



Programa de Doctorado en Señalización Celular

Papel de los receptores Sigma-1 en la  
Transmisión y Modulación Nociceptiva a Través  
de la Médula Espinal

Memoria de Tesis Doctoral

Irene Mazo Espinosa

Directores:

Dr. Carolina Roza Fernández de Caleyá

Dr. Jose Antonio López García

Alcalá de Henares, 2015



**D. Antonio Jiménez Ruíz**, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá

INFORMA:

Que **D<sup>a</sup> Irene Mazo Espinosa** ha realizado la Tesis Doctoral titulada ***“Papel de los receptores Sigma-1 en la Transmisión y Modulación Nociceptiva a Través de la Médula Espinal”***, bajo la dirección de los Doctores Carolina Roza Fernandez de Caleyá y Jose Antonio López García en el Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa pública.

Alcalá de Henares, a 8 de Abril de 2015



**D<sup>a</sup>. Carolina Roza Fernandez de Caleyá**, Profesora titular y **D. Jose Antonio López García**, Catedrático, del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá

INFORMA:

Que **D<sup>a</sup> Irene Mazo Espinosa** ha realizado la Tesis Doctoral titulada ***“Papel de los receptores Sigma-1 en la Transmisión y Modulación Nociceptiva a Través de la Médula Espinal”***, dentro del programa de Doctorado “Señalización Celular” del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa pública.

Alcalá de Henares, a 8 de Abril de 2015



A mis padres, a mi hermano.  
Gracias por vuestro apoyo incondicional.



## **AGRADECIMIENTOS**

Esta Tesis es el resultado de tres años de trabajo de dedicación e ilusión. Durante este tiempo, muchas personas dentro y fuera del laboratorio, me han apoyado y ayudado, y a todas ellas quiero expresar mi más sincera gratitud.

A mis directores de Tesis, la Dr. Roza y el Dr. López-García que me han contagiado la ilusión por la ciencia y de los que tanto he aprendido. A Carolina, no solo por todo lo que me ha enseñado y por disfrutar haciéndolo, sino por la profunda amistad surgida entre papeles, cables y electrodos. A José Antonio, por la paciencia y dedicación siempre que le he necesitado. Gracias por todo, no podría imaginar mentores mejores.

A Laboratorios ESTEVE, por confiar en mí, y brindarme la oportunidad de llevar a cabo esta Tesis, sin ellos nada de esto hubiese sido posible.

Al Dr. Rivera-Arconada, por la ayuda desinteresada, por los días dentro y fuera del laboratorio, porque ha sido compañero y amigo. A la Dr. Cisneros, porque hace que todo parezca más sencillo. Sin ambos, todo hubiese sido mucho más duro.

A Laura, Ismel y Alberto, porque me han hecho el trabajo de laboratorio mucho más fácil. Sin la compañía de Laura y las aportaciones al análisis de Ismel y Alberto, el camino hubiese sido más largo y difícil.

Al Dr. Santiso por no dejar que desesperase con la ofimática, sin tu ayuda todavía estaría poniendo encabezados, paginando y queriendo volver a la era de las máquinas de escribir.

A mi familia. Especialmente a mis padres, que han sufrido conmigo estos años, y me han animado y apoyado en todo momento. Gracias, porque sin vuestra comprensión, amor y paciencia nunca hubiese llegado este momento. A mi yaya, que aunque ya no está, sigue muy presente en mí, soy quien soy, en gran parte por ella. A mi hermano, que siempre ha confiado en mi capacidad, me ha apoyado y ayudado, gracias bro, soy afortunada de tenerte. A Anke, porque el término cuñada le queda pequeño, siempre se ha preocupado e interesado como una hermana. A Lasse que me ha alegrado con su sonrisa los últimos meses, gracias enano, sin darte cuenta has conseguido bajar mis niveles de desesperación. A la pequeña Maite que ha llegado con una tesis bajo el brazo.

A Raquel Utande, mi hermana de corazón, Marta Guerra, mi gran amiga, y sus Jorges por estar siempre que se os necesita y sin necesidad de pedirlo. Parte de esta Tesis es muy vuestra.

A Sandra Román, Jorge Cañas, María González, Bárbara Díaz, Roberto Amador y David Suarez, por los días de facultad. Esta aventura que termina aquí, comenzó en realidad hace algunos años, con vosotros, en los pasillos de Farmacia.

A mi "chupipandi" del master, Ricardo Cano, Ana González y Andrea Collado, que me contagiaron su amor por la ciencia, entre risas, bromas, frases célebres y sobre todo por seguir a día de hoy en mi vida.

Al Dr. Alelú por el apoyo académico, científico y sobretodo moral. Nunca podré llegar a agradecer todo lo que sin darte cuenta, has hecho por mí estos años. Gracias por las cenas de becarios, que sin ti son mucho más aburridas, por los desayunos casi terapéuticos, por valorarme tanto y hablarme siempre desde la honestidad. Tenerte cerca me hace mejor persona, aunque sólo sea por comparación.

A Nadia, gracias por escucharme siempre, por las tardes de gimnasio, las noches de cañas, las risas y por preocuparte por mí como lo has hecho. A Irene Cuesta, por tu amistad y estar siempre pendiente de mi. A Claire por el apoyo durante muchos años. A mis pasilleras, Nuria y Ali, por alegrar los pasillos y por los momentos fuera de la Universidad.

Al brother (Pedro), por las tardes de escalada y de respirar aire puro. Por enseñarme lo que significa la palabra superación y no rendirse jamás. Por decirme muchas veces “no te enteras de la vida”, para que aprendiese a ver lo importante y a relajar en los momentos de tensión. Tu lucha constante la contagias.

A Pilar, Leti, Afri y Raquel. Porque los últimos años los habéis vivido día a día conmigo. Gracias chicas por la paciencia, el cariño con el que habéis gestionado mi mal humor, y la comprensión cuando he estado más insoportable. Siempre estáis ahí para sacarme una sonrisa.

A Rubén Martínez y a Raúl Armenteros, por las tardes y noches en “La Vaca”. Esos momentos han sido necesarios para coger carrerilla y no rendirme.

A Fran, Miri, Iván, Isa y David, porque habéis sido un soplo de aire fresco. Especialmente a ti David, que me has acompañado y apoyado en todo momento. Gracias por tu cariño, tu amor, tu comprensión y por darme ese golpe de energía cuando estoy sin batería.

A la kuadrilla de aquí, en especial a Esteban por todo lo vivido juntos. A la kuadrilla de allí, en especial a Zaloa y Andrea porque con vosotras todo es siempre mejor.

## ÍNDICE

Publicaciones .....	i
Abreviaturas.....	iii
Resumen .....	v
Abstract .....	vii

## INTRODUCCIÓN

1. Dolor .....	3
2. Sistema nociceptivo.....	5
2.1. Vía periférica .....	5
Clasificación de los nociceptores .....	6
2.2. Vías centrales de la nocicepción .....	7
2.2.a. Médula espinal .....	7
2.2.b. Vías ascendentes de la transmisión nociceptiva .....	11
2.2.c. Vías descendentes de la transmisión nociceptiva .....	12
3. Principales neurotransmisores implicados en la transmisión nociceptiva .....	13
4. Sensibilización .....	17
5. Modelos experimentales de sensibilización central.....	18
5.1. Wind-up.....	19
5.2. Modelo de inflamación por carragenina.....	19
5.3. Modelo de neuropatía.....	20
6. Analgesia.....	20
7. Nuevas dianas terapéuticas: Receptor sigma 1 .....	23
7.1. Receptor $\sigma_1$ .....	24
Distribución de los receptores.....	25
Ligandos endógenos y exógenos .....	26
7.2. Receptor $\sigma_1$ y dolor .....	27
Antagonismo de receptores $\sigma_1$ como estrategia analgésica .....	27
7.3. Receptor $\sigma_1$ y morfina.....	28
7.4. Fármaco experimental S1RA .....	29

## CAPÍTULO 1: ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS EN REFLEJOS MOTORES DE MÉDULA ESPINAL

I. OBJETIVOS .....	33
I. MATERIALES Y MÉTODOS .....	35
II.1. Animales .....	35
II.2. Anestesia .....	35
II.3. Extracción de la médula espinal .....	36
II.4. Mantenimiento de la médula espinal .....	36
II.5. Estimulación eléctrica y protocolo de estimulación.....	38
II.6. Tratamiento de las señales bioeléctricas.....	39
II.7. Características de las respuestas.....	40
II.8. Preparación y aplicación de los fármacos.....	42
III. RESULTADOS.....	45
<u>III.1. Efecto de diferentes fármacos en los reflejos espinales en animal naïve</u> .....	45
III.1.1. Efecto en el índice del wind-up .....	48
III.1.2. Respuesta a estímulos unitarios .....	49
<u>II.2. Efecto de S1RA en médula espinal de animal naïve frente animal inflamado.</u> .....	53
II.2.1. Evaluación del proceso inflamatorio .....	53
II.2.2. Diferencias en las respuestas bioeléctricas entre animales naïve y animales inflamados .....	53
II.2.3. Efecto de S1RA en las respuestas bioeléctricas en animal naïve y en animal inflamado.....	54
<u>II.3. Interacción S1RA- morfina</u> .....	57
II.3.1. Respuesta al tren .....	57
II.3.2. Respuesta a estímulos unitarios.....	59
IV. DISCUSIÓN .....	61
<u>IV.1. Efecto de diferentes fármacos en los reflejos espinales en animal naïve</u> .....	61
<u>VI. 2. Efecto de S1RA en médula espinal de animal naïve frente animal inflamado.</u> .....	63
<u>VI.3. Interacción S1RA- morfina</u> .....	64

## CAPÍTULO 2: ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS EN NEURONAS DE LÁMINAS SUPERFICIALES DE RATÓN ADULTO

I. OBJETIVOS .....	69
II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	71
II.1. Animales .....	71
II.2. Cirugía SNI.....	71
II.3. Estudios de comportamiento .....	72
II.4. Registros electrofisiológicos utilizando matrices de multielectrodos .....	74

II.4.1. Anestesia y extracción de la médula espinal .....	74
II.4.2. Obtención de una rodaja longitudinal de médula espinal .....	74
II.4.3. Obtención y procesamiento de las señales .....	75
II.4.4. Búsqueda de neuronas, estimulación eléctrica y protocolo de estimulación .....	77
II.4.5. Características de las respuestas .....	78
<b>II.5. Preparación y aplicación de los fármacos.....</b>	<b>81</b>
<b>II.6. Histología.....</b>	<b>82</b>
II.6.1. Trazado con Dil .....	82
II.6.2. Procesamiento de las médulas espinales.....	82
II.6.3. Marcaje con IB4 .....	82
II.6.4. Localización de las neuronas registradas.....	82
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>87</b>
<b><u>III.1. Estudio de circuitos nociceptivos en animal naïve y animal neuropático.</u></b> .....	<b>87</b>
III.1.1. Estudios de comportamiento .....	87
III.1.2. Registros electrofisiológicos utilizando matrices de multielectrodos (MMEs) .....	88
III.1.3. Localización de las neuronas registradas.....	94
<b><u>III.2. Estudios farmacológicos</u></b> .....	<b>99</b>
III.2.1. Bloqueo de receptores tipo AMPA.....	99
III.2.2. Bloqueo de receptores tipo NMDA .....	104
III.2.3. Bloqueo de receptores tipo NK1 .....	106
<b><u>III.3. Efecto del fármaco S1RA en diferentes modelos de sensibilización</u></b> .....	<b>111</b>
III.3.1. Neuronas procedentes de animal naïve .....	111
III.3.2. Neuronas procedentes de animal neuropático .....	112
III.3.3. Neuronas procedentes de animal inflamado .....	113
<b>IV. DISCUSIÓN .....</b>	<b>115</b>
<b><u>III.1. Estudio de circuitos nociceptivos en animal naïve y animal neuropático.</u></b> .....	<b>115</b>
<b><u>III.2. Estudios farmacológicos</u></b> .....	<b>117</b>
<b><u>III.3. Efecto del fármaco S1RA en diferentes modelos de sensibilización</u></b> .....	<b>118</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>121</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>125</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>129</b>



## **PUBLICACIONES**

Los resultados experimentales de esta Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

### **I. ARTÍCULOS**

1. Mazo, I., Roza, C., Zamanillo, D., Merlos, M., Vela, J.M., and Lopez-Garcia, J.A. (2014). Effects of centrally acting analgesics on spinal segmental reflexes and wind-up. *European Journal of Pain*.

### **II. ABSTRACTS**

1. Cisneros, E., Mazo, I., Roza, C., Rivera-Aarconada, I., López-García, J.A. (2014). Multiunit recordings of superficial dorsal horn nociceptive neurons in a longitudinal slice of mice spinal cord. Program No. 627.02. *Society for Neuroscience Annual Meeting*, Washington DC.
2. Roza, C., Cisneros, E., Mazo, I., Rivera-Arconada, I., López-García, J.A. (2013). A longitudinal slice of the adult mice spinal cord for electrophysiological recording of nociceptive neurons. 15º Congreso Nacional de la SENC, Oviedo.

Otras publicaciones relacionadas con la Tesis:

### **I. ARTÍCULOS**

1. Mazo, I., Rivera-Arconada, I., & Roza, C. (2013). Axotomy-induced changes in activity-dependent slowing in peripheral nerve fibers: Role of hyperpolarization-activated/HCN channel current. *European Journal of Pain*

### **II. ABSTRACTS**

1. Mazo, I., Rivera-Arconada, I., Roza, C. (2012). Changes in activity-dependent slowing after axotomy: role of HCN channel currents (I<sub>h</sub>). *14º World Congress of Pain (IASP)*, Milan.

Los trabajos realizados en esta Tesis han sido posibles gracias a los proyectos financiados por los siguientes organismos:

- Mecanismos antinociceptivos mediados por receptores sigma-1 en la médula espinal de ratones. Laboratorios Dr. ESTEVE, S.A. (2011-2013).
- Estudios sobre excitabilidad de sistemas nociceptivos. BFU 2012-37905. Ministerio de Economía y Competitividad. (2013-2015).



## ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPA	Acido amino metil fosfórico
ANOVA	Análisis de varianza
BDNF	Factor neurotóxico derivado del cerebro
CGRP	Péptido relacionado con el gen de calcitonina
COX-2	Ciclooxigenasa 2
GABA	Acido gamma aminobutírico
GDNF	Factor neurotrópico derivado de la línea de células gliales
IB4	Isoetina B4
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
IP3	Inositol trifosfato
LCRA	Líquido cefalorraquídeo artificial
MAO	Monoamino oxidasa
MMEs	Matrices de multielectrodos
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NK1	Neurocinina-1
NMDA	Acido N-metil-D-aspártico
PB	Tampón fosfato
PBS	Tampón fosfato salino
PFA	Paraformaldehido
PGE2	Prostaglandina E2
RMS	Reflejo monosináptico
S1RA	4-(2-((5metil-1-(naftalen-2-il)-1H-pirazol-3-il)oxi)etil) morfolina
SNI	Spared Nerve Injury
SP	Sustancia P
5-HT	Serotonina



## RESUMEN

La médula espinal es el lugar donde se da la primera integración de la información somatosensorial procedente de periferia. Por esta razón, la modulación de circuitos espinales se ha convertido en una estrategia de gran interés para la generación de fármacos analgésicos y anestésicos. Los receptores  $\sigma_1$  han sido, en los últimos años, objeto de estudio al haber demostrado ser eficaces en diferentes modelos de dolor.

El objetivo principal de esta Tesis doctoral ha sido evaluar los efectos del fármaco experimental S1RA, antagonista de los receptores  $\sigma_1$ , en médula espinal. Para cumplir este objetivo se han realizado registros electrofisiológicos extracelulares en dos modelos experimentales de médula espinal "in vitro".

En la primera parte de esta Tesis se utilizó un modelo de médula espinal entera extraída de ratones neonatos (de 6 a 10 días). Utilizando electrodos de succión se estimulaba la raíz dorsal y se registraba la señal motora generada en la raíz ventral. Estos registros han permitido (1) evaluar los efectos de S1RA en médulas procedentes de animales naïve y comparar estos efectos con los producidos por otros fármacos analgésicos utilizados en la clínica, (2) evaluar los efectos de S1RA en médulas de ratones tratados con carragenina como agente inflamatorio y (3) estudiar una posible interacción entre S1RA y morfina a nivel espinal.

En la segunda parte, se ha desarrollado un modelo de rodaja longitudinal de médula espinal, que mantiene las láminas superficiales intactas para el registro de neuronas sensoriales. En estos estudios se han utilizado matrices de multielectrodos (MEAs), que permiten el registro de varias neuronas de manera simultánea. Se han analizado las respuestas de estas neuronas a la estimulación eléctrica de raíz dorsal así como su actividad espontánea. Utilizando este modelo se han realizado (1) estudios de caracterización de las señales procedentes de médula espinal de animal naïve y de animales a los que se les había producido una neuropatía (SNI), (2) estudios farmacológicos con antagonistas de receptores AMPA, NMDA y sustancia P y (3) estudios de los efectos de S1RA en médulas de animales naïve, animales tratados con carragenina y animales neuropáticos (SNI).

Los estudios farmacológicos en los reflejos espinales muestran efectos semejantes producidos por S1RA, a los observados con los fármacos analgésicos de referencia. El efecto inhibitorio de S1RA en los reflejos espinales de médulas procedentes de animales inflamados es ligeramente mayor que el producido en animales naïve. No se han observado interacciones significativas entre el sistema  $\sigma_1$  y morfina a nivel espinal.

Los registros de neuronas de láminas superficiales no han mostrado diferencias sustanciales ni en la actividad eléctrica evocada ni en la espontánea entre animales naïve y animales SNI. Los estudios de caracterización farmacológica muestran que sólo el bloqueo de receptores AMPA produce efectos inhibitorios en la actividad evocada por estímulos unitarios. El bloqueo de

receptores AMPA, NMDA y sustancia P produjeron efectos tendentes a la inhibición de las respuestas a estímulos repetitivos de alta intensidad. Todos los fármacos bloqueantes mostraron efectos inhibitorios en la actividad espontánea.

S1RA no mostró efectos ni en actividad eléctrica espontánea ni en la actividad eléctrica inducida en los registros de neuronas de láminas superficiales procedentes de animales naïve. Los registros obtenidos de neuronas de láminas superficiales de médulas de animales pretratados con carragenina muestran un efecto inhibitorio de S1RA en la actividad eléctrica espontánea, mientras que en animales neuropáticos (SNI) S1RA mostró efectos inhibitorios tanto en la actividad eléctrica espontánea como en la inducida por estimulación repetida.

El fármaco S1RA ha mostrado tener efectos a nivel espinal, y estos efectos han mostrado ser mayores en el modelo de dolor inflamatorio por carragenina y en neuropatía. Estos resultados parecen confirmar la implicación del sistema  $\sigma_1$  en dolor patológico y su potencial como diana terapéutica para este tipo de procesos.

## ABSTRACT

The spinal cord is the first relay center for somatosensory inputs from peripheral receptors. Thus, modulation of spinal circuits has become an important strategy to design analgesic and anesthetic drugs. Drugs currently used in the clinic, are still not effective in many chronic pain processes. Therefore, the finding of new therapeutic targets remains essential.  $\sigma_1$  receptors have been studied in an attempt to elucidate their possible neuropharmacological applications in analgesia.

The aim of this Thesis was to study the effects of S1RA, a selective  $\sigma_1$  receptor antagonist, on nociceptive transmission in mice spinal cord. To this purpose, electrophysiological recordings were performed in two different spinal cord “in vitro” models.

In the first chapter of this Thesis, spinal motor responses to dorsal root stimulation (spinal reflexes) were recorded, from mice pups (6 to 10 days). Dorsal root primary afferents were activated using electrical stimulation and the motor signal generated through ventral root was registered using suction electrodes. This model was used to evaluate (1) the effects of S1RA compared to other well-stabilized analgesics in cords from naïve animals, (2) the effects of S1RA in cords from animals pretreated with carrageenan (inflammation model) and (3) the interaction between S1RA and morphine.

For the second chapter, a longitudinal slice of adult spinal cord was developed. Single units from superficial laminae were registered. Multielectrode arrays were used for recording electrical activity evoked by dorsal root stimulation and spontaneous intrinsic activity. This model was used to (1) characterize neuronal behavior in cords from naïve mice and cords from neuropathic mice (SNI), (2) to evaluate the pharmacological effects of NMDA, AMPA and substance P blockers, on spontaneous and induced neuronal responses and (3) to evaluate the effect of S1RA in superficial neurons in cords from naïve animals and animals that had received an inflammatory (carrageenan) or a neuropathic (SNI) treatment.

Results indicate that, S1RA has an inhibitory action similar to that of other commercial analgesics. These depressant effects of S1RA in cords from inflamed mice are slightly greater than the effects shown in cords from naïve mice. No significant interaction between S1RA and morphine has been found.

Recordings from superficial laminae neurons have not shown substantial differences in evoked or spontaneous electrical activity between cords from naïve and neuropathic mice. Pharmacological experiments show that only blockade of AMPA receptors produces inhibitory effects in responses to single electrical stimuli. Blockade of AMPA-, NMDA- and substance P receptors produces inhibitory effects in responses to repetitive electrical stimuli and spontaneous activity.

S1RA showed no effect, on either spontaneous or induced activity, in neurons from superficial laminae from naïve animals. However, S1RA, showed an inhibitory effect on spontaneous activity in animals pretreated with carrageenan. The compound also had inhibitory effects on spontaneous activity and on responses to repetitive stimuli in neuropathic animals.

The S1RA drug has been shown to have effects at the spinal level, and these effects were shown to be higher in a carrageenan and neuropathy model. These results seem to confirm the involvement of  $\sigma_1$  system in pathological pain and its potential as a therapeutic target for this type of process.

# Introducción

---



### 1. Dolor

El dolor es una experiencia sensorial influenciada por elementos tales como la emoción, la cognición, la memoria y el entorno social. Ante una estimulación de igual intensidad traumática, la sensación de dolor varía entre individuos (Coghill et al., 2003). La percepción del dolor, no es el resultado final de una transmisión pasiva de impulsos, sino que se trata de una experiencia compleja, determinada por la experiencia personal del individuo, el significado del estímulo para el sujeto, la situación anímica en la que se encuentra, las diferencias sociales y culturales, su capacidad cognitiva, etc.

Teniendo en cuenta todos los factores que conducen a esta sensación, la Asociación Internacional para el estudio del dolor (IASP) lo ha definido como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a daño tisular potencial o real, o descrita en términos de dicho daño” (IASP, 1979 y 1986).

El sistema nociceptivo es el encargado de detectar y procesar estímulos de alto umbral que en última instancia se traducirán como una sensación de dolor. Ante un estímulo potencialmente lesivo, se ponen en marcha respuestas protectoras que evitarán daños importantes. La nocicepción es por tanto, en condiciones fisiológicas, un mecanismo beneficioso y fundamental en la supervivencia.

En ocasiones, el sistema nociceptivo produce sensaciones de dolor prolongadas en el tiempo, que se mantienen una vez ha desaparecido el estímulo, así como respuestas desproporcionadas ante estímulos inocuos. En determinadas situaciones, estas respuestas tienen una función de protección, y aparecen mientras se activan mecanismos de reparación del tejido tras una lesión. Sin embargo, en ocasiones esta respuesta se mantiene en el tiempo, sin función protectora, considerando este tipo de dolor como patológico.

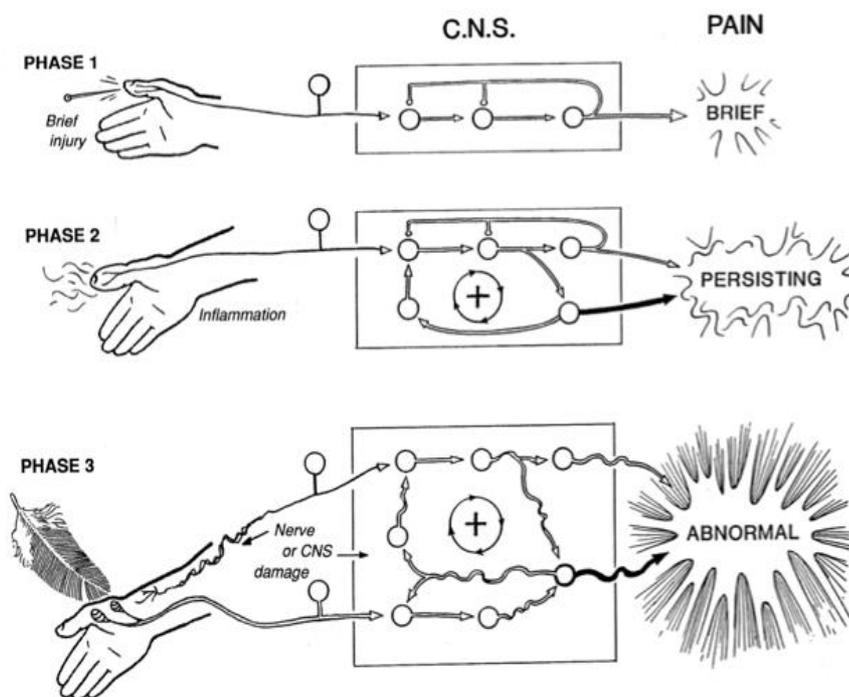
En base a las características del estímulo nociceptivo y a la respuesta al mismo se han descrito **tres fases o tipos de dolor**, que se producen por mecanismos neurofisiológicos diferentes (Cervero and Laird, 1991):

Dolor de fase 1 o dolor agudo nociceptivo: aparece tras un estímulo nociceptivo breve que nos advierte de un daño tisular real o potencial. Este dolor tiene una función protectora y se considera necesario para la supervivencia. En este caso, existe una estrecha correlación entre la intensidad del estímulo nocivo y la sensación de dolor.

Dolor de fase 2 o dolor inflamatorio: aparece como respuesta a una lesión tisular que inicia un proceso inflamatorio. Este proceso inflamatorio causará una sensibilización de los nociceptores periféricos, que se traducirá en un aumento en la excitabilidad neuronal y en la activación de

mecanismos de amplificación de la respuesta a nivel del sistema nervioso central. Como consecuencia, se pierde la correlación entre la intensidad del estímulo y la sensación del dolor, manteniéndose esta sensación en ausencia del estímulo. Esta, es una respuesta adaptativa, que puede ayudar a la recuperación de la lesión manteniéndose, en este caso, la función protectora.

Dolor de fase 3 o dolor neuropático: se refiere a los estados que aparecen como resultado de una lesión o disfunción del sistema nervioso central o periférico, donde los mecanismos de control y modulación de las vías nociceptivas se encuentran alterados. En este caso se pierde completamente la relación entre la intensidad de los estímulos y la sensación que se evoca, de tal manera que aparece dolor por estímulos inocuos o estímulos de baja intensidad e incluso en ausencia de éstos.



Cerveró & Laird 1991

Figura 1. Esquema explicativo de las fases del dolor en base al estímulo y la respuesta a él. En la fase 1 tras un estímulo nociceptivo, la información es enviada por los nociceptores al sistema nervioso central evocándose en última instancia una sensación de dolor. En fase 2, tras el estímulo nociceptivo, se produce un proceso inflamatorio que enviará información al sistema nervioso central evocándose en última instancia una sensación de dolor mantenida en el tiempo. En fase 3, el daño es producido en el propio sistema nervioso, de tal manera que la señal enviada se traducirá como una sensación anormal.

## 2. Sistema nociceptivo

El procesamiento nociceptivo comienza con la activación de nociceptores periféricos que son los responsables de detectar y transmitir la información hacia la médula espinal donde se sucede el primer procesamiento de la información sensorial. Desde médula espinal, la información se envía a centros supraespinales, donde se integra y en última instancia se evoca la sensación de dolor. Desde estructuras supraespinales, se activa a su vez un sistema de control descendente, hacia médula espinal, de modulación de la señal.

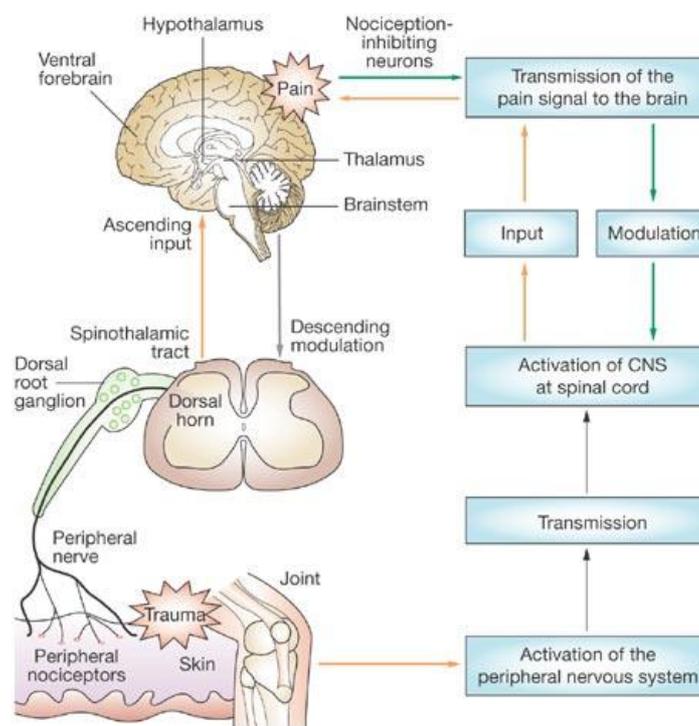


Figura 2: Esquema del procesamiento nociceptivo (extraído de Bingham et al., 2009). La activación de los nociceptores genera señales que viajan al asta dorsal de la médula espinal a través de ganglio de la raíz dorsal. Desde el asta dorsal, las señales ascienden por el tracto espinotalámico al tálamo y la corteza. Señales descendentes originados en centros supraespinales pueden modular la actividad en el asta dorsal.

### 2.1. Vía periférica

La parte periférica del sistema nociceptivo la componen los nociceptores. Éstos son neuronas monopolares, que emiten una proyección axónica hacia periferia, y otra hacia el sistema nervioso central entrando en el asta posterior de la médula espinal donde se establecerá la primera sinapsis. Los cuerpos celulares de estas neuronas se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal y del trigémino.

Los nociceptores son las terminaciones nerviosas de las fibras aferentes de tipo A $\delta$  y C, capaces de transducir estímulos mecánicos, térmicos o químicos de alta intensidad y enviar esta información en forma de potenciales de acción al sistema nervioso central (SNC). Se caracterizan por activarse sólo ante estímulos de alta intensidad, por mantener la respuesta una vez cesado el estímulo y por aumentar su excitabilidad ante estimulación continuada.

### Clasificación de los nociceptores

Los nociceptores se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios. De manera general, se puede hacer una distinción de acuerdo con el diámetro, el grado de mielinización, la velocidad de conducción de las fibras sensitivas, y la sensación que desencadenan:

Tipo de fibra	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	Mielinización	Velocidad de conducción (m/s)	Tipo de dolor que desencadena
A $\delta$	2-6	Fina	3-15	agudo o primer dolor
C	0.4-01.2	Ausente	0.5-2	sostenido o segundo dolor

Tabla 1: Resumen de las características de los nociceptores.

Los terminales centrales de los nociceptores A $\delta$ , expresan neurotrofina 3 y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Serra 2006). Sus axones hacen sinapsis en la lámina I y lámina V de médula espinal.

Los terminales centrales de los nociceptores C, hacen sinapsis en lámina I y lámina II de médula espinal (Figura 2). En cuanto a sus características neuroquímicas diferenciamos dos tipos:

- Nociceptores C peptidérgicos: liberan sustancia P y el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP). Expresan receptores TrkA que responden al factor de crecimiento nervioso (NGF) (Basbaum et al., 2009). Sus axones hacen sinapsis en la lámina I y en la parte externa de la lámina II en la médula espinal. Se han postulado como los posibles responsables de la inflamación neurogénica.
- Nociceptores C no peptidérgicos: expresan receptores c-Ret a los que se une el factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF), neurturina y artemina. Pueden ser identificados mediante marcaje con IB4, por la presencia de isolectinas específicas, además de

tener receptores purinérgicos o enzimas que también son útiles para su identificación (Basbaum et al., 2009). Sus axones hacen sinapsis en la parte interna de la lámina II.

Existen un grupo de nociceptores C, denominados silentes (Cervero, 1994), descritos por primera vez en 1985 (Schaible and Schmidt, 1985), que solo se activan tras inflamación o lesión tisular, y que una vez han sido activados responden a una gran variedad de estímulos (Dmitrieva and McMahon, 1996).

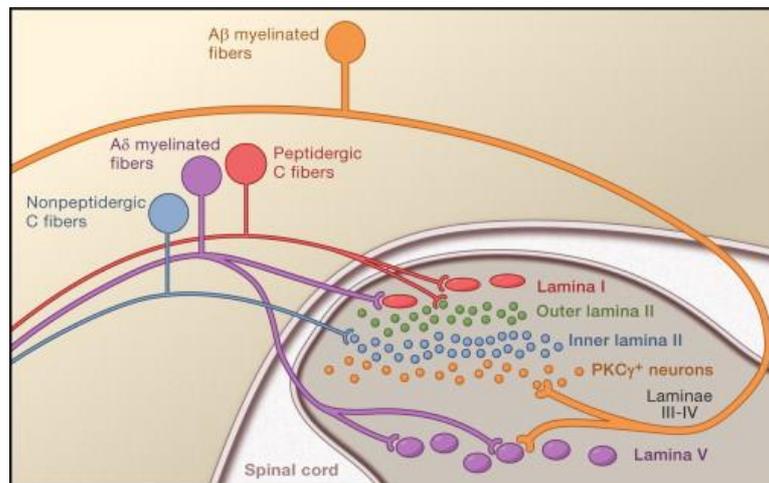


Figura 3: Entrada de los axones de las fibras nerviosas de los nociceptores a la médula espinal, indicando en cada caso, la lámina en la que harán sinapsis (extraído de Basbaum et al., 2009).

## 2.2. Vías centrales de la nocicepción

### 2.2.a. Médula espinal

#### Neuroanatomía

La médula espinal está compuesta de una región central de sustancia gris, donde se encuentran los cuerpos celulares, rodeada de sustancia blanca, formada por los axones de las neuronas de proyección de tractos ascendentes y descendentes. La sustancia gris tiene forma de H y cada lado está subdividido en un asta posterior o dorsal y un asta anterior o ventral.

En 1952, Rexed publicó un estudio de las neuronas de la sustancia gris medular, describiendo una citoarquitectura dispuesta longitudinalmente al eje de la médula. Dividió la sustancia gris en diez capas celulares que denominó láminas. El asta dorsal de la médula espinal comprende desde la lámina I a la VI, mientras que el asta ventral comprende de la VII a la IX. La lámina X se sitúa en el medio de ambas regiones.

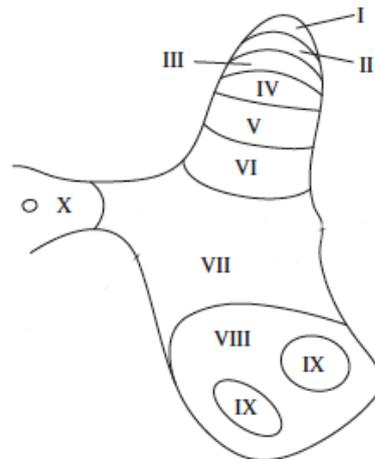


Figura 4: Esquema de una sección transversal de médula espinal. En la imagen se muestra la sustancia gris, indicando en cada caso cada una de las láminas descritas por Rexed y su numeración. La región dorsal, se sitúa hacia arriba en la imagen y la ventral hacia abajo. Obsérvese que el grosor de las láminas más superficiales es menor al resto de láminas.

#### *Asta dorsal de la médula espinal*

El asta dorsal de la médula espinal es la región que se encarga principalmente del procesamiento de información somatosensorial. Aquí llega información de las aferentes procedentes de periferia. Contiene cuatro componentes neuronales principales: (1) terminales centrales de axones de aferentes primarios, que se ramifican en diferentes áreas (2) neuronas intrínsecas –interneuronas- con axones que sólo se propagan a otros segmentos espinales, (3) neuronas de proyección, con axones que llevan información a centros supraespinales y (4) axones descendentes desde centros supraespinales, que tienen un papel importante en la modulación de la transmisión de la información nociceptiva.

Las neuronas de esta región se pueden caracterizar en base a su morfología (ver Willis and Coggeshall, 2004) y a sus propiedades electrofisiológicas (López-García and King, 1994; Russo and Hounsgaard, 1999).

Las neuronas de **lámina I** se han clasificado en función de su morfología. Existen neuronas fusiformes, multipolares, piramidales y según algunos autores aplanadas (Lima and Coimbra, 1983; Lima and Coimbra, 1986; Galhardo and Lima, 1999). Las neuronas fusiformes parecen corresponderse con aquellas nociceptivo específicas, las piramidales con las termorreceptoras específicas y las multipolares son de ambos tipos (Han et al., 1998).

Según el patrón de disparo por pulsos de corriente intracelular, estas neuronas se han clasificado como (1) tónicas, que responden a lo largo de la estimulación y se corresponden

con las de morfología fusiforme, (2) fásicas, que se adaptan a la frecuencia de disparo y se corresponden con las piramidales, (3) de comienzo retrasado, que tienen un disparo irregular viéndose un retraso entre su despolarización y el disparo y (4) de espiga única. Tanto las de comienzo retrasado como las de espiga única parecen corresponderse con las neuronas multipolares (Thomson et al., 1989; Prescott and De Koninck, 2002). Además dentro de la lámina I, existe una pequeña proporción de neuronas de proyección que presentan características diferentes al resto de neuronas de la lámina, así como entre ellas. Se han identificado dos patrones de disparo característicos de este tipo de neuronas evocados por pulsos de corriente intracelular: neuronas con un disparo en ráfaga seguido de un disparo tónico y neuronas con un intervalo amplio entre el primer potencial de acción y los sucesivos (Ruscheweyh et al., 2004).

La **lámina II**, se divide en dos regiones, una más externa o dorsal (Ilo) y otra interna o ventral (Ili). Esta lámina recibe información proveniente de termorreceptores, mecanorreceptores y nociceptores.

La mayor parte de las neuronas de esta lámina son interneuronas pequeñas, y sólo una pequeña proporción contribuyen a la formación de tractos ascendentes. A nivel morfológico encontramos (1) neuronas de tallo, que son interneuronas de tipo nociceptivo, (2) neuronas islote (Gobel and Falls, 1979), que son neuronas inhibitorias, (3) neuronas de tipo central, que hay tanto excitatorias como inhibitorias y (4) neuronas de tipo radial que son sólo excitatorias.

A nivel electrofisiológico, al aplicar pulsos de corriente intracelular, encontramos neuronas con disparo retardado, neuronas que producen un solo potencial de acción, neuronas que producen una ráfaga inicial de disparos, y neuronas con ráfagas discontinuas (Thomson et al. 1989; Wall et al., 1979).

Las neuronas de **lámina III** tienen campos dendríticos complejos. Encontramos dos tipos de neuronas, neuronas de proyección del Tracto Espinotalámico que poseen dendritas dorsales que podrían llegar a lámina I recibiendo así información nociceptiva, y las neuronas postsinápticas de las columnas dorsales que envían las dendritas hacia lámina I y II (Brown and Fyffe, 1981; Brown et al., 1981; Brown et al., 1977). A esta lámina llega información procedente de fibras gruesas.

La **lámina IV** posee neuronas de tamaños muy diferentes. Encontramos neuronas tipo antena, que envían sus prolongaciones dendríticas a láminas superficiales para realizar sinapsis con axones de neuronas centrales, neuronas con dendritas orientadas longitudinalmente y otras con dendritas transversales (Rethelyi and Szentagothai, 1973). Además existen neuronas de proyección del Tracto Espinotalámico y postsinápticas de las columnas dorsales. Esta lámina recibe información de fibras aferentes gruesas.

En **lámina V** la población neuronal es muy heterogénea, encontrándose (1) neuronas multirreceptivas, alargadas y con campos dendríticos que se extienden hacia todas las direcciones, (2) neuronas que responden sólo a estímulos nocivos, con cuerpos celulares de menor tamaño pero con campos dendríticos aproximadamente iguales, en tamaño, que los de las multirreceptivas y (3) neuronas que responden sólo a estímulos inocuos, que morfológicamente son las más pequeñas y sus campos dendríticos son también de menor tamaño (Ritz and Greenspan, 1985). Estas neuronas proyectan al tálamo, núcleos de las columnas dorsales, núcleo cervical lateral y hacia otras regiones de médula espinal.

No se han descrito tipos neuronales diferentes en **lámina VI**. Estas células reciben información de diversas zonas del asta dorsal, pero no de láminas superficiales y por lo tanto no reciben información procedente de aferentes finas.

Según la intensidad del estímulo al que responden, las neuronas del asta dorsal se han clasificado como (Cerveró et al., 1975):

- Neuronas de clase 1: activadas exclusivamente por fibras aferentes de baja intensidad. Los órganos receptores para las neuronas de clase 1 son mecanorreceptores de la piel o propioceptores. Estas neuronas también han sido llamadas neuronas de bajo umbral (Handwerker et al., 1975).

- Neuronas de clase 2: activadas tanto por estímulos de baja intensidad conducidos por fibras gruesas mielinizadas, como de alta intensidad conducidos por fibras amielínicas, por lo que también han sido llamadas neuronas de amplio rango dinámico (Handwerker et al., 1975). Estas neuronas son excitadas por una gran variedad de receptores mecánicos así como por nociceptores. No distinguen entre estímulos inocuos y estímulos nocivos y poseen campos receptivos muy amplios. Aumentan su respuesta a medida que aumenta la intensidad del estímulo y ante estimulación repetida. Este grupo de neuronas tiende a sensibilizarse.

- Neuronas de clase 3: Este tipo de neuronas sólo se excita por estímulos de alta intensidad (nocivos) conducidos por fibras aferentes finas. También se conocen como neuronas nociceptivas específicas (Handwerker et al., 1975). Las neuronas de esta clase a su vez se pueden dividir en: neuronas que reciben información de nociceptores mecánicos A $\delta$  y que no responden a estímulos térmicos nocivos y en neuronas que son excitadas por fibras A $\delta$  y C respondiendo a estímulos térmicos y mecánicos nocivos, además de por fibras de grupo III y IV (mecanosensitivas de bajo y alto umbral) del músculo.

