. Neurosci.* 21 (2001) 5546–5558.
- [33] C. Gao, M.E. Wolf, Dopamine receptors regulate NMDA receptor surface expression in prefrontal cortex neurons, *J. Neurochem.* 106 (2008) 2489–2501.
- [34] Y.C. Li, G. Liu, J.L. Hu, W.J. Gao, Y.Q. Huang, Dopamine D(1) receptor-mediated enhancement of NMDA receptor trafficking requires rapid PKC-dependent synaptic insertion in the prefrontal neurons, *J. Neurochem.* 114 (2010) 62–73.
- [35] S. Wang, C. Liao, W. Meng, Q. Huang, D. Li, Activation of D1-like dopamine receptors increases the NMDA-induced gain modulation through a PKA-dependent pathway in the premotor nucleus of adult zebra finches, *Neurosci. Lett.* 589 (2015) 37–41.
- [36] W. Ma, J.C. Eisenach, Chronic constriction injury of sciatic nerve induces the up-regulation of descending inhibitory noradrenergic innervation to the lumbar dorsal horn of mice, *Brain Res.* 970 (2003) 110–118.
- [37] R. Bardoni, T. Takazawa, C.K. Tong, P. Choudhury, G. Scherrer, A.B. Macdermott, Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1279 (2013) 90–96.
- [38] Q. Barraud, I. Obeid, I. Aubert, G. Barrière, H. Contamin, S. McGuire, P. Ravenscroft, G. Porras, F. Tison, E. Bezaud, I. Ghorayeb, Neuroanatomical study of the A11 diencephalospinal pathway in the non-human primate, *PLoS One* 5 (2010) e13306.
- [39] S. Qu, W.G. Ondo, X. Zhang, W.J. Xie, T.H. Pan, W.D. Le, Projections of diencephalic dopamine neurons into the spinal cord in mice, *Exp. Brain Res.* 168 (2006) 152–156.
- [40] W. Taniguchi, T. Nakatsuka, N. Miyazaki, H. Yamada, D. Takeda, T. Fujita, E. Kumamoto, M. Yoshida, In vivo patch-clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on substantia gelatinosa neurons in the spinal cord, *Pain* 152 (2011) 95–105.
- [41] H. Wei, H. Viisanen, A. Pertovaara, Descending modulation of neuropathic hypersensitivity by dopamine D2 receptors in or adjacent to the hypothalamic A11 cell group, *Pharmacol. Res.* 59 (2009) 355–363.
- [42] H. Zhao, W. Zhu, T. Pan, W. Xie, A. Zhang, W.G. Ondo, W. Le, Spinal cord dopamine receptor expression and function in mice with 6-OHDA lesion of the A11 nucleus and dietary iron deprivation, *J. Neurosci. Res.* 85 (2007) 1065–1076.
- [43] K. Kawamoto, K. Otsuguro, M. Ishizuka, S. Ito, Inhibitory effects of dopamine on spinal synaptic transmission via dopamine D1-like receptors in neonatal rats, *Br. J. Pharmacol.* 166 (2012) 788–800.
- [44] H.W. Yang, L.J. Zhou, N.W. Hu, W.J. Xin, X.G. Liu, Activation of spinal d1/d5 receptors induces late-phase LTP of C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn, *J. Neurophysiol.* 94 (2005) 961–967.
- [45] J.Y. Kim, D.V. Tillu, T.L. Quinn, G.L. Mejia, A. Shy, M.N. Asiedu, E. Murad, A.P. Schumann, S.K. Totsch, R.E. Sorge, P.W. Mantyh, G. Dussor, T.J. Price, Spinal dopaminergic projections control the transition to pathological pain plasticity via a D1/D5-mediated mechanism, *J. Neurosci.* 35 (2015) 6307–6317.

- [46] G.J. Brenner, R.R. Ji, S. Shaffer, C.J. Woolf, Peripheral noxious stimulation induces phosphorylation of the NMDA receptor NR1 subunit at the PKC-dependent site serine-896, in spinal cord dorsal horn neurons, *Eur. J. Neurosci.* 20 (2004) 375–384.
- [47] R.M. Caudle, F.M. Perez, A.Y. Del Valle-Pinero, M.J. Iadarola, Spinal cord NR1 serine phosphorylation and NR2B subunit suppression following peripheral inflammation, *Mol. Pain* 1 (2005) 25.
- [48] X. Zou, Q. Lin, W.D. Willis, Role of protein kinase A in phosphorylation of NMDA receptor 1 subunits in dorsal horn and spinothalamic tract neurons after intradermal injection of capsaicin in rats, *Neuroscience* 115 (2002) 775–786.