### *Asta ventral de la médula espinal*

Este asta es puramente motor y como ya se ha mencionado anteriormente, está formado por las **láminas VII, VIII y IX** de Rexed. Las dos primeras son láminas de transición, mientras que

la lámina IX es donde se sitúan las motoneuronas espinales. Además, hay neuronas propioespinales e interneuronas que se encargan de modular y coordinar la actividad de las motoneuronas (Delgado et al., 1998).

Las motoneuronas son neuronas de tamaño relativamente grande que reciben información sensorial a través de fibras aferentes, bien directamente o bien a través de neuronas del asta dorsal, y a su vez reciben información descendente procedente de centros supraespinales, para controlar los movimientos voluntarios. Los axones de las motoneuronas se dirigen a los músculos a través de las raíces ventrales. Existen diferentes tipos de respuestas rápidas o reflejos espinales, entre ellos el reflejo miotático o de estiramiento y el flexor o de retirada, los cuales se han estudiado en el desarrollo de esta tesis.

- Reflejo miotático: Es un reflejo monosináptico iniciado en neuronas sensitivas que inervan los husos musculares que hacen sinapsis con motoneuronas, que provocarán la contracción de dicho músculo.
- Reflejo flexor o de retirada: es un reflejo polisináptico complejo, puramente nociceptivo. En este caso, la aferencia nociceptiva hace contacto sináptico indirecto con una serie de motoneuronas, de tal modo que se produce la retirada del miembro que ha sido estimulado.

### *Zona intermedia de la médula espinal*

En esta zona se encuentra la lámina X de Rexed. Sobre esta lámina proyectan nociceptores mecánicos A $\delta$  y fibras aferentes viscerales no mielinizadas, por lo que las neuronas situadas en esta zona serían importantes en la transmisión nociceptiva visceral.

### 2.2.b. Vías ascendentes de la transmisión nociceptiva

La información nociceptiva es transmitida desde la médula espinal hasta el tálamo y corteza cerebral a través de cinco vías principales (Basbaum and Jessell, 2000):

- Tracto Espinotalámico: es la principal vía ascendente. Sus axones se proyectan al lado contralateral de la médula espinal y ascienden por la sustancia blanca anterolateral, terminando en el tálamo. Se origina a partir de neuronas nociceptivo-específicas y de amplio rango dinámico de lámina I, V, VII y VIII. Esta vía contribuye a la discriminación sensorial, así como también a desencadenar la actividad en los sistemas de control descendente.
- Tracto Espinoreticular: se origina en las neuronas de lámina VII y VIII. Asciende por el cuadrante anterolateral de la médula espinal y termina en la formación reticular y el tálamo. Este tracto se puede dividir en tres componentes, una parte que realiza sinapsis en la

formación reticular romboencefálica medial que probablemente participe en el procesamiento sensorial, un segundo componente que proyecta al núcleo reticular lateral y un tercer componente que proyecta al núcleo reticular dorsal, proporcionando aparentemente información nociceptiva.

- Tracto Espinomesencefálico: se origina en las neuronas de lámina I y V, proyecta del cuadrante anterolateral de la médula espinal a la formación reticular del mesencéfalo y la sustancia gris periaqueductal. Se pueden considerar componentes de este sistema los tractos espinotectal, espinoanular y espinoparabraquial. Este último proyecta a los núcleos parabraquiales y a su vez las neuronas de esos núcleos proyectan a la amígdala, componente principal del sistema límbico. Por este motivo, cabe pensar que el Tracto Espinomesencefálico contribuye al componente afectivo del dolor.

- Tracto Cervicotálámico: se origina en las neuronas del asta dorsal (principalmente lámina III y IV), cuyos axones proyectan en la parte dorsal del funículo lateral ipsilateral para realizar sinapsis con células del núcleo cervical lateral, constituido por neuronas especializadas situadas en la sustancia blanca externa de los segmentos cervicales C1 a C3. La mayoría de axones cruzan la línea media y ascienden por el lemnisco medio del tronco del encéfalo a los núcleos del mesencéfalo y a los núcleos externos ventroposteriores y posteromediales del tálamo.

- Tracto Espinohipotálámico: comprende los axones de las neuronas de láminas I, V y VIII. Sus fibras se proyectan directamente a los centros supraespinales de control autonómico y participa en la activación de las respuestas neuroendocrinas y cardiovasculares que acompañan las sensaciones de dolor. Parecen tener una función en la contribución de aspectos afectivos y emocionales en las respuestas a estímulos nociceptivos.

Los núcleos del tálamo transmiten la información aferente a la corteza cerebral.

### 2.2.c. Vías descendentes de la transmisión nociceptiva

Se ha demostrado la existencia de mecanismos supraespinales de control y modulación de la señal nociceptiva a través de la médula espinal. Desde la sustancia gris periaqueductal del mesencéfalo, surge un sistema de inhibición descendente que establece un relevo en los núcleos del rafe en el tronco del encéfalo y termina en el asta posterior de la médula espinal produciendo inhibición de las neuronas nociceptivas a este nivel. Las fibras descienden por el cordón dorsolateral a la médula espinal enviando proyecciones a lámina I y V (Basbaum and Fields, 1984).

Este control puede ser tanto excitatorio como inhibitorio. Las vías descendentes inhibitorias, son capaces de atenuar los efectos de los mediadores pronociceptivos de las fibras aferentes

primarias y de suprimir la excitación de las neuronas de proyección a través de las interneuronas. De esta manera un control inhibitorio sobre las fibras aferentes primarias y sobre interneuronas excitatorias produciría un descenso en la señal nociceptiva. Sin embargo si este control inhibitorio se ejerce sobre interneuronas inhibitorias, cabría esperar una facilitación del sistema nociceptivo. Para que la inhibición descendente se traduzca en inhibición o facilitación de la señal, dependerá o bien de la implicación de neurotransmisores diferentes, o de la acción del mismo neurotransmisor sobre receptores diferentes, pudiendo producirse así efectos distintos (Millan, 2002).

### 3. Principales neurotransmisores implicados en la transmisión nociceptiva

El sistema nociceptivo dispone de numerosos neurotransmisores implicados en la transmisión, procesamiento y modulación de la señal nociceptiva. En el desarrollo de esta tesis se ha estudiado el papel de algunos de estos neurotransmisores a nivel espinal, los cuales se pasan a describir a continuación.

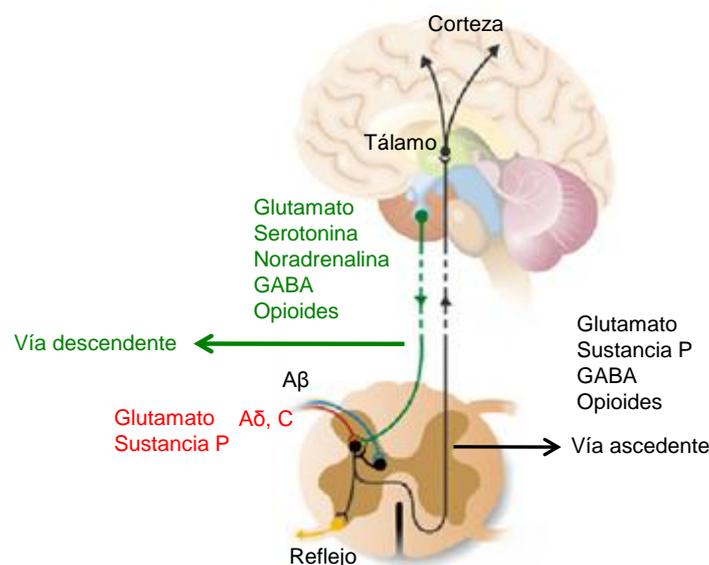


Figura 5: Esquema de la transmisión nociceptiva y los principales neurotransmisores implicados en cada nivel. Los principales neurotransmisores liberados por las fibras Aδ y C son el glutamato y SP. En médula espinal, implicados en la vía ascendente, se encuentran principalmente Glutamato, SP, GABA y opioides. Vía descendente se libera hacia médula espinal, principalmente Glutamato, 5-HT, Noradrenalina, GABA y opioides.

La transmisión sináptica entre los nociceptores y neuronas del asta posterior está mediada por neurotransmisores que son liberados por las terminaciones nerviosas sensitivas centrales.

El principal neurotransmisor excitador liberado por fibras A $\delta$  y C, es el **glutamato**. Es capaz de interactuar con tres tipos diferentes de receptores ionotrópicos y con ocho subtipos de receptores metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos de glutamato se han clasificado de manera común, atendiendo a su sensibilidad por el análogo sintético de glutamato, el ácido N-metil-D-aspartico (NMDA). De esta manera se diferencia entre receptores tipo NMDA y tipo no NMDA. Dentro de los receptores tipo no-NMDA existen receptores de AMPA, muy sensibles al ácido aminometilfosfórico (AMPA) y de kainato, sensibles al ácido kaínico. La localización subcelular de los receptores NMDA y AMPA es fundamentalmente postsináptica, mientras que los de kainato se localizan tanto a nivel postsináptico como presináptico (Dingledine et al., 1999).

Los receptores metabotrópicos, por otro lado, están acoplados por medio de proteínas G a segundos mensajeros intracelulares, los cuales pueden regular actividades celulares como transcripción de genes y fosforilación de canales iónicos dependientes de voltaje o dependientes de ligandos (Simeone et al., 2004).

Las aferentes primarias realizan contactos sinápticos con las neuronas de primer orden a través de receptores del tipo AMPA, sin embargo, los contactos entre las neuronas espinales parecen ser mediados por receptores tipo NMDA. Así, los componentes monosinápticos de las respuestas de las neuronas espinales son sensibles al bloqueo de los receptores de tipo no-NMDA y los componentes polisinápticos al bloqueo de receptores de NMDA (Evans, 1989; Evans and Long, 1989; King et al., 1992). El glutamato también es el neurotransmisor de poblaciones de neuronas cuyos somas se localizan en la sustancia gris periaqueductal y en el núcleo del rafe. Su papel antinociceptivo reside en que facilita la liberación de serotonina y noradrenalina en las terminaciones descendentes que se proyectan en el asta dorsal, gracias a que interacciona con los receptores AMPA y NMDA localizados en las terminaciones de los axones monoaminérgicos.

Con el glutamato se liberan conjuntamente otros neuropéptidos por las terminales de las aferentes primarias. Estos neuropéptidos además de tener funciones fisiológicas concretas, parecen potenciar y prolongar la acción del glutamato. De los muchos neuropéptidos presentes en las neuronas sensitivas nociceptivas, la **sustancia P (SP)** es la que se ha estudiado con mayor detalle. La SP pertenece a la familia de las taquicininas, junto con la neurocinina A (NKA) y la neurocinina B (NKB). Las taquicininas son producidas por las neuronas de primer y segundo orden y reaccionan con los receptores metabotrópicos postsinápticos NK, produciendo despolarización de la neurona postsináptica. La SP se libera desde las fibras aferentes primarias por estimulación intensa y sostenida de éstas, e interacciona en médula

espinal con los receptores NK tipo 1 (NK1) (Pennefather et al., 2004). La mayoría de proyecciones descendentes coexpresan también SP y las neuronas supraespinales que coexpresan SP proyectan hacia terminaciones axónicas de las neuronas descendentes noradrenérgicas, produciéndose tras su liberación una despolarización mediada por receptores NK1 y liberación de noradrenalina en la médula espinal (Muto et al., 2012).

A nivel inhibitorio, el neurotransmisor más abundante en el sistema nervioso es el ácido gamma-aminobutírico (**GABA**). Este es liberado por interneuronas y actúa abriendo una conductancia para  $Cl^-$  generalmente produciendo inhibición, aunque también es capaz de producir despolarización de las aferentes primarias. Además, GABA se encuentra localizado en el núcleo del rafe produciendo hiperpolarización sobre neuronas de primer y segundo orden (Bormann, 2000).

El **sistema opioide** está involucrado en la modulación del dolor tanto a nivel ascendente como descendente. A nivel ascendente los tres receptores opioides  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  parecen ser responsables de esta modulación, mientras que a nivel descendente los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  son los que participan mayoritariamente (Stamford, 1995). Se han identificado tres clases de opioides endógenos que interactúan con estos receptores opioides: encefalinas,  $\beta$ -endorfinas y dinorfinas. Tanto las encefalinas como las dinorfinas se pueden encontrar en los cuerpos celulares de neuronas y en las terminales axónicas en la sustancia gris periaqueductal, en la región dorsoventral del bulbo y en el asta posterior de la médula espinal, principalmente en lámina I y II. Las  $\beta$ -endorfinas, se encuentran principalmente en las neuronas del hipotálamo que envían proyecciones a la región gris periaqueductal y a los núcleos noradrenérgicos del tronco del encéfalo.

Se han descrito cambios en el sistema opioide según la edad de los animales utilizados en experimentación. Aunque parece que los receptores están presentes en las primeras etapas de desarrollo en ratas, la predominancia de estos en la médula espinal, varía en función de la edad. Así, en los primeros días tras el nacimiento, en la médula espinal se han visto receptores  $\mu$  y  $\kappa$  (Marsh et al., 1997), sin embargo en animales adultos, cambia la expresión de los receptores, predominando los  $\mu$  y  $\delta$  (Marsh et al., 1997). Como parece que los efectos depresores de la excitabilidad están mediados principalmente por receptores  $\mu$  (Briggs and Barnes, 1987), cabría esperar que las diferencias en el efecto opiáceo no fuesen significativas. En este sentido, el control descendente relacionado con los opioides se encuentra ya formado en el nacimiento, aunque no comienza a funcionar hasta los 10 días de vida, alcanzando los niveles del adulto en torno a la tercera semana (Marsh et al., 1997).

Otro de los sistemas descendentes de relevancia en la modulación de la señal nociceptiva es el **sistema noradrenérgico**. Las neuronas noradrenérgicas implicadas en la modulación descendente del dolor tienen sus somas en núcleos pontolobulares (locus coeruleus, locus

subcoeruleus) (Tucker et al., 1987; Kwiat and Basbaum, 1992; Tavares et al., 1996; Hokfelt et al., 2000) y proyectan a diversas áreas del encéfalo y médula espinal. Una vez liberada la noradrenalina, en la médula espinal actúa sobre receptores adrenérgicos  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . Los receptores  $\alpha 1$  se localizan en neuronas inhibitorias, y tras unión de noradrenalina produce despolarización de estas neuronas. Los  $\alpha 2$  se encuentran en neuronas de proyección y en las terminaciones centrales de las neuronas nociceptivas de primer orden. La unión de noradrenalina a estos receptores produce hiperpolarización neuronal y se ha observado que además se da una reducción en la liberación de neurotransmisores pronociceptivos como sustancia P y glutamato en las terminales (Millan, 1997). Diversos estudios neuroquímicos, electrofisiológicos y de comportamiento en modelos de dolor inflamatorio y neuropático, así como estudios de los efectos de la administración sistémica y en médula espinal de noradrenalina (Yaksh, 1985; Eisenach et al., 1996; Dickenson and Besson, 1997; Millan, 1997) parecen indicar que la presencia de receptores  $\alpha 2$  en el asta dorsal desempeña un papel importante en la inhibición nociceptiva.

El control descendente **serotoninérgico** también parece tener un papel importante en la modulación nociceptiva. Las neuronas serotoninérgicas descendentes tienen sus somas principalmente en los núcleos del rafe y proyectan sus axones, a través del cordón dorsolateral, hasta lámina I, II, IV, V y VI (Basbaum and Fields, 1984; Besson and Chaouch, 1987; Ruda et al., 1986; Li et al., 1997; Stewart and Maxwell, 2000). Estos axones sinaptan con neuronas de proyección, interneuronas espinales y neuronas de primer orden. Una vez liberada la serotonina (5-HT), interacciona con receptores serotoninérgicos tipo 1 localizados en las neuronas de proyección y en las terminaciones sinápticas de las fibras aferentes nociceptivas; o con receptores tipo 2 y 3 de las interneuronas inhibitorias espinales. A nivel espinal, la administración directa de 5-HT produce efectos analgésicos en una serie de pruebas de comportamiento y existen evidencias que sugieren un papel para el 5-HT en el sistema de control del dolor endógeno (Millan, 1997). A nivel celular, 5-HT induce una gama de respuestas que incluyen hiperpolarización, despolarización, cambios en la excitabilidad de las neuronas espinales, despolarización de los aferentes primarios y modulación de la transmisión glutamatérgica y peptidérgica (Davies and Roberts, 1981; Del Mar et al., 1994; Headley et al., 1987; López-García and King, 1996; Larkman and Kelly, 1997; López-García, 1998). Se cree que varios de estos efectos moduladores a nivel espinal podrían estar contribuyendo a la depresión en la transmisión sináptica por 5-HT (López-García and King, 1996) y por lo tanto a su efecto antinociceptivo. El control de la concentración de 5-HT en el espacio sináptico se realiza a través de un transportador que recapta presinápticamente el neurotransmisor para ser degradado por la enzima monoamino oxidasa (MAO).

Se ha visto que tanto los sistemas descendentes de noradrenalina como de serotonina, son funcionales durante los primeros días de vida (Lakke, 1997).

#### 4. Sensibilización

Como ya se ha descrito anteriormente, la nocicepción cumple un papel protector importante, ya que ayuda, tanto a prevenir posibles daños tisulares, como a reparar tejidos ya dañados. Un fenómeno que ayuda a mejorar esta función protectora es la sensibilización del sistema nociceptivo, proceso que se caracteriza por un incremento en la excitabilidad celular, bien directamente, como en el caso de los nociceptores periféricos o indirectamente, en las neuronas centrales, a través de las vías aferentes (Cervero, 2009). En estas situaciones, aparecen fenómenos de dolor espontáneo, dolor ante estímulos inocuos (alodinia), y respuestas exageradas a estímulos nociceptivos (hiperalgesia).

A nivel periférico, en un proceso de sensibilización, se ha visto que existe un aumento en la excitabilidad (Burgess and Horch, 1973), que se relaciona con un incremento en la sensibilidad al dolor en el área inervada por los nociceptores sensibilizados. Esto podría ser debido a cambios en la expresión y propiedades funcionales de los canales iónicos dependientes de voltaje que inducirían a estos estados de incremento de excitabilidad (Cervero, 2009).

Tras un proceso inflamatorio, las terminales nerviosas periféricas liberan gran cantidad de agentes algógenos que producirán un aumento en la excitabilidad de los nociceptores, produciéndose alteraciones tales como el aumento de los campos receptores cutáneos, y la adquisición de inputs nuevos por los nociceptores. En este sentido se ha visto que el input eléctrico, mediado por fibras A $\beta$  hacia las neuronas del asta dorsal superficial, es mayor (Baba et al., 1999) en inflamación.

En estados de neuropatía, tras una lesión en un nervio periférico, los cuerpos celulares de las fibras sensoriales primarias no siempre mueren, sino que en ocasiones sobreviven produciendo una regeneración de sus ramas periféricas de manera aberrante, denominado neuroma. Estos neuromas sufren una serie de cambios a nivel funcional y molecular que podrían estar relacionados con el dolor neuropático. Se ha visto un aumento en la expresión de canales de potasio (Roza et al., 2011) y de sodio, que producen actividad eléctrica ectópica (Roza et al., 2003; Tal and Devor, 1992) y acumulación de neuropéptidos (Zochodne et al., 2001).

Los estados de sensibilización periférica, así como la estimulación repetida de las fibras aferentes, conducen a un aumento en la excitabilidad de las neuronas espinales. En la actualidad no se conocen los mecanismos exactos que subyacen a estos estados de sensibilización a nivel central, pero parece que estos procesos podrían estar mediados en parte

por una liberación sostenida de glutamato y neuropéptidos por los nociceptores. Esta liberación estaría produciendo una despolarización de la membrana lo suficientemente intensa como para desplazar el  $Mg^{2+}$  del poro del receptor NMDA, permitiendo así la unión del glutamato, y produciéndose, por tanto, una fuerte entrada  $Ca^{2+}$  en la neurona. Este aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular activa diversas vías intracelulares que podrían estar implicadas en el mantenimiento del estado de hiperexcitabilidad central (Latremoliere and Woolf, 2009).

Durante un proceso inflamatorio, se ha visto que existe un aumento de SP y una regulación a la alza de receptores NK1 en láminas superficiales de médula espinal (Abbadie et al., 1996).

Una vía central que parece ser importante para la generación de hipersensibilidad por inflamación se da también por inducción de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en las neuronas del asta dorsal, que impulsa la producción de prostaglandinas E2 (PGE2) (Samad and Abdi, 2001). PGE2 se une a su receptor EP2 GPC en las neuronas del asta dorsal potenciando receptores AMPA y NMDA.

En contraposición, el sistema opioide, en inflamación, parece encontrarse aumentado. Se ha visto un aumento en los niveles tanto de opioides endógenos como de sus receptores (Stanfa and Dickenson, 1995).

Durante un proceso neuropático por lesión en un nervio, se han visto también alteraciones a nivel de la transmisión inhibitoria. Se ha descrito apoptosis de interneuronas gabaérgicas espinales, produciéndose una disminución en la síntesis de GABA, lo que supondría una pérdida en la inhibición de la transmisión nociceptiva (Moore et al., 2002). Además el sistema opioide, en este caso, parece encontrarse disminuido (Zhang et al., 1998).

Pese a que se van conociendo algunos de los procesos y moléculas que podrían estar implicadas, los mecanismos concretos que subyacen a estos estados de sensibilización central siguen siendo un problema sin resolver.

## 5. Modelos experimentales de sensibilización central

A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes modelos experimentales que fuesen de utilidad para estudiar los cambios que se suceden durante los procesos de sensibilización central. Para la elaboración de esta tesis se han utilizado tres modelos: (1) wind-up; (2) inflamación por carragenina y (3) modelo de neuropatía. En el caso del fenómeno de wind-up, pese a no quedar clara la relación directa con la sensibilización central, parece que tienen mecanismos comunes, por lo que su estudio podría ayudar a entender mejor estos procesos. Los procesos inflamatorios y neuropáticos, están relacionados con la sensibilización central, aunque parece que los mecanismos y neurotransmisores implicados no son los mismos en

ambos casos o los cambios que suceden en éstos no son en la misma dirección. Por ello, estudios farmacológicos, en ambas situaciones, podrían ayudar a entender lo que está sucediendo en cada caso.

### 5.1. Wind-up

Lorne Mendell, en 1966 (Mendell, 1966), describió el fenómeno de wind-up como una descarga exagerada por estimulación repetitiva de fibras C. Se define como un incremento progresivo en la respuesta de fibras C ante un estímulo constante repetido de alta intensidad a baja frecuencia.

Evidencias experimentales, han conducido a la teoría de que podría existir una relación entre el fenómeno de wind-up y la hiperexcitabilidad de neuronas nociceptivas de médula espinal (Woolf, 1983). Se ha visto que tras generación de wind-up hay un aumento prolongado en la excitabilidad de las neuronas del asta dorsal (Cervero et al., 1984; Cook et al., 1987), así como el bloqueo de receptores NMDA produce un descenso en el wind-up (Davies and Lodge, 1987; Dickenson and Sullivan, 1987; Woolf and Thompson, 1991).

Además otros neuromedadores como taquicinas, opioides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) con acción central, tienen efectos inhibitorios en el wind-up (Herrero et al., 2000).

El wind-up generado por los distintos tipos neuronales de médula espinal posee alguna característica diferencial. Estas características fueron estudiadas por primera vez por Schouenborg y Lund Sjöe en 1983 en rata anestesiada. Este estudio reveló que las neuronas de clase 2 registradas en el asta dorsal profunda mostraban un wind-up más pronunciado que las neuronas del asta dorsal superficial mientras que, tanto las neuronas de clase 3 (en su mayoría superficiales) así como las neuronas de clase 1, no mostraron un marcado wind-up.

Parece, por lo tanto, que las neuronas de láminas más profundas, presentan una probabilidad mayor de mostrar un wind-up pronunciado.

De igual manera examinaron el wind-up de los reflejos de las extremidades posteriores, en rata anestesiada, y lo compararon con el wind-up generado en diferentes clases de neuronas del asta dorsal. En este estudio, la potenciación observada en las respuestas reflejas después de la estimulación repetitiva tenía características similares al wind-up observado en las neuronas de clase 2 registradas en el asta dorsal profunda (Schouenborg and Sjölund, 1983).

### 5.2. Modelo de inflamación por carragenina

El modelo de inflamación por inyección de carragenina intraplantar representa uno de los modelos clásicos de formación de edema e hiperalgesia (Hargreaves et al., 1988). La

respuesta inflamatoria por inyección de carragenina fue estudiada por primera vez por Winter y colaboradores en 1962 (Winter et al., 1962). La inyección intraplantar de carragenina en rata induce edema (Winter et al., 1962; Di Rosa et al., 1971), hiperalgesia mecánica y térmica (Hargreaves et al., 1988; Joris et al., 1990).

Este modelo tiene como ventajas que es sencillo, reproducible y mantiene el proceso inflamatorio a largo plazo, de 6 a 20 h tras inyección, en preparaciones de médula espinal aislada, en registros electrofisiológicos (Hedo et al., 1999).

### 5.3. Modelo de neuropatía

Se han utilizado diversos modelos para el estudio de los fenómenos que suceden durante neuropatía. Los más utilizados son los que implican un daño traumático a nivel periférico ya que son sencillos de generar y reproducibles. Uno de los modelos más estudiados es el modelo SNI (del inglés *spared nerve injury*) que consiste en una axotomía de las ramas tibial y peroneo común, dejando intacta la rama sural (Decosterd and Woolf, 2000). Este modelo, de denervación parcial, permite estudiar los cambios que ocurren en las neuronas sensoriales primarias dañadas y en las no dañadas que se encuentran en las regiones próximas, ya que ofrece la ventaja de una distribución anatómica clara, sin entremezclado de las fibras nerviosas lesionadas y no lesionadas, de tal manera que los territorios lesionados y no lesionados se pueden identificar fácilmente (Decosterd and Woolf, 2000).

## 6. Analgesia

Se define analgesia como el alivio de la sensación de dolor sin intención de producir sedación. Como se ha descrito en secciones anteriores de esta tesis, en el dolor patológico o no nociceptivo existen múltiples estructuras y moléculas involucradas. Las terapias farmacológicas irán dirigidas a restaurar la señal nociceptiva que se encuentra alterada.

De manera general, los tratamientos farmacológicos se centran en bloquear sistemas facilitadores y potenciar sistemas inhibidores de la transmisión nociceptiva. A nivel periférico se utilizan fármacos cuyos efectos analgésicos radican en el bloqueo en la conducción sensorial (anestésicos locales) y en la inhibición en la síntesis de moléculas pro-inflamatorias (AINEs) principalmente. A nivel central, se han buscado moléculas que a nivel espinal bloqueen aquellos neurotransmisores implicados en la excitación neuronal como el glutamato y la SP, que potencien la liberación de péptidos con efecto analgésico como endorfinas, o que potencien vías descendentes inhibitorias. En los últimos años, han tomado especial relevancia este tipo de fármacos de acción central para tratamiento de dolor crónico, siendo en muchos casos tratamiento de elección. En el desarrollo de esta tesis se han utilizado una serie de

fármacos de elección en clínica, y con mecanismos de acción diferentes, con el fin de encontrar algún patrón común.

### Pregabalina

Es un análogo sintético del ácido gamma-aminobutírico (GABA), que no ha mostrado tener acción alguna sobre receptores tipo GABA (Bialer et al., 1999).

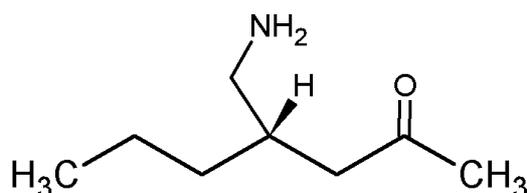


Figura 6: Estructura química de la pregabalina

Su mecanismo de acción concreto se desconoce, pero se sabe que actúa sobre los canales de calcio dependiente de voltaje. Estos canales se han dividido en seis clases, de los cuales los tipo N se cree que tienen un papel en procesos de sensibilización central (Matthews and Dickenson, 2001). Estructuralmente los canales se componen de cinco subunidades, y pregabalina se une de manera potente a la subunidad  $\alpha 2-\delta$  en el sistema nervioso periférico y central (Gee et al., 1996). La unión de la pregabalina a esta subunidad altera la cinética y la dependencia de voltaje de los canales, reduciendo el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a los terminales nerviosos y disminuyendo la liberación de neurotransmisores como el glutamato, la noradrenalina, SP y la calcitonina entre otros (Dooley et al., 2000; Fink et al., 2002; Maneuf et al., 2001). La disminución en la liberación de dichos neurotransmisores parece ser la responsable de su acción analgésica en neuropatía.

Ha demostrado eficacia en el tratamiento del dolor asociado a neuralgia post-herpética (Dworkin et al., 2003) neuropatía diabética periférica (Rosenstock et al., 2004), fibromialgia y lesión medular, siendo tratamiento de elección en todos los casos (Attal et al., 2006). En estos procesos, pregabalina ha mostrado reducir la actividad ectópica sin producir cambios en la conducción normal de los nervios.

### Duloxetina

Es un inhibidor potente y selectivo de la recaptación de serotonina y noradrenalina, con poca o ninguna afinidad sobre los receptores 5-HT, receptores de noradrenalina, de dopamina, de acetilcolina o receptores opioides (Bymaster et al., 2001).

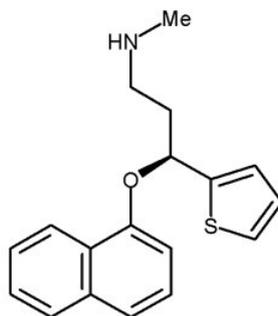


Figura 7: Estructura química de duloxetina

Su mecanismo concreto en cuanto al alivio del dolor crónico no está muy claro, aunque el aumento de la participación de serotonina y noradrenalina en las vías inhibitorias descendentes o su acción directa sobre corrientes neuronales de  $\text{Na}^+$  podría explicar sus efectos (Thor et al., 2007; Wang et al., 2010).

Fue el primer fármaco aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento del dolor asociado a neuropatía diabética (Perahia et al., 2006) y es uno de los tratamientos de elección en fibromialgia.

### Morfina

Es un alcaloide del opio que actúa como agonista de receptores opioides localizados en cerebro, médula espinal y otros tejidos. A diferencia de otros opioides, morfina se une preferiblemente a receptores tipo  $\mu$ , aunque también es agonista de receptores  $\delta$  y  $\kappa$ .

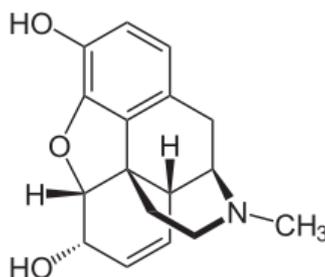


Figura 8: Estructura química de morfina

El efecto analgésico de morfina parece ser a través de dos mecanismos:

- Bloqueo de la transmisión sináptica, mediante la inhibición de la liberación presináptica de neurotransmisores excitatorios como SP.
- Estabilizando membranas mediante hiperpolarización neuronal, modulando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  a la célula, desensibilizando la membrana postsináptica a la acción de SP.

Estas dos acciones, una a nivel presináptico y otra a nivel postsináptico, se traducen en una reducción en la transmisión neuronal con la consecuente producción de un efecto analgésico.

Morfina está indicada en dolores agudos y en crónicos de origen oncológico. En los dolores crónicos no oncológicos suele ser tratamiento de segunda o tercera elección (Attal et al., 2006) debido a que no ha mostrado ser efectivo en dolores neuropáticos, a la multitud de efectos secundarios que presenta su uso a largo plazo, y la posibilidad de desarrollar fenómenos de tolerancia (Benyamin et al., 2008).

### Clonidina

Es un agonista de receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos.

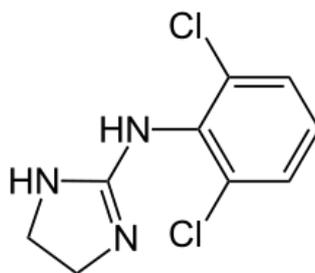


Figura 9: Estructura química de clonidina

Parece que los efectos analgésicos de clonidina se deben a que es capaz de bloquear la transmisión nociceptiva reduciendo la liberación de glutamato y SP desde las terminales nerviosas (Calvillo and Ghignone, 1986) e imitando la acción de noradrenalina liberada vía inhibición descendente (Stamford, 1995).

Está indicado en dolor crónico intratable y en dolor neuropático (Eisenach et al., 1996; Hassenbusch et al., 2002; Siddall et al., 2000).

## 7. Nuevas dianas terapéuticas: Receptor sigma 1

Debido a sus múltiples etiologías y mecanismos, el dolor sigue siendo un problema a la hora de encontrar tratamientos eficaces. Se han introducido en el arsenal terapéutico fármacos antiepilépticos, antidepresivos, antagonistas de receptores de NMDA, agonistas  $\alpha$ -2 adrenérgicos y capsaicina entre otros, que parece que mejoran los estados patológicos de dolor. No obstante, aunque la incorporación de estos fármacos ha supuesto un avance en las terapias, el dolor continúa siendo persistente en muchos casos. Por este motivo, se siguen buscando nuevas dianas farmacológicas, como es el caso del receptor  $\sigma$ 1, el cual ha sido

motivo de estudio durante los últimos años, por su posible implicación en procesos de sensibilización central y por ello ha sido uno de los focos de interés en esta Tesis.

### 7.1. Receptor $\sigma_1$

Los receptores  $\sigma$  fueron descritos por primera vez como una subclase de receptor opioide (Martin et al., 1976), por su interacción con SFK-10,047 (N-alilnormetazocina) y benzomorfanos relacionados. Debido a que se pensó que SFK-10,047 era el prototipo de ligando para estos receptores, adquirió la denominación  $\sigma$ , que proviene de la letra "S" del SFK-10,047. Posteriormente se vio que este fármaco tenía otros lugares de unión.

Se conocen dos tipos de receptores:  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$ . Estos subtipos fueron determinados en función de sus pesos moleculares, distribución en tejidos y selectividad ante diferentes fármacos (Hellewell and Bowen, 1990). El subtipo  $\sigma_1$ , ha sido estudiado con especial interés debido a sus posibles aplicaciones neurofarmacológicas, ya que se ha visto que está implicado en procesos de memoria, aprendizaje, depresión, ansiedad, esquizofrenia y analgesia (Cobos et al., 2008).

El receptor  $\sigma_1$  es un polipéptido sencillo de 29-kDa, que fue clonado por primera vez del hígado de cobaya (Hanner et al., 1996). Posteriormente ha sido clonado en diferentes especies entre las que incluimos, ratón, rata y humanos (Guitart et al., 2004) no mostrando homología con otras proteínas mamíferas conocidas. Sin embargo, curiosamente, tiene una homología del 30% con el gen de levadura que codifica la C7-C8 esteroles isomerasa (Moebius et al., 1997).

Recientemente, se ha visto, que en realidad  $\sigma_1$  es una proteína chaperona con actividad regulada por unión a ligando. Estructuralmente difiere de los receptores acoplados a proteína G y a canales iónicos. Se han propuesto varias estructuras para este receptor, y en la actualidad se sabe que consiste en una cadena de 223 aa que, en la membrana plasmática, tiene dos segmentos transmembrana, con los extremos amino y carboxilo terminal hacia el citoplasma celular (Aydar et al., 2002). Además de las regiones hidrofóbicas, que constituyen los dominios putativos transmembrana, existen otros dos segmentos hidrofóbicos adicionales que podrían ser dominios de unión de esteroides (Chen et al., 2007).

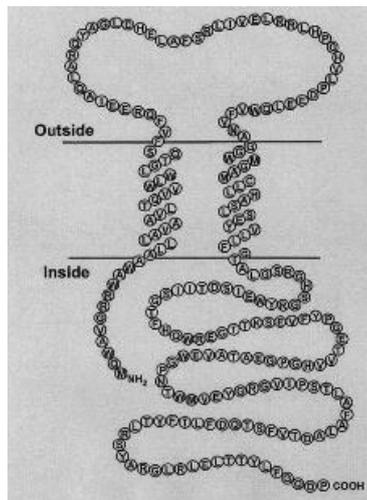


Figura 10: Topología del receptor  $\sigma_1$  (Matsumoto et al 2007). Consta de dos hélices que atraviesan la membrana celular, dejando los extremos amino y carboxilo hacia el citoplasma celular y un bucle extracelular.

#### Distribución de los receptores

Los receptores  $\sigma_1$  se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo. Se pueden encontrar en órganos como corazón (Novakova et al., 1995), pulmones, hígado, riñón (Kawamura et al., 2000) órganos reproductores como ovarios y testículos, glándula adrenérgica (Wolfe et al., 1989), bazo (Brent, 1996), tracto gastrointestinal (Harada et al., 1994), ojo (Ola et al., 2001) y sistema nervioso.

En el sistema nervioso se encuentran tanto en periferia como a nivel central. Se han visto receptores en el ganglio de la raíz dorsal, en láminas superficiales del asta dorsal y en regiones motoras del asta ventral así como en áreas específicas involucradas en memoria, emoción y funciones motoras, en cerebro.

A nivel subcelular se han encontrado receptores  $\sigma_1$  en membrana del retículo endoplasmático, membrana nuclear y membrana mitocondrial.

Diversos estudios han mostrado que los receptores  $\sigma_1$  son capaces de modular diferentes sistemas de neurotransmisión. Se ha notificado potenciación de la neurotransmisión glutamatérgica, colinérgica y serotoninérgica, así como una modulación negativa del sistema gabaérgico y un descenso en la liberación de noradrenalina. También parecen estar implicados en la modulación de canales iónicos como los de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , pero hasta ahora se desconoce el mecanismo por el cual ejercen esas modulaciones (Diaz et al., 2009).

Sin embargo, en el retículo endoplasmático, se ha propuesto un modelo a través del cual, los receptores  $\sigma_1$  estarían modulando el flujo de calcio. Según este modelo, los receptores IP3,

ankyrina y el receptor  $\sigma 1$  estarían formando un complejo. En presencia de un agonista  $\sigma 1$ , el receptor  $\sigma 1$  y la ankyrina se disociarían del receptor IP3, permitiendo la unión de IP3 a su receptor y aumentando así el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Mientras que, cuando se produce un bloqueo del receptor  $\sigma 1$  por un antagonista el resultado sería una disociación de la ankyrina, permaneciendo el receptor  $\sigma 1$  unido al de IP3, de tal manera que IP3 no podría interactuar con su receptor impidiendo la potenciación en el flujo de calcio (Cobos et al., 2008).

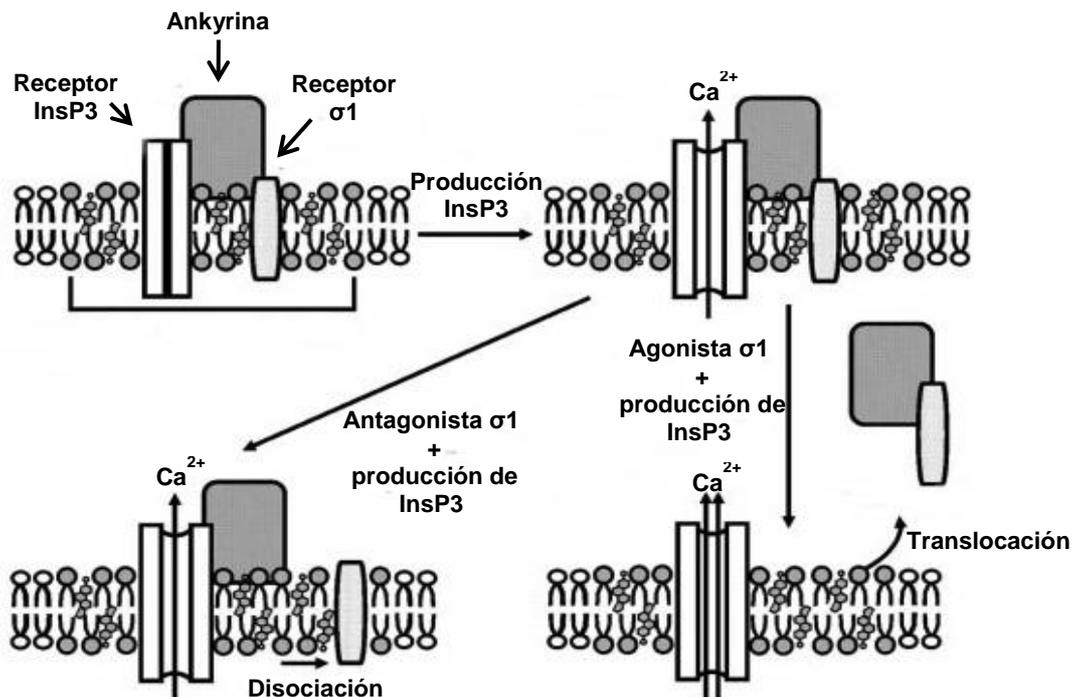


Figura 11: Modelo de la modulación de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  por receptores  $\sigma 1$  propuesto por Hayashi y Su en 2001. El receptor InsP3, ankyrina y el receptor  $\sigma 1$  estarían formando un complejo. Por acción de un agonista  $\sigma 1$ , el complejo  $\sigma 1$ -ankyrina se disocia del receptor InsP3, que se transloca, produciendo un aumento del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por unión de un antagonista, el receptor  $\sigma 1$  se disocia, permaneciendo la ankyrina unida al receptor InsP3, impidiendo la potenciación del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  (modificado de Cobos et al., 2008).

### Ligandos endógenos y exógenos

Se han buscado ligandos endógenos para el receptor  $\sigma 1$ , no obteniendo un gran éxito en su búsqueda. Quizá, la razón, es que  $\sigma 1$  no se corresponde con el modelo clásico de receptor, al ser en realidad una chaperona, y quizá no existan ligandos endógenos para él. Aun así diversos neuroesteroides han mostrado afinidad por el receptor, concretamente progesterona, para la cual se ha visto una afinidad nanomolar por el receptor en el cerebro de cobaya y en bazo, (Su et al., 1988) pero sin embargo, no se ha visto un efecto fisiológico derivado de su unión.

Se pensó que otro ligando endógeno podría ser el neuropéptido Y (Roman et al., 1989) pero no se ha podido confirmar. También se ha visto en estudios de radioligando, que determinados cationes divalentes como  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  interaccionan con  $\sigma 1$  (Connor and Chavkin, 1992).

Un aspecto interesante del receptor  $\sigma 1$  es el amplio abanico de ligandos exógenos, con estructuras y funciones muy diferentes. Se ha demostrado su unión a neurolépticos como el haloperidol, antidepresivos como la fluvoxamina, antitusivos como el dextrometorfano y drogas de abuso como la cocaína y la metanfetamina.

Se ha postulado que los ligandos del receptores  $\sigma 1$  no tienen un efecto por sí mismos, sino que modulan las vías de señalización activadas tras la estimulación de otros sistemas en condiciones fisiopatológicas. Por lo que estos ligandos  $\sigma 1$  podrían ser una diana terapéutica interesante, ya que sería efectiva en condiciones de patología e inactiva en situaciones fisiológicas.

### **7.2. Receptor $\sigma 1$ y dolor**

Como se ha descrito en el apartado anterior, poco se sabe de los mecanismos exactos a través de los cuales, los receptores  $\sigma 1$  ejercen su acción, pero sí parece claro, que adquieren un papel importante en la modulación del dolor inflamatorio y neuropático, y no en el dolor nociceptivo.

#### Antagonismo de receptores $\sigma 1$ como estrategia analgésica

Bajo condiciones de sensibilización inducida por inyección de capsaicina y formalina, o tras daño en un nervio periférico, se han visto efectos antinociceptivos por unión de antagonistas del receptor y en ratones KO.

En ratones KO, capsaicina no induce hipersensibilidad mecánica (Entrena et al., 2009b) y en el test de formalina el dolor se ve disminuido en ambas fases (Cendan et al., 2005b). Además se ha visto que la hipersensibilidad mecánica y la alodinia al frío inducida por paclitaxel (Nieto et al., 2012) y por ligadura parcial del nervio ciático (de la Puente et al., 2009) se veía fuertemente reducida en estos ratones KO.

El antagonismo de los receptores, ha mostrado efectos similares a los que se producen en ratones KO. Experimentos con haloperidol, el cual ha mostrado ser antagonista  $\sigma 1$ , muestran una reducción en las respuestas a dolor en el test de formalina (Cendan et al., 2005a) y a sensibilidad inducida por capsaicina en animales naïve por efecto de éste (Entrena et al., 2009a). Otros fármacos antagonistas selectivos, como BD-1063, BD-1047 y NE-100, administrados vía subcutánea también han producido una inhibición dosis dependiente de la

alodinia mecánica inducida por capsaicina, y sus efectos se han visto revertidos por PRE-084, un agonista  $\sigma 1$  (Entrena et al., 2009b).

El bloqueo de los receptores a nivel espinal, por BD-1047, también produce una reducción de la respuesta en la segunda fase del test de formalina (Kim et al., 2006) y previene la regulación a la alta de receptores NMDA tras neuropatía (Roh et al., 2008).

Parece entonces, que tras un proceso de sensibilización, producido por inyección de capsaicina y formalina, y tras neuropatía producida por ligadura de un nervio periférico o inducida por un tratamiento con paclitaxel, el bloqueo de estos receptores tiene un efecto analgésico.

### 7.3. Receptor $\sigma 1$ y morfina

La posibilidad de una interacción entre receptores  $\sigma 1$  y el sistema opioide, abre una ventana en el tratamiento de determinados tipos de dolor crónico. Los fármacos opioides se utilizan en la práctica clínica habitual para el tratamiento de diferentes tipos de dolor crónico, pero su uso se ve limitado debido a los fenómenos de tolerancia y a sus efectos secundarios.

Los estudios de interacción de ambos sistemas indican una potenciación del efecto analgésico opioide por antagonismo del receptor  $\sigma 1$ , sin verse potenciados los efectos no deseados de los opioides. Por lo tanto, dosis menores de opioide serían necesarias para conseguir el mismo efecto terapéutico, reduciéndose de esta manera los efectos no deseados (Sanchez-Fernandez et al., 2013).

Morfina es uno de los fármacos opioides más utilizado en terapéutica, y también el que más se ha estudiado en relación con  $\sigma 1$ . La primera evidencia de una interacción entre receptores  $\sigma 1$  y receptores opioides, fue descrita en 1993 por Chien y Pasternak (Chien and Pasternak, 1993). En estos estudios se vio como (+)-pentazocina, un agonista  $\sigma 1$ , antagonizaba el efecto analgésico de morfina, administrada vía sistémica, tanto a nivel espinal como supraespinal. Estudios posteriores mostraron, que tras administración de la (+)-pentazocina vía espinal o supraespinal, no había potenciación del efecto analgésico de la morfina a nivel espinal (Mei and Pasternak, 2002). Se pensó por tanto que el efecto observado a nivel espinal tras administración del agonista  $\sigma 1$  y de la morfina vía sistémica, podría ser el resultado de una interacción a nivel periférico y no tanto a nivel espinal.

En relación a esta posible interacción a nivel periférico, estudios recientes (Sanchez-Fernandez et al., 2013) han mostrado un efecto sinérgico en la antinocicepción mecánica de morfina en ratones KO  $\sigma 1$  igual a la que se observa en animales naïve tras administración del fármaco experimental S1RA, sin alterar los efectos no analgésicos, tales como locomoción y tránsito gastrointestinal, lo cual hace pensar que esta interacción sinérgica, podría estar sucediendo a

nivel periférico.

Por otro lado, el haloperidol, un antagonista  $\sigma_1$ , potencia significativamente el efecto de morfina. Esta potenciación por un antagonista sugería una posible actividad tónica del sistema  $\sigma_1$ . Finalmente, se ha descrito una interacción física y funcional entre el receptor  $\sigma_1$  y los receptores  $\mu$ -opioides (Kim et al., 2010).

Estos estudios, parecen indicar, por lo tanto, que el efecto sinérgico en la analgesia de morfina producido por antagonismo de receptores  $\sigma_1$ , parece quedar restringido a periferia y a nivel supraespinal.

#### 7.4. Fármaco experimental S1RA

S1RA nace de la necesidad de encontrar una molécula antagonista para los receptores  $\sigma_1$  con una posible aplicación directa en la clínica.

Posee una afinidad muy alta por los receptores ( $K_i=17nM$ ), y no ha mostrado afinidad por otros 170 receptores, canales iónicos y enzimas probados (Diaz et al., 2012; Romero et al., 2012). S1RA tiene unas propiedades químicas que permite que atraviese barrera hematoencefálica y se una a receptores  $\sigma_1$  en el sistema nervioso.

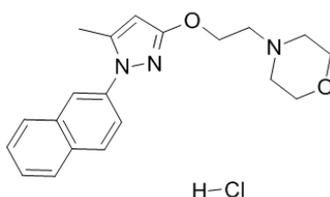


Figura 12: Estructura química del fármaco experimental S1RA

S1RA ha mostrado ser capaz de inhibir de manera dosis-dependiente la nocicepción inducida por formalina, la hipersensibilidad mecánica inducida por capsaicina y la hipersensibilidad mecánica y térmica inducida por lesión en un nervio (Romero et al., 2012).

Actualmente el fármaco ha superado con éxito los estudios de tolerabilidad, seguridad y farmacocinética en fase I. Ha mostrado ser bien tolerado tanto en hombres como mujeres a dosis únicas de hasta 800 mg y a dosis múltiples de hasta 400 mg una vez al día durante 8 días, sin toxicidades limitantes de la dosis o efectos adversos graves observados.



# Capítulo 1

---

## **Estudios farmacológicos en reflejos motores de médula espinal**



### I. OBJETIVOS

El estudio de los reflejos espinales y más concretamente el fenómeno de wind-up, ha sido utilizado como herramienta para evaluar los posibles efectos analgésicos de fármacos con acción central. Aunque como ya se ha dicho anteriormente, el wind-up no es equivalente a sensibilización central, se ha propuesto como una forma de plasticidad dependiente de actividad, similar a la que ocurre en las primeras etapas de sensibilización (Herrero et al., 2000). Por ello parece ser de interés, para el estudio del efecto de fármacos en la transmisión somatosensorial a través de la médula espinal.

Tres han sido los objetivos de este capítulo:

1. Estudiar el efecto de diferentes fármacos en los reflejos espinales en animal naïve. El objetivo de este grupo de experimentos consistió en la búsqueda de un patrón de acción, de diferentes compuestos analgésicos centrales, en los reflejos espinales, que puedan servir para predecir el potencial analgésico de nuevas moléculas experimentales. En este sentido se han escogido diferentes fármacos de elección en la clínica para diferentes procesos de dolor crónico, y se ha comparado sus efectos con el del fármaco experimental S1RA.
2. Establecer la eficacia de S1RA en médula espinal de animal naïve frente animal inflamado. Los receptores  $\sigma_1$  parecen tener especial relevancia en situaciones de dolor patológico, por lo que parece interesante estudiar el efecto de S1RA durante un proceso inflamatorio y compararlo con situación basal.
3. Estudiar la posible interacción entre S1RA y morfina en los reflejos espinales. Existen estudios experimentales que han mostrado una interacción entre el receptor  $\sigma_1$  y morfina (Chien and Pasternak, 1993; Mei and Pasternak, 2002; Sanchez-Fernandez et al., 2013; Chien and Pasternak, 1994). Aunque esta interacción no parece suceder a nivel espinal (Mei and Pasternak, 2002), se realizó un grupo de experimentos preliminares, para comprobar si se producía un efecto sinérgico tras perfusión de ambos fármacos directamente sobre la médula espinal.



### II. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales realizados en el transcurso de la elaboración de esta Tesis se llevaron a cabo según las regulaciones vigentes sobre el bienestar de los animales de experimentación y la conformidad del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá.

Los animales fueron criados en el centro de experimentación animal de la Universidad de Alcalá, donde se mantenían estabulados en condiciones de temperatura controlada, con ciclos de luz de 12 horas y sin limitación de comida ni agua.

#### II.1. Animales

En este bloque de experimentos se utilizaron ratones C57BL6 neonatos de entre 6 y 10 días de edad, con un peso comprendido entre los 3.5 y los 6.5 g.

Para un bloque de experimentos se utilizaron ratones a los que se les inyectó carragenina lambda disuelta en NaCl 0.9%, a una concentración del 30% p/v, con el fin de producir una inflamación visible y evaluable. El proceso inflamatorio se produjo mediante la inyección del agente pro-inflamatorio 20 horas antes de la extracción de la médula, vía intraplantar y en ambas patas posteriores. La inyección se realizó usando jeringas de 1 ml, y agujas de 12 mm, inmovilizando al animal con una mano e inyectando, lentamente, en la planta de la pata, la carragenina, observando de manera instantánea la inflamación.

Justo antes de la extracción de la médula se evaluaban dos parámetros para comprobar que la inflamación se había realizado correctamente y era mantenida:

- Diámetro de la pata: con ayuda de un calibre, se medía el diámetro, comprobando que existía un aumento con respecto a situación basal.
- Sensibilización en el área inflamada. Para ello se utilizaron filamentos Von Frey, aplicándolos en sentido ascendente de fuerza, y anotando la fuerza a la cual el animal retiraba la pata.

#### II.2. Anestesia

Previa extracción de la médula espinal, se procedió a inducir un estado de anestesia general. Una vez terminado el proceso, todos los animales fueron sacrificados mediante decapitación.

El estado de anestesia se indujo administrando uretano 2g/kg, vía intraperitoneal. El uretano produce una anestesia rápida, profunda y de lenta recuperación. En ocasiones, cuando la primera anestesia no producía la anulación completa de los reflejos, se procedía a realizar una segunda inyección con  $\frac{1}{4}$  o  $\frac{1}{2}$  del volumen inicial.

Una vez anestesiado, el animal se colocaba en hielo sobre su parte dorsal, reduciendo así el metabolismo celular y el flujo sanguíneo en la zona.

### II.3. Extracción de la médula espinal

Tras 2-3 minutos, se retiraba el animal del hielo y se colocaba estirado sobre un corcho, fijando las patas a éste con cinta adhesiva. Una vez anestesiado y colocado el animal, se retiraba la piel que recubre la parte dorsal y se comenzaba a aplicar, con una pipeta Pasteur, líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) previamente enfriado a 4°C, de manera constante y hasta el final de la cirugía.

Una vez expuesta la columna vertebral, y bajo una lupa binocular se procedía a realizar la laminectomía, utilizando material de microcirugía. Se comenzaba con un corte transversal a la altura de las vértebras cervicales, rompiendo el arco vertebral sin seccionar la médula espinal. Una vez realizado este corte, se procedía a seccionar el resto de vértebras introduciendo las tijeras de modo lateral, con cuidado de no tocar la médula espinal, separando así la columna vertebral de la médula y en sentido caudal. Una vez se tenía expuesta, se realizaba un corte para seccionarla en su región más rostral. Con ayuda de unas pinzas de punta curva y muy fina se sujetaba la médula espinal por las meninges para proceder a separar la región ventral de la médula espinal, de la columna vertebral. De esta manera se tenía la médula espinal liberada completamente y con las raíces dorsales y ventrales intactas. En este momento se transfería a una placa Petri con un fondo de Sylgard (Sylgard 184 silicone elastómero kit, Dow Corning, USA) llena de LCRA a 4°C, oxigenado constantemente mediante un tubo. La médula se fijaba por las meninges, con alfileres de 0.1 mm de grosor. En este momento se retiraban las capas meníngeas más externas a lo largo de toda la médula y se separaban las raíces dorsales y ventrales.

### II.4. Mantenimiento de la médula espinal

La médula espinal era transferida a la cámara de registro, fijada con alfileres de 0.1 mm, y perfundida constantemente con LCRA oxigenado.

La composición del LCRA era (en mM): NaCl (128), KCl (1.9), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2), MgSO<sub>4</sub> (1.3), CaCl<sub>2</sub> (2.4), NaHCO<sub>3</sub> (26), glucosa (10), con un pH de 7.4. Los componentes se pesaban previamente y se disolvían en agua ultrapura, producida por un aparato de la marca milliQ, justo antes del experimento. La temperatura del líquido se mantenía a 23 ± 1°C. El LCRA se gaseaba constantemente con carbógeno (95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>) para mantener una oxigenación homogénea.

El baño tenía un fondo de Sylgard y constaba de dos cámaras separadas, la primera de ellas, más grande, para la colocación de la médula y el registro electrofisiológico, y la segunda, más

pequeña, para la evacuación de LCRA. Esta disposición permitía la retirada del líquido sin crear turbulencias en la parte de registro. La tubería de entrada conectaba el baño con el sistema de perfusión y la de salida llevaba el líquido a un depósito de recogida.

El sistema de perfusión funcionaba por gravedad, con una velocidad de flujo ajustada a  $4 \pm 2$  ml/min y permitía la aplicación de compuestos. Este sistema constaba de un depósito principal de 500 ml, que se rellenaba manualmente, situado a unos 45 cm sobre el baño y conectado con éste mediante tuberías de silicona de 5 mm de diámetro interno. Interpuestos en este sistema se situaban tres depósitos calibrados de 60 ml cada uno, que mediante llaves de paso de tres vías se podían conectar o desconectar al resto del sistema de perfusión. Estos depósitos se utilizaban para la aplicación de fármacos (ver figura 13).

Todo el sistema se encontraba montado sobre una mesa antivibratoria (Technical Manufacturing Corporation, MA, USA), y ésta a su vez estaba situada dentro de una caja de Faraday que sólo dejaba un lateral abierto para permitir trabajar dentro de ella. La caja de Faraday a su vez estaba conectada a tierra.

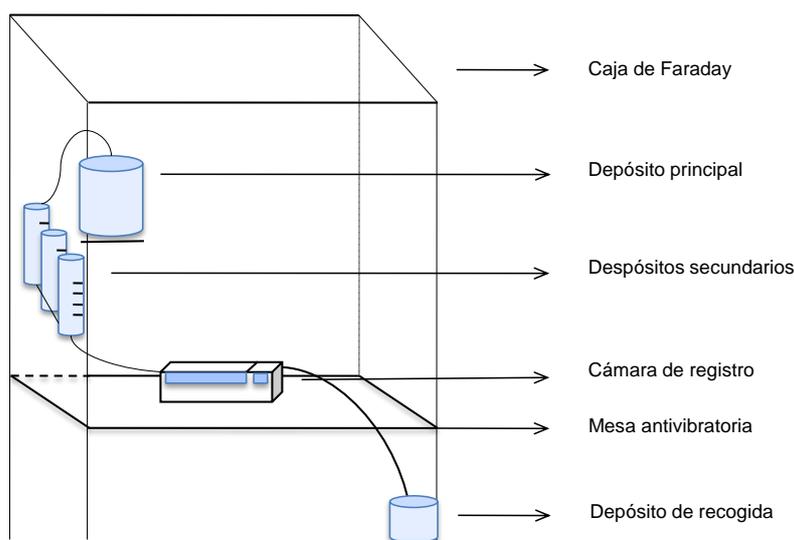


Figura 13: Disposición de los elementos del sistema de perfusión, de manera esquemática. Todo el sistema se encuentra sobre una mesa antivibratoria y en el interior de una caja de Faraday. El LCRA se encuentra en los depósitos superiores continuamente burbujeado. Los depósitos secundarios se utilizan para la perfusión de fármacos mediante llaves de 3 vías situadas en el circuito de perfusión. En la cámara de registro se observan 2 regiones diferenciadas, una parte de mayor tamaño, para colocar el tejido y otra de menor tamaño que permite la evacuación del líquido sin cambios bruscos de nivel.

### II.5. Estimulación eléctrica y protocolo de estimulación

En todos los experimentos electrofisiológicos se activaban las aferentes primarias mediante la estimulación eléctrica de una raíz dorsal del segmento lumbar (normalmente el L4 o L5) utilizando electrodos de succión de vidrio.

La raíz se introducía dentro del electrodo prácticamente en su totalidad, dejando un milímetro de distancia con la médula espinal para evitar la estimulación directa de las neuronas intraespinales y/o de fibras de paso. Los electrodos utilizados se desarrollaban a partir de capilares de boro-silicato (Clark Electromedical Instruments, GC120-10) modificados a la llama para ajustar su diámetro interno al grosor de la raíz. Estos electrodos se denominan de succión por estar conectados a una jeringa cuya fuerza de succión se emplea para llenarlos con el propio LCRA en primer lugar y para introducir la raíz en el electrodo una vez que están llenos. Para la estimulación de la raíz dorsal se empleaba un electrodo de succión lleno de LCRA al que se ponía una espiral de hilo de plata por la parte externa y otro hilo de plata en el interior, en contacto con el LCRA. Entre ambos filamentos se generaban los pulsos de corriente que estimulaban las fibras de la raíz dorsal.

La estimulación eléctrica de la raíz dorsal genera una serie de respuestas, que se registraron como reflejos espinales por medio de electrodos de succión situados en la raíz ventral que correspondía con el par dorsal, siendo el polo de referencia para los electrodos de registro un electrodo de plata (Ag/AgCl pellet, WPI, Inc., USA) que se encontraba sumergido en el baño de registro.

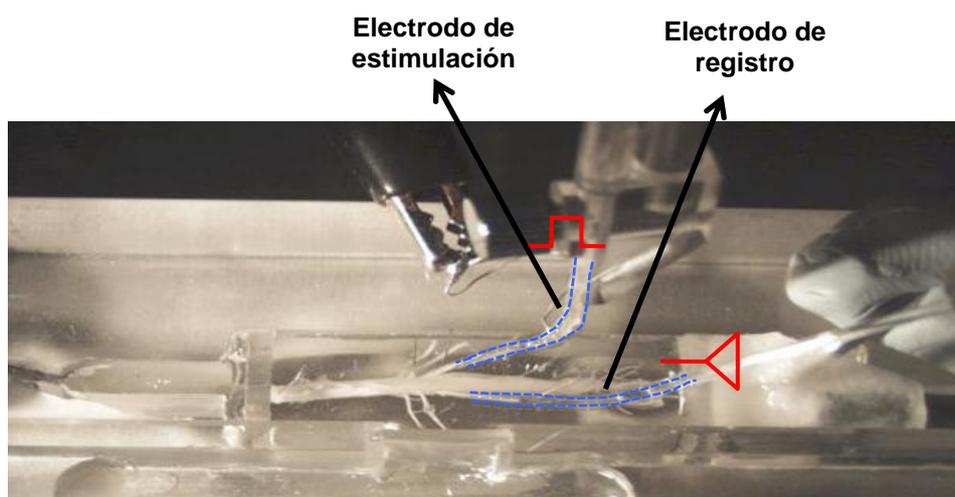


Figura 14: En la fotografía se muestra la disposición de la médula espinal en el interior de la cámara de registro. La médula se encuentra con su región dorsal dispuesta hacia arriba. En esta parte superior se observa una de las raíces dorsales introducida en un electrodo de estimulación, con una espiral de hilo de plata alrededor. En la parte inferior se puede apreciar la raíz ventral del mismo segmento, dentro del electrodo de succión que corresponde con el de registro.

El protocolo de estimulación consistía en aplicar pulsos de diferentes intensidades de manera ascendente. La elección de intensidades se basó en estudios preliminares realizados en el laboratorio, en nervio ciático de ratón neonato. En todos los casos la duración del pulso fue de 200  $\mu$ s, y las intensidades utilizadas fueron 10 y 20  $\mu$ A, para estimular únicamente fibras A $\beta$  o de bajo umbral, 40  $\mu$ A, para estimular fibras A $\beta$  y A $\delta$ , y de 60, 100 y 200  $\mu$ A para reclutar además fibras C. El tiempo de reposo mínimo de la médula espinal entre dos estímulos unitarios era de 60 s.

Además de estímulos unitarios, también se aplicaban trenes de estímulos de alta intensidad a baja frecuencia (1 Hz), que permitían observar el fenómeno de tipo Wind-up (Mendell and Wall, 1965), que consiste en un aumento de la excitabilidad a medida que progresa el tren de estímulos. Este aumento de la excitabilidad se caracteriza por un aumento del número de potenciales de acción y por un aumento en la despolarización.

La duración, la frecuencia y el intervalo de los pulsos eléctricos de estimulación se controlaban con un sistema Master-8; la intensidad de los pulsos era controlada por un estimulador ISO-flex (ambos de AMPI, Israel).

### II.6. Tratamiento de las señales bioeléctricas

Las señales registradas de la raíz ventral se amplificaban x10 por un pre-amplificador DC (Dagan 4001, Corporation, Mineapolis, Estados Unidos) al cual se acopló directamente el electrodo de registro, y posteriormente se volvió a amplificar la señal x100, a través de un amplificador AC-DC (EX4-400 Quad Differential amplifier, Dangan Corporation, Mineapolis, Estados Unidos) hasta conseguir una amplificación final de 1000 veces la señal registrada.

La señal se pasó por un sistema de eliminación de ruido (HumBug Quest Scientific, Canadá). Tras ello, la señal se envió de nuevo al amplificador, para amplificarla nuevamente (x20) utilizando otro canal en modo AC y posteriormente se eliminaron las frecuencias menores de 300 Hz y mayores de 1200 Hz.

Las señales bioeléctricas se monitorizaban en un osciloscopio Gould 6100 (200 MHz) y simultáneamente eran enviadas por medio de un convertidor analógico-digital (CED 1401 plus, Cambridge Electronics Design Ltd, UK) a un ordenador, en el cual las señales se podían visualizar utilizando un programa de adquisición de señales bioeléctricas (Spike 2, versión 7.09 Cambridge Electronics Design Ltd, UK).

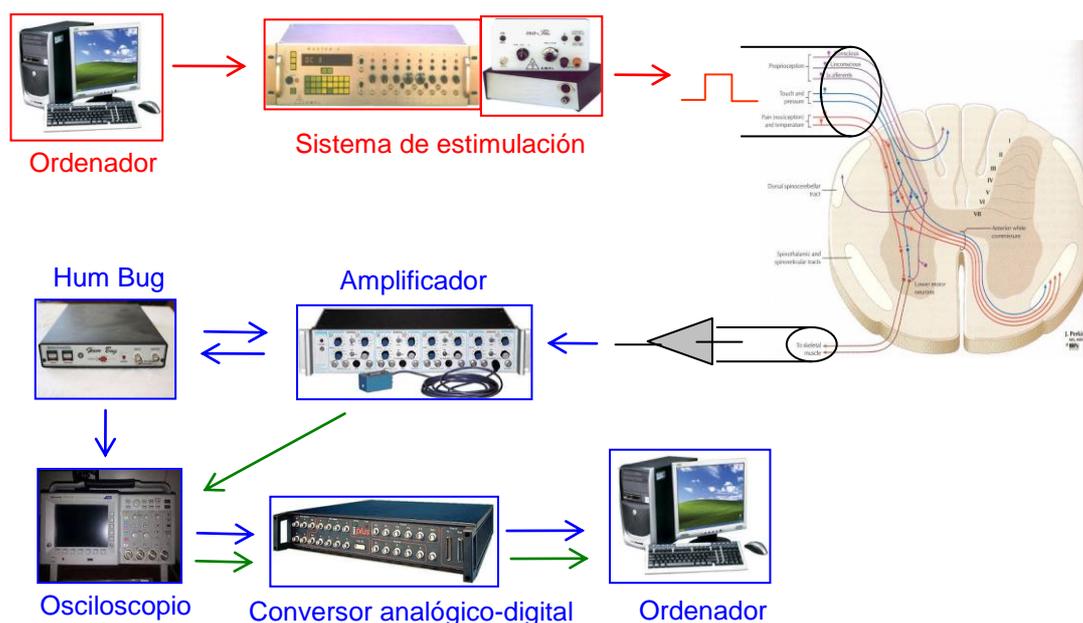


Figura 15: En la figura se muestra la disposición del equipo utilizado para el registro y la estimulación. En la parte derecha se muestra un esquema de un segmento lumbar de la médula espinal que tiene situado un electrodo de succión para estimular la raíz dorsal (parte superior) y otro electrodo en la raíz ventral para el registro (parte inferior). La señal registrada de raíz ventral pasa por diferentes equipos antes de llegar al ordenador, un amplificador, hum bug, osciloscopio, y un convertor analógico digital. En azul se muestra la señal en DC y en verde en AC. Para estimular se utilizó un sistema Master-8 que se podía controlar a través del ordenador, acoplado a un estimulador Iso-Flex (en rojo).

Las respuestas AC y DC se digitalizaban y almacenaban a una frecuencia de 10 KHz, para su posterior análisis con aplicaciones informáticas desarrolladas en nuestro laboratorio.

### II.7. Características de las respuestas

Los potenciales de la raíz ventral evocados por la estimulación de la raíz dorsal tienen un perfil característico en el canal DC que consiste en un primer pico rápido, de gran amplitud, causado por la activación monosináptica sincrónica de las motoneuronas  $\alpha$  (RMS) y una onda lenta de baja amplitud originada por potenciales postsinápticos excitatorios asincrónicos en las motoneuronas, producidos por activación de circuitos polisinápticos. Se tomó como medida del RMS la amplitud, en mV, y de la onda lenta, el área bajo la curva, en mV\*s.

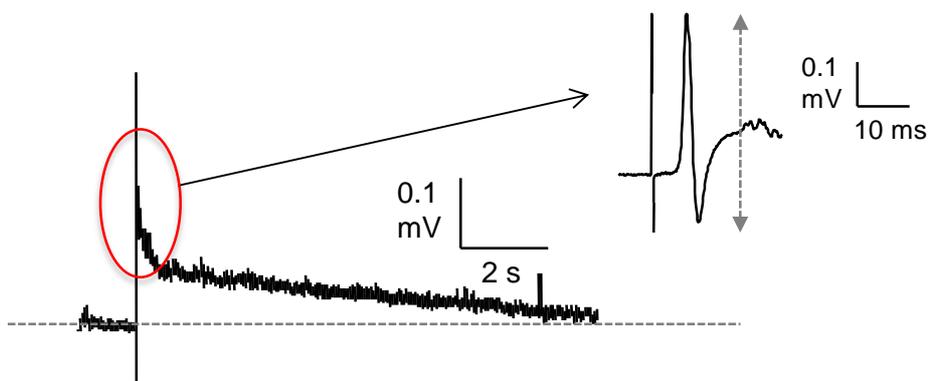


Figura 16: Ejemplo de registro original DC, donde se ve el área de despolarización tras un estímulo de baja intensidad ( $200\mu\text{s} \cdot 20\mu\text{A}$ ). Ampliando la imagen en la zona del artefacto de estímulo observamos un pico pronunciado que corresponde con el RMS.

El aumento de la intensidad del estímulo hace variar cuantitativamente la respuesta, pero no cualitativamente.

Estas mismas respuestas observadas en el canal AC, consisten en un pico de corta latencia debido al RMS seguido de algunas variaciones sobre la línea base. En este modo se pueden observar una serie de eventos rápidos ( $\leq 2$  ms), sobre todo utilizando estimulación repetitiva de alta intensidad, originados por potenciales de acción compuestos y que pueden tener amplitud y duración variable dependiendo de la simultaneidad con la que se produzcan. Las medidas realizadas en esta respuesta consistían en contar el número de eventos que superaban un umbral que se situaba manualmente por encima del nivel medio del ruido. Para estímulos unitarios se medía el número de potenciales por respuesta.

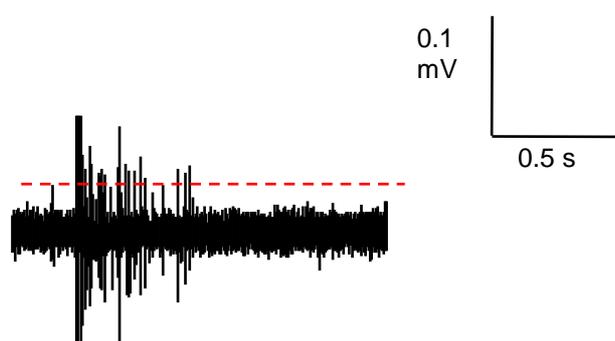


Figura 17: Registro original en AC, donde se ven los potenciales de acción evocados tras un estímulo de baja intensidad ( $200\mu\text{s} \cdot 20\mu\text{A}$ ). El conteo de espigas se hacía colocando una línea umbral (línea rojo discontinua) y se contaban las señales por encima de ese umbral.

En el caso del tren de estímulos el número de eventos suele ir en incremento progresivo ante la repetición del estímulo (figura 17). Se contó el número de eventos para cada estímulo y se tomaron dos medidas:

- Número de espigas totales: suma total de potenciales de acción en cada tren.
- Índice de wind-up: se obtenía restando, al número de espigas contadas en el último estímulo, el número de espigas registradas en el primer estímulo y este valor dividido por el tiempo entre ambos estímulos (14s).

Con el fin de excluir actividad debida a la estimulación de las fibras A en los trenes, solo se medían los eventos que aparecían en una ventana de entre 100 a 990 ms desde el artefacto del estímulo.

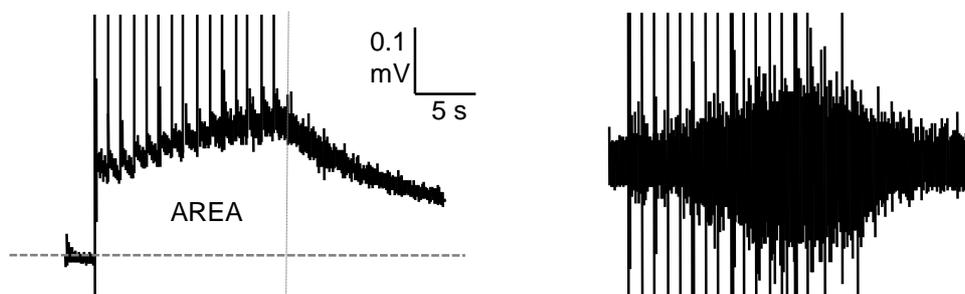


Figura 18: Ejemplo original de wind-up. La imagen de la izquierda muestra la señal DC, en donde se observa el área de despolarización acumulada. En la imagen de la derecha vemos la misma señal filtrada AC, donde se ve el número de espigas totales durante el tren de estímulos. En ambos casos se observa un aumento de la señal según aumenta el número de estímulos.

### II.8. Preparación y aplicación de los fármacos

Los fármacos utilizados se habían alicuotado y congelado previamente a distintas concentraciones, desde 1 mM a 100 mM en agua mili-Q, en función de la concentración a la que iban a ser utilizados posteriormente. En el momento del experimento, se diluía la cantidad de alícuota necesaria en 100 ml de LCRA, y se perfundía a través de uno de los depósitos, posicionando la llave de paso, en la posición que dejara pasar el fármaco cortando la perfusión de LCRA.

En todos los casos y para todos los fármacos utilizados, el tiempo de perfusión fue de 30 minutos. Tras aproximadamente 3 minutos, desde el inicio de la perfusión del fármaco, éste se fue recuperando para su continua perfusión.

## **Estudios farmacológicos en reflejos motores de médula espinal**

---

En el estudio comparativo en el efecto de los distintos fármacos, en animales naïve, se perfundieron dos o tres concentraciones distintas del fármaco de manera acumulada, sin tiempo de lavado entre la perfusión de una concentración de fármaco y la siguiente.

En los estudios de comparación del efecto del fármaco experimental S1RA, en médulas procedentes de animal naïve y médulas procedentes de animales inflamados, se utilizó una única concentración por experimento.

En el caso de los estudios de potenciación del efecto de morfina con el fármaco S1RA, ambos fármacos se disolvieron y perfundieron juntos, en el mismo recipiente.



### III. RESULTADOS

#### III.1. Efecto de diferentes fármacos en los reflejos espinales en animal naïve

Se comparó el efecto de una serie de fármacos analgésicos de acción central, clonidina, morfina, pregabalina y duloxetina, con el producido por el fármaco experimental S1RA, en los reflejos espinales. Con los resultados obtenidos, se realizaron gráficas concentración-respuesta para el número de espigas totales (figura 19a) y el área de despolarización acumulada (figura 19b) en el tren. En ambos casos, todos los fármacos mostraron una reducción concentración dependiente de ambos parámetros, siendo más evidente esta reducción en el número de espigas que en el área de despolarización acumulada.

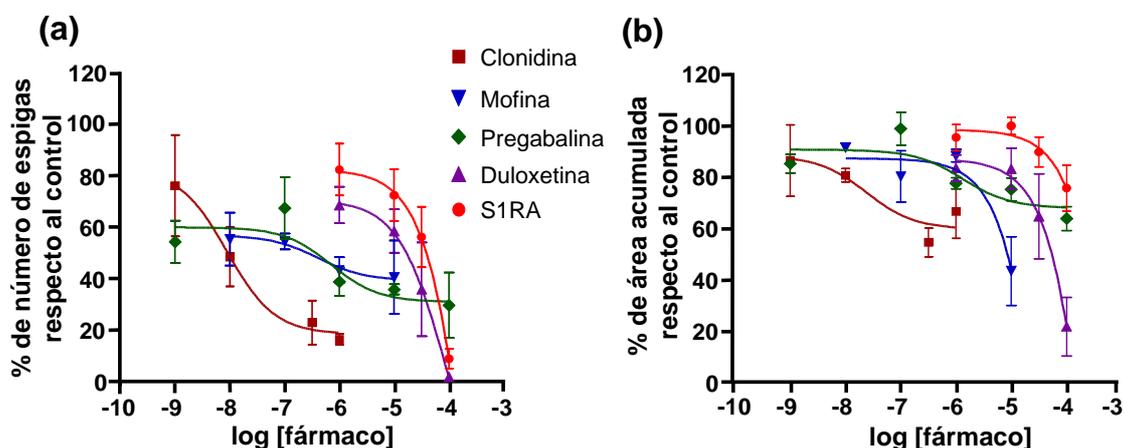


Figura 19: Efecto concentración-respuesta de los diferentes fármacos usados, en el número de espigas totales (a) y en el área de despolarización acumulada (b) producida por el tren de estimulación. Los puntos graficados corresponden con un mínimo de 3 observaciones y hasta un máximo de 7. Los datos se muestran como porcentaje con respecto al control.

En el caso de los efectos en el número de espigas del tren, clonidina, duloxetina y el fármaco experimental S1RA, mostraron reducciones más marcadas a medida que aumentaba la concentración, llegando en algunos casos, como duloxetina, a abolir completamente la señal. Sin embargo, observando las curvas de pregabalina y de morfina, si bien un aumento en la concentración no producía efectos mucho mayores, el efecto era ya muy evidente desde concentraciones muy pequeñas (figura 19a). Pregabalina muestra reducciones del 40% a concentraciones de 1 nM, y morfina a 10 nM.

En la despolarización acumulada (figura 19b) durante el tren, las reducciones más marcadas las mostraron morfina y duloxetina.

## Estudios farmacológicos en reflejos motores de médula espinal

---

A partir de la gráfica obtenida para la reducción de espigas y los valores obtenidos de  $IC_{50}$  ( $-8.2 \pm 0.36$  para clonidina,  $-6.7 \pm 0.8$  para morfina,  $-6.5 \pm 0.49$  para pregabalina,  $-4.6 \pm 0.6$  para duloxetina y  $3.3 \pm 1.7$  para S1RA) se seleccionó para cada fármaco una concentración a la que el efecto fuese de aproximadamente el 50% de reducción, para posteriores análisis. Las concentraciones escogidas fueron 10 nM para clonidina, 0.1  $\mu$ M para morfina, 1  $\mu$ M para pregabalina, 10  $\mu$ M para duloxetina y 30  $\mu$ M para el fármaco experimental S1RA.

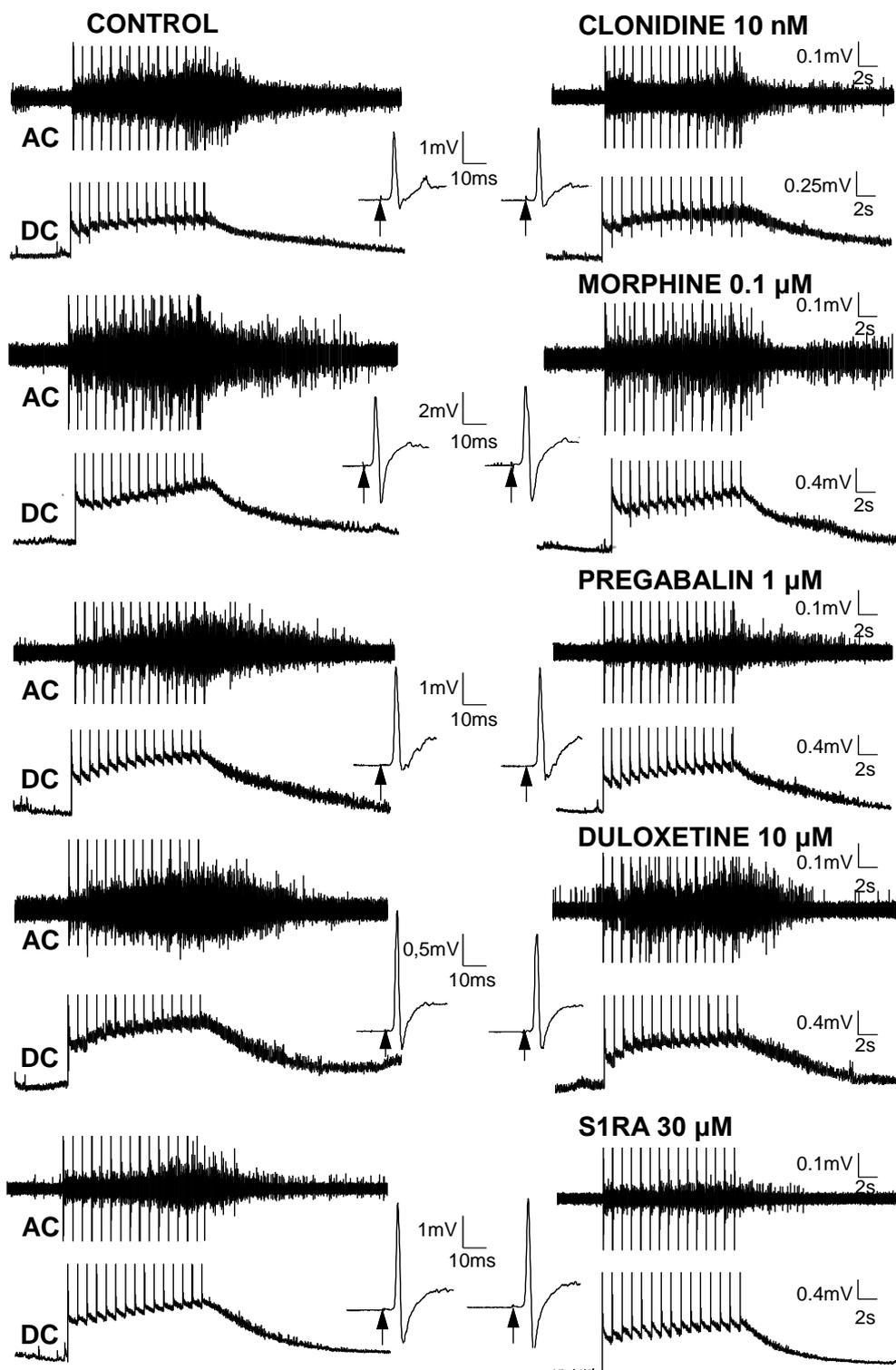


Figura 20: Registros originales del efecto de cada uno de los fármacos en el wind-up, a las concentraciones a las que su efecto en la reducción del número de espigas fue del 50%. Obsérvese además, como a esas concentraciones el RMS no sufre variaciones en su amplitud en ninguno de los fármacos, excepto en el caso de duloxetina, que se ve una pequeña reducción.

III.1.1. Efecto en el índice del wind-up

A las concentraciones seleccionadas, como se ha dicho anteriormente, todos los fármacos producían una reducción de aproximadamente el 50% en el número de espigas totales en el tren. A nivel cualitativo, sin embargo, se encontraron diferencias en dicha reducción. Calculando el índice de wind-up, se observa como morfina y duloxetina no sufren una variación significativa, mientras que pregabalina, clonidina y el fármaco experimental S1RA sí sufrieron una reducción en dicho parámetro (tabla 2 y figura 20).

		<b>Clonidina</b> 10 nM (n=7)	<b>Morfina</b> 0.1 μM (n=5)	<b>Pregabalina</b> 1 μM (n=4)	<b>Duloxetina</b> 10 μM (n=5)	<b>S1RA</b> 30 μM (n=6)
<b>Índice de wind-up (espigas/s)</b>	Control	8.8 ± 2.7	6.2±2.2	9.6 ± 1.9	7.1 ± 1.8	8.3 ± 3.6
	Fármaco	1.0 ± 1.2 *	4.9±2.7	4.0 ± 0.6 *	5.5 ± 1.4	3.9 ± 2.2 *
<b>Número de espigas totales</b>	Control	4139 ± 824	2676±859	2623 ± 739	3284 ± 933	3581 ± 797
	Fármaco	2242 ± 678 *	1473±512*	972 ± 371 *	1977 ± 713 *	2054 ± 875 *

Tabla 2: En todos los casos la reducción en el número de espigas totales fue de alrededor del 50% (Test-t pareado, p<0.05). En cuanto al índice de wind-up, se observa que tan sólo clonidina, pregabalina y el compuesto experimental S1RA tuvieron un efecto significativo (Test-t pareado, p<0.05).

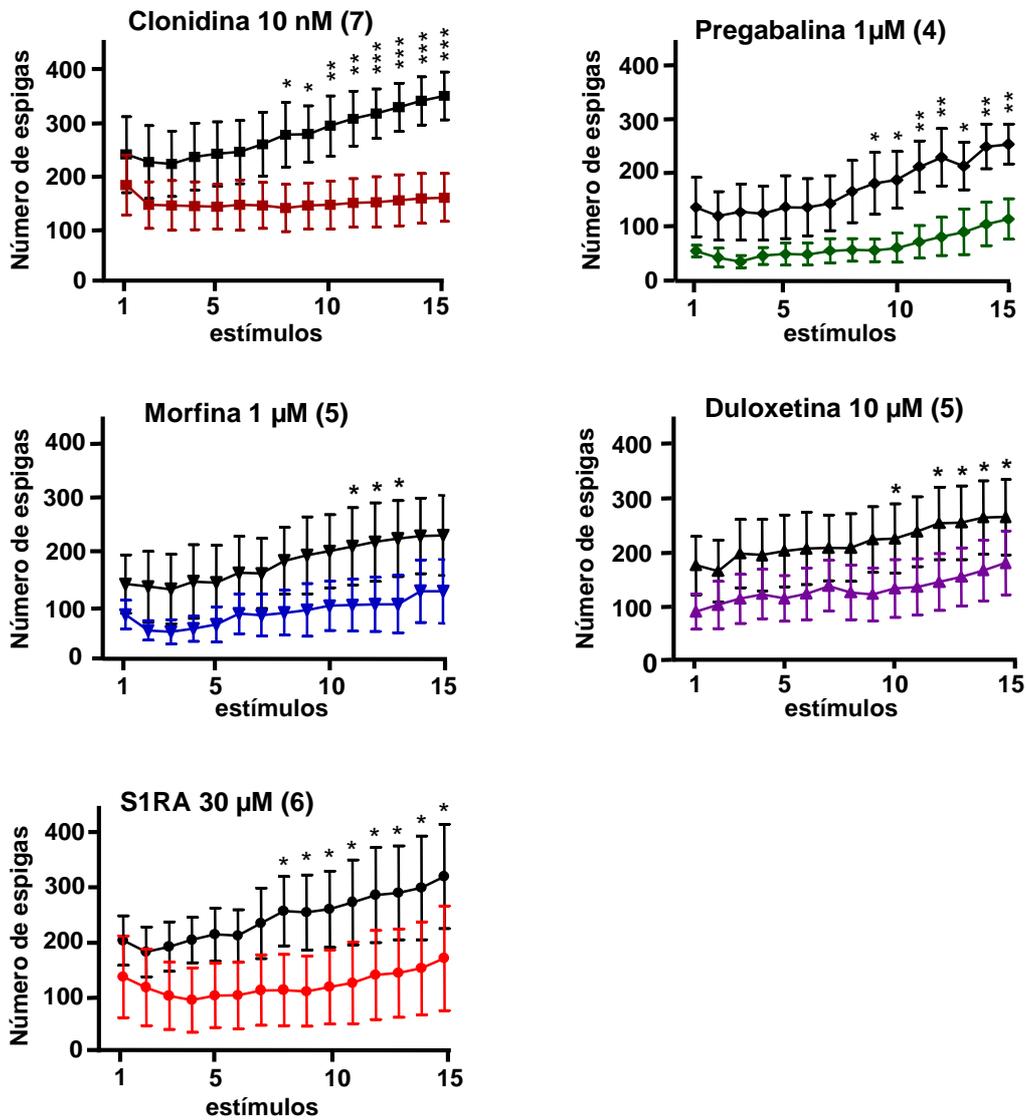


Figura 21: Efecto de cada uno de los fármacos sobre el índice de wind-up. Se observan dos grupos diferenciados en cuanto al tipo de efecto. El compuesto experimental se comporta de manera similar a pregabalina y clonidina.

El número medio de espigas y el índice de wind-up en cada experimento antes de la perfusión de los fármacos, no fue estadísticamente significativa entre los diferentes grupos ( $n=27$ ; media del número de espigas =  $3340 \pm 367$ ; media del índice de wind-up =  $8.0 \pm 1.2$  espigas/s).

### III.1.2. Respuesta a estímulos unitarios

Se analizó la reducción en el número de espigas a estímulos unitarios de baja ( $200 \mu s * 20 \mu A$ ) y alta ( $200 \mu s * 200 \mu A$ ) intensidad, comparándolo con el efecto producido sobre el tren y el efecto de los fármacos en la amplitud del RMS ante estímulos de alta intensidad.

## Estudios farmacológicos en reflejos motores de médula espinal

### *Efecto en el número de espigas ante estímulos de baja y alta intensidad*

Comparando los efectos observados a estímulos unitarios de alta y baja intensidad, no se puede concluir que exista un efecto asociado a la intensidad del estímulo. Sin embargo sí se observaron diferencias comparando estos efectos, con el efecto producido en el tren. Clonidina, pregabalina y S1RA produjeron reducciones mayores en las respuestas evocadas por el tren que por estímulos unitarios (tabla 3).

	<b>Clonidina</b> 10 nM (n=7)	<b>Morfina</b> 0.1 μM (n=5)	<b>Pregabalina</b> 1 μM (n=4)	<b>Duloxetina</b> 10 μM (n=5)	<b>S1RA</b> 30 μM (n=6)
<b>Estímulo unitario intensidad de fibra A</b>	37.2 ± 16.1	47.2±3.6	31.2 ± 26.4	50.5 ± 9.6	32 ± 12
<b>Estímulo unitario intensidad de fibra C</b>	22.1 ± 7.5	34.9±7.3	24.3 ± 6.1	47.6 ± 8.1	22.5 ± 14.4
<b>Estímulo repetido de alta intensidad</b>	53.13±11.46	42.5±8.9	62.8 ± 5.4	43.15 ± 8.4	50.7± 12.3

Tabla 3: Efecto, mostrado como media del porcentaje de reducción ± SEM, de cada fármaco analgésico a la concentración en la que tuvieron aproximadamente el 50% de reducción en el número de espigas del tren.

El número de espigas antes de la perfusión de los fármacos a las diferentes intensidades no resulto ser estadísticamente significativa entre los distintos grupos (n=27; media en el número de espigas = 381 ± 63 a baja intensidad y 524 ± 69 a alta intensidad).

### *Efecto en el reflejo monosináptico (RMS)*

El reflejo monosináptico se considera una medida de especificidad para comprobar que los efectos de los fármacos no afectan al reflejo miotático. Se midió su amplitud a estímulos unitarios de alta intensidad (200 μs \* 200 μA), ya que, a esta intensidad, esta señal se encuentra completamente saturada.

Se realizó una curva concentración-respuesta para este parámetro. Tan sólo morfina y duloxetina mostraron reducción a alguna de las concentraciones probadas. Para morfina la reducción fue de alrededor del 30% a 10  $\mu\text{M}$  (concentración más alta probada para este fármaco), y duloxetina llegó a abolirlo completamente a 100  $\mu\text{M}$  (figura 22).

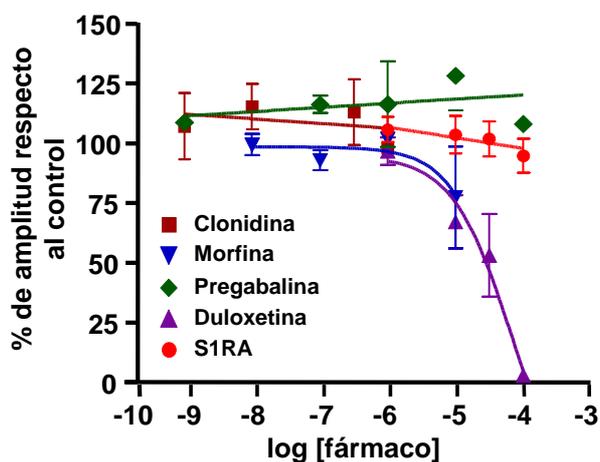


Figura 22: Curva concentración-respuesta en la amplitud del reflejo monosináptico a estímulos únicos de alta intensidad ( $200 \mu\text{s} * 200 \mu\text{A}$ ). Obsérvese, como sólo morfina y duloxetina tienen efecto en este parámetro a partir de concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  (-5).

De manera resumida, tanto clonidina, pregabalina como S1RA mostraron efectos similares al tren, reduciendo no sólo el número de espigas de manera cuantitativa, sino también de manera cualitativa al reducir el índice de wind-up. Además, ninguno de ellos, tuvo efecto en el reflejo monosináptico a ninguna de las concentraciones probadas.

Por otro lado, tanto morfina como duloxetina, mostraron un perfil en el que la reducción en el número de espigas no iba acompañado de una reducción en el índice de wind-up, y para ambos fármacos se encontró alguna concentración a la cual el RMS se veía afectado.

## Estudios farmacológicos en reflejos motores de médula espinal

<b>Efectos en respuesta ante estímulos repetidos</b>	<b>Clonidina</b>	<b>Morfina</b>	<b>Pregabalina</b>	<b>Duloxetina</b>	<b>S1RA</b>
Inhibición concentración dependiente en el número de espigas	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Efecto máximo en las espigas totales	>70%	~ 70%	~ 70%	>70%	>70%
Reducción del índice de wind-up a concentración 50% efecto	Sí	No	Sí	No	Sí
Efecto fuerte en despolarización acumulada	No	Sí (>10 µM)	No	Sí (>10µM)	No
Curso temporal de la inhibición a concentración 50% efecto	prolongado	prolongado	prolongado	prolongado	prolongado
<b><i>Efectos en el reflejo monosináptico</i></b>					
Inhibición a la concentración que produce reducción del 50% en el número de espigas	No	No	No	Sí (modesta)	No
Inhibición a la concentración más alta probada	No	Sí (modesta)	No	Sí (fuerte)	No

Tabla 4: Resumen donde se muestran los efectos de cada uno de los fármacos probados en los distintos parámetros estudiados.

**II.2. Efecto de S1RA en médula espinal de animal naïve frente animal inflamado.**

Para el estudio comparativo del efecto de S1RA entre animal naïve y animal inflamado, se perfundió una única concentración de S1RA por experimento, tal y como ha sido descrito en la sección de Materiales y Métodos de éste Capítulo.

Se vio el efecto de S1RA en un total de 26 animales de ambos grupos.

**II.2.1. Evaluación del proceso inflamatorio**

Se evaluó el proceso inflamatorio en un total de 16 animales control y en 15 con inflamación, de los 26 totales, en cada caso.

El proceso inflamatorio se produjo por inyección de carragenina intraplantar 20 h antes de la realización de los experimentos. Se evaluaron dos parámetros para comprobar que el proceso inflamatorio se había producido correctamente: (1) diámetro de la pata; (2) hipersensibilidad ante estimulación mecánica.

- 1- Los animales a los que se les inyectó carragenina mostraron un diámetro de pata estadísticamente mayor (ver tabla 5) que los que no habían sufrido dicho proceso.
- 2- Se evaluó la hipersensibilidad mecánica utilizando filamentos Von Frey, aplicándolos en sentido ascendente, comenzando por los filamentos de fuerza menor, hasta que el animal retiraba y sacudía la pata. Los ratones que habían sufrido una inflamación previa, respondían a intensidades menores (ver tabla 5) que los naïve.

	<b>n</b>	<b>Von Frey (g)</b>	<b>Diámetro de la pata (mm)</b>
<b>Control</b>	16	2.8 ± 0.18	2.3 ± 0.04
<b>Inflamado</b>	15	0.9 ± 0.04 ***	2.9 ± 0.04 ***

Tabla 5: Valores medios en la respuesta a filamentos de Von Frey y de la medida de diámetro de la pata, en animales control comparando con animales a los que se había inyectado carragenina intraplantar (Test-t no pareado p<0,0001). Se observa que tras inflamación baja el umbral de respuesta a estimulación mecánica y aumenta el diámetro de la pata.

**II.2.2. Diferencias en las respuestas bioeléctricas entre animales naïve y animales inflamados**

Se comparó el tipo de respuesta obtenida entre las médulas procedentes de ambos grupos de animales, tanto a estímulos unitarios como al tren. En ambos grupos el número de animales utilizados fue de 26.

### *Respuesta a estímulos unitarios*

El número de espigas evocadas en ambos casos, fue mayor a medida que aumentaba la intensidad del estímulo, pero no se encontraron diferencias significativas entre las respuestas evocadas por cada grupo (media en el número de espigas a baja intensidad=  $267.7 \pm 55.9$  en naïve y  $337.8 \pm 70.6$  en inflamación y a alta intensidad=  $313.6 \pm 92.8$  en naïve y  $348.3 \pm 101.2$  en inflamación)

### *Respuesta al tren*

Se compararon las respuestas evocadas por estimulación repetida. El número medio de espigas evocado en situación naïve fue de  $2032 \pm 337.2$  con un índice de wind-up de  $9.2 \pm 1.1$  espigas /s. En inflamación el número de espigas medio fue de  $2339 \pm 459.1$  y el índice de wind-up de  $12.5 \pm 2$  espigas/s. Comparando ambas respuestas registradas, se observa que el wind-up evocado por las médulas del grupo de inflamación es mayor que en el grupo naïve.

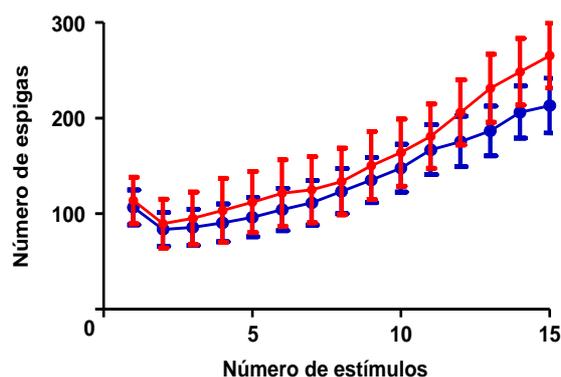


Figura 23: Comparación del wind-up evocado por médulas procedentes de animal naïve frente a las procedentes de animal inflamado (ANOVA de 2 vías,  $p < 0.0001$ ). El número de observaciones en cada caso fue de 26.

### II.2.3. Efecto de S1RA en las respuestas bioeléctricas en animal naïve y en animal inflamado

En este bloque de experimentos se profundió una única concentración de S1RA por experimento. El rango de concentraciones probadas fue de 1 a 100  $\mu\text{M}$  en ambas situaciones. El número de observaciones en cada caso fue de al menos 4, excepto a la concentración más alta y la más baja probada que fue tan solo de 2.

Se evaluó el efecto de S1RA en cada situación, utilizando como medida, el porcentaje del número de espigas con respecto al control durante el tren de estímulos. La curva concentración-respuesta obtenida, muestra un ligero desplazamiento a la izquierda de la curva de inflamación (ver figura 24), no siendo esta diferencia significativa. Los valores obtenidos, en cada caso de  $\text{IC}_{50}$  fueron  $-4.5 \pm 0.47$  en naïve y  $-5.1 \pm 0.4$  en inflamación.

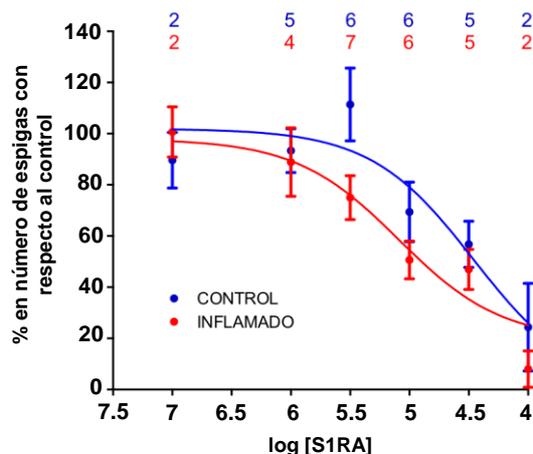


Figura 24: Curva concentración-respuesta del fármaco experimental S1RA. El efecto se muestra como porcentaje de espigas del tren con respecto al control. En la parte superior de la gráfica se muestra el número de observaciones para cada concentración, en cada caso.

A partir de ésta gráfica y con los datos obtenidos de IC<sub>50</sub> en cada caso, se seleccionó, una concentración a la cual el efecto fuese de aproximadamente el 50% en la reducción del número de espigas, para posteriores análisis. Para situación naïve se utilizó la concentración 30 µM y para situación de inflamación 10 µM.

*Efecto en el índice de wind-up*

Observando este parámetro, en situación naïve, la variación que se produce no resultó significativa, mientras que sí lo fue en inflamación (ver tabla 6).

		Náïve n=5	Inflamación n=6
Índice de wind-up (espigas/s)	Control	5.6 ±2.2	9.2 ±2.7
	S1RA	3.4 ±2.6	6.1 ±2.5*

Tabla 6: Efecto del fármaco S1RA en el índice de wind-up a 30 µM en naïve y 10 µM en inflamación, concentraciones próximas a IC<sub>50</sub>. La reducción en el índice de wind-up en inflamación resultó estadísticamente significativa (Test-t pareado, p<0.05).



### II.3. Interacción S1RA- morfina

Para comprobar el efecto sinérgico o no de S1RA con morfina, a nivel espinal, se diseñaron una serie de experimentos preliminares en los que se comparó, el efecto de cada fármaco por separado con la administración conjunta de ambos. La elección de las concentraciones fue en base a los resultados obtenidos para ambos fármacos en los estudios anteriores. De tal manera, que se escogió para morfina una concentración en la que la reducción en el número de espigas en el tren fuese al menos del 50%, mientras que para S1RA se escogió una concentración inmediatamente por debajo a la que se conseguía esa reducción. De esta manera si se daba un efecto sinérgico podría ser observable. Por lo tanto, en este bloque de experimentos se perfundió S1RA a 10  $\mu\text{M}$  y morfina a 0.3  $\mu\text{M}$ .

#### II.3.1. Respuesta al tren

A las concentraciones seleccionadas, ambos fármacos reducían el número de espigas totales de manera significativa. La perfusión de ambos fármacos juntos, no produjo un efecto mayor que el de los fármacos por separado (ver figura 26).

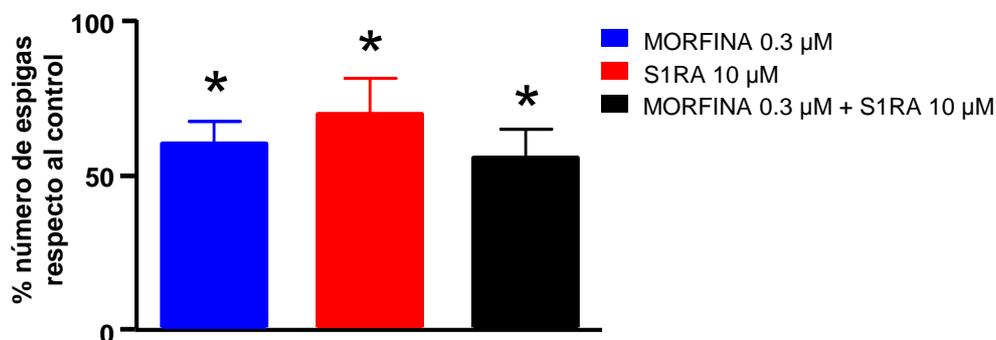


Figura 26: Comparación entre los efectos de morfina (n=3), S1RA (n=6) y Morfina + S1RA (n=3). Morfina, S1RA y la combinación de ambos redujeron significativamente el número de espigas (Test-t pareado  $p < 0.05$ ). Sin embargo el efecto de la combinación de ambos, comparado con cada uno por separado no fue significativamente diferente.

Observando el efecto en las espigas por estímulo, se observa una reducción en el número de espigas que resultó estadísticamente significativa en todos los casos (figura 27), mientras que la reducción en el índice de wind-up no mostró una variación significativa tras perfusión de ninguno de los fármacos, ni de ambos juntos (tabla 8).

		morfina (n=3)	S1RA (n=6)	Morfina + S1RA (n=3)
Índice de wind-up (espigas/s)	Control	12.2 ± 1.4	10.3 ± 2.7	16.02 ± 3.5
	Fármaco	9.04 ± 1.01	8.9 ± 2.3	9.4 ± 2.1

Tabla 8: Efecto en el índice de wind-up tras la perfusión de cada uno de los fármacos por separado y de los fármacos juntos. En ningún caso la reducción mostró ser significativa.

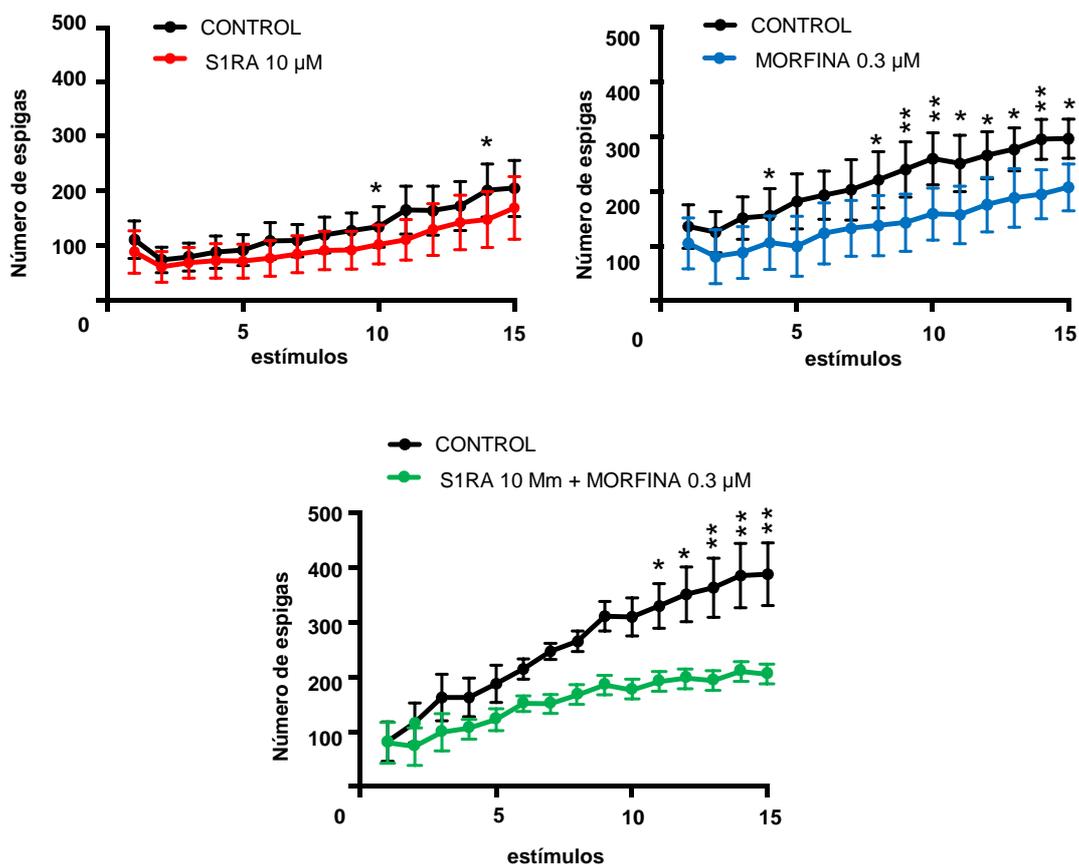


Figura 27: Efecto de S1RA a 10 µM (ANOVA de 2 vías,  $p < 0.0001$ ;  $n = 6$ ), morfina 0.3 µM (ANOVA de 2 vías,  $p < 0.0001$ ;  $n = 3$ ) y S1RA 10 µM + morfina 0.3 µM (ANOVA de 2 vías,  $p < 0.0001$ ;  $n = 3$ ) en las espigas del wind-up.

El número medio de espigas evocados por el tren antes de la perfusión de los compuestos no fue estadísticamente significativa entre los diferentes grupos (n=12; media del número de espigas =  $3582 \pm 499$ ; media en el índice de wind-up=  $12.5 \pm 1.6$  espigas/s).

### II.3.2. Respuesta a estímulos unitarios

A estímulos de baja intensidad, no se observó una reducción significativa en el número de espigas aplicados por separados o conjuntamente (% reducción número espigas en ningún caso supero el 10%).

A estímulos de alta intensidad el porcentaje de reducción no fue diferente entre la perfusión de los fármacos por separados o juntos (% reducción en número de espigas morfina=  $39.8 \pm 11.6$ ; S1RA =  $23.72 \pm 6.3$  % y morfina+S1RA =  $29.2 \pm 19.6$  %).

Ni a baja, ni a alta intensidad, el número de espigas evocadas antes de la perfusión de los fármacos fue estadísticamente significativa entre los diferentes grupos (n= 12; media en el número de espigas =  $253.2 \pm 52.7$  a baja intensidad y  $376.4 \pm 78.7$  a alta intensidad)

El RMS tampoco sufrió alteraciones por efecto de la perfusión conjunta de ambos fármacos a esas concentraciones.



## IV. DISCUSIÓN

### IV.1. Efecto de diferentes fármacos en los reflejos espinales en animal naïve

La primera parte de este capítulo, tuvo como objetivo la búsqueda de patrones comunes en los efectos de una serie de analgésicos de acción central, en los reflejos espinales. Todos los fármacos utilizados habían mostrado en estudios previos un efecto analgésico tras administración intratecal (Vidal-Torres et al., 2014; Teasell et al., 2010). Se sabe que alguno de los mecanismos subyacentes a la sensibilización central podrían deberse a una modulación de mecanismos funcionales en situación normal, como la liberación de determinados neurotransmisores o la expresión de receptores. Por lo que cabría esperar que muchos analgésicos presenten efectos sobre la médula espinal de animales naïve. Sin embargo, no se debe descartar la posibilidad de que durante la sensibilización central se den mecanismos totalmente nuevos, y por tanto analgésicos que actúen sobre estos mecanismos no mostrarán los efectos descritos en este estudio.

Una de las primeras cuestiones a plantear, es el uso de neonatos para predecir efectos analgésicos de fármacos que pueden ser utilizados principalmente en los adultos. En este sentido, existen datos sólidos que demuestran que los recién nacidos, incluso los muy prematuros, tienen los circuitos neuronales básicos necesarios para el procesamiento de la información nociceptiva y son capaces de producir las respuestas de protección fisiológicas y de comportamiento ante estímulos nocivos (Fitzgerald and Beggs, 2001). Pese a que estos fármacos se utilizan también en analgesia pediátrica, para la mayoría de ellos no existen datos comparativos en su efecto entre neonatos y adultos. Se sabe que determinadas moléculas diana de estos fármacos analgésicos, podrían estar moduladas por el desarrollo como es el caso de morfina (Beland and Fitzgerald, 2001; Westin et al., 2010). Por otro lado, clonidina no ha mostrado diferencias en la dosis necesaria para aumentar los umbrales de retirada mecánica en rata entre neonato y adulto.

A tenor de los datos obtenidos, el fenómeno de wind-up es el que mostró una mayor sensibilidad al efecto de los fármacos. En todos los casos, el efecto fue concentración dependiente, y más evidente en el número de espigas evocadas. Los efectos del fármaco sobre la despolarización acumulada fueron mucho menos evidentes que para el número de espigas (figura 19b). Tan sólo morfina y duloxetina mostraron una reducción importante a concentraciones altas.

En relación a la reducción en el número de espigas del tren, llama la atención el efecto de morfina, clonidina y pregabalina a concentraciones especialmente bajas (ver figura 19a), sin

embargo, estos efectos parecen no diferir de los que otros autores han descrito con anterioridad (Faber et al., 1997; McClelland et al., 2004).

Todos los fármacos lograron reducir en más del 50% el número de espigas evocadas en el tren, aunque a nivel cualitativo mostraron diferencias. En este sentido, a la concentración en la que se observaron reducciones de alrededor del 50%, clonidina, pregabalina y S1RA redujeron también el índice de wind-up, mientras que duloxetina y morfina no produjeron variaciones significativas en el índice de wind-up (ver figura 21).

A esas mismas concentraciones se analizó el efecto sobre la respuesta evocada por estímulos unitarios. Se midieron los estímulos de baja intensidad con los que sólo se activan fibras A, tanto A $\beta$  como A $\delta$ , y de alta intensidad con los que se reclutan además fibras C. A ambas intensidades se produjo una reducción en el número de espigas evocadas (tabla 3). Las fibras A $\beta$  participan en la transmisión táctil no nociceptiva, por lo que cabría esperar que no se viesen afectadas por los fármacos analgésicos. Este efecto podría ser debido a que no sólo se están reclutando fibras A $\beta$  sino también A $\delta$  simultáneamente, aunque en algunos casos como clonidina y morfina, se han descrito efectos de ambos fármacos sobre reflejos espinales producidos por activación selectiva de fibras A $\beta$  (Faber et al., 1997) incluso mayores que los obtenidos a estimulación de alta intensidad. Además en todos los casos el efecto obtenido no fue diferente al observado en las espigas del tren (ver tabla 3).

El reflejo monosináptico es un parámetro de especial interés debido a que se produce por el disparo sincrónico de una población de neuronas motoras, tras activación de fibras gruesas mielinizadas que se originan en el huso muscular. El estudio de este reflejo, nos permite saber el efecto de estos fármacos sobre un circuito que no es puramente nociceptivo, sino motor. Solo duloxetina y morfina produjeron una reducción de la amplitud del RMS. En ambos casos esta reducción se produjo a concentraciones superiores a las que se veía una reducción del 50% en el número de espigas en el tren, existiendo una ventana amplia de concentraciones a las que teniendo efecto en el número de espigas no se ve efecto alguno en la amplitud del RMS.

En el caso de duloxetina, probablemente, estos efectos en el RMS se deban a los efectos inhibitorios sobre la recaptación de serotonina y como consecuencia el aumento de los niveles de ésta. Ambos fármacos, morfina y duloxetina, han mostrado en estudios de comportamiento animal, producir alteraciones motoras a dosis próximas a las necesarias para producir analgesia (Munro et al., 2012). Dado que la alteración del RMS puede contribuir a la alteración del rendimiento del motor y la morfina y la duloxetina (pero no los otros fármacos) tienden a deprimir este reflejo, podríamos especular que existe una relación entre estos efectos espinales y de comportamiento. Por supuesto, hay que tener en cuenta que existen efectos mediados por estructuras supraespinales, que estarían contribuyendo a esta alteración motora, incluyendo

acciones directas sobre centros motores, así como efectos indirectos como la sedación y somnolencia. Además se sabe que los receptores de morfina se encuentran sobreexpresados en fibras no nociceptivas neonatales (Beland and Fitzgerald, 2001).

Con los resultados obtenidos con los diferentes fármacos analgésicos de uso en la clínica, se comparó el efecto del fármaco experimental S1RA. Al igual que clonidina y pregabalina, redujo el número de espigas del tren y el índice de wind-up, sobre estímulos unitarios mostró inhibiciones discretas así como sobre el área de despolarización acumulada y no tuvo efecto alguno sobre el RMS (tabla 4). Estudios previos han demostrado que S1RA no produce alteraciones motoras (Nieto et al., 2012), no tiene efecto alguno en modelos de dolor agudo, pero sí efectos antihiperalgésicos en modelos de dolor inflamatorio y neuropático en roedores (Nieto et al., 2012; Cendan et al., 2005a; Romero et al., 2012).

Parece por tanto, que los analgésicos de acción central muestran un patrón reconocible de acción sobre los reflejos espinales y de wind-up. De acuerdo con esto, se podrían definir una serie de efectos que parecen comunes y que podrían ser de especial interés para el estudio de nuevos fármacos analgésicos:

- Inhibición del número de espigas producido por estimulación repetida
- Efecto inhibitorio mantenido en el tiempo
- Efectos más discretos sobre la respuesta a estímulos unitarios que al tren
- Efectos discretos o nulos sobre el RMS

### **VI. 2. Efecto de S1RA en médula espinal de animal naïve frente animal inflamado.**

Los datos obtenidos muestran en primer lugar que tras inyección intraplantar de carragenina se induce un estado de inflamación que conlleva un proceso de sensibilización central. A nivel periférico se observa un aumento en el diámetro de la pata y una disminución en el umbral de la respuesta a estímulos mecánicos que ya han sido descritos previamente por otros autores (Hedo et al., 1999; Parenti et al., 2014; Tejada et al., 2014). A nivel central no se han visto cambios en la respuesta tras estímulos eléctricos unitarios, sin embargo sí se observa un aumento de esta respuesta tras estimulación repetida (Hedo et al., 1999).

La curva concentración–respuesta en inflamación se encuentra ligeramente desplazada hacia la izquierda con respecto a situación naïve, aunque este desplazamiento no es estadísticamente significativo. Sin embargo, la concentración en la que en cada caso se observó una reducción de alrededor del 50% en el número de espigas a concentraciones ligeramente diferentes. En el caso de naïve esta reducción se logró a la concentración 30  $\mu$ M y a 10  $\mu$ M.

A las concentraciones a las que se daba una inhibición de alrededor del 50% en ambos casos, se observa un efecto en el índice de wind-up en inflamación que no se ve en naïve, lo que podría estar indicando una mayor implicación de los receptores  $\sigma_1$  en condiciones de sensibilización central por un proceso inflamatorio. En este sentido, estudios de comportamiento con antagonistas  $\sigma_1$ , tras inflamación por carragenina, han mostrado efectos en el diámetro de la pata, reduciendo la inflamación (Parenti et al., 2014) y en la reducción de la hiperalgia mecánica producida por el agente inflamatorio (Parenti et al., 2014; Tejada et al., 2014) aunque parte de estos efectos podrían ser debido a efectos periféricos de los antagonistas  $\sigma_1$  (Tejada et al., 2014).

### **VI.3. Interacción S1RA- morfina**

Diversos estudios han hecho evidente la interacción entre receptores  $\sigma_1$  y receptores opioides. Estudios de comportamiento en ratón han mostrado un antagonismo del efecto de morfina, administrada tanto vía intracerebrovascular como vía intratecal, tras administración de un agonista  $\sigma_1$  vía sistémica (Chien and Pasternak, 1994). Posteriormente, se ha intentado ver, en qué regiones del sistema nervioso se está produciendo esta interacción. Parece que en función de la vía de administración, las respuestas varían. La administración de un agonista  $\sigma_1$  vía intracerebrovascular, es capaz de reducir los efectos de morfina administrada por la misma vía. Sin embargo, tras administraciones de ambos fármacos vía intratecal, el agonista  $\sigma_1$  no es capaz de reducir los efectos analgésicos de morfina (Mei and Pasternak, 2002).

El hecho de que la administración sistémica de los agonistas  $\sigma_1$  sean capaces de reducir la respuesta de morfina administrada vía intratecal, y que esta reducción en el efecto no se vea cuando el agonista  $\sigma_1$  también se administra vía intratecal, hace pensar en la posible existencia de una interacción entre ambos sistemas a nivel periférico, además de a nivel supraespinal.

Experimentos con morfina vía intraplantar han mostrado un mayor efecto analgésico en ratones KO que en ratones naïve (Sanchez-Fernandez et al., 2013) confirmando la interacción de ambos sistemas a nivel periférico.

Parece, por tanto, que la médula espinal por sí sola no juega un papel importante en la interacción entre el sistema  $\sigma_1$  y morfina. El efecto que se ha visto en médula espinal en estudios anteriores (Chien and Pasternak, 1994), quizá se deba a una contribución de la vía periférica o de la vía descendente.

Los datos obtenidos en este bloque de experimentos muestran reducciones en el número de espigas del tren al perfundir cada uno de los fármacos por separado y de ambos juntos, sin embargo no se observan diferencias entre los efectos de cada fármaco con el efecto observado tras la perfusión conjunta. El efecto observado en este parámetro tras perfusión de ambos

fármacos parece similar al que se observa por morfina 0.3  $\mu$ M, lo que indica que el hecho de perfundir ambos fármacos a la vez ni siquiera parece tener un efecto aditivo.

A las concentraciones seleccionadas para cada fármaco no se observaron efectos en el índice de wind-up, y esto no varió con la perfusión de ambos fármacos perfundidos conjuntamente.

A esas concentraciones, tampoco se observó efecto sobre la respuesta evocada por estímulos unitarios ni a baja ni a alta intensidad, y esto no varió al perfundir ambos fármacos conjuntamente.

En general el efecto observado por la perfusión de morfina y S1RA por separado no parece diferente del que se produce por la perfusión conjunta, por lo que parece que el efecto sinérgico no sucede a nivel espinal (Mei and Pasternak, 2002). El hecho de que no se observe ni siquiera un efecto aditivo por perfusión de ambos, podría ser debido a diversos factores como la edad temprana de los animales, o la posible activación/inhibición de otras vías de señalización que estuvieran interfiriendo, no permitiendo un mayor efecto por la administración conjunta de morfina y S1RA.



## **Capítulo 2**

---

### **Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto**



## **I. OBJETIVOS**

Se han interpretado los mecanismos de sensibilización central, como un incremento en la excitabilidad de mecanismos neurales responsables de la generación de la sensación de dolor. Diversos estudios, llevados a cabo en diferentes modelos experimentales de dolor crónico, demuestran una gran variedad de alteraciones en los circuitos espinales, como incrementos en la excitabilidad de las neuronas espinales (Roza et al., 1998), alteración en los controles de inhibición y facilitación supraespinales (Cervero and Laird, 1996) e incluso en la fuerza sináptica (Sandkhuler and Liu, 1998; Woolf and Saltre, 2000).

La mayoría del conocimiento sobre el procesamiento nociceptivo en la médula espinal, está basado en el análisis de neuronas individuales y parece que podría ser interesante el estudio de neuronas de manera simultánea. Registros de neuronas de manera simultánea han mostrado, que neuronas vecinas pueden tener diferentes funciones y estar sometidas a diferente modulación (Sandkhuler et al., 1995).

Por ello, en este capítulo se han realizado estudios con matrices de multielectrodos (MMEs), para el registro simultáneo de poblaciones neuronales, en una preparación de rodaja longitudinal de ratón adulto, que permite además realizar estudios en médula espinal en un modelo de neuropatía.

Los objetivos principales de este capítulo fueron:

1. Implementar un modelo de rodaja longitudinal de médula espinal de ratón, manteniendo las láminas superficiales para el registro de neuronas sensoriales y las raíces dorsales para su estimulación eléctrica.
2. Obtener registros individuales de varias neuronas de manera simultánea utilizando matrices de multielectrodos (MMEs) para conocer el comportamiento de poblaciones discretas de neuronas espinales en situación naïve y en neuropatía.
3. Realizar estudios farmacológicos utilizando bloqueantes de receptores que parecen tener un papel en los procesos de sensibilización central (NMDA, AMPA y NK1) y comparar los efectos de estos fármacos sobre las poblaciones de neuronas en ambas situaciones experimentales.
4. Estudiar el efecto del fármaco experimental S1RA en este modelo, en condiciones naïve, de neuropatía y de inflamación.



## II. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales realizados en el transcurso de la elaboración de esta Tesis se llevaron a cabo según las regulaciones vigentes sobre el bienestar de los animales de experimentación y la conformidad del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá.

Los animales fueron criados en el centro de experimentación animal de la Universidad de Alcalá, donde se mantenían estabulados en condiciones de temperatura controlada, con ciclos de luz de 12 horas y sin limitación de comida ni agua.

### II.1. Animales

Se utilizaron ratones CD1, hembras, de entre 5 y 6 semanas de edad, con un peso comprendido entre 17 y 26 g.

### II.2. Cirugía SNI

Las cirugías se realizaron a las tres semanas del nacimiento, en el momento del destete.

Bajo anestesia con isoflurano (~ 3.5-4% en O<sub>2</sub> puro) se realizó una incisión en la pata izquierda, a la altura de la cresta ilíaca. Se hizo un corte en el músculo bíceps femoral, quedando expuestas las tres ramas del nervio ciático. Con cuidado, para preservar intacta la rama sural, se pasó un hilo de nylon 8-0 por debajo de las ramas tibial y peroneo común, con el fin de ligarlas y cortarlas a 1 mm por debajo de la ligadura.

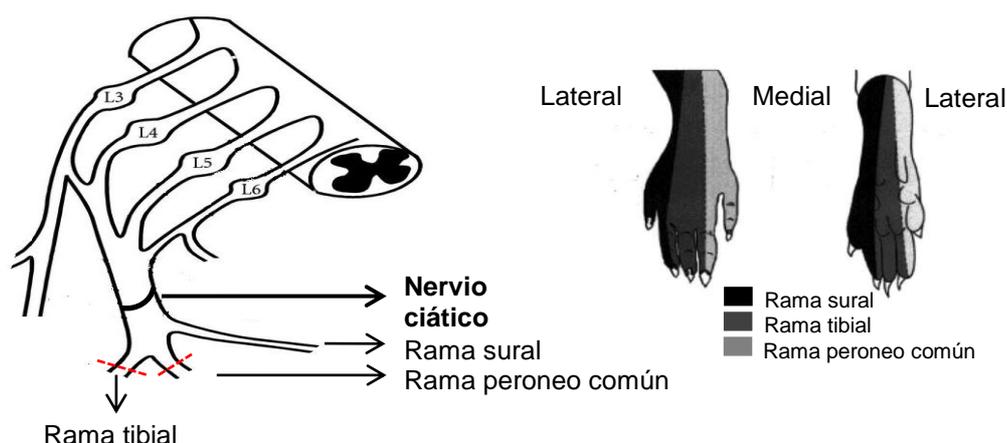


Figura 28: Esquema del modelo de neuropatía SNI (modificado de Decosterd and Woolf, 2000). En el esquema se observa la entrada del ciático a las raíces dorsales L4, L5 y L6 y las regiones de la pata que inerva cada rama.

## **Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto**

---

Tras ello, se dio un punto de sutura en el músculo cortado y posteriormente se cerró la incisión, usando en ambos casos hilo de nylon 5-0. Los animales fueron observados durante un periodo de 60 minutos post-cirugía, hasta su total recuperación y posteriormente estabulados en grupos de 4 con acceso a comida y agua *ad libitum*.

### **II.3. Estudios de comportamiento**

Se avaluó la alodinia mecánica usando filamentos de Von Frey, según el método descrito por Chaplan en 1994 (Chaplan et al., 1994). Para este test, los animales se colocaron dentro de un cubículo de plástico abierto, dispuesto sobre una rejilla metálica, permitiendo el acceso de los filamentos a las extremidades. Los cubículos se cubrieron con una tela de color oscuro durante 30 minutos con el fin de que los animales se habituasen al espacio.

El área de la pata donde se aplicaron los filamentos de Von Frey fue la región exterior, que corresponde con la región inervada por el sural, de ambas patas posteriores. La aplicación se hizo con el filamento perpendicular a la palma de la pata y aplicando la fuerza suficiente para que el filamento se doblase. Cada estímulo se repitió tres veces, con un intervalo de al menos 20 s, realizándose el test primero en una pata y después en la otra.

El test de comportamiento se inició utilizando el filamento de 0.6 g aplicando los estímulos siempre de forma consecutiva, ya fuese en sentido ascendente o descendente. En ausencia de respuesta de retirada de la pata, al estímulo seleccionado inicialmente, se aplicó el filamento inmediatamente superior; en el caso de retirada, se aplicó el estímulo siguiente más débil, hasta observar un cambio en el sentido de la respuesta.

Hasta el momento en el que se producía el cambio en el sentido de la respuesta, los resultados se anotaban en la primera fila de la tabla, con una X cuando había respuesta, y con una O en ausencia de ella.

Se continuó aplicando filamentos de manera secuencial hacia arriba o hacia abajo, según el animal respondía o no, obteniendo cuatro respuestas adicionales que constituyen el resto de la serie (ver tabla 9).

**Estudios farmacológicos en neuronas de láminas  
superficiales de médula espinal de ratón adulto**

Von Frey (g)									
0.02	0.04	0.07	0.16	0.4	0.6	1	1.4	2	4
					○	○	○	X	
							○		
								X	
							○		
								X	

Tabla 9: Ejemplo de la tabla utilizada para rellenar las respuestas ante los estímulos. Se marca en gris oscuro el filamento que se utilizaba para comenzar la serie de estímulos, y en gris claro la fila que se rellenaba hasta observar un cambio en el sentido de la respuesta. En el ejemplo el animal no respondió hasta aplicar un filamento de 2g. Después se aplicó el inmediatamente inferior, 1g, y no respondió (segunda fila), por lo que se aplicó el inmediatamente superior donde volvió a responder (tercera fila) y así sucesivamente hasta completar la tabla.

El umbral de respuesta se halló utilizando la fórmula:

$$50\% \text{ g umbral} = (10^{[x_i + k\delta]}) / 10000$$

Donde  $x_i$  es el valor del último filamento de Von Frey utilizado (g); k es un valor tabulado en función de la secuencia de respuesta (Chaplan et al., 1994) y  $\delta$  es la diferencia media entre estímulos  $[\log(g)]$ .

En el caso de los animales naïve, estos estudios se realizaron a las 5 semanas de edad, justo antes de la extracción de la médula espinal.

En el caso de los animales a los que se les sometió a la cirugía SNI, el test de comportamiento se realizó justo antes de la lesión en el nervio, que se realizó a las 3 semanas de edad, y justo antes de la extracción de la médula espinal, con 5 semanas de edad, con el fin de comprar las respuestas antes y después de la neuropatía.

#### **II.4. Registros electrofisiológicos utilizando matrices de multielectrodos**

##### II.4.1. Anestesia y extracción de la médula espinal

La anestesia y extracción de la médula espinal se realizó según el procedimiento explicado en los experimentos de reflejos espinales en ratón neonato (Sección II.2 y II.3), con la salvedad de que, en este caso, se utilizó un LCRA de extracción diferente, cuya composición fue (en mM): sacarosa (252), KCl (1.9),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.2),  $\text{MgSO}_4$  (1.3),  $\text{CaCl}_2$  (2.4),  $\text{NaHCO}_3$  (26), glucosa (10), con un pH de 7.4. La temperatura del líquido se mantenía a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . El LCRA de extracción se oxigenó constantemente con carbógeno (95%  $\text{O}_2$  – 5%  $\text{CO}_2$ ).

##### II.4.2. Obtención de una rodaja longitudinal de médula espinal

La extracción de la médula se realizó utilizando la misma metodología que en los experimentos de reflejos espinales. Una vez extraída la médula espinal, se transfería a una placa Petri con un fondo Sylgard, llena del líquido cefalorraquídeo artificial modificado, a  $4^\circ\text{C}$  y constantemente oxigenado. En ese momento se seccionó la médula de manera transversal para dejar solo los segmentos correspondientes con L3, L4 y L5 preservando las correspondientes raíces dorsales. El fragmento seleccionado de la médula espinal se pegó, por su región ventral, con pegamento (SuperGlu) a un soporte para proceder al corte en un vibrátomo (Vibratome 1500, Intracel LTD, Royston, Inglaterra). El soporte tenía en su interior 2 piezas de metacrilato, una rectangular donde quedaría adherida la médula espinal, por su parte ventral, y otra auxiliar, posicionada inmediatamente antes de la pieza rectangular (ver figura 29), donde se ponía inicialmente la médula y se deslizaba con ayuda de unas pinzas hacia la pieza rectangular.

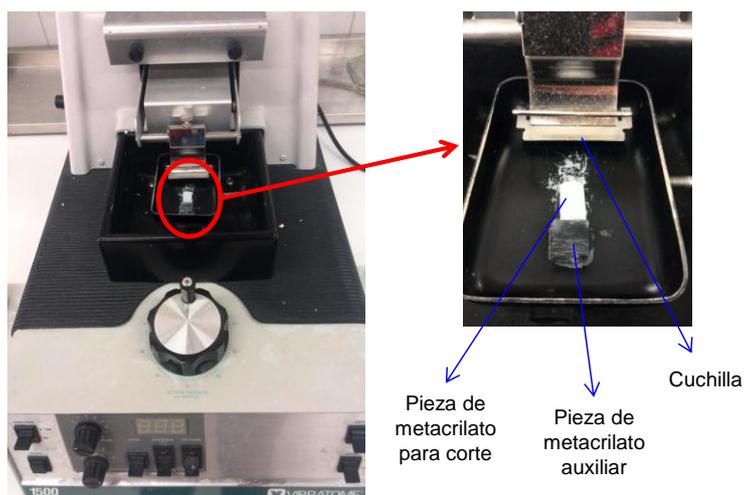


Figura 29: Imagen del vibrátomo, y del soporte donde se colocaba la médula para su corte, indicándose las dos piezas de metacrilato, una auxiliar donde se colocaba la médula inicialmente y desde la que se deslizaba a la pieza rectangular para su corte. Este soporte se encontraba lleno de LCR de extracción.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

El soporte se colocó en el vibrátomo y se rellenó con LCA de extracción y oxigenado constantemente. Se colocó la cuchilla del vibrátomo sobre la región más engrosada de la médula espinal y se fue bajando hasta casi tocar el tejido. Se movió entonces la cuchilla hasta la zona del inicio del corte, se bajó 400  $\mu\text{m}$  y se comenzó el corte longitudinal a una velocidad de 0.4 mm/s y con una amplitud del movimiento vibratorio de 1.6 mm.

Una vez el corte había finalizado, se transfirió la zona correspondiente a la región dorsal a la cámara de registro, donde se fijaba por las raíces dorsales que no iban a ser utilizadas para la estimulación (L3, L5) mediante alfileres de 0.1 mm con la región dorsal apoyada sobre la base de Sylgard.

La rodaja de médula espinal se mantenía con LCA de mantenimiento, de igual composición que el descrito en la sección II.4 del Capítulo 1, a 23°C, constantemente oxigenado.

### II.4.3. Obtención y procesamiento de las señales

La adquisición de señales electrofisiológicas se hizo utilizando matrices de multielectrodos de silicio de Neuronexus Technologies (Ann Arbor, Estados Unidos). Se utilizaron dos modelos de matrices que se diferenciaban únicamente en la distancia que existía entre los sensores. Las matrices estaban formadas por cuatro patas separadas 125  $\mu\text{m}$  entre sí, con 4 sensores o puntos de registro de iridio, en cada pata, separados 50 o 100  $\mu\text{m}$ , dependiendo del modelo de matriz usada (ver figura 30).

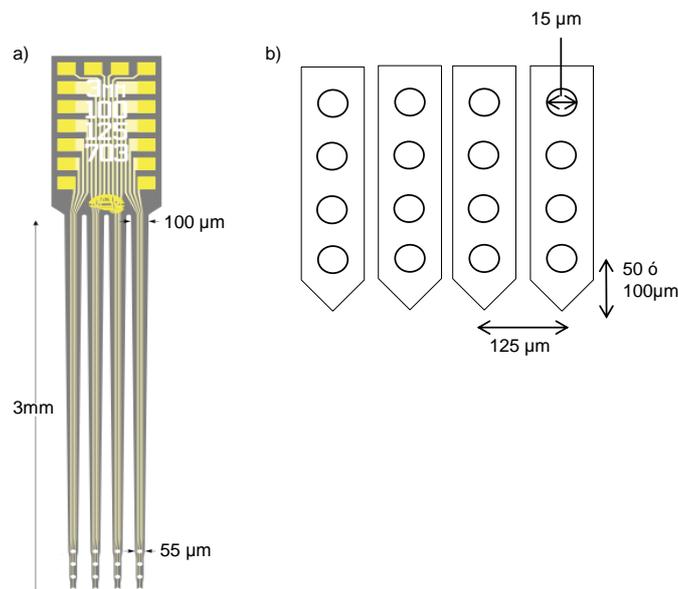


Figura 30: Imagen de la matriz de multielectrodos (a) utilizada para los registros de láminas superficiales, indicando las medidas de cada una de las patas y (b) esquema de la región donde se encuentran los sensores con sus dimensiones y distancias entre ellos.

## **Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto**

---

Estas matrices han sido diseñadas especialmente para producir el mínimo daño cuando se introducen en el tejido, además, por sus características mecánicas, geométricas y eléctricas permiten obtener resultados consistentes y altamente reproducibles.

Las matrices constaban de 16 sensores o puntos de registro, por lo que se acoplaron dos preamplificadores DC de 8 canales cada uno. A través del preamplificador, la señal se amplificó x10. Posteriormente, la señal se volvió a amplificar, a través de un amplificador AC-DC (CyberAmp 300, Axon Instruments, Inc. California, Estados Unidos) hasta conseguir una amplificación final de 500 veces la señal registrada y se filtró la señal eliminando frecuencias menores de 300 Hz y mayores de 10000 Hz obteniendo así una señal AC.

Las señales bioeléctricas eran enviadas por medio de un conversor analógico-digital (CED 1401 plus, Cambridge Electronics Design Ltd, UK) a un ordenador, en el cual las señales se podían visualizar utilizando un programa de adquisición de señales bioeléctricas (Spike 2, versión 7.09 Cambridge Electronics Design Ltd, UK). La frecuencia de muestreo fue de 20000 Hz.

Las matrices de multielectrodos usadas constaban de 16 sensores y el amplificador utilizado tiene 8 canales, de tal manera que solo se podían obtener registros de 8 sensores, simultáneamente. Para poder escoger los sensores de las MMEs con los que registrar, se utilizó un adaptador que permitía escoger el sensor de registro. De esta manera, se registraron las señales procedentes de los sensores que más información proporcionaban en cada experimento.

El posterior análisis y clasificación de las neuronas se hizo utilizando el programa de adquisición de señales bioeléctricas (Spike2, versión 7.09 Cambridge Electronics Design Ltd, UK) y los programas para MatLab desarrollados en nuestro laboratorio (proyecto de colaboración con el departamento de Electrónica de la Universidad de Alcalá).

Una vez obtenidas las señales, se realizó una primera clasificación utilizando Spike2. Con los métodos de clasificación de este programa se clasificaron aquellas neuronas en las que su amplitud sobresalía notablemente del resto de señales y por lo tanto se podía distinguir con facilidad. Spike2, además permite realizar la lectura de dos canales simultáneamente. Si en varios canales se repite la misma señal en el mismo momento de tiempo, el programa es capaz de clasificarla como una señal procedente de una neurona y separarla del resto de señales que pudiese haber en esos canales.

Una vez realizada esa primera clasificación en Spike2, los canales en los que seguía habiendo señales sin clasificar, se llevaron a Matlab, uno a uno para su análisis y clasificación. Este programa de MatLab comienza detectando todas las señales que sobresalen del ruido. Una vez detectadas, permite mediante cursores indicar el tramo de la onda a analizar. Utilizando diferentes algoritmos matemáticos, el programa es capaz de diferenciar y separar las señales

## **Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto**

---

en grupos, de tal manera que cada grupo corresponde a una neurona concreta. Además nos permite unificar grupos en el caso de que exista sospecha de que esas señales correspondan a una misma neurona, y eliminar otros que pudieran ser ruido. La clasificación realizada en MatLab fue posteriormente importada a Spike2 donde se pudo comparar la detección con la señal original y así descartar posibles clasificaciones erróneas.

Además, mediante otro programa de MatLab también desarrollado en el laboratorio, se logró la lectura de más de dos canales de manera simultánea, comparando las señales procedentes de todos los canales, y pudiendo establecer una clasificación mucho más eficiente, que igual que en el caso anterior podía ser importado a Spike2 para comprobar que la clasificación había sido correcta.

Finalmente, para cada una de las neuronas clasificadas se realizaron autocorrelogramas para detectar posibles contaminaciones en el periodo refractario.

En algunos casos la detección no fue todo lo eficiente que cabría esperar y esas señales fueron descartadas.

### II.4.4. Búsqueda de neuronas, estimulación eléctrica y protocolo de estimulación

La estimulación de raíz dorsal se realizó como en los experimentos anteriormente descritos, utilizando en todos los casos L4, y en los animales a los que se les había producido una lesión, utilizando únicamente la raíz que se correspondía con el lado lesionado.

Se utilizó un micromanipulador para introducir la MMEs en la rodaja de médula. Este micromanipulador permitía ajustar la velocidad de bajada, mediante movimientos más o menos finos. Se utilizaron movimientos menos finos para introducir las primeras tres filas de sensores en la rodaja y movimientos más finos para continuar bajando hasta encontrar actividad neuronal en forma de actividad espontánea.

La búsqueda de actividad eléctrica se comenzó utilizando los 8 sensores situados en las dos filas situadas hacia el extremo de la matriz. Para optimizar la señal, se bajaba lentamente con movimientos muy finos y se aplicaban estímulos de  $200 \mu s^*$   $60 \mu A$  con el fin de obtener registros de aquellas neuronas que no mostraban actividad espontánea pero sí respondían eléctricamente.

Una vez, la MMEs se encontraba en la región que idealmente se corresponde con las láminas más superficiales de la médula espinal, se comenzaban a grabar las señales y se mantenía durante un periodo de al menos 30 minutos para comprobar que la señal se mantenía estable en el tiempo. En ocasiones, una misma neurona se registró con más de un sensor simultáneamente, lo que facilitó el posterior análisis de identificación.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

Pasado ese tiempo, se aplicó el protocolo de estimulación eléctrica a través de la raíz dorsal. Este protocolo consistía en aplicar pulsos de diferentes intensidades (ver figura 31) y a intervalos de 1 minuto entre cada pulso, para finalizar con un tren de estímulos de alta intensidad ( $200\mu\text{s} \times 200\mu\text{A}$ ) a baja frecuencia (1Hz).

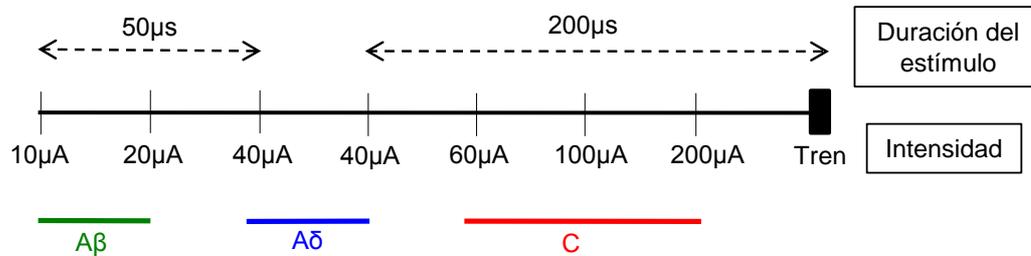


Figura 31: Esquema del protocolo de estimulación. La primera serie de estímulos, se aplicaron pulsos de  $50\mu\text{s}$  a baja intensidad para reclutar señales de neuronas que respondían a intensidades de fibra  $A\beta$  y  $A\delta$ , para continuar con pulsos de  $200\mu\text{s}$  a intensidades cada vez mayores hasta llegar a  $200\mu\text{A}$ , de tal manera que se reclutaban señales de neuronas que respondían a intensidades de  $A\delta$  y  $C$ . Al final de la serie de estímulos se aplicaba un tren de estímulos a la intensidad más alta.

La duración, la frecuencia y el intervalo de los pulsos eléctricos de estimulación se controlaban con un sistema Master-8 y la intensidad de los pulsos era controlada por un estimulador ISO-flex (ambos de AMPI, Israel).

### II.4.5. Características de las respuestas

Las señales registradas se caracterizaron en función de su actividad espontánea y de su respuesta a estimulación eléctrica.

#### *Análisis de la actividad espontánea*

De forma cuantitativa se midió la frecuencia de disparo espontáneo en una ventana de tiempo de 300 s en los cuales no hubiese estimulación eléctrica.

A nivel cualitativo se evaluó el tipo de disparo, con ayuda de autocorrelogramas (ver imagen 32). Los autocorrelogramas se pueden definir como un estimador de la densidad de probabilidad de los tiempos entre dos disparos cualesquiera. Una característica importante en toda correlación neuronal es el periodo refractario, causado por la incapacidad de las neuronas de emitir dos espigas en un tiempo próximo.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

---

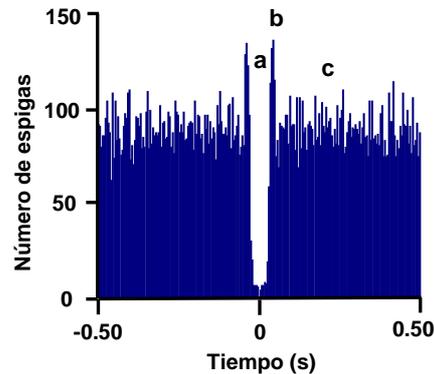


Figura 32: Ejemplo de autocorrelograma. En el centro del histograma se observa una zona (a) donde la probabilidad de encontrar el siguiente disparo es nula, correspondiente con el periodo refractario. El pico de mayor altura (b) corresponde con el periodo de mayor probabilidad de encontrar el siguiente disparo y de ahí en adelante los picos de probabilidad son menores (c).

### *Respuesta ante estimulación eléctrica*

Se evaluó la respuesta a estímulos unitarios, clasificando las neuronas en función de la intensidad a la que comenzaban a responder, y se anotó el número de respuestas evocadas por estímulo.

En función de esa intensidad a la que comenzaban a responder, se clasificaron como:

- Neuronas con respuesta a intensidad de fibra A $\beta$ : aquellas en las que se veía respuesta a intensidades menores o iguales a 50  $\mu$ s \* 20  $\mu$ A.
- Neuronas con respuesta a intensidad de fibra A $\delta$ : aquellas que sus respuestas aparecían a intensidades de 50  $\mu$ s \* 40  $\mu$ A o 200  $\mu$ s \* 40  $\mu$ A.
- Neuronas con respuesta a intensidad de fibra C: aquellas que respondían a intensidades mayores o iguales a 200  $\mu$ s \* 60  $\mu$ A.
- Neuronas no eléctricas: que no respondían a ninguna intensidad, pero que mostraban actividad espontánea.

Dentro de las neuronas que tenían respuesta a alguna intensidad, algunas lo hacían de manera invertida (figura 33), es decir, tras estimulación eléctrica cesaba su actividad espontánea. Estas neuronas se clasificaron como A $\beta$ , A $\delta$  o C en función de la intensidad a la que se comenzaba a ver la respuesta invertida.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

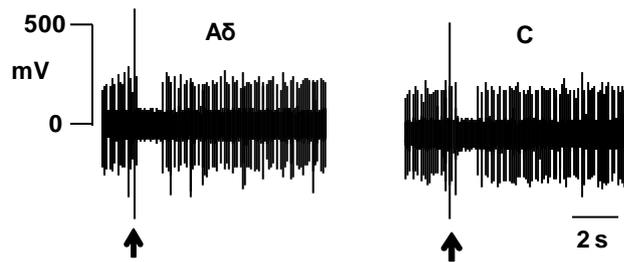


Figura 33: Ejemplo original de una neurona con actividad eléctrica invertida a intensidad de fibra A $\delta$  y con intensidad de fibra C. Se observa que tras el estímulo eléctrico se produce un cese en la actividad espontánea.

La respuesta al tren se evaluó mediante el conteo de número de espigas avocadas totales y el conteo de espigas por estímulos. De esta manera se clasificó la respuesta como:

- Tipo 1: neuronas en las que su respuesta al tren no difería de su respuesta a estímulos unitarios.
- Tipo 2: neuronas tipo wind-up, en la que el número de espigas evocadas aumentaba a medida que aumentaba el número de estímulos.

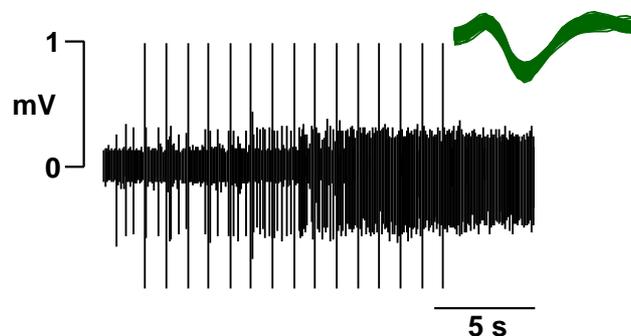


Figura 34: Registro original de una neurona con respuesta al tren tipo wind-up. Obsérvese que tras el séptimo estímulo se comienza a ver una respuesta acumulada. En la parte superior de la imagen se representa la señal correspondiente al total de espigas evocadas en el tren.

- Tipo S: neuronas que debido al tren de estímulos cesaba su actividad espontánea. Las neuronas con este tipo de respuesta al tren, también silenciaban su respuesta por estímulos unitarios (invertidas).

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

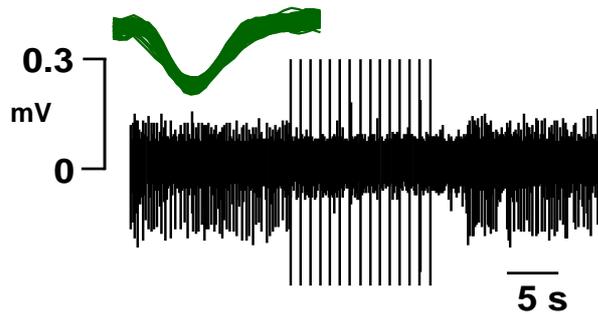


Figura 35: Registro original de una neurona con respuesta tipo S. Observarse como con el tren de estímulos se cesa la actividad de la neurona. En la parte superior de la imagen se representa la señal correspondiente al total de espigas evocadas en el tren.

### II.5. Preparación y aplicación de los fármacos

Los fármacos utilizados se habían alicuotado y congelado previamente a distintas concentraciones, en función de la concentración final que se iba a utilizar en cada caso, en agua mili-Q. En el momento del experimento, se diluía la cantidad de alícuota necesaria en 100 ml de LCRA de mantenimiento, y se perfundía a través de uno de los depósitos, posicionando la llave de paso, en la posición que dejara pasar el fármaco cortando la perfusión de LCRA.

En todos los casos y para todos los fármacos utilizados, el tiempo de perfusión fue de 30 minutos. Tras aproximadamente 3 minutos, desde el inicio de la perfusión del fármaco, éste se fue reciclando para su continua perfusión.

Excepto en el caso de CP-99994, que se aplicaron dos concentraciones de manera acumulada, para el resto de fármacos, se perfundió una única concentración por experimento.

En alguno de los registros se aplicó más de un fármaco por experimento, en estos casos la perfusión de los fármacos se hizo de manera acumulada, atendiendo al siguiente esquema:

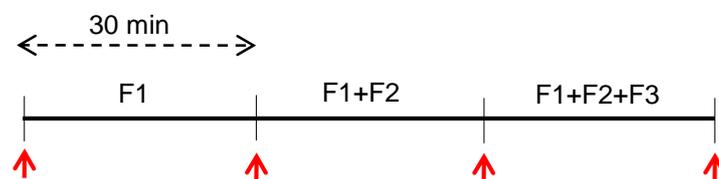


Figura 36: Las flechas en rojo indican el momento en el que se hacía el protocolo de estimulación. Entre un protocolo y el siguiente pasaba un periodo de 30 minutos, durante el cual se perfundía el fármaco o los fármacos. Tras la perfusión del primer fármaco (indicado en el esquema como F1), la perfusión del segundo se hacía conjuntamente con el primero (F1+F2) y el tercero con los dos anteriores (F1+F2+F3).

## **II.6. Histología**

### II.6.1. Trazado con Dil

Una vez finalizados los experimentos de registro se determinó la profundidad a la que estaba colocada la MMEs. Con el objetivo de determinar la posición de las neuronas registradas se introdujo una MMEs con la punta impregnada en cristales de Dil (Invitrogen) en la misma posición que la utilizada en el registro.

### II.6.2. Procesamiento de las médulas espinales

Las médulas espinales trazadas con Dil se fijaron por inmersión en PFA (Sigma) 4% en tampón fosfato 0.1 M (PB) a 4°C durante 16 horas. Los tejidos se lavaron en PB para eliminar el exceso de fijador y se incubaron en sacarosa (Sigma) preparada al 30 % en PB a 4°C durante 2-3 días para protegerlas del proceso de congelación. Las muestras se embebieron en una solución de gelatina (Sigma) 7.5 % / sacarosa 15% en PB, se congelaron a -40°C y cortaron en secciones de 30 µm de grosor en un criostato Bright OTF a una temperatura de -18 a -20 °C.

### II.6.3. Marcaje con IB4

Las terminaciones de las aferentes primarias no-peptidérgicas en la médula espinal se marcaron usando isolectina B4 (IB4) acoplada a fluoresceína (Vector, FL-1201). Las secciones de criostato se lavaron en PBS 5 minutos y posteriormente se bloqueó el marcaje inespecífico incubando con albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) 1% en PBS. Tras ello, se incubó el tejido con IB4 1:500 en PBS durante toda la noche a temperatura ambiente. Se volvió a lavar el tejido con PBS y se montó en mowiol (Sigma) con DAPI 1:500 para teñir núcleos. Se observó el marcaje en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX61).

### II.6.4. Localización de las neuronas registradas

Se realizó una reconstrucción de los lugares de registro a partir de las imágenes obtenidas por el trazado de Dil, y los datos de la profundidad a la que estaba el electrodo en el momento del registro.

La profundidad a la que se encontraba la MMEs se estimó bajando con el micromanipulador hasta tocar la superficie del Sylgard, asumiendo que la distancia recorrida con cada pulso de bajada del micromanipulador correspondía a aproximadamente 5 µm. Una vez conocida la distancia aproximada a la que se encontraba la punta de la MMEs de la superficie del Sylgard, donde se encuentra apoyada la región dorsal de la rodaja, y conociendo la distancia entre la punta de la matriz y cada uno de los sensores, se calculó la profundidad a la que se realizaba el registro de cada neurona.

## **Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto**

---

Las imágenes del trazado con Dil proporcionaron información sobre la región, en la que el electrodo se había encontrado posicionado durante el registro (ver figura 37).

En los animales a los que se les había sometido a la cirugía SNI, se trató de determinar si los registros se habían realizado en aquellas correspondientes con las de proyección de los axones dañados. Para ello, se realizaron marcajes con IB4, que desaparece en las aferencias de las aferentes primarias axotomizadas. Las imágenes obtenidas muestran, de manera general, que tras axotomía de la raíz peroneo común y tibial del nervio ciático izquierdo, las láminas superficiales de la región más caudal correspondiente a la entrada de L3 y la más rostral correspondiente con L4, se encuentra desafereciada prácticamente todo, y la parte que permanece no desafereciada en estas regiones, es la más lateral que se corresponde con el nervio safeno (ver figura 38).

En las médulas procedentes de animales neuropáticos, para la reconstrucción se utilizaron dos imágenes esquemáticas. En una de ellas se localizaron los lugares de registro que correspondían con zonas en las que existía una desafereciación y en la otra imagen se localizaron aquellas que correspondían con zonas en las que no había desafereciación, con la finalidad de ver si existían diferencias en el tipo de respuestas según estuviesen en una u otra región.

Estudios farmacológicos en neuronas de láminas  
superficiales de médula espinal de ratón adulto

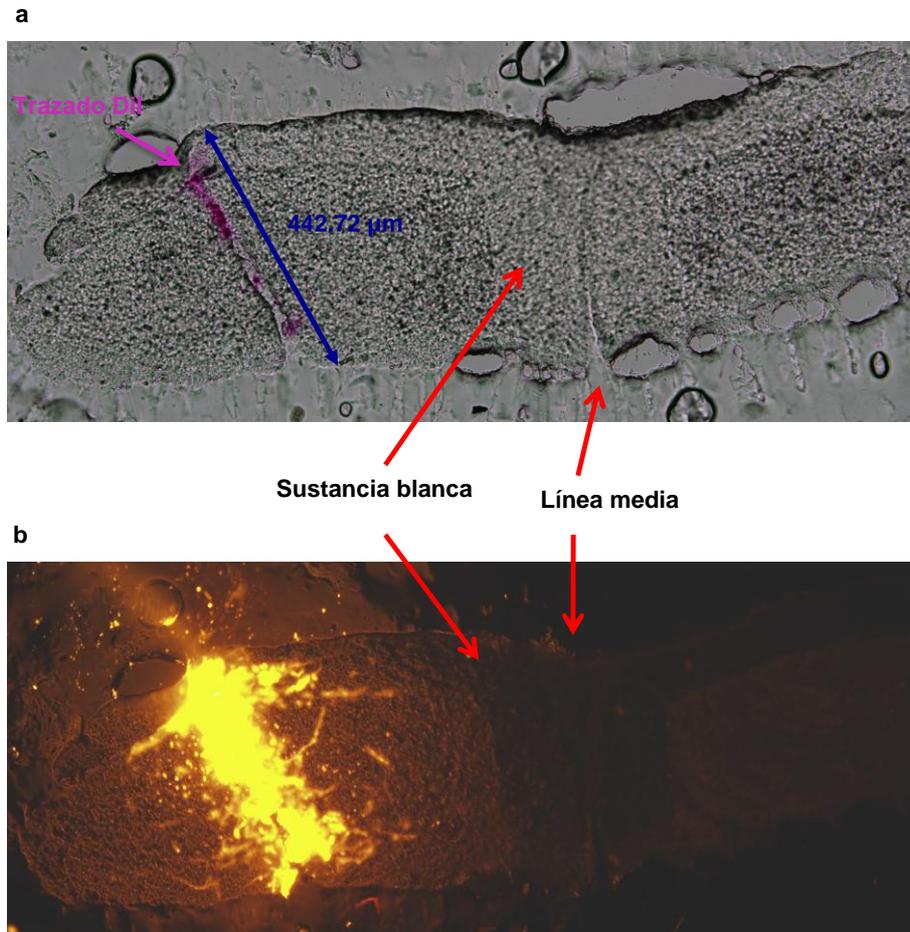


Figura 37: Imágenes del trazado de Dil al microscopio sin fluorescencia (a) y con fluorescencia (b). En ambos casos se muestra la región dorsal de la rodaja en la parte superior de la imagen, de tal manera que se ve que el trazado se realizó en la región izquierda de la médula espinal. Obsérvese la línea en rosa en la imagen de arriba y en amarillo intenso en la imagen de abajo, que se corresponde con el recorrido de la MME e indica la inclinación con la que entraba en la médula.

Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

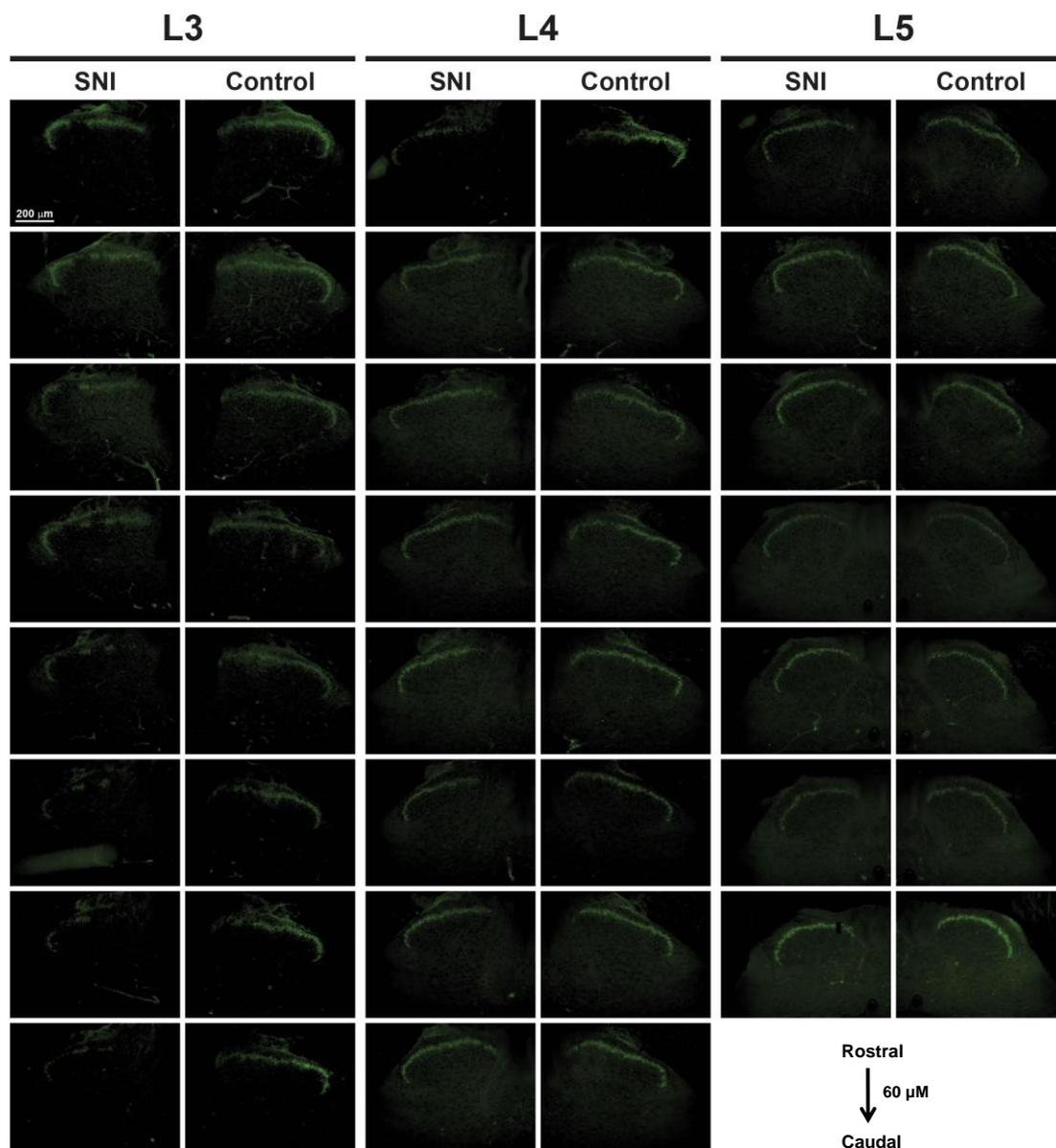


Figura 38: Imagen de diferentes secciones de médula espinal, comparando el trazado con IB4, entre animal naïve y animal al que se le ha sometido a cirugía SNI (imágenes obtenidas por la Dra. Elsa Cisneros). Las secciones corresponden con las regiones de entrada de L3, L4 y L5. Obsérvese como las láminas superficiales de las regiones más caudales de L3 se encuentran prácticamente desafienciadas en su totalidad, mientras que en control no.



### III. RESULTADOS

#### III.1. Estudio de circuitos nociceptivos en animal naïve y animal neuropático.

##### III.1.1. Estudios de comportamiento

Se evaluó la respuesta a estimulación mecánica en 10 animales del grupo naïve y 18 animales del grupo de neuropatía. Se compararon las respuestas de ambos grupos en situación basal. En el grupo naïve, el test se realizó a las 5 semanas de edad, el día del experimento y en el caso del grupo de neuropatía se realizó a las 3 semanas de edad, justo antes de realizar la cirugía SNI. Las respuestas obtenidas en cada caso no fueron distintas entre ambos grupos por las diferentes edades de los animales (la media en el umbral fue  $1.5 \pm 0.1$  g en el grupo naïve y  $1.3 \pm 0.1$  g en el grupo de neuropatía) ni entre ambas patas en cada grupo (grupo naïve: media en el umbral en la pata derecha fue  $1.7 \pm 0.1$  g y  $1.4 \pm 0.2$  g en la izquierda; grupo neuropatía: media en el umbral en la pata derecha fue de  $1.4 \pm 0.2$  g en la pata derecha y de  $1.2 \pm 0.1$  g en la izquierda).

En el grupo de neuropatía se repitió el test de comportamiento a las dos semanas tras la cirugía, observándose una disminución en el umbral de respuesta en la pata ipsilateral (media del umbral fue  $1.2 \pm 0.1$  g antes de la cirugía y de  $0.2 \pm 0.05$  g tras la cirugía) mientras que en la contralateral no se observan cambios (media del umbral fue de  $1.4 \pm 0.2$  g antes de la cirugía y de  $1.3 \pm 0.1$  g después de la cirugía).

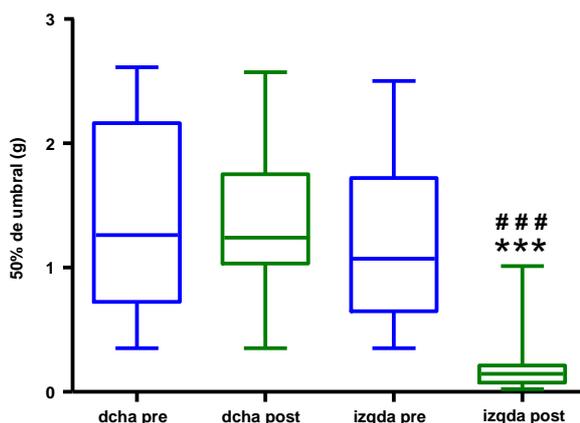


Figura 39: Efecto en el umbral mecánico tras cirugía SNI. Se observa un cambio en la media del umbral en la pata en la que se realizó la cirugía con respecto a la pata derecha del mismo animal (\*\*\*) Test-t pareado  $p=0.0001$ ) y entre la pata izquierda (lesionada) antes y después de la cirugía (### Test-t pareado  $p=0.0001$ )

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

### III.1.2. Registros electrofisiológicos utilizando matrices de multielectrodos (MMEs)

Se obtuvieron rodajas de médula espinal de un total de 24 animales naïve y 30 animales neuropáticos, de las cuales se lograron identificar un total de 119 neuronas en naïve y 171 en neuropatía. Las neuronas se localizaron en las láminas superficiales del asta dorsal a una profundidad media de la superficie dorsal de  $124.0 \pm 3.4 \mu\text{m}$  (el rango fue de 50 a 300  $\mu\text{m}$ ). Se clasificaron y compraron las neuronas de ambos grupos en función de sus respuestas a estimulación eléctrica de raíz dorsal y de su actividad eléctrica espontánea. En ambos casos el número máximo de neuronas que se lograron identificar fue de 9.

	<b>Náïve</b>	<b>Neuropatía</b>
Experimentos	24	30
Registros	46	70
Neuronas registradas	119	171
Neuronas por registro (mediana)	2 rango: 2-9	2 rango: 2-9

Tabla 10: Resumen del número de experimentos realizados, registros obtenidos y neuronas clasificadas. En ambos casos la mediana de neuronas por registro fue de 2.

Tras la identificación de neuronas, se compararon las poblaciones de ambos grupos en función de sus respuestas a estimulación eléctrica y de las características de su actividad espontánea.

#### III.1.2.a. Actividad eléctrica evocada

##### - Estímulos unitarios

Experimentos piloto utilizando electrodos de vidrio para el registro, mostraron que la mayor parte de las respuestas evocadas eléctricamente se producen dentro de los primeros 50-100 ms. Para un gran número de neuronas, la estimulación a intensidades altas ( $>200 \mu\text{s} * 40 \mu\text{A}$ ) produce potenciales de acción compuestos, debido al reclutamiento de señales producidas por neuronas que se encuentran en las proximidades de la MMEs. La presencia de estos potenciales de acción compuestos ha dificultado la clasificación de las neuronas en función de la intensidad del estímulo a la que comenzaban a responder.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

En naïve, se pudo detectar el input eléctrico en 69 neuronas, y 15 no respondieron a ninguna de las intensidades probadas y en neuropatía se pudo determinar el input en 111 neuronas y otras 12 no respondieron a ninguna intensidad.

Del total de neuronas que mostraron respuesta a estimulación eléctrica y se pudo determinar su input, se observa una mayor proporción de neuronas con respuesta a intensidad de fibra A $\beta$  en neuropatía que en naïve. Además, la frecuencia de la actividad espontánea en estas neuronas con input A $\beta$ , fue también mayor en neuropatía (ver tabla 11).

	Näive	Neuropatía
<b>A<math>\beta</math> (<math>\leq 50\mu\text{s} \cdot 20\mu\text{A}</math>)</b>	n=25 (1) 1.7 $\pm$ 0.5 Hz	n=56 (1)* 3 $\pm$ 0.4* Hz
<b>A<math>\delta</math> (<math>\geq 50\mu\text{s} \cdot 40\mu\text{A}</math>)</b>	n=33 (1) 2.2 $\pm$ 0.4 Hz	n=54 (1) 2.2 $\pm$ 0.4 Hz
<b>C (<math>200\mu\text{s} \cdot 60\mu\text{A}</math>)</b>	n=13 (1) 2.6 $\pm$ 0.7 Hz	n=9 (2) 2.7 $\pm$ 0.5 Hz

Tabla 11: Resumen del número de neuronas en función de la intensidad a la que comenzaban a responder, indicando en cada caso la frecuencia media de actividad espontánea. Entre paréntesis se indican aquellas que respondieron de manera invertida. La proporción de neuronas con disparo tipo A $\beta$  fue mayor en neuropatía que en naïve (Chi cuadrado  $p < 0.05$ ) así como la frecuencia de las neuronas con respuesta a esta intensidad (Test-t no pareado  $p < 0.05$ ).

### - Tren de estímulos

La mayoría de las neuronas registradas, mostraron respuestas al tren tipo 1, es decir, su respuesta no era diferente a la que se observaba ante estímulos unitarios (n= 93 en naïve y n=126 en neuropatía).

En ambos grupos experimentales las respuesta tipo 2 o wind-up, se observaron en un número discreto de neuronas, que en ambos casos fue de aproximadamente el 10% (n=14 en naïve y n=20 en neuropatía). Además el wind-up en ambos grupos no mostró diferencias ni en el número de espigas totales (media en el número de espigas fue 152.7  $\pm$  17.7 en naïve y 155.3  $\pm$  27.8 en neuropatía) ni en el índice de wind-up producido (0.52  $\pm$  0.1 espigas/s en naïve y 0.8  $\pm$  0.2 espigas/s en neuropatía).

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

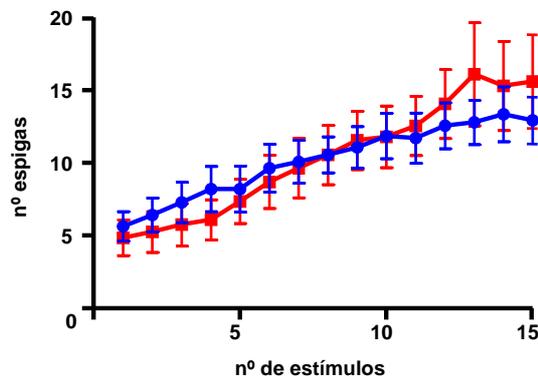


Figura 40: Comparación del wind-up evocado en naïve (azul) frente a neuropatía (rojo), donde se ve que no existen diferencias entre los wind-up evocados en cada caso.

Un número muy reducido de neuronas mostraron respuesta tipo S ( $n=3$  en naïve y  $n=4$  en neuropatía). Además todas estas neuronas también silenciaban su respuesta por estímulos unitarios (invertidas).

### III.1.2.b. Actividad espontánea

La mayoría de las neuronas registradas tanto en ratones naïve como en neuropatía exhibieron actividad espontánea ( $n=115$  en naïve y  $n=159$  en neuropatía). Esta actividad intrínseca no mostró diferencias en las frecuencias de disparo entre ambos grupos, oscilando de 0.03 a 12 Hz en naïve y 0.05 a 11.8 Hz en neuropatía ( $f_{media}$  naïve =  $2.3 \pm 0.2$  Hz y  $f_{media}$  SNI =  $2.5 \pm 0.2$  Hz).

El análisis de esta actividad espontánea mediante autocorrelogramas mostró diferentes patrones:

- Neuronas con actividad regular: Se registraron 10 neuronas con este tipo de actividad ( $\approx 8\%$  del total) en naïve y 25 en neuropatía ( $\approx 15\%$  del total).

Estas neuronas mostraron frecuencias de disparo que se mantenían constantes en el tiempo (figura 41c). Los autocorrelogramas de este tipo de neuronas indican que los disparos suceden a intervalos de tiempo constantes (figura 41b).

Todas las neuronas de este grupo, mostraron frecuencias de actividad espontánea alta ( $>2$  Hz) en ambos grupos de estudio, oscilando de 4.4 a 9.8 Hz ( $f_{media} = 6.7 \pm 0.5$  Hz) en naïve y de 2 a 11 Hz ( $f_{media} = 5.4 \pm 0.5$  Hz) en neuropatía.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

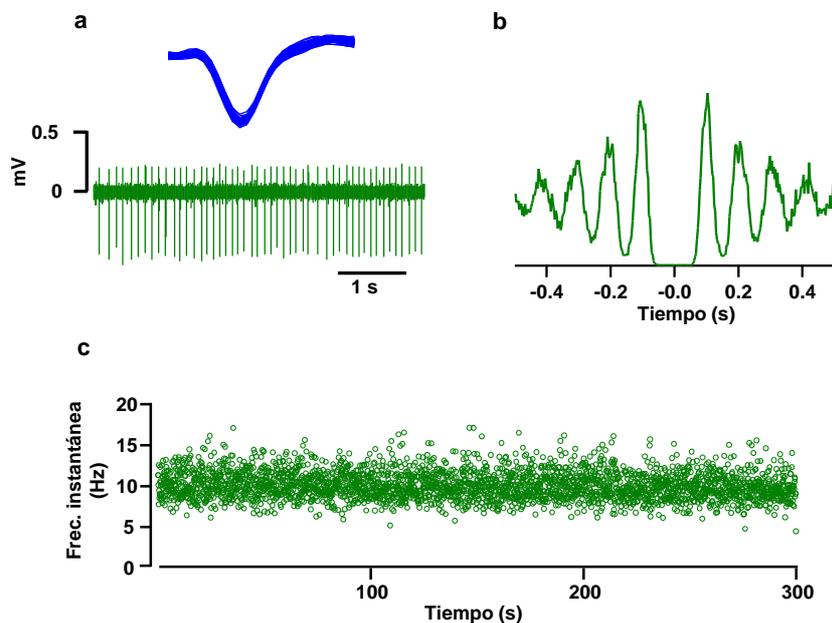


Figura 41: (a) Ejemplo de registro original de una neurona con disparo regular. En azul se muestra la señal correspondiente al total de espigas en el intervalo de tiempo mostrado. (b) El autocorrelograma muestra que la probabilidad de que habiendo un disparo suceda el siguiente se produce de manera cíclica. (c) Representación de la actividad espontánea como frecuencia instantánea.

- Neuronas con ráfagas de corta duración: Se registraron 22 neuronas con este tipo de actividad ( $\approx 19\%$  del total) en naïve y 37 en neuropatía ( $\approx 23\%$  del total).

Esta actividad espontánea consistía en un disparo seguido de al menos otro más (dupletes) o de un número discreto de disparos no mayor de 5 (figura 42c). Los autocorrelogramas en este tipo de actividad indican que la probabilidad de que suceda un potencial de acción habiendo sucedido el anterior, está muy próximo en el tiempo, y aparece como dos picos próximos al 0 (figura 42b).

Las frecuencias en este tipo de neuronas variaron de 0.05 a 7.2 Hz ( $f_{media} = 1.1 \pm 0.3$  Hz) en naïve y de 0.07 a 10.5 Hz ( $f_{media} = 1.3 \pm 0.3$  Hz) en neuropatía, no siendo diferente entre ambos grupos.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

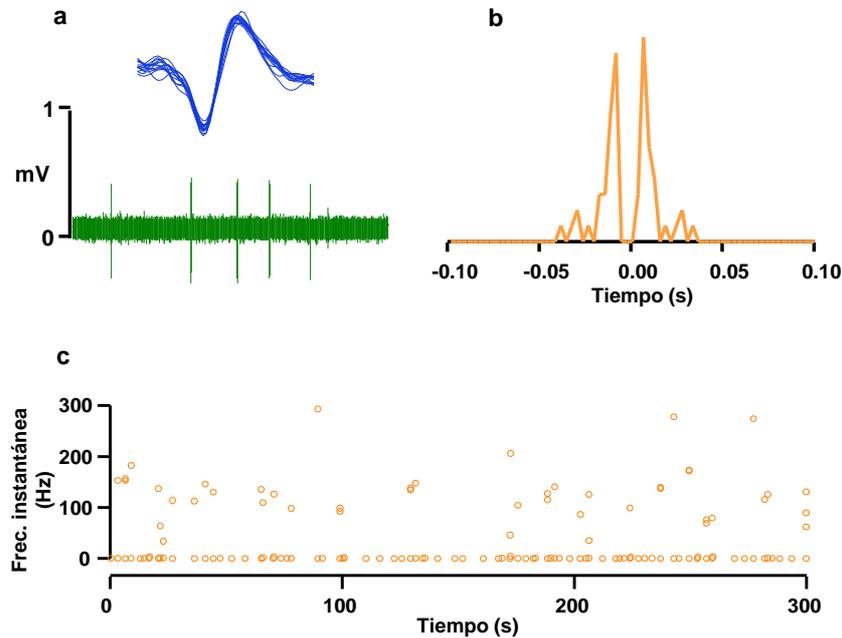


Figura 42: (a) Ejemplo de registro original de una neurona con un disparo en ráfagas de corta duración. . En azul se muestra la señal correspondiente al total de espigas en el intervalo de tiempo mostrado. (b) El autocorrelograma muestra que la probabilidad de que habiendo un disparo suceda el siguiente se produce en una ventana de tiempo reducida. (c) Representación de la actividad espontánea como frecuencia instantánea.

- Neuronas con ráfagas de larga duración: Se registraron 6 neuronas con este tipo de patrón ( $\approx 5\%$  del total) en naïve y 12 en neuropatía ( $\approx 7\%$  del total).

Estas neuronas, mostraban una actividad espontánea en la que tras un potencial de acción se sucedía un número elevado de potenciales de acción a lo largo del tiempo (figura 43c). Los autocorrelogramas en este tipo de actividad indican que la probabilidad de que suceda un potencial de acción habiendo sucedido el anterior, es variable en el tiempo (figura 43b).

Las frecuencias en este tipo de neuronas variaron de 1.4 a 12 Hz ( $f_{media} = 4.9 \pm 1.7$  Hz) en naïve y de 0.8 a 8 Hz ( $f_{media} = 3.4 \pm 0.6$  Hz) en neuropatía, no siendo diferente entre ambos grupos.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

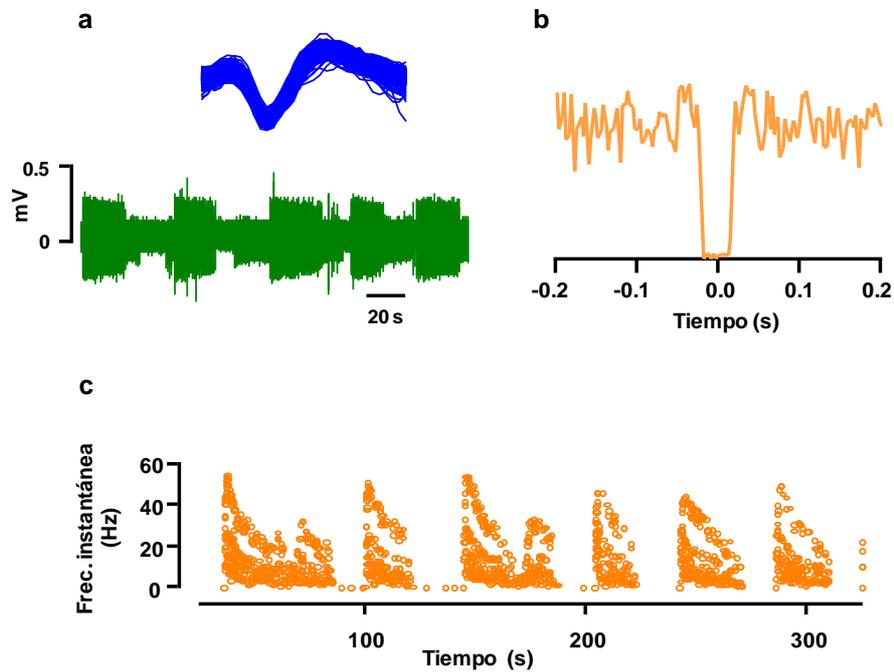


Figura 43: (a) Ejemplo de registro original de una neurona con un disparo en ráfagas de larga duración. En azul se muestra la señal correspondiente al total de espigas en el intervalo de tiempo mostrado. (b) El autocorrelograma muestra que la probabilidad de que habiendo un disparo suceda el siguiente se produce en una ventana de tiempo amplia. (c) Representación de la actividad espontánea como frecuencia instantánea.

De manera general, en neuropatía se observó una mayor proporción de neuronas con patrones definidos (74 de 159), frente a las que mostraron patrones en naïve (38 de 115). Sin embargo al comparar la proporción de neuronas por patrón, no se encontraron diferencias entre los diferentes grupos (ver tabla 12).

**Estudios farmacológicos en neuronas de láminas  
superficiales de médula espinal de ratón adulto**

<b>Patrón de actividad espontánea</b>	<b>Nº neuronas Näive n=115</b>	<b>Nº neuronas SNI n=159</b>
Regular	10 (2)	25 (2)
Ráfagas de corta duración (<5 espigas por ráfaga)	22	37
Ráfagas de larga duración (>10 espigas por ráfaga)	6	12
Total de neuronas con patrón	38	74*

Tabla 12: Número de neuronas registradas de cada tipo. En paréntesis se indican las que respondían de manera invertida. La proporción de neuronas para cada tipo de patrón no fue diferente entre ambos grupos, pero si el número total de neuronas que mostraron patrones (Chi cuadrado,  $p < 0.05$ ).

### III.1.3. Localización de las neuronas registradas

Con los datos obtenidos del trazado de Dil y la profundidad a la que se encontraba desde la superficie dorsal la MMEs, se logró identificar la región aproximada donde se realizaron los registros para 63 neuronas en naïve y 94 en neuropatía.

Se ubicaron las posiciones de los registros en función del input eléctrico de las neuronas y de sus patrones de actividad espontánea, indicando en ambos casos aquellas neuronas que mostraron wind-up y las que mostraron una respuesta al tren tipo S (invertidas).

En naïve, los registros se realizaron a una profundidad de la superficie dorsal de entre 50 y 250  $\mu\text{m}$  (profundidad media =  $126.1 \pm 6.4 \mu\text{m}$ ). La mayoría de los registros se localizaron hacia la región mas medial.

Observando el esquema de las regiones de registro según input eléctrico no se observan regiones concretas para neuronas que comiencen a responder con inputs de baja o alta intensidad (figura 44a).

En relación a los patrones de actividad espontánea, tampoco se puede concluir que existan regiones concretas en las que predomine un patrón frente a otro (figura 44b).

Observando las neuronas que mostraron una respuesta al tren tipo wind-up, se lograron ubicar un total de 12 neuronas (identificadas con un cuadrado en el esquema), no encontrándose ninguna región concreta para este tipo de respuesta.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

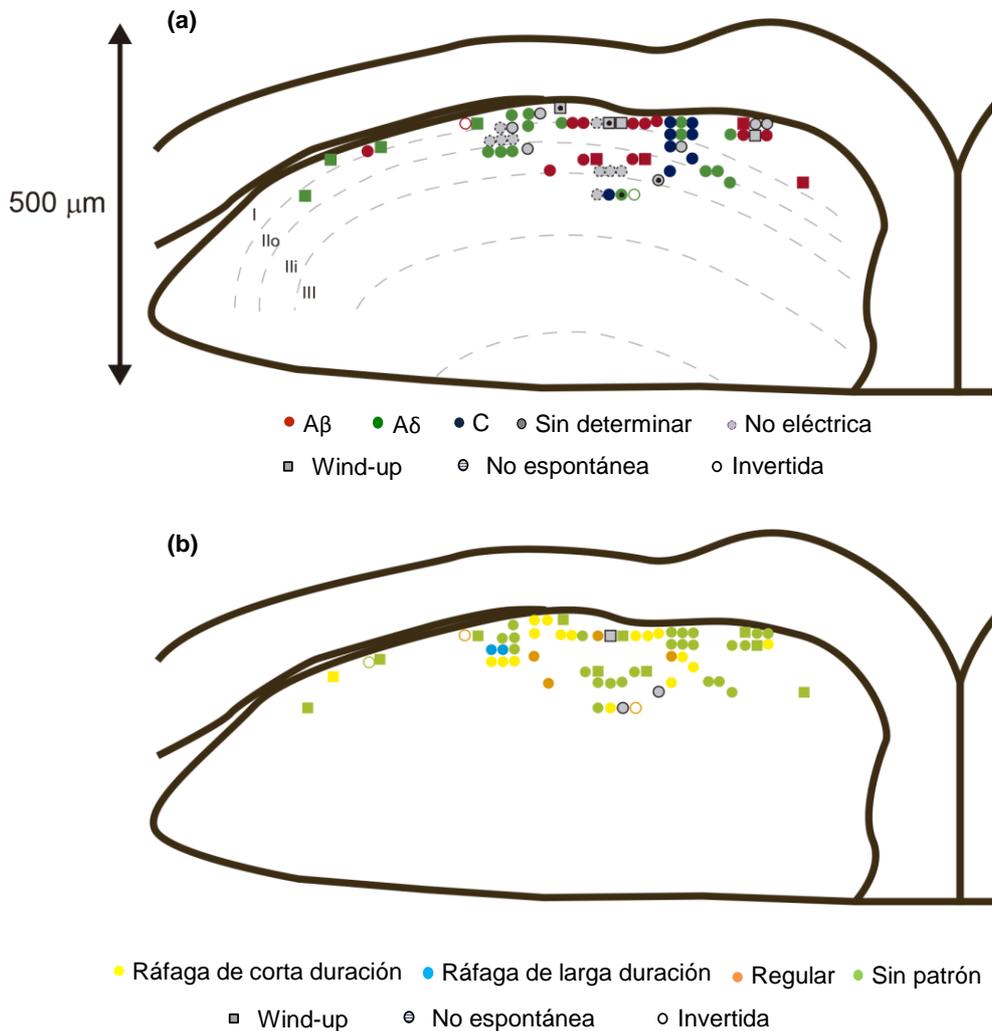


Figura 44: Esquema de las regiones de registro en médula naïve en función del input eléctrico (a) y del tipo de actividad espontánea (b). En ninguno de los casos se vieron regiones concretas para algún tipo de neuronas. Obsérvese que los registros se realizaron en láminas superficiales.

En neuropatía, los registros se realizaron a una profundidad de entre 50 y 300  $\mu\text{m}$  desde la superficie dorsal (profundidad media =  $122.6 \pm 3.8 \mu\text{m}$ ). Las regiones de registro se ubicaron, además de por input eléctrico y actividad espontánea, por si se encontraban en regiones correspondientes a zonas de axones de proyección dañados o no dañados.

De manera general, las neuronas que se lograron ubicar en neuropatía se localizaron en la región más lateral de la médula espinal.

Observando las regiones de registro según input eléctrico tampoco se puede concluir que existan regiones concretas, al igual que sucedía en naïve. Si observamos entre regiones de axones no dañados (figura 45a) y axones dañados (figura 45b) tampoco se puede concluir que predomine más un tipo de respuesta frente a otro.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

En relación a los patrones de actividad espontánea, tampoco se puede concluir que existan regiones concretas en las que predomine un patrón frente a otro (figura 46), ni que existan diferencias entre regiones de axones no dañados (figura 46a) y axones dañados (46b).

Observando las neuronas que mostraron una respuesta al tren tipo wind-up, se lograron ubicar 2 neuronas con esta respuesta en regiones de axones no dañados y 5 en regiones de axones dañados, no pudiendo concluir que existan tampoco en este caso, regiones concretas.

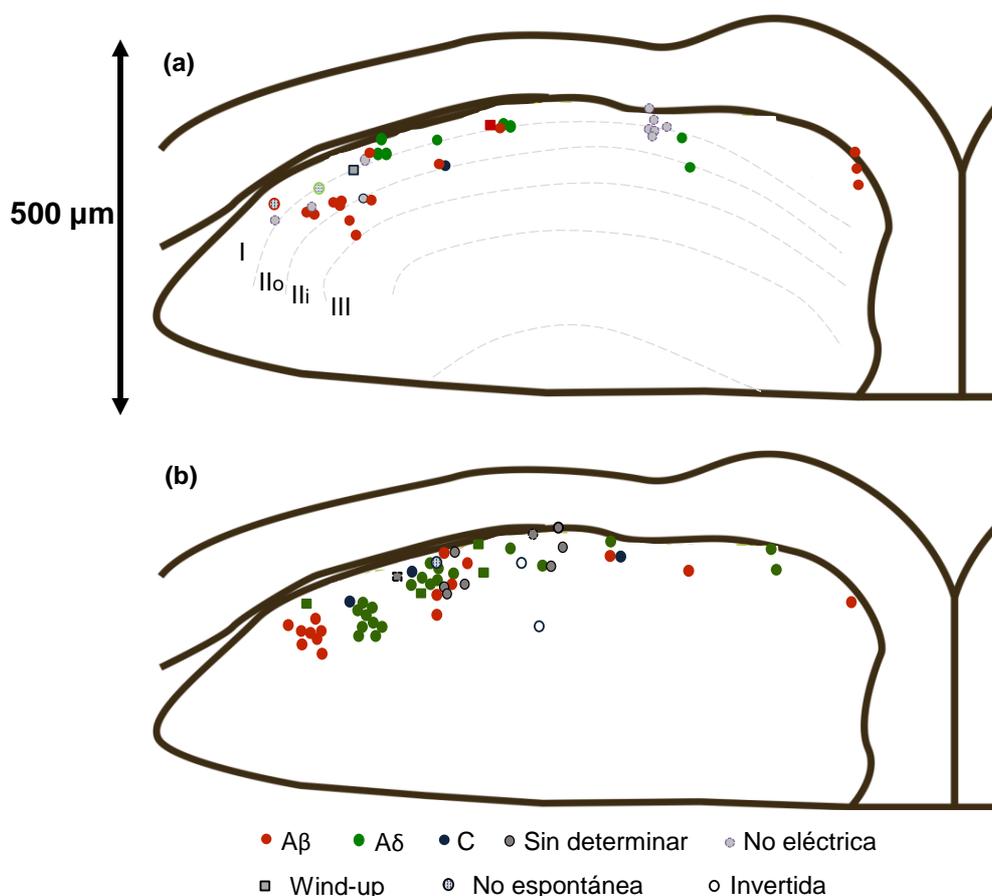


Figura 45: Esquema de las regiones de registro en médula neuropática en función del input eléctrico. La imagen superior (a) corresponde con los registros realizados en zonas de proyección de axones no dañados, y la imagen inferior (b) con las zonas de proyección de axones dañados. Obsérvese como las zonas correspondientes a axones dañados se encuentran en la región más lateral de la médula.

Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

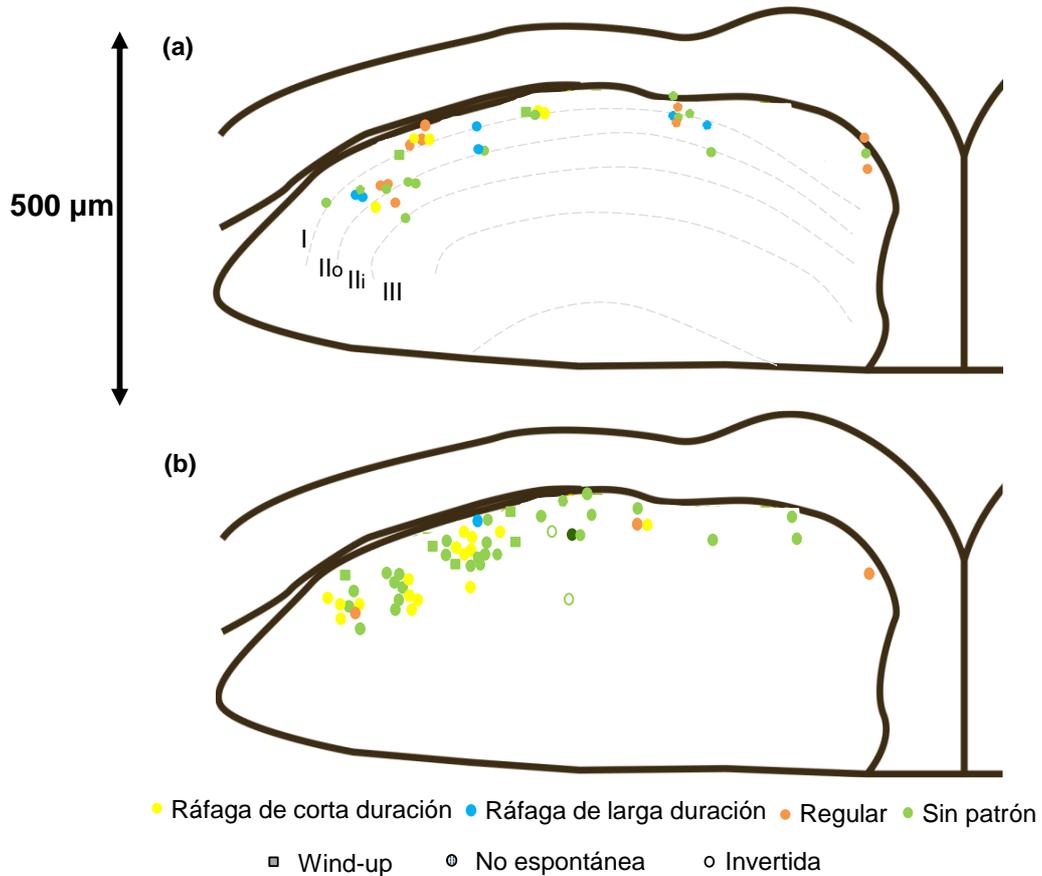


Figura 46: Esquema de las regiones de registro en médula neuropática en función del tipo de actividad espontánea. La imagen superior (a) corresponde con los registros realizados en zonas de proyección de axones no dañados, y la imagen inferior (b) con las zonas de proyección de axones dañados. Obsérvese como las zonas correspondientes a axones dañados se encuentran en la región más lateral de la médula.



## **III.2. Estudios farmacológicos**

### **III.2.1. Bloqueo de receptores tipo AMPA**

Se utilizó NBQX a una concentración 5  $\mu\text{M}$  en 27 neuronas procedentes de médulas de animal naïve y en 18 de animal neuropático. Los registros se realizaron a una profundidad media desde la superficie dorsal de  $131.4 \pm 13.9 \mu\text{m}$  (el rango fue de 50 a 230  $\mu\text{m}$ ) en naïve y a  $130.0 \pm 11.2 \mu\text{m}$  (el rango fue de 50 a 230  $\mu\text{m}$ ) en neuropatía.

#### *III.2.1.a. Efecto en actividad eléctrica evocada*

- Estímulos eléctricos unitarios

Del total de neuronas en las que se probaron los efectos de NBQX, se pudo determinar el input eléctrico en 17 neuronas en naïve y en 12 en neuropatía.

En animal naïve de las 17 neuronas, 4 no respondían inicialmente a ninguna intensidad (no eléctricas). De las 13 en las que se conocía el input eléctrico, en 8 hubo que aplicar estímulos eléctricos de mayor intensidad para evocar una respuesta tras perfusión de NBQX.

De las 8 neuronas en las que se vio efecto en naïve, 5 respondían inicialmente con intensidad de fibra A $\beta$  y 3 con intensidad de A $\delta$ . Las neuronas que tenían respuesta A $\beta$ , 2 de ellas pasaron a responder con intensidad de A $\delta$  y 3 no respondieron a ninguna intensidad por efecto de NBQX. Las neuronas que tenían inicialmente una respuesta a intensidad de A $\delta$ , 2 pasaron a responder con intensidad de fibra C y 1 no respondió a ninguna de las intensidades (tabla 13).

En neuropatía, de las 12 neuronas en las que se pudo determinar el input, 4 no respondieron a ninguna intensidad. De las 8 restantes, en las que se conocía el input, en 7 neuronas se vió un efecto en el mismo sentido que en naïve.

En las 7 neuronas en las que se vio efecto, 3 respondían una intensidad inicial de fibra A $\beta$  y 4 con intensidad de A $\delta$ . Por efecto de NBQX las neuronas con respuesta a intensidad de A $\beta$  pasaron a responder 2 de ellas a intensidad de fibra C y 1 no respondió a ninguna intensidad y las que respondían a intensidad de A $\delta$  una pasó a responder con intensidad de fibra C y las otras 3 no respondieron a ninguna intensidad (tabla 13).

En ambos casos, naïve y neuropatía, la respuesta se bloqueó completamente en 4 neuronas.

**Estudios farmacológicos en neuronas de láminas  
superficiales de médula espinal de ratón adulto**

		Input tras NBQX Náive (n=13)				Input tras NBQX Neuropatía (n=8)			
		A $\beta$	A $\delta$	C	Bloqueo total del input	A $\beta$	A $\delta$	C	Bloqueo total del input
Input antes de NBQX	A $\beta$	4	2		3	1		2	1
	A $\delta$	1		2	1			1	3

Tabla 13: Tabla resumen del efecto en el input eléctrico por perfusión de NBQX.

- Efecto sobre wind-up

En situación náive se registraron 8 neuronas con este patrón de disparo al tren (media en el número total de espigas=  $142.9 \pm 20.9$ ; media del índice de wind-up =  $0.7 \pm 0.1$  espigas/s). En 5 se vio un efecto inhibitorio (media en el número total de espigas<sub>control</sub>=  $147.0 \pm 25.7$  y media en el número total de espigas<sub>NBQX</sub>=  $59.0 \pm 17.5$ ; media del índice de wind-up<sub>control</sub> =  $0.8 \pm 0.2$  espigas/s y media del índice de wind-up<sub>NBQX</sub>=  $0.3 \pm 0.1$  espigas/s) por perfusión de NBQX (ANOVA de 2 vías,  $p < 0.0001$ ) y en las 3 restantes no se vio efecto alguno (en 2 de ellas tampoco se vio efecto en su actividad espontánea y en una pasó de 0.1 Hz a 0 Hz).

En neuropatía se probó el efecto de NBQX en 4 neuronas con wind-up (media en el número total de espigas=  $155.3 \pm 82.4$ ; media del índice de wind-up =  $0.3 \pm 0.09$  espigas/s). Se vio un efecto inhibitorio en 2 de ellas (media en el número total de espigas<sub>control</sub>=  $250.0 \pm 151.0$  y media en el número total de espigas<sub>NBQX</sub>=  $181.5 \pm 101.5$ ; media del índice de wind-up<sub>control</sub> =  $0.5 \pm 0.02$  espigas/s y media del índice de wind-up<sub>NBQX</sub>=  $0.5 \pm 0.3$  espigas/s) y en otras 2 el efecto fue excitatorio (media en el número total de espigas<sub>control</sub>=  $60.5 \pm 2.5$  y media en el número total de espigas<sub>NBQX</sub>=  $83.0 \pm 9.0$ ; media del índice de wind-up<sub>control</sub> =  $0.2 \pm 0.1$  espigas/s y media del índice de wind-up<sub>NBQX</sub>=  $0.3 \pm 0.1$  espigas/s). Las neuronas en las que se vio un aumento del wind-up, una de ellas redujo su actividad espontánea de 1.4 a 0.4 Hz, y en la otra aumento de 2.4 a 6.7 Hz.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

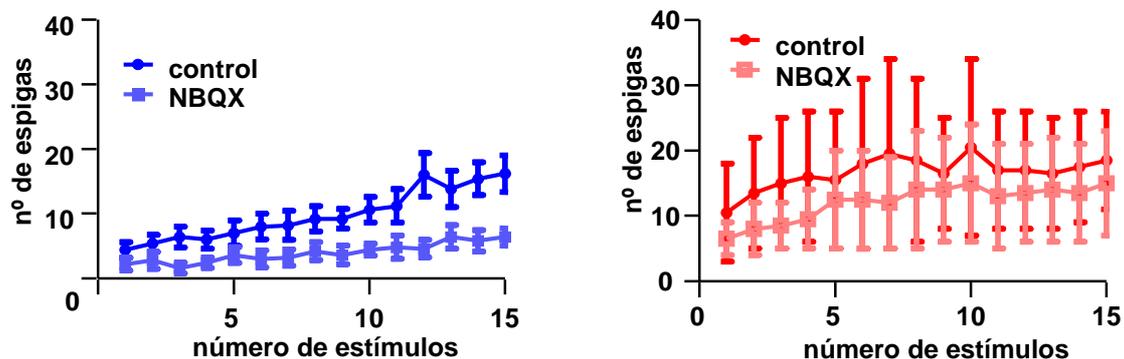


Figura 47: Efecto inhibitorio de NBQX 5  $\mu$ M en el wind-up de neuronas procedentes de médulas de animal naïve (azul, n=5) y de animal neuropático (rojo, n=2).

### III.2.1.b. Actividad espontánea

#### - Frecuencia de disparo

Se estudió el efecto sobre la actividad espontánea en 25 neuronas en naïve y en 17 en neuropatía. La frecuencia de disparo de las neuronas naïve osciló de 0.03 a 12 Hz ( $f_{media} = 2.9 \pm 0.7$  Hz) y en neuropatía de 0.08 a 7 Hz ( $f_{media} = 2.7 \pm 0.5$  Hz).

En situación naïve se vio un efecto inhibitorio sobre la frecuencia de disparo (Test-t pareado,  $p < 0.0001$ ) en 21 neuronas ( $f_{media_{control}} = 2.8 \pm 0.7$  Hz;  $f_{media_{NBQX}} = 1.5 \pm 0.6$  Hz) llegando a ser esta inhibición total en 11 de ellas. De las 4 neuronas que no sufrieron inhibición, 3 no sufrieron cambios en su frecuencia y una aumentó su frecuencia de disparo de 1.8 a 4.8 Hz.

En neuropatía se produjo un efecto inhibitorio (Test-t pareado,  $p < 0.005$ ) por efecto de NBQX en 11 neuronas ( $f_{media_{control}} = 2.6 \pm 0.7$  Hz;  $f_{media_{NBQX}} = 0.9 \pm 0.4$  Hz) llegando a ser esta inhibición total en 5 de ellas. De las 6 neuronas restantes en 3 no se vio efecto y en otras tres se vio un aumento en la frecuencia ( $f_{media_{control}} = 3.5 \pm 1.5$  Hz;  $f_{media_{NBQX}} = 6.7 \pm 2.7$  Hz).

No se hallaron diferencias en el porcentaje de reducción de la actividad espontánea entre naïve y neuropatía.

#### - Patrón de actividad espontánea

Se pudo estudiar el efecto sobre los patrones de disparo en 15 neuronas en naïve y en 10 en neuropatía.

De las 15 neuronas de estudio en naïve, 2 tenían un patrón de disparo regular, 1 tenía un disparo en ráfagas de corta duración, 2 en ráfagas de larga duración y 10 no mostraron ningún patrón. Sólo en 5 neuronas se vio algún efecto sobre este parámetro.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

En las 2 neuronas con un disparo regular una de ellas regularizó más su actividad (figura 48a), y no sufrió cambios en su frecuencia de disparo, mientras que en la otra neurona su actividad espontánea bajó de 8.2 a 2.9 Hz y desapareció parte del patrón de regularidad (figura 48b).

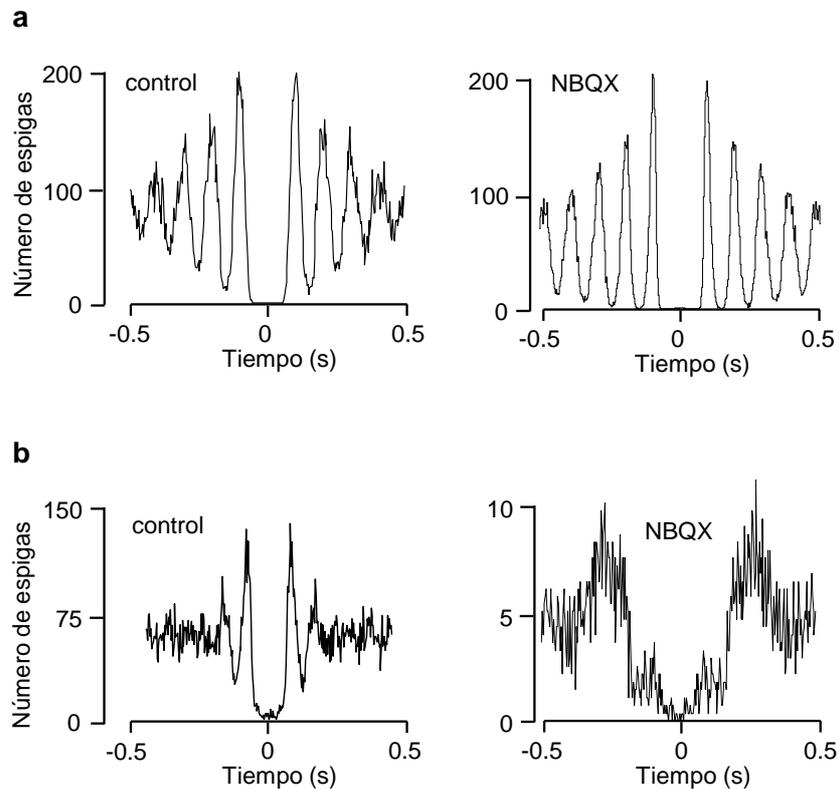


Figura 48: Autocorrelograma del efecto de NBQX 5  $\mu$ M sobre una neurona regular en la que su actividad se regulariza más (a) y sobre otra neurona en la que se pierde parte de ese disparo regular (b).

La neurona con ráfagas de corta duración, tenía concretamente un disparo en dupletes, aunque en ocasiones disparaba de manera unitaria. El efecto que se observó fue un aumento del disparo en dupletes (figura 49), y su frecuencia de actividad espontánea bajó de 7.6 a 6 Hz.

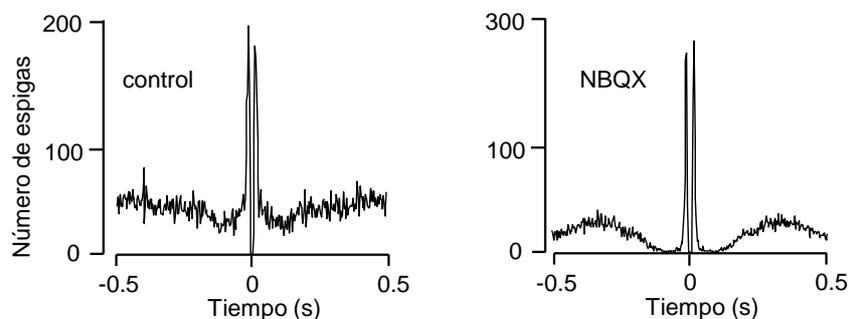


Figura 49: Autocorrelograma del efecto de NBQX 5  $\mu$ M sobre una neurona con disparo en ráfagas de corta duración.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

---

Las dos neuronas con disparo en ráfagas de larga duración sufrieron reducción en su frecuencia pero su patrón de disparo no se vio modificado.

De las 10 neuronas sin patrón, 2 regularizaron su actividad (figura 50) por efecto de NBQX además de sufrir una reducción en su frecuencia (de 3.2 a 2.4 Hz y de 3.8 a 2.7 Hz).

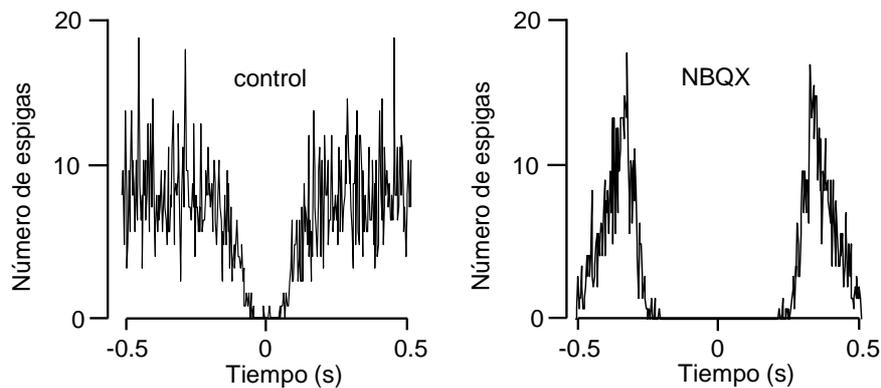


Figura 50: Autocorrelograma del efecto de NBQX 5  $\mu$ M sobre una neurona que regularizó su actividad espontánea.

En neuropatía, se pudo estudiar el efecto de NBQX en 10 neuronas. De las neuronas de estudio, 2 tenían un patrón regular, 3 un patrón de disparo en ráfagas de larga duración, y otras 5 no tenían ningún patrón. Se registraron 3 neuronas con ráfagas de corta duración pero en todas ellas desapareció por completo su actividad espontánea.

Solo se observó algún cambio en el patrón, en una neurona regular que perdió parte de ese ritmo regular y además se redujo su frecuencia de disparo de 5.2 a 2.5 Hz (figura 51b) y en una sin patrón que regularizó su disparo y además aumentó su frecuencia de 2.4 a 6.7 Hz (figura 51a).

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

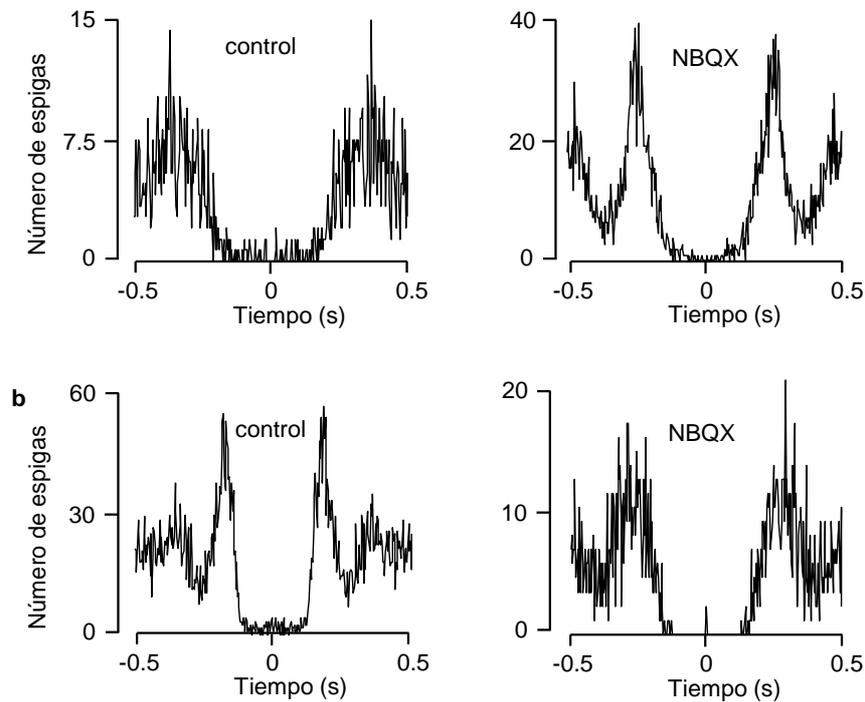


Figura 51: Autocorrelogramas del efecto de NBQX 5  $\mu$ M sobre una neurona regular en la que su actividad se regulariza más (a) y sobre otra neurona en la que se pierde parte de ese disparo regular (b).

### III.2.2. Bloqueo de receptores tipo NMDA

Se estudiaron los efectos de DAP5 a una concentración 50  $\mu$ M en 6 neuronas en naïve y en 20 en neuropatía. Los registros se realizaron a una profundidad media de  $145.4 \pm 13.8 \mu$ m (el rango fue de 120 a 200  $\mu$ m) en naïve y a  $106.8 \pm 9.4 \mu$ m (el rango fue de 50 a 205  $\mu$ m) en neuropatía.

#### III.2.2.a. Efecto en actividad eléctrica evocada

- Estímulos eléctricos unitarios

Se pudo determinar el input eléctrico en 4 neuronas en naïve y en 17 en neuropatía.

De las 4 neuronas en naïve, 3 respondían a intensidad de fibra A $\beta$  y 1 con intensidad de A $\delta$ .

En neuropatía de las 17 neuronas en las que se pudo estudiar los efectos en el input, 3 respondieron a intensidades de A $\beta$ , haciéndolo una de ellas además de manera invertida, 6 con intensidad de A $\delta$ , 1 con intensidad de C y otras 7 no respondieron a ninguna intensidad.

No se observaron cambios en el input eléctrico de las neuronas por bloqueo de receptores NMDA en ninguno de los casos.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

### - Efecto sobre wind-up

En situación naïve se registraron 5 neuronas con respuesta al tren tipo wind-up (media en el número total de espigas=  $138.8 \pm 19.9$ ; media del índice de wind-up =  $0.8 \pm 0.3$  espigas/s). En 2 neuronas, se vio un efecto inhibitorio (media en el número total de espigas<sub>control</sub>=  $148.0 \pm 43.0$  y media en el número total de espigas<sub>DAP5</sub>=  $84.0 \pm 11.0$ ; media del índice de wind-up<sub>control</sub> =  $1.2 \pm 0.5$  espigas/s y media del índice de wind-up<sub>DAP5</sub>=  $0.6 \pm 0.3$  espigas/s) y en las 3 restantes no se vio efecto alguno.

En neuropatía se probó el efecto de NBQX en 4 neuronas con wind-up (media en el número total de espigas=  $139.3 \pm 62.7$ ; media del índice de wind-up=  $0.9 \pm 0.5$  espigas/s). Todas sufrieron una inhibición (media en el número total de espigas<sub>control</sub>=  $139.3 \pm 62.7$  y media en el número total de espigas<sub>DAP5</sub>=  $37.7 \pm 12.9$ ; media del índice de wind-up<sub>control</sub> =  $0.9 \pm 0.5$  espigas/s y media del índice de wind-up<sub>DAP5</sub>=  $0.1 \pm 0.06$  espigas/s), por efecto de DAP5 (ANOVA de 2 vías,  $p < 0.0001$ ).

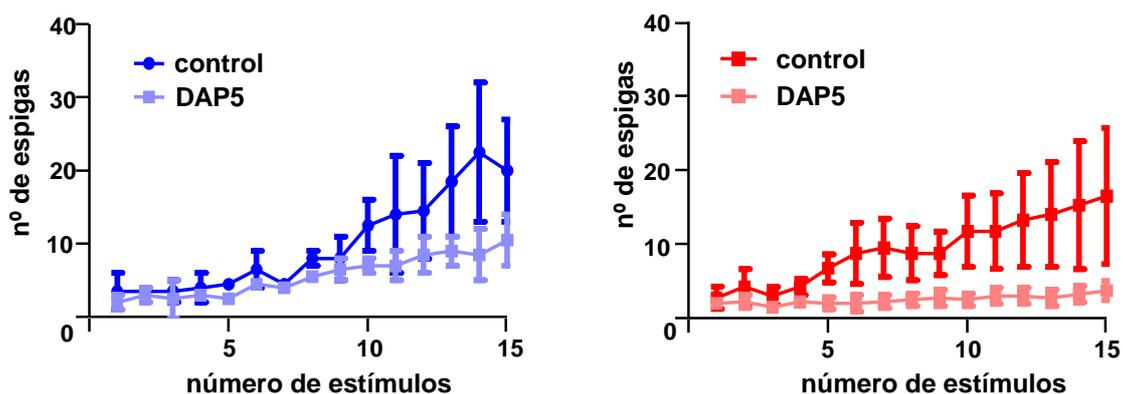


Figura 52: Efecto inhibitorio de DAP5 50  $\mu$ M en el wind-up de neuronas naïve (azul,  $n=2$ ) y de animal neuropático (rojo,  $n=4$ ).

### III.2.2.b. Actividad espontánea

#### - Frecuencia de disparo

Se estudió el efecto en la actividad espontánea en 4 neuronas en naïve y en 19 en neuropatía. La frecuencia de disparo de las neuronas naïve osciló de 0.3 a 9.9 Hz ( $f_{media} = 4.0 \pm 2.1$  Hz) y en neuropatía de 0.1 a 10.2 Hz ( $f_{media} = 2.9 \pm 0.6$  Hz).

En naïve bajó la actividad espontánea en 3 neuronas ( $f_{media}$ <sub>control</sub>=  $5.2 \pm 2.3$  Hz;  $f_{media}$ <sub>DAP5</sub>=  $3.1 \pm 0.7$  Hz) y en una no cambió su frecuencia. En neuropatía se redujo la actividad espontánea ( $f_{media}$ <sub>control</sub>=  $4.0 \pm 1.1$  Hz;  $f_{media}$ <sub>DAP5</sub>=  $2.6 \pm 0.9$  Hz) en 10 neuronas (Test-t pareado,  $p < 0.01$ ) llegando a desaparecer totalmente en 2. De las 9 neuronas en las que no se

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

dio una reducción, en 2 se vio un aumento de esta actividad ( $f_{media\ control} = 3.7 \pm 1.9$  Hz;  $f_{media\ DAP5} = 4.5 \pm 2.1$  Hz).

La inhibición en ambas situaciones fue muy similar, no encontrándose diferencias en el porcentaje de reducción de la actividad espontánea entre naïve y neuropatía.

### - Patrón de actividad espontánea

Se pudo estudiar el efecto sobre los patrones de disparo en las 4 neuronas en naïve y 17 en neuropatía.

Ninguna de las neuronas naïve tenía un patrón de disparo definido y sólo en una de ellas se vio efecto por DAP5, que consistió en una regularización de la actividad, además de reducir su frecuencia de 9.9 a 4.6 Hz.

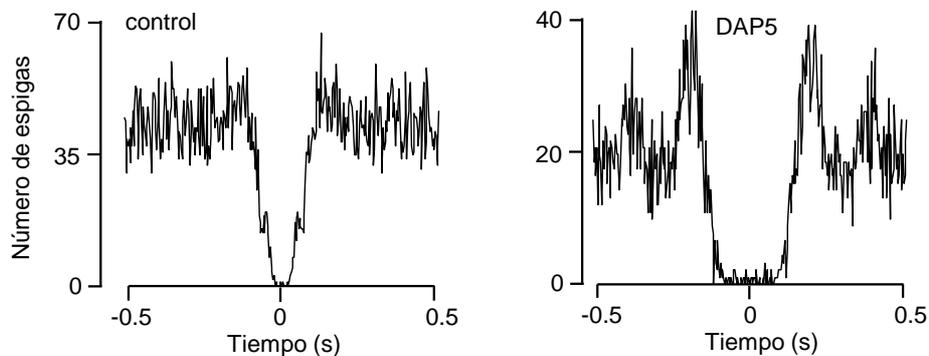


Figura 53: Autocorrelogramas del efecto de DAP5 5 µM sobre una neurona sin patrón que comenzó a regularizar su tipo de disparo.

En neuropatía no se vieron cambios en el patrón de ninguna neurona.

### III.2.3. Bloqueo de receptores tipo NK1

Se utilizó CP9994 a una concentración de 3 µM y 10 µM en 24 neuronas naïve y en 11 de neuropatía. Los registros se realizaron a una profundidad media de la superficie dorsal de  $111.3 \pm 10.5$  µm (el rango fue de 50 a 300 µm) en naïve y a  $130.0 \pm 12.9$  µm (el rango fue de 50 a 200 µm) en neuropatía.

#### *III.2.3.a. Efecto en actividad eléctrica evocada*

##### - Estímulos eléctricos unitarios

Se pudo determinar el input eléctrico en 17 neuronas en naïve y en 11 en neuropatía.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

---

De las 17 neuronas en naïve, 9 respondían a intensidad de fibra A $\beta$ , de las cuales 1 lo hacía de manera invertida, 5 con intensidad de A $\delta$ , 1 con intensidad C y otras 2 no respondieron a ninguna intensidad.

En neuropatía de las 11 neuronas en las que se pudo estudiar los efectos en el input, 3 respondieron a intensidades de A $\beta$ , 5 con intensidad de A $\delta$  y otras 3 no respondieron a ninguna intensidad.

No hubo cambios en el input eléctrico de las neuronas por acción del bloqueo de receptores NK1 ni en naïve ni en neuropatía, a ninguna de las concentraciones usadas.

### - Efecto sobre el wind-up

Se estudió el efecto sobre el wind-up en 2 neuronas en naïve (media en el número total de espigas= 59.5  $\pm$  23.5; media del índice de wind-up = 0.3  $\pm$  0.1 espigas/s). A la concentración de 3  $\mu$ M, el fármaco, tuvo un efecto inhibitorio, llegando a inhibirse completamente la señal en una de ellas y desapareciendo el fenómeno de wind-up en la otra, por lo que no se pueden describir efectos a la concentración 10  $\mu$ M.

En neuropatía sólo se pudo estudiar el efecto en una neurona (número total de espigas= 131; índice de wind-up = 0.7 espigas/s) en la que se vio inhibición del wind-up a 3  $\mu$ M y esta reducción se hizo más pronunciada a la concentración de 10  $\mu$ M (número total de espigas  $_{control}$ = 131, número total de espigas  $_{CP3\mu M}$ = 116 y número total de espigas  $_{CP10\mu M}$ = 66; índice de wind-up  $_{control}$  = 0.7 espigas/s, índice de wind-up  $_{CP3\mu M}$ = 0.7 espigas/s e índice de wind-up  $_{CP10\mu M}$ = 0.4 espigas/s).

### 3.2.3.b. Actividad espontánea

#### - Frecuencia de disparo

Se estudió la actividad espontánea en 22 neuronas en naïve y en 12 en neuropatía. La frecuencia de disparo de las neuronas naïve osciló de 0.1 a 9.3 Hz ( $f_{media}$ = 2.8  $\pm$  0.5 Hz) y en neuropatía de 0.3 a 11.5 Hz ( $f_{media}$ = 3.3  $\pm$  0.9 Hz).

En naïve, A 10  $\mu$ M se redujo la actividad espontánea (Test-t pareado,  $p < 0.001$ ) en 18 neuronas ( $f_{media}$   $_{control}$ = 2.8  $\pm$  0.6 Hz;  $f_{media}$   $_{CP10\mu M}$ = 1.4  $\pm$  0.4 Hz) y no la modificó en 2.

En neuropatía de las 12 neuronas estudiadas, a la concentración de 10  $\mu$ M se redujo la actividad espontánea en 10 neuronas (Test-t pareado,  $p < 0.05$ ) ( $f_{media}$   $_{control}$ = 3.7  $\pm$  1.2 Hz ;  $f_{media}$   $_{CP10\mu M}$ = 1.2  $\pm$  0.5 Hz) y en las 2 restantes no tuvo efecto.

En ambos casos, los efectos a 3  $\mu$ M fueron en la misma dirección que los observados a 10  $\mu$ M, pero más sutiles.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

No se hallaron diferencias en el porcentaje de reducción de actividad espontánea entre naïve y neuropatía.

### - Patrón de actividad espontánea

Se pudo estudiar el efecto sobre los patrones en 20 neuronas en naïve y en 10 en neuropatía. En naïve, de las 20 neuronas, 4 tenían un disparo regular, 3 lo hacían con ráfagas de corta duración, 3 con disparo en ráfagas de larga duración y 10 no mostraron ningún patrón.

De las 4 neuronas con disparo regular se vieron cambios por efecto del fármaco en 2 neuronas. En ambos casos se fue perdiendo parte de la regularidad por bloqueo de receptores NK1, y se redujo su frecuencia de disparo (en una de las neuronas la reducción fue de 9.3 a 6.1 Hz y en la otra de 2.4 a 1.6 Hz a 10 $\mu$ M).

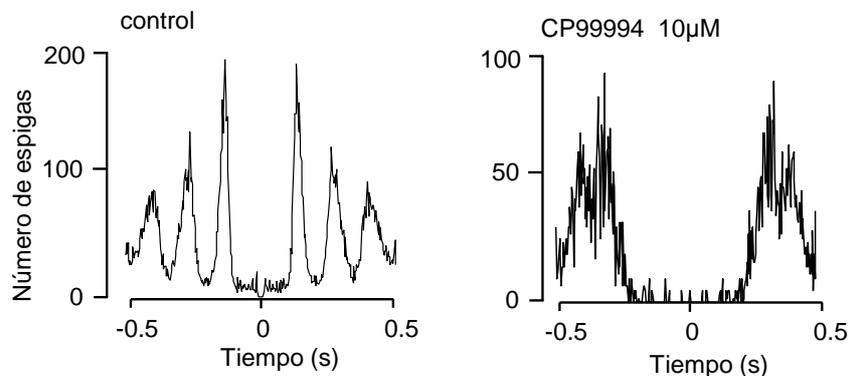


Figura 54: Autocorrelogramas del efecto de CP99994 a 10  $\mu$ M sobre una neurona con patrón regular. Se observa que a medida que aumenta la concentración, la neurona va perdiendo regularidad en su disparo.

De las 3 neuronas con un disparo en ráfagas de corta duración, en 1 de ellas, desapareció ese patrón, comenzando a disparar de manera irregular desde la concentración 3  $\mu$ M (su frecuencia se vio reducida de 4.9 Hz a 4 Hz a 10  $\mu$ M).

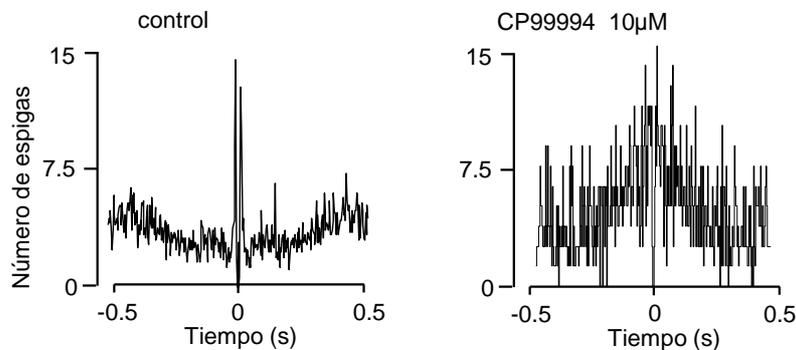


Figura 55: Autocorrelogramas del efecto de CP99994 a 10  $\mu$ M sobre una neurona con patrón en ráfagas de corta duración, en la que desaparece ese patrón por acción del fármaco.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

---

No se encontraron efectos en los patrones, ni en las neuronas con disparo en ráfagas de larga duración ni en las que no tenían patrón de disparo.

En neuropatía, de las 10 neuronas de estudio, 2 mostraron un patrón regular, 1 tenía un patrón en ráfagas de corta duración, 2 disparaban con ráfagas de larga duración y 5 no mostraron un patrón definido.

Solo se vio algún efecto en los patrones en las neuronas con disparo regular, perdiéndose parte de esta regularidad, además de reducir su frecuencia de disparo (en una de las neuronas la reducción fue de 7.0 a 2.7 Hz y en la otra de 6.3 a 1.3 Hz a  $10\mu\text{M}$ ).

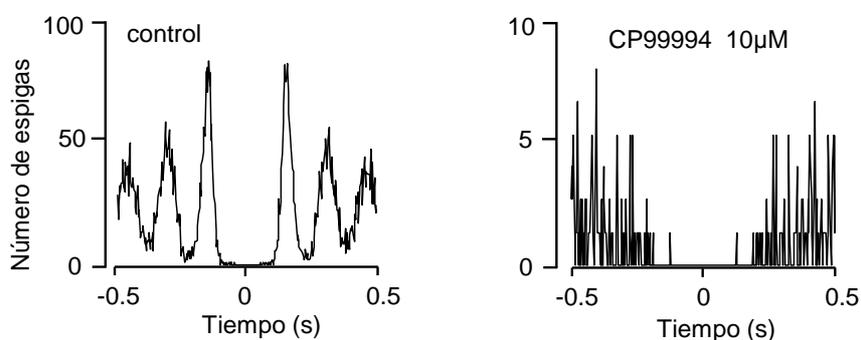


Figura 56: Autocorrelogramas del efecto de CP99994 a  $10\mu\text{M}$  sobre una neurona con patrón regular. Se observa que a medida que aumenta la concentración la neurona va perdiendo regularidad en su disparo.



### III.3. Efecto del fármaco experimental S1RA en diferentes modelos de sensibilización

Para estudiar el efecto del fármaco experimental S1RA en diferentes modelos de dolor, se escogió una concentración, a la cual, en los estudios en reflejos espinales, el fármaco tenía un efecto discreto en situación naïve. De esta manera, se escogió la concentración 3  $\mu$ M, para ver si el fármaco tenía un efecto mayor en situaciones patológicas con respecto a las fisiológicas.

Se probó el efecto en un total de 5 neuronas procedentes de animal naïve, 9 neuronas de animal neuropático y 8 neuronas de animal al que 20 h antes de la extracción de la médula se le habían inflamado ambas patas traseras.

#### III.3.1. Neuronas procedentes de animal naïve

Se evaluaron los efectos de S1RA 3  $\mu$ M en 5 neuronas.

De estas 5 neuronas se pudo determinar el input eléctrico en 3, de las cuales 1 respondía con intensidad de A $\beta$  y otras 2 con intensidad de A $\delta$ . No se observaron cambios en el input en ninguna de estas neuronas con S1RA.

Todas las neuronas registradas tuvieron respuestas al tren tipo1, es decir, no fue diferente su respuesta a la que se veía ante estímulos unitarios. No se apreciaron cambios en esta respuesta por efecto del fármaco (media en el número total de espigas=  $53.0 \pm 25.7$ ; media en el número total de espigas  $_{S1RA} = 39.8 \pm 13.5$ ).

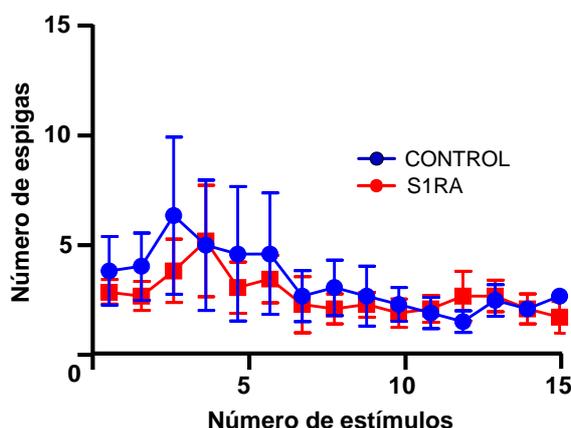


Figura 57: Efecto de S1RA 3  $\mu$ M en el número de espigas por estímulo en el tren (n=5). No existen diferencias en la respuesta por efecto del fármaco.

Todas las neuronas mostraron actividad espontánea aunque lo hicieron con una frecuencia de disparo baja, que osciló de 0.1 a 0.8 Hz ( $f_{media} = 0.4 \pm 0.1$  Hz). No se vieron efectos de S1RA en ninguna de las neuronas, manteniéndose para cada una la frecuencia de actividad inicial.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

De las 5 neuronas, sólo una mostró alguno de los patrones de disparo descritos anteriormente. Este patrón consistió en ráfagas de corta duración que se mantuvieron tras perfusión del fármaco. En el resto de neuronas, que tenían una actividad espontánea con disparos irregulares, no se vieron cambios.

### III.3.2. Neuronas procedentes de animal neuropático

Se evaluaron los efectos de S1RA en 9 neuronas procedentes de médulas de animal neuropático.

Se pudo determinar el input eléctrico en todas ellas, 2 de ellas respondieron con intensidad de A $\delta$ , 1 con intensidad C y las 6 restantes no respondieron a ninguna intensidad. No se observaron cambios en el input en ninguna de las neuronas con S1RA.

Se encontró respuesta tipo wind-up en 4 de las neuronas (media en el número total de espigas =  $120.0 \pm 31.3$ ; media del índice de wind-up =  $0.7 \pm 0.2$  espigas/s). Todas sufrieron una inhibición (media en el número total de espigas  $_{S1RA}$  =  $101.5 \pm 33$  y media del índice de wind-up  $_{S1RA}$  =  $0.5 \pm 0.2$  espigas/s), por efecto de S1RA.

Las 5 neuronas restantes tuvieron una respuesta al tren tipo 1. No se vio efecto inhibitorio en el número de espigas totales evocadas en el tren (media en el número total de espigas =  $45.6 \pm 24.3$ ; media en el número total de espigas  $_{S1RA}$  =  $38.6 \pm 25.8$ ), pero si en la reducción del número de espigas por estímulo.

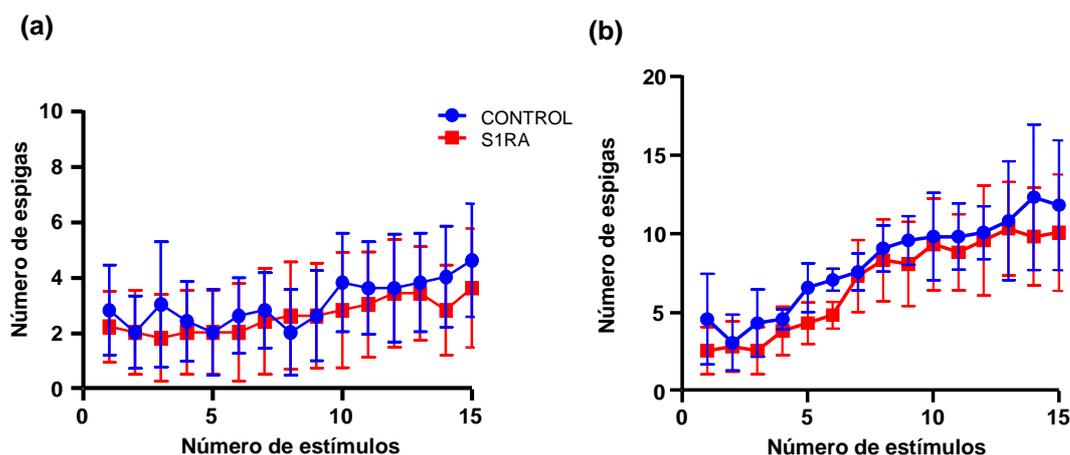


Figura 58: Efecto de S1RA 3  $\mu$ M sobre el número de espigas evocadas por estímulo en el tren en neuronas con respuesta tipo 1 (a) y en neuronas con respuesta tipo wind-up (b). En ambos casos la reducción observada fue estadísticamente significativa (ANOVA de 2 vías,  $p < 0.0001$ ).

De las 9 neuronas registradas, 8 tenían actividad espontánea. Las frecuencias oscilaron de 0.3 a 7.9 Hz ( $f_{media}$  =  $1.3 \pm 0.7$  Hz). Tras perfusión del S1RA las frecuencias de disparo

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

disminuyeron significativamente en 4 neuronas (Test-t pareado,  $p < 0.05$ ;  $f_{media\ control} = 1.7 \pm 0.8$  Hz,  $f_{media\ S1RA} = 1.1 \pm 0.7$  Hz), mientras en las otras 4 no tuvo efecto alguno.

Se estudió el efecto de S1RA en 2 neuronas con actividad espontánea regular, 1 con ráfagas de corta duración y 5 sin patrón definido. Se vio efecto en la neurona con disparo en ráfagas de corta duración en la que desapareció el patrón y su frecuencia de disparo pasó de 2.2 a 1.3 Hz.

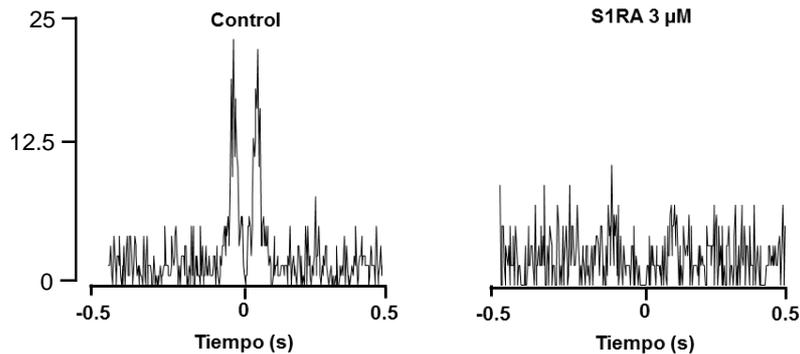


Figura 59: Efecto de S1RA 3  $\mu$ M sobre una neurona con disparo en ráfagas que perdió su patrón de disparo.

### III.3.3. Neuronas procedentes de animal inflamado

Se estudiaron los efectos de S1RA en 8 neuronas procedentes de animal inflamado. Se pudo determinar el input eléctrico en 6 de las 8 y todas ellas respondieron con intensidad de A $\beta$ . No se vieron cambios en el input por efecto del fármaco.

Todas las neuronas de este grupo, tuvieron una respuesta al tren tipo 1, que no sufrió cambios por efecto de S1RA (media en el número total de espigas =  $55.2 \pm 29.9$ ; media en el número total de espigas  $S1RA = 50.7 \pm 24.9$ ).

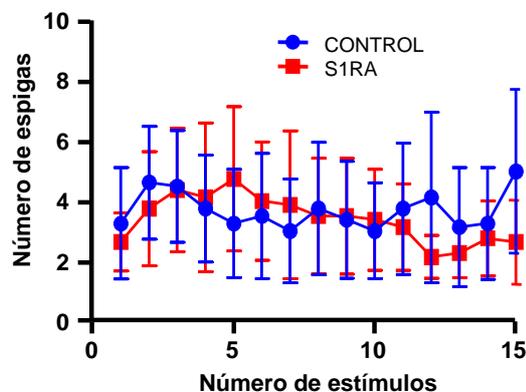


Figura 60: Efecto de S1RA 3  $\mu$ M en el número de espigas por estímulo en el tren ( $n=8$ ). No existen diferencias en la respuesta por efecto del fármaco.

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

---

De las 8 neuronas, todas excepto 1, mostraron actividad espontánea. Las frecuencias en este grupo variaron de 0.1 a 1.1 Hz ( $f_{media} = 0.5 \pm 0.1$  Hz). De las 7 neuronas con actividad espontánea, 6 sufrieron inhibición de ésta por efecto de S1RA (Test-t pareado,  $p < 0.05$ ;  $f_{media_{control}} = 0.5 \pm 0.1$  Hz,  $f_{media_{S1RA}} = 0.2 \pm 0.06$  Hz).

En relación al tipo de actividad espontánea, 3 neuronas tenían un disparo en ráfagas de corta duración y las otras 5 no mostraron ningún patrón. No se vio ningún efecto de S1RA en ninguno de los casos.

Se compararon los porcentajes de inhibición de la frecuencia espontánea, entre las neuronas de animal neuropático y animal inflamado, y no se encontraron diferencias en las inhibiciones.

## **IV. DISCUSIÓN**

Las preparaciones de rodaja de médula espinal, han demostrado ser preparaciones viables, en las que la anatomía y funcionalidad de la médula se mantiene (Baba et al., 1994; Bentley and Gent, 1994; Chery et al., 2000; Magnuson and Dickenson, 1991; Nashmi et al., 2002; Phelan and Newton, 2000; Schneider and Perl, 1988; Whyment et al., 2004; Flynn et al., 2011). Los resultados obtenidos en este capítulo, confirman la utilidad de la preparación de rodaja longitudinal para el estudio de circuitos neuronales de láminas superficiales, habiéndose obtenido registros de neuronas individuales que se mantenían estables en el tiempo. La estabilidad de la preparación ha permitido, además de realizar estudios descriptivos de las neuronas registradas, estudios farmacológicos.

La implantación de MMEs en la preparación de rodaja longitudinal, permite el estudio de circuitos neuronales, ya que se puede registrar más de una neurona de manera simultánea, pudiendo ver comportamientos diferentes ante el bloqueo de determinados receptores, de neuronas registradas a la vez y que se encuentran próximas entre ellas, y que por tanto, podrían estar formando parte de un mismo circuito.

Los resultados obtenidos, han demostrado que el uso de MMEs, es de gran utilidad para el estudio de la actividad espontánea. Esto permite no solo una optimización de los registros, ya que se obtiene un mayor número de datos por experimento, sino que abre la puerta al estudio de posibles relaciones entre la actividad intrínseca de neuronas próximas entre sí.

Sin embargo, para el estudio de actividad eléctrica evocada, las MMEs tienen sensores con un tamaño tal, que es capaz de registrar actividad de neuronas que se encuentran en las inmediaciones, y en un porcentaje elevado de las veces, se observa esa señal como un potencial de acción compuesto, no permitiendo la identificación de la neurona de estudio. Pese a estas dificultades encontradas en la identificación de señales unitarias por estimulación eléctrica, las MMEs han permitido estudiar el fenómeno de wind-up en estas neuronas superficiales. El wind-up en estas neuronas fue discreto, evocando un número reducido de espigas en comparación con el wind-up que se describe en láminas más profundas (Seagrove et al., 2004a).

### **III.1. Estudio de circuitos nociceptivos en animal naïve y animal neuropático.**

Al comparar los registros obtenidos de rodajas de medula espinal de ratón naïve y neuropático, las diferencias encontradas parecen ser sutiles.

En relación a la actividad eléctrica evocada, se ha encontrado en neuropatía, un incremento en la proporción de neuronas que tenían respuesta a intensidades bajas ( $A\beta$ ). Este aumento en el número de neuronas con respuesta tipo  $A\beta$ , ya ha sido descrito con anterioridad por otros

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

---

autores. Parece que existe un incremento de neuronas con respuesta a intensidad de fibra A en regiones donde normalmente llegan las terminaciones de fibras C, como es lámina II (Woolf et al., 1992; Koerber et al., 1994; Woolf et al., 1995). Se ha descrito, que tras lesión de fibras C, por anatomía de nervio periférico, las terminales de las fibras A ilesas, estarían brotando de manera colateral hacia lámina II (Mannion et al., 1996). Este aumento en la proporción de neuronas que responden a estímulos de baja intensidad podría estar relacionado con los fenómenos de alodinia mecánica, desencadenándose una respuesta nociceptiva por estimulación de baja intensidad.

En cuanto al fenómeno de wind-up, la proporción de neuronas que lo mostraron en ambos casos fue similar, lo que ya había sido descrito por otros autores en otros modelos de neuropatía (Laird and Bennett, 1993; Chapman et al., 1998).

En relación a la frecuencia con las que las neuronas disparaban de manera espontánea en ambos grupos, no se han encontrado diferencias, excepto en aquellas neuronas que respondían a intensidad de fibra A $\beta$ , que mostraron frecuencias mayores en neuropatía que en naïve. Este aumento en la frecuencia de disparo espontáneo, así como la mayor proporción de neuronas con estas respuestas a baja intensidad en neuropatía podrían ser de interés para el estudio de estos procesos de sensibilización.

Los patrones de actividad espontánea descritos en este capítulo, se han visto con anterioridad en neuronas de otras regiones del sistema nervioso. Así, en cerebro de rata, se han visto patrones de actividad en neuronas dopaminérgicas (Chiodo, 1988; Overton and Clark, 1997). El tipo de disparo en ráfagas ha sido de los más estudiados en estas neuronas dopaminérgicas, ya que se ha relacionado con aumentos fásicos de la liberación de dopamina (Gonon, 1988; Suaud-Chagny et al., 1992) y parece que podría tener un papel importante en la plasticidad sináptica y en el procesamiento de la información en cerebro.

También se han descrito disparos en ráfagas de corta duración, concretamente en dupletes, en registros de neuronas de láminas superficiales y se han relacionado con anomalías sensoriales asociadas a daño nervioso (Calvin et al., 1977; Devor et al., 2002; Waxman et al., 1999). Sin embargo, los estudios realizados en esta Tesis, no han mostrado diferencias en la proporción de neuronas que disparaban con este patrón concreto entre naïve y neuropatía. Sin embargo, sí se ha visto una mayor proporción de neuronas con patrones definidos en neuropatía frente a naïve, que podría indicar que los ritmos intrínsecos están sufriendo algún tipo de alteración como resultado de un daño en un nervio periférico.

El hecho de que no se hayan encontrado grandes diferencias en la actividad eléctrica de las neuronas de láminas superficiales de médula espinal entre animal naïve y neuropático, hace pensar que quizá haya una implicación mayor de la vía periférica o de regiones supraespinales que estén contribuyendo en mayor medida a la sensibilización central, por lo que una

preparación de médula aislada quizá no pueda proporcionar información suficiente en este tipo de procesos.

### **III.2. Estudios farmacológicos**

De manera general, parece que la transmisión sináptica de las neuronas de láminas superficiales se produce principalmente por receptores AMPA, mientras que la contribución de receptores NMDA es menor (Seagrove et al., 2004b; Doolen et al., 2012; Ruscheweyh and Sandkuhler, 2003) y parece que en situación de neuropatía se mantiene esta predominancia de receptores AMPA frente a receptores NMDA (Xu et al., 1995). Por otro lado, los receptores NK1 no parecen tener tampoco un papel importante ni en situación naïve ni tras neuropatía.

Sobre la actividad eléctrica unitaria evocada, sólo el bloqueo de receptores AMPA ha producido un efecto, necesitándose intensidades mayores para producir un potencial de acción, e incluso llegando a bloquearse totalmente la actividad a todas las intensidades probadas. Otros autores, ya han descrito este bloqueo, en estudios intracelulares, en neuronas de ganglio de raíz dorsal y en neuronas de lámina I y II (Lu and Perl, 2005).

Los efectos de los diferentes fármacos sobre wind-up muestran una tendencia a la inhibición de éste, pero debido al número de neuronas en las que en cada caso se ha probado, no se puede concluir que existan diferencias, ni entre los distintos fármacos, ni entre naïve y neuropatía. Sin embargo, se ha descrito en neuronas de lámina I en rata, una reducción del wind-up mayor por efecto del bloqueo por NBQX que por DAP5 (Seagrove et al., 2004), pareciendo que existe también una mayor implicación de receptores AMPA que de NMDA sobre este fenómeno.

En cuanto a la actividad espontánea, todos los fármacos han mostrado un efecto principalmente inhibitorio, no encontrándose diferencias entre los distintos grupos ni entre los diferentes fármacos.

Observando el número de neuronas que muestran una reducción en la frecuencia de actividad espontánea por efecto del bloqueo de receptores NK1, a la concentración más baja probada se observa que la proporción de neuronas en la que se vio el efecto es mayor en neuropatía que en naïve, mientras que a la concentración mayor, prácticamente todas las neuronas sufren una reducción en su actividad. Se sabe que tras lesión de un nervio existe una regulación a la baja en la liberación de SP, pero sin embargo hay una regulación a la alta del receptor, no solo en la región del asta dorsal correspondiente a las aferentes primarias lesionadas, sino en las regiones circundantes (Abbadie et al., 1996), lo que podría explicar el hecho de que el efecto inhibitorio se de en una proporción mayor de neuronas en neuropatía.

**Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto**

	NBQX		DAP5		CP99994			
	Näive n=25	SNI n=17	Näive n=4	SNI n=19	Näive n=22		SNI n=12	
					3µM	10µM	3µM	10µM
<b>Reduce</b>	21	11	3	10	12	18	8	10
<b>No efecto</b>	3	3	1	7	10	4	4	2
<b>Aumenta</b>	1	3		2				

Tabla 14: Tabla resumen del número de neuronas y los efectos de cada fármaco en la frecuencia de la actividad espontánea.

Al igual que sobre la actividad eléctrica evocada, el bloqueo de receptores AMPA mostró un mayor efecto sobre los patrones de disparo. Sin embargo estudios intracelulares en neuronas de lámina I con otro antagonista de receptores AMPA (CNQX) describen que no existen cambios en las neuronas con disparo regular por el bloqueo de los receptores (Szucs et al., 2013). Quizá esta diferencia en los efectos se deba a una menor selectividad de CNQX por los receptores AMPA con respecto a NBQX.

### **III.3. Efecto del fármaco experimental S1RA en diferentes modelos de sensibilización**

El receptor  $\sigma_1$  se encuentra ampliamente distribuido en médula espinal especialmente en láminas I y II (Alonso et al., 2000), y se ha descrito una mayor expresión en procesos neuropáticos (Roh et al., 2008).

Durante este bloque experimental, se ha tratado de ver el efecto del fármaco experimental S1RA, antagonista  $\sigma_1$ , en neuronas de láminas superficiales de animal inflamado y animal neuropático y comprar el efecto con animal naïve.

Los estudios en animal naïve no mostraron efecto del S1RA ni en la actividad espontánea ni en las respuestas evocadas eléctricamente. Estos resultados, están en consonancia con la idea de que el receptor  $\sigma_1$  no tiene un papel en la transmisión nociceptiva bajo condiciones fisiológicas. Estudios farmacológicos previos han mostrado que los ligandos para el receptor no influyen en las conductas nociceptivas en condiciones normales (Cendan et al., 2005b; Chien and Pasternak, 1994; Entrena et al., 2009b; Kim et al., 2008).

## Estudios farmacológicos en neuronas de láminas superficiales de médula espinal de ratón adulto

---

En neuropatía S1RA redujo la actividad espontánea en 4 de 8 neuronas de manera significativa. También se ha observado una reducción de la señal evocada en el tren de estímulos. Estos resultados podrían estar indicando una activación del receptor como resultado del proceso neuropático.

La implicación de receptores  $\sigma_1$  en neuropatía ha sido vista en otros modelos. Se ha descrito en un modelo de ligadura parcial de nervio ciático que la alodinia mecánica generada era menor en ratones heterocigotos que en ratones naïve para el receptor y nula en ratones KO (de la Puente et al., 2009). En un modelo de constricción de nervio ciático en rata, se ha observado una reducción en la alodinia por estímulos mecánicos (Roh et al., 2008). En un modelo de dolor neuropático inducido por un agente quimioterapéutico como el paclitaxel, se ha visto que el bloqueo  $\sigma_1$  inhibe el dolor. En ausencia del agente quimioterapéutico los valores en el test de comportamiento de alodinia mecánica y alodinia al frío fueron iguales en naïve y en KO, sin embargo tras administración de paclitaxel el animal naïve desarrolló alodinia y el KO no. Además se ha visto que la administración de un antagonista  $\sigma_1$  antes del paclitaxel previene la alodinia mecánica, así como la administración posterior del paclitaxel es capaz de revertirla (Nieto et al., 2012).

De igual manera S1RA, ha mostrado un efecto inhibitorio en la frecuencia de disparo de todas las neuronas excepto una, de las probadas en inflamación. Si bien este efecto inhibitorio no difiere del encontrado en neuropatía, sí parece que se da en una proporción mayor de neuronas. Estudios de comportamiento en diferentes modelos inflamatorios, ya habían mostrado un efecto por bloqueo del receptor (Entrena et al., 2009b; Cendan et al., 2005b; Cendan et al., 2005a; Kim et al., 2006). Sin embargo, en inflamación no se han encontrado efectos en la actividad evocada por un tren de estímulos.



# Discusión general

---



## DISCUSIÓN GENERAL

Tras un proceso inflamatorio o una lesión periférica, se produce una sensibilización de elementos periféricos y centrales del sistema nociceptivo. La llegada de estímulos a la médula espinal, procedentes del lugar de la lesión, produce hiperexcitabilidad de las neuronas espinales e incremento de la actividad motora y autonómica, que en última instancia se percibirá como un incremento en la sensación de dolor (Cervero, 2009; Entrena et al., 2009b).

Estos cambios que parece que suceden en las neuronas de médula espinal, son una diana terapéutica importante a la hora de buscar nuevos tratamientos para los procesos de dolor crónico. En este sentido, los estudios farmacológicos realizados en reflejos espinales, han mostrado patrones comunes en los efectos de fármacos con mecanismos de acción diferentes, que han permitido predecir la potencia analgésica de un fármaco experimental, el S1RA, tanto en situación naïve como tras un proceso inflamatorio, y su interacción con el sistema opioide. En este sentido, se puede concluir que S1RA tiene efectos similares a los vistos en el resto de fármacos analgésicos, que su efecto en inflamación es ligeramente mayor, y que su interacción con el sistema opioide no parece estar sucediendo a nivel espinal, algo que ya habían descrito con anterioridad otros autores (Mei and Pasternak, 2002).

Por otro lado, los estudios de neuronas individuales en rodaja de animal joven, no han mostrado grandes diferencias en la actividad eléctrica ni espontánea ni evocada, entre médulas procedentes de animales naïve y de animales neuropáticos. Si bien las diferencias no han sido sustanciales, si se ha observado una proporción mayor de neuronas en neuropatía que disparan de manera espontánea con un patrón o ritmo intrínseco. Además, se ha visto también en neuropatía, una mayor proporción de neuronas que responden a intensidades de fibra A $\beta$  y la frecuencia de actividad espontánea de éstas neuronas fue mayor que en naïve.

Los estudios farmacológicos con bloqueantes de receptores que de manera tradicional se han relacionado con procesos de sensibilización central, no han mostrado diferencias entre naïve y neuropatía, aunque sí muestran un papel predominante de la vía AMPA en la transmisión de la información nociceptiva.

El hecho de que no se hayan visto grandes diferencias entre situación naïve y neuropatía, hace pensar que quizá una preparación de médula espinal aislada, no sea suficiente para poder estudiar este tipo de procesos. En este sentido existen diversas hipótesis sobre la generación y mantenimiento de un proceso de sensibilización central a nivel espinal.

Algunos autores afirman que la aferente primaria es fundamental en la ganancia de actividad espontánea de las neuronas nociceptivas del asta dorsal y en la capacidad de respuesta de estas neuronas a estimulación cutánea. Concluyen que la sensibilización central amplifica más aún la señal, pero que estos mecanismos espinales son dependientes de periferia y por tanto

sin accionamiento aferente se puede dar una sensibilización central, pero de tipo temporal (Pitcher and Henry, 2008). Otros autores sugieren que la sensibilización central a nivel de la médula espinal se mantiene independientemente del input de la aferencia primaria (Sandkuhler and Liu, 1998). En este sentido, se ha visto que el input de periferia no parece ser suficiente para mantener las modificaciones en el procesamiento neuropático (Burgess et al., 2002; Sun et al., 2005; Xie et al., 2005).

Por otro lado, otros autores sugieren que la sensibilización central a nivel espinal requiere de un input facilitador constante desde estructuras supraespinales (Bian et al., 1998; Carlson et al., 2007; Gardell et al., 2003).

A pesar de la implicación de mecanismos periféricos y centrales en el dolor neuropático, la contribución relativa de los 2 sitios es aún desconocido. Con los datos obtenidos, lo que parece claro es, que una preparación de médula espinal aislada no parece ser suficiente para poder observar cambios en la actividad eléctrica de las neuronas sensoriales de láminas superficiales.

Sin embargo, éste modelo de rodaja de médula espinal de ratón adulto, sí ha permitido observar diferencias en los efectos del fármaco S1RA en diferentes modelos de sensibilización central. Parece ser que la vía  $\sigma_1$  no tiene implicación en la transmisión de dolor en animales naïve, y sin embargo parece tener un papel relevante en la modulación del dolor inflamatorio y neuropático (de la Puente et al., 2009). Los datos obtenidos en esta Tesis, indican que a concentraciones en las que el bloqueo de receptores  $\sigma_1$  no produce efecto alguno en situación naïve, en inflamación y neuropatía si se observan efectos inhibitorios.

De manera general, y a tenor de los datos obtenidos, parece que los receptores  $\sigma_1$  podrían ser una nueva y prometedora diana terapéutica para la modulación de las señales nociceptivas, principalmente en situaciones de sensibilización central, donde parece que el sistema  $\sigma_1$  cobra mayor relevancia.

# CONCLUSIONES

---



Los estudios referidos en esta Tesis Doctoral nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- Los reflejos segmentales de la médula espinal permiten la realización de estudios farmacológicos útiles para evaluar los efectos analgésicos de fármacos con potencial analgésico.
- El fármaco experimental S1RA tiene efectos similares a otros fármacos analgésicos en reflejos segmentales.
- El fármaco S1RA tiene un efecto inhibitorio ligeramente mayor sobre los reflejos segmentales de médulas procedentes de animales con un pretratamiento inflamatorio que en aquellas procedentes de animales naïve.
- No se ha visto interacción entre S1RA y morfina en los reflejos segmentales.
- El uso de matrices de multielectrodos es una herramienta útil para el estudio de la actividad espontánea en neuronas superficiales de la médula espinal. Además permiten estudiar neuronas diferentes bajo las mismas condiciones, observando efectos farmacológicos distintos en varias neuronas en un mismo registro. Estas matrices abren la puerta a estudios de correlaciones entre neuronas.
- No se aprecian diferencias sustanciales entre las señales obtenidas de neuronas superficiales en médulas de animal naïve y animal neuropático.
- Los receptores AMPA parecen tener especial importancia en la transmisión de señales sensoriales en las neuronas superficiales tanto en situación naïve como de neuropatía.
- S1RA tiene efectos depresores sobre neuronas superficiales procedentes de animales infamados o con axotomía que no son evidentes en animales naïve.

**De manera general se puede concluir que los receptores  $\sigma_1$  parecen ser una interesante diana terapéutica para el tratamiento de dolor crónico, debido a los efectos mayores observados en modelos de dolor inflamatorio y neuropatía.**



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbadie C, Brown JL, Mantyh PW, Basbaum AI. (1996). Spinal cord substance P receptor immunoreactivity increases in both inflammatory and nerve injury models of persistent pain. *Neuroscience*, ;**70**,201-209.
- Alonso G, Phan V, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, Anoaï M, Maurice T. (2000). Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, ;**97**,155-170.
- Attal N, Cruccu G, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, Sampaio C, Sindrup S, Wiffen P, EFNS Task Force. (2006). EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol*, ;**13**,1153-1169.
- Aydar E, Palmer CP, Klyachko VA, Jackson MB. (2002). The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron*, ;**34**,399-410.
- Baba H, Doubell TP, Woolf CJ. (1999). Peripheral inflammation facilitates Abeta fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*, ;**19**,859-867.
- Baba H, Yoshimura M, Nishi S, Shimoji K. (1994). Synaptic responses of substantia gelatinosa neurones to dorsal column stimulation in rat spinal cord in vitro. *J Physiol*, ;**478 ( Pt 1)**,87-99.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, ;**139**,267-284.
- Basbaum AI, Fields HL. (1984). Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci*, ;**7**,309-338.
- Basbaum AI, Jessell T. (2000). The Perception of Pain. In: Kandel ER, Schwartz J, Jessell T, editors. *Principles of Neuroscience*. New York: Appleton and Lange, 472–491.
- Beland B, Fitzgerald M. (2001). Mu- and delta-opioid receptors are downregulated in the largest diameter primary sensory neurons during postnatal development in rats. *Pain*, ;**90**,143-150.
- Bentley GN, Gent JP. (1994). Electrophysiological properties of substantia gelatinosa neurones in a novel adult spinal slice preparation. *J Neurosci Methods*, ;**53**,157-162.
- Benyamin R, Trescot AM, Datta S, Buenaventura R, Adlaka R, Sehgal N, Glaser SE, Vallejo R. (2008). Opioid complications and side effects. *Pain Physician*, ;**11**,S105-20.
- Besson JM, Chaouch A. (1987). Descending serotonergic systems. *Pain Headache*, ;**9**,64-100.

- Bialer M, Johannessen SI, Kupferberg HJ, Levy RH, Loiseau P, Perucca E. (1999). Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the fourth Eilat conference (EILAT IV). *Epilepsy Res*, ;**34**,1-41.
- Bian D, Ossipov MH, Zhong C, Malan TP,Jr, Porreca F. (1998). Tactile allodynia, but not thermal hyperalgesia, of the hindlimbs is blocked by spinal transection in rats with nerve injury. *Neurosci Lett*, ;**241**,79-82.
- Bingham B, Ajit SK, Blake DR, Samad TA. (2009). The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology. *Nat Clin Pract Rheumatol*, ;**5**,28-37.
- Bormann J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*, ;**21**,16-19.
- Brent PJ. (1996). Kappa opioid receptor agonists inhibit sigma-1 (sigma 1) receptor binding in guinea-pig brain, liver and spleen: autoradiographical evidence. *Brain Res*, ;**725**,155-165.
- Briggs I, Barnes JC. (1987). Actions of opioids on the dorsal root potential of the isolated spinal cord preparation of the neonate rat. *Neuropharmacology*, ;**26**,469-475.
- Brown AG, Fyffe RE. (1981). Form and function of dorsal horn neurones with axons ascending the dorsal columns in cat. *J Physiol*, ;**321**,31-47.
- Brown AG, Fyffe RE, Rose PK, Snow PJ. (1981). Spinal cord collaterals from axons of type II slowly adapting units in the cat. *J Physiol*, ;**316**,469-480.
- Brown AG, Rose PK, Snow PJ. (1977). The morphology of hair follicle afferent fibre collaterals in the spinal cord of the cat. *J Physiol*, ;**272**,779-797.
- Burgess PR, Horch KW. (1973). Specific regeneration of cutaneous fibers in the cat. *J Neurophysiol*, ;**36**,101-114.
- 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.
- Bymaster FP, Dreshfield-Ahmad LJ, Threlkeld PG, Shaw JL, Thompson L, Nelson DL, Hemrick-Luecke SK, Wong DT. (2001). Comparative affinity of duloxetine and venlafaxine for serotonin and norepinephrine transporters in vitro and in vivo, human serotonin receptor subtypes, and other neuronal receptors. *Neuropsychopharmacology*, ;**25**,871-880.
- Calvillo O, Ghignone M. (1986). Presynaptic effect of clonidine on unmyelinated afferent fibers in the spinal cord of the cat. *Neurosci Lett*, ;**64**,335-339.
- Calvin WH, Loeser JD, Howe JF. (1977). A neurophysiological theory for the pain mechanism of tic douloureux. *Pain*, ;**3**,147-154.

- Carlson JD, Maire JJ, Martenson ME, Heinricher MM. (2007). Sensitization of pain-modulating neurons in the rostral ventromedial medulla after peripheral nerve injury. *J Neurosci*, ;**27**,13222-13231.
- Cendan CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Baeyens JM. (2005a). Antinociceptive effects of haloperidol and its metabolites in the formalin test in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, ;**182**,485-493.
- Cerveró F, Iggo A, Ogawa H. (2003). Nociceptor-driven dorsal horn neurones in the lumbar spinal cord of the cat. *Pain*, ;**2**.5-24.
- Cervero F, Laird J. (1991). One Pain or Many Pains?. *Physiology*, ;**6**,268-273.
- Cendan CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Montoliu L, Baeyens JM. (2005b). Formalin-induced pain is reduced in sigma(1) receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol*, ;**511**,73-74.
- Cervero F. (2009). Spinal cord hyperexcitability and its role in pain and hyperalgesia. *Exp Brain Res*, ;**196**,129-137.
- Cervero F. (1994). Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiol Rev*, ;**74**,95-138.
- Cervero F, Shouenborg J, Sjolund BH, Waddell PJ. (1984). Cutaneous inputs to dorsal horn neurones in adult rats treated at birth with capsaicin. *Brain Res*, ;**301**,47-57.
- 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.
- Chapman V, Suzuki R, Dickenson AH. (1998). Electrophysiological characterization of spinal neuronal response properties in anaesthetized rats after ligation of spinal nerves L5-L6. *J Physiol*, ;**507 ( Pt 3)**,881-894.
- Chen Y, Hajipour AR, Sievert MK, Arbabian M, Ruoho AE. (2007). Characterization of the cocaine binding site on the sigma-1 receptor. *Biochemistry*, ;**46**,3532-3542.
- Chery N, Yu XH, de Koninck Y. (2000). Visualization of lamina I of the dorsal horn in live adult rat spinal cord slices. *J Neurosci Methods*, ;**96**,133-142.
- Chien CC, Pasternak GW. (1994). Selective antagonism of opioid analgesia by a sigma system. *J Pharmacol Exp Ther*, ;**271**,1583-1590.
- Chien CC, Pasternak GW. (1993). Functional antagonism of morphine analgesia by (+)-pentazocine: evidence for an anti-opioid sigma 1 system. *Eur J Pharmacol*, ;**250**,R7-8.
- Chiodo LA. (1988). Dopamine-containing neurons in the mammalian central nervous system: electrophysiology and pharmacology. *Neurosci Biobehav Rev*, ;**12**,49-91.

- Cobos EJ, Entrena JM, Nieto FR, Cendan CM, Del Pozo E. (2008). Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands. *Curr Neuropharmacol*, ;**6**,344-366.
- Coghill RC, McHaffie JG, Yen YF. (2003). Neural correlates of interindividual differences in the subjective experience of pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, ;**100**,8538-8542.
- Connor MA, Chavkin C. (1992). Ionic zinc may function as an endogenous ligand for the haloperidol-sensitive sigma 2 receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*, ;**42**,471-479.
- Cook AJ, Woolf CJ, Wall PD, McMahon SB. (1987). Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following C-primary afferent input. *Nature*, ;**325**,151-153.
- Davies JE, Roberts MH. (1981). 5-Hydroxytryptamine reduces substance P responses on dorsal horn interneurons: a possible interaction of neurotransmitters. *Brain Res*, ;**217**,399-404.
- Davies SN, Lodge D. (1987). Evidence for involvement of N-methylaspartate receptors in 'wind-up' of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. *Brain Res*, ;**424**,402-406.
- de la Puente B, Nadal X, Portillo-Salido E, Sanchez-Arroyos R, Ovalle S, Palacios G, Muro A, Romero L, Entrena JM, Baeyens JM, Lopez-Garcia JA, Maldonado R, Zamanillo D, Vela JM. (2009). Sigma-1 receptors regulate activity-induced spinal sensitization and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain*, ;**145**,294-303.
- Decosterd I, Woolf CJ. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, ;**87**,149-158.
- Del Mar LP, Cardenas CG, Scroggs RS. (1994). Serotonin inhibits high-threshold Ca<sup>2+</sup> channel currents in capsaicin-sensitive acutely isolated adult rat DRG neurons. *J Neurophysiol*, ;**72**,2551-2554.
- Delgado JM, Ferrús A, Mora F, Rubia FJ. (1998). Manual de Neurociencia. Ed. Síntesis.
- Devor M, Amir R, Rappaport ZH. (2002). Pathophysiology of trigeminal neuralgia: the ignition hypothesis. *Clin J Pain*, ;**18**,4-13.
- Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. (1971). Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol*, ;**104**,15-29.
- Diaz JL, Cuberes R, Berrocal J, Contijoch M, Christmann U, Fernandez A, Port A, Holenz J, Buschmann H, Laggner C, Serafini MT, Burgueno J, Zamanillo D, Merlos M, Vela JM, Almansa C. (2012). Synthesis and biological evaluation of the 1-arylpyrazole class of sigma(1) receptor antagonists: identification of 4-{2-[5-methyl-1-(naphthalen-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl]oxy}ethyl}morpholine (S1RA, E-52862). *J Med Chem*, ;**55**,8211-8224.

- Diaz JL, Zamanillo D, Corbera J, Baeyens JM, Maldonado R, Pericas MA, Vela JM, Torrens A. (2009). Selective sigma-1 (sigma1) receptor antagonists: emerging target for the treatment of neuropathic pain. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, ;**9**,172-183.
- Dickenson A, Besson J. (1997). The pharmacology of Pain. *Handbook of Experimental Pharmacology*.
- Dickenson AH, Sullivan AF. (1987). 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**,1235-1238.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*, ;**51**,7-61.
- Dmitrieva N, McMahon SB. (1996). Sensitisation of visceral afferents by nerve growth factor in the adult rat. *Pain*, ;**66**,87-97.
- Doolen S, Blake CB, Smith BN, Taylor BK. (2012). Peripheral nerve injury increases glutamate-evoked calcium mobilization in adult spinal cord neurons. *Mol Pain*, ;**8**,56-8069-8-56.
- Dooley DJ, Mieske CA, Borosky SA. (2000). Inhibition of K(+)-evoked glutamate release from rat neocortical and hippocampal slices by gabapentin. *Neurosci Lett*, ;**280**,107-110.
- Dworkin RH, Corbin AE, Young JP,Jr, Sharma U, LaMoreaux L, Bockbrader H, Garofalo EA, Poole RM. (2003). Pregabalin for the treatment of postherpetic neuralgia: a randomized, placebo-controlled trial. *Neurology*, ;**60**,1274-1283.
- Eisenach JC, De Kock M, Klimscha W. (1996). alpha(2)-adrenergic agonists for regional anesthesia. A clinical review of clonidine (1984-1995). *Anesthesiology*, ;**85**,655-674.
- Entrena JM, Cobos EJ, Nieto FR, Cendan CM, Baeyens JM, Del Pozo E. (2009a). Antagonism by haloperidol and its metabolites of mechanical hypersensitivity induced by intraplantar capsaicin in mice: role of sigma-1 receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, ;**205**,21-33.
- Entrena JM, Cobos EJ, Nieto FR, Cendan CM, Gris G, Del Pozo E, Zamanillo D, Baeyens JM. (2009b). Sigma-1 receptors are essential for capsaicin-induced mechanical hypersensitivity: studies with selective sigma-1 ligands and sigma-1 knockout mice. *Pain*, ;**143**,252-261.
- Evans RH. (1989). The pharmacology of segmental transmission in the spinal cord. *Prog Neurobiol*, ;**33**,255-279.
- Evans RH, Long SK. (1989). Primary afferent depolarization in the rat spinal cord is mediated by pathways utilising NMDA and non-NMDA receptors. *Neurosci Lett*, ;**100**,231-236.

- Faber ES, Chambers JP, Brugger F, Evans RH. (1997). Depression of A and C fibre-evoked segmental reflexes by morphine and clonidine in the in vitro spinal cord of the neonatal rat. *Br J Pharmacol*, ;**120**,1390-1396.
- Fink K, Dooley DJ, Meder WP, Suman-Chauhan N, Duffy S, Clusmann H, Gothert M. (2002). Inhibition of neuronal Ca(2+) influx by gabapentin and pregabalin in the human neocortex. *Neuropharmacology*, ;**42**,229-236.
- Fitzgerald M, Beggs S. (2001). The neurobiology of pain: developmental aspects. *Neuroscientist*, ;**7**,246-257.
- Flynn JR, Brichta AM, Galea MP, Callister RJ, Graham BA. (2011). A horizontal slice preparation for examining the functional connectivity of dorsal column fibres in mouse spinal cord. *J Neurosci Methods*, ;**200**,113-120.
- Galhardo V, Lima D. (1999). Structural characterization of marginal (lamina I) spinal cord neurons in the cat: a Golgi study. *J Comp Neurol*, ;**414**,315-333.
- Gardell LR, Vanderah TW, Gardell SE, Wang R, Ossipov MH, Lai J, Porreca F. (2003). Enhanced evoked excitatory transmitter release in experimental neuropathy requires descending facilitation. *J Neurosci*, ;**23**,8370-8379.
- Gee NS, Brown JP, Dissanayake VU, Offord J, Thurlow R, Woodruff GN. (1996). The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the alpha2delta subunit of a calcium channel. *J Biol Chem*, ;**271**,5768-5776.
- Gobel S, Falls WM. (1979). Anatomical observations of horseradish peroxidase-filled terminal primary axonal arborizations in layer II of the substantia gelatinosa of Rolando. *Brain Res*, ;**175**,335-340.
- Gonon FG. (1988). Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry. *Neuroscience*, ;**24**,19-28.
- Guitart X, Codony X, Monroy X. (2004). Sigma receptors: biology and therapeutic potential. *Psychopharmacology (Berl)*, ;**174**,301-319.
- Han ZS, Zhang ET, Craig AD. (1998). Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat Neurosci*, ;**1**,218-225.
- Handwerker HO, Iggo A, Zimmermann M. (1975). Segmental and supraspinal actions on dorsal horn neurons responding to noxious and non-noxious skin stimuli. *Pain*, ;**1**,147-165.
- Hanner M, Moebius FF, Flandorfer A, Knaus HG, Striessnig J, Kempner E, Glossmann H. (1996). Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, ;**93**,8072-8077.

- Harada Y, Hara H, Sukamoto T. (1994). Characterization of specific (+)-[3H]N-allylnormetazocine and [3H]1,3-di(2-tolyl)guanidine binding sites in porcine gastric fundic mucosa. *J Pharmacol Exp Ther*, ;**269**,905-910.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, ;**32**,77-88.
- Hassenbusch SJ, Gunes S, Wachsman S, Willis KD. (2002). Intrathecal clonidine in the treatment of intractable pain: a phase I/II study. *Pain Med*, ;**3**,85-91.
- Hayashi T, Su TP. (2001). Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, ;**98**,491-496.
- Headley PM, Parsons CG, West DC. (1987). The role of N-methylaspartate receptors in mediating responses of rat and cat spinal neurones to defined sensory stimuli. *J Physiol*, ;**385**,169-188.
- Hedo G, Laird JM, Lopez-Garcia JA. (1999). Time-course of spinal sensitization following carrageenan-induced inflammation in the young rat: a comparative electrophysiological and behavioural study in vitro and in vivo. *Neuroscience*, ;**92**,309-318.
- Hellewell SB, Bowen WD. (1990). A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma (PC12) cells: decreased affinity for (+)-benzomorphans and lower molecular weight suggest a different sigma receptor form from that of guinea pig brain. *Brain Res*, ;**527**,244-253.
- 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.
- Hokfelt T, Arvidsson U, Cullheim S, Millhorn D, Nicholas AP, Pieribone V, Seroogy K, Ulfhake B. (2000). Multiple messengers in descending serotonin neurons: localization and functional implications. *J Chem Neuroanat*, ;**18**,75-86.
- Joris J, Costello A, Dubner R, Hargreaves KM. (1990). Opiates suppress carrageenan-induced edema and hyperthermia at doses that inhibit hyperalgesia. *Pain*, ;**43**,95-103.
- Kawamura K, Ishiwata K, Tajima H, Ishii S, Matsuno K, Homma Y, Senda M. (2000). In vivo evaluation of [(11)C]SA4503 as a PET ligand for mapping CNS sigma(1) receptors. *Nucl Med Biol*, ;**27**,255-261.
- Kim FJ, Kovalyshyn I, Burgman M, Neilan C, Chien CC, Pasternak GW. (2010). Sigma 1 receptor modulation of G-protein-coupled receptor signaling: potentiation of opioid transduction independent from receptor binding. *Mol Pharmacol*, ;**77**,695-703.
- Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Seo HS, Kwon YB, Han HJ, Kim KW, Beitz AJ, Lee JH. (2008). Activation of the spinal sigma-1 receptor enhances NMDA-induced pain via PKC- and PKA-dependent phosphorylation of the NR1 subunit in mice. *Br J Pharmacol*, ;**154**,1125-1134.

- Kim HW, Kwon YB, Roh DH, Yoon SY, Han HJ, Kim KW, Beitz AJ, Lee JH. (2006). Intrathecal treatment with sigma1 receptor antagonists reduces formalin-induced phosphorylation of NMDA receptor subunit 1 and the second phase of formalin test in mice. *Br J Pharmacol*, ;**148**,490-498.
- King AE, López-García JA, Cumberbatch M. (1992). Antagonism of synaptic potentials in ventral horn neurons by 6-cyano-7nitroquinoxaline-2,3-dione: a study in the rat spinal cord in vitro. *Br. J. Pharmacol*, ;**107**, 375-381.
- Koerber HR, Mirnics K, Brown PB, Mendell LM. (1994). Central sprouting and functional plasticity of regenerated primary afferents. *J Neurosci*, ;**14**,3655-3671.
- Kwiat GC, Basbaum AI. (1992). The origin of brainstem noradrenergic and serotonergic projections to the spinal cord dorsal horn in the rat. *Somatosens Mot Res*, ;**9**,157-173.
- Laird JM, Bennett GJ. (1993). An electrophysiological study of dorsal horn neurons in the spinal cord of rats with an experimental peripheral neuropathy. *J Neurophysiol*, ;**69**,2072-2085.
- Lakke EA. (1997). The projections to the spinal cord of the rat during development: a timetable of descent. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, ;**135**,I-XIV, 1-143.
- Larkman PM, Kelly JS. (1997). Modulation of IH by 5-HT in neonatal rat motoneurons in vitro: mediation through a phosphorylation independent action of cAMP. *Neuropharmacology*, ;**36**,721-733.
- Latremoliere A, Woolf CJ. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*, ;**10**,895-926.
- Li JL, Kaneko T, Nomura S, Li YQ, Mizuno N. (1997). Association of serotonin-like immunoreactive axons with nociceptive projection neurons in the caudal spinal trigeminal nucleus of the rat. *J Comp Neurol*, ;**384**,127-141.
- Lima D, Coimbra A. (1986). A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. *J Comp Neurol*, ;**244**,53-71.
- Lima D, Coimbra A. (1983). The neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. A study based on reconstructions of serially sectioned cells. *Anat Embryol (Berl)*, ;**167**,273-288.
- Lopez-Garcia JA. (1998). Serotonergic modulation of the responses to excitatory amino acids of rat dorsal horn neurons in vitro: implications for somatosensory transmission. *Eur J Neurosci*, ;**10**,1341-1349.
- Lopez-Garcia JA, King AE. (1994). Membrane properties of physiologically classified rat dorsal horn neurons in vitro: correlation with cutaneous sensory afferent input. *Eur J Neurosci*. ;**6**, 998-1007.

- Lopez-Garcia JA, King AE. (1996). Pre- and post-synaptic actions of 5-hydroxytryptamine in the rat lumbar dorsal horn in vitro: implications for somatosensory transmission. *Eur J Neurosci*, ;**8**,2188-2197.
- Lu Y, Perl ER. (2005). Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J Neurosci*, ;**25**,3900-3907.
- Magnuson DS, Dickenson AH. (1991). Lamina-specific effects of morphine and naloxone in dorsal horn of rat spinal cord in vitro. *J Neurophysiol*, ;**66**,1941-1950.
- Maneuf YP, Hughes J, McKnight AT. (2001). Gabapentin inhibits the substance P-facilitated K(+)-evoked release of [(3)H]glutamate from rat caudial trigeminal nucleus slices. *Pain*, ;**93**,191-196.
- Mannion RJ, Doubell TP, Coggeshall RE, Woolf CJ. (1996). Collateral sprouting of uninjured primary afferent A-fibers into the superficial dorsal horn of the adult rat spinal cord after topical capsaicin treatment to the sciatic nerve. *J Neurosci*, ;**16**,5189-5195.
- Marsh DF, Hatch DJ, Fitzgerald M. (1997). Opioid systems and the newborn. *Br J Anaesth*, ;**79**,787-795.
- Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. (1976). The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther*, ;**197**,517-532.
- Matthews EA, Dickenson AH. (2001). Effects of spinally delivered N- and P-type voltage-dependent calcium channel antagonists on dorsal horn neuronal responses in a rat model of neuropathy. *Pain*, ;**92**,235-246.
- McClelland D, Evans RM, Barkworth L, Martin DJ, Scott RH. (2004). A study comparing the actions of gabapentin and pregabalin on the electrophysiological properties of cultured DRG neurones from neonatal rats. *BMC Pharmacol*, ;**4**,14.
- Mei J, Pasternak GW. (2002). Sigma1 receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, ;**300**,1070-1074.
- Mendell LM. (1966). Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Exp Neurol*, ;**16**,316-332.
- Mendell LM, Wall PD. (1965). Responses of Single Dorsal Cord Cells to Peripheral Cutaneous Unmyelinated Fibres. *Nature*, ;**206**,97-99.
- Millan MJ. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, ;**66**,355-474.

- Millan MJ. (1997). The Role of Descending Noradrenergic and Serotonergic Pathways in the Modulation of Nociception: Focus on Receptor Multiplicity . The pharmacology of pain. Handbook of experimental pharmacology; **130**, 385-446.
- Moebius FF, Reiter RJ, Hanner M, Glossmann H. (1997). High affinity of sigma 1-binding sites for sterol isomerization inhibitors: evidence for a pharmacological relationship with the yeast sterol C8-C7 isomerase. *Br J Pharmacol*, ;**121**,1-6.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ. (2002). Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci*, ;**22**,6724-6731.
- Munro G, Storm A, Hansen MK, Dyhr H, Marcher L, Erichsen HK, Sheykhzade M. (2012). The combined predictive capacity of rat models of algogen-induced and neuropathic hypersensitivity to clinically used analgesics varies with nociceptive endpoint and consideration of locomotor function. *Pharmacol Biochem Behav*, ;**101**,465-478.
- Muto Y, Sakai A, Sakamoto A, Suzuki H. (2012). Activation of NK(1) receptors in the locus coeruleus induces analgesia through noradrenergic-mediated descending inhibition in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol*, ;**166**,1047-1057.
- Nashmi R, Velumian AA, Chung I, Zhang L, Agrawal SK, Fehlings MG. (2002). Patch-clamp recordings from white matter glia in thin longitudinal slices of adult rat spinal cord. *J Neurosci Methods*, ;**117**,159-166.
- Nieto FR, Cendan CM, Sanchez-Fernandez C, Cobos EJ, Entrena JM, Tejada MA, Zamanillo D, Vela JM, Baeyens JM. (2012). Role of sigma-1 receptors in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. *J Pain*, ;**13**,1107-1121.
- Novakova M, Ela C, Barg J, Vogel Z, Hasin Y, Eilam Y. (1995). Inotropic action of sigma receptor ligands in isolated cardiac myocytes from adult rats. *Eur J Pharmacol*, ;**286**,19-30.
- Ola MS, Moore P, El-Sherbeny A, Roon P, Agarwal N, Sarthy VP, Casellas P, Ganapathy V, Smith SB. (2001). Expression pattern of sigma receptor 1 mRNA and protein in mammalian retina. *Brain Res Mol Brain Res*, ;**95**,86-95.
- Overton PG, Clark D. (1997). Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Brain Res Rev*, ;**25**,312-334.
- Parenti C, Marrazzo A, Arico G, Parenti R, Pasquinucci L, Ronsisvalle S, Ronsisvalle G, Scoto GM. (2014). The antagonistic effect of the sigma 1 receptor ligand (+)-MR200 on persistent pain induced by inflammation. *Inflamm Res*, ;**63**,231-237.
- Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. (2004). Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci*, ;**74**,1445-1463.

- Perahia DG, Pritchett YL, Desai D, Raskin J. (2006). Efficacy of duloxetine in painful symptoms: an analgesic or antidepressant effect? *Int Clin Psychopharmacol*, ;**21**,311-317.
- Phelan KD, Newton BW. (2000). Intracellular recording of lamina X neurons in a horizontal slice preparation of rat lumbar spinal cord. *J Neurosci Methods*, ;**100**,145-150.
- Pitcher GM, Henry JL. (2008). Governing role of primary afferent drive in increased excitation of spinal nociceptive neurons in a model of sciatic neuropathy. *Exp Neurol*, ;**214**,219-228.
- Prescott SA, De Koninck Y. (2002). Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. *J Physiol*, ;**539**,817-836.
- Matsumoto RR, Bowen WD, and Su TP. (2007). Sigma Receptors: chemistry, cell biology and clinical implications. Springer Science-KBusiness Media, LLC. New York.
- Rethelyi M, Szentagothai J. (1973). Distribution and connections of afferent fibers in the spinal cord. In A. Iggo (ed): Handbook of Sensory Physiology II. Heidelberg: Springer-Verlag, 207-252.
- Ritz LA, Greenspan JD. (1985). Morphological features of lamina V neurons receiving nociceptive input in cat sacrocaudal spinal cord. *J Comp Neurol*, ;**238**,440-452.
- Roh DH, Kim HW, Yoon SY, Seo HS, Kwon YB, Kim KW, Han HJ, Beitz AJ, Na HS, Lee JH. (2008). Intrathecal injection of the sigma(1) receptor antagonist BD1047 blocks both mechanical allodynia and increases in spinal NR1 expression during the induction phase of rodent neuropathic pain. *Anesthesiology*, ;**109**,879-889.
- Roman FJ, Pascaud X, Duffy O, Vauche D, Martin B, Junien JL. (1989). Neuropeptide Y and peptide YY interact with rat brain sigma and PCP binding sites. *Eur J Pharmacol*, ;**174**,301-302.
- Romero L, Zamanillo D, Nadal X, Sanchez-Arroyos R, Rivera-Arconada I, Dordal A, Montero A, Muro A, Bura A, Segales C, Laloya M, Hernandez E, Portillo-Salido E, Escriche M, Codony X, Encina G, Burgueno J, Merlos M, Baeyens JM, Giraldo J, Lopez-Garcia JA, Maldonado R, Plata-Salaman CR, Vela JM. (2012). Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. *Br J Pharmacol*, ;**166**,2289-2306.
- Rosenstock J, Tuchman M, LaMoreaux L, Sharma U. (2004). Pregabalin for the treatment of painful diabetic peripheral neuropathy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Pain*, ;**110**,628-638.
- Roza C, Laird JM, Cerveró F. (1998). Spinal mechanisms underlying persistent pain and referred hyperalgesia in rats with an experimental ureteric stone. *J Neurophysiol*, ;**79**,1603-1612.

- Roza C, Laird J, Souslova V, Wood J, Cerveró F. (2003). The tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> channel Nav1.8 is essential for the expression of spontaneous activity in damaged sensory axons of mice. *J Physiol*, ;**550**,921-926.
- Roza C, Castillejo S, López-García JA. (2011). Accumulation of Kv7.2 channels in putative ectopic transduction zones of mice nerve-end neuromas. *Molecular Pain*, ;**7**,58-64.
- Ruda MA, Bennett GJ, Dubner R. (1986). Neurochemistry and neural circuitry in the dorsal horn. *Prog Brain Res*, ;**66**,219-268.
- Ruscheweyh R, Ikeda H, Heinke B, Sandkuhler J. (2004). Distinctive membrane and discharge properties of rat spinal lamina I projection neurones in vitro. *J Physiol*, ;**555**,527-543.
- Ruscheweyh R, Sandkuhler J. (2003). Epileptiform activity in rat spinal dorsal horn in vitro has common features with neuropathic pain. *Pain*, ;**105**,327-338.
- Russo RE, Hounsgaard J. (1999). Dynamics of intrinsic electrophysiological properties in spinal cord neurones. *Prog Biophys Mol Biol*, ;**72**,329-365.
- Samad T, Abdi S. (2001). Cyclooxygenase-2 and antagonists in pain management. *Curr Opin Anaesthesiol*, ;**14**,527-532.
- Sanchez-Fernandez C, Nieto FR, Gonzalez-Cano R, Artacho-Cordon A, Romero L, Montilla-Garcia A, Zamanillo D, Baeyens JM, Entrena JM, Cobos EJ. (2013). Potentiation of morphine-induced mechanical antinociception by sigma(1) receptor inhibition: role of peripheral sigma(1) receptors. *Neuropharmacology*, ;**70**,348-358.
- Sandkuhler J. (2000). Learning and memory in pain pathways. *Pain*, ;**88**,113-118.
- Sandkuhler J, Liu X. (1998). Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury. *Eur J Neurosci*, ;**10**,2476-2480.
- Schaible HG, Schmidt RF. (1985). Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. *J Neurophysiol*, ;**54**,1109-1122.
- Schneider SP, Perl ER. (1988). Comparison of primary afferent and glutamate excitation of neurons in the mammalian spinal dorsal horn. *J Neurosci*, ;**8**,2062-2073.
- Schouenborg J, Sjolund 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**,1108-1121.
- Seagrove LC, Suzuki R, Dickenson AH. (2004). Electrophysiological characterisations of rat lamina I dorsal horn neurones and the involvement of excitatory amino acid receptors. *Pain*, ;**108**,76-87.
- Serra, J., 2006. Tratado de dolor neuropático. Médica Panamericana, Madrid.

- Siddall PJ, Molloy AR, Walker S, Mather LE, Rutkowski SB, Cousins MJ. (2000). The efficacy of intrathecal morphine and clonidine in the treatment of pain after spinal cord injury. *Anesth Analg*, ;**91**,1493-1498.
- Simeone TA, Sanchez RM, Rho JM. (2004). Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *J Child Neurol*, ;**19**,343-60; discussion 361.
- Stamford JA. (1995). Descending control of pain. *Br J Anaesth*, ;**75**,217-227.
- Stanfa L, Dickenson A. (1995). Spinal opioid systems in inflammation. *Inflamm Res*, ;**44**,231-241.
- Stewart W, Maxwell DJ. (2000). Morphological evidence for selective modulation by serotonin of a subpopulation of dorsal horn cells which possess the neurokinin-1 receptor. *Eur J Neurosci*, ;**12**,4583-4588.
- Su TP, Schell SE, Ford-Rice FY, London ED. (1988). Correlation of inhibitory potencies of putative antagonists for sigma receptors in brain and spleen. *Eur J Pharmacol*, ;**148**,467-470.
- Suaud-Chagny MF, Chergui K, Chouvet G, Gonon F. (1992). Relationship between dopamine release in the rat nucleus accumbens and the discharge activity of dopaminergic neurons during local in vivo application of amino acids in the ventral tegmental area. *Neuroscience*, ;**49**,63-72.
- Sun Q, Tu H, Xing GG, Han JS, Wan Y. (2005). Ectopic discharges from injured nerve fibers are highly correlated with tactile allodynia only in early, but not late, stage in rats with spinal nerve ligation. *Exp Neurol*, ;**191**,128-136.
- Szucs P, Luz LL, Pinho R, Aguiar P, Antal Z, Tiong SY, Todd AJ, Safronov BV. (2013). Axon diversity of lamina I local-circuit neurons in the lumbar spinal cord. *J Comp Neurol*, ;**521**,2719-2741.
- Tal M, Devor M. (1992). Ectopic discharge in injured nerves: comparison of trigeminal and somatic afferents. *Brain Res*, ;**579**,148-151.
- Tavares I, Lima D, Coimbra A. (1996). The ventrolateral medulla of the rat is connected with the spinal cord dorsal horn by an indirect descending pathway relayed in the A5 noradrenergic cell group. *J Comp Neurol*, ;**374**,84-95.
- Teasell RW, Mehta S, Aubut JA, Foulon B, Wolfe DL, Hsieh JT, Townson AF, Short C, Spinal Cord Injury Rehabilitation Evidence Research Team. (2010). A systematic review of pharmacologic treatments of pain after spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*, ;**91**,816-831.
- Tejada MA, Montilla-Garcia A, Sanchez-Fernandez C, Entrena JM, Perazzoli G, Baeyens JM, Cobos EJ. (2014). Sigma-1 receptor inhibition reverses acute inflammatory hyperalgesia in mice: role of peripheral sigma-1 receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, ;**231**,3855-3869.

- Thomson AM, West DC, Headley PM. (1989). Membrane Characteristics and Synaptic Responsiveness of Superficial Dorsal Horn Neurons in a Slice Preparation of Adult Rat Spinal Cord. *Eur J Neurosci*, ;**1**,479-488.
- Thor KB, Kirby M, Viktrup L. (2007). Serotonin and noradrenaline involvement in urinary incontinence, depression and pain: scientific basis for overlapping clinical efficacy from a single drug, duloxetine. *Int J Clin Pract*, ;**61**,1349-1355.
- Tucker DC, Saper CB, Ruggiero DA, Reis DJ. (1987). Organization of central adrenergic pathways: I. Relationships of ventrolateral medullary projections to the hypothalamus and spinal cord. *J Comp Neurol*, ;**259**,591-603.
- Vidal-Torres A, Fernandez-Pastor B, Carceller A, Vela JM, Merlos M, Zamanillo D. (2014). Effects of the selective sigma-1 receptor antagonist S1RA on formalin-induced pain behavior and neurotransmitter release in the spinal cord in rats. *J Neurochem*, ;**129**,484-494.
- Walker SM, Grafe M, Yaksh TL. (2012). Intrathecal clonidine in the neonatal rat: dose-dependent analgesia and evaluation of spinal apoptosis and toxicity. *Anesth Analg*, ;**115**,450-460.
- Wall PD, Merrill EG, Yaksh TL. (1979). Responses of single units in laminae 2 and 3 of cat spinal cord. *Brain Res*, ;**160**,245-260.
- Wang SY, Calderon J, Kuo Wang G. (2010). Block of neuronal Na<sup>+</sup> channels by antidepressant duloxetine in a state-dependent manner. *Anesthesiology*, ;**113**,655-665.
- Waxman SG, Cummins TR, Dib-Hajj S, Fjell J, Black JA. (1999). Sodium channels, excitability of primary sensory neurons, and the molecular basis of pain. *Muscle Nerve*, ;**22**,1177-1187.
- Westin BD, Walker SM, Deumens R, Grafe M, Yaksh TL. (2010). Validation of a preclinical spinal safety model: effects of intrathecal morphine in the neonatal rat. *Anesthesiology*, ;**113**,183-199.
- Whyment AD, Wilson JM, Renaud LP, Spanswick D. (2004). Activation and integration of bilateral GABA-mediated synaptic inputs in neonatal rat sympathetic preganglionic neurones in vitro. *J Physiol*, ;**555**,189-203.
- Willis, W.D., Coggeshall, R.E., 2004. Sensory mechanisms of the spinal cord. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*, ;**111**,544-547.
- Wolfe SA, Jr, Culp SG, De Souza EB. (1989). Sigma-receptors in endocrine organs: identification, characterization, and autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal, testis, and ovary. *Endocrinology*, ;**124**,1160-1172.

- Woolf CJ, Shortland P, Reynolds M, Ridings J, Doubell T, Coggeshall RE. (1995). Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. *J Comp Neurol*, ;**360**,121-134.
- Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. (1992). Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*, ;**355**,75-78.
- Woolf CJ, 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.
- Woolf CJ. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, ;**306**,686-688.
- Xie W, Strong JA, Meij JT, Zhang JM, Yu L. (2005). Neuropathic pain: early spontaneous afferent activity is the trigger. *Pain*, ;**116**,243-256.
- Xu XJ, Zhang X, Hokfelt T, Wiesenfeld-Hallin Z. (1995). Plasticity in spinal nociception after peripheral nerve section: reduced effectiveness of the NMDA receptor antagonist MK-801 in blocking wind-up and central sensitization of the flexor reflex. *Brain Res*, ;**670**,342-346.
- Yaksh TL. (1985). Pharmacology of spinal adrenergic systems which modulate spinal nociceptive processing. *Pharmacol Biochem Behav*, ;**22**,845-858.
- Zhang X, Bao L, Shi TJ, Ju G, Elde R, Hokfelt T. (1998). Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. *Neuroscience*, ;**82**,223-240.
- Zochodne DW, Cheng C, Miampamba M, Hargreaves K, Sharkey KA. (2001). Peptide accumulations in proximal endbulbs of transected axons. *Brain Res*, ;**902**,40-50.