

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**Papel de los canales de potasio tipo M
en la transmisión nociceptiva a través de la
médula espinal**

Tesis Doctoral

Iván Rivera Arconada

2006

ABREVIATURAS

ADP	Despolarización después del potencial de acción
AHP	Hiperpolarización después del potencial de acción
AMPA	Ácido aminometil fosfónico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
BFNC	Convulsiones familiares neonatales benignas
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CHO	Células de ovario de hámster chino
DAG	Diacil glicerol
DMSO	Dimetil sulfóxido
DRG	Ganglio de la raíz dorsal
EEM	Error estándar de la media
ERKs	Kinasas reguladas por señales extracelulares
GABA	Ácido γ amino butírico
HEK	Células embrionarias de hígado humano
IP ₃	Inositol trifosfato
LCRA	Líquido cefalorraquídeo artificial
NK-1	Neuroquinina 1
NMDA	Ácido N-metil D-aspártico
PBS	Tampón fosfato salino
PIP ₂	Fosfatidil inositol difosfato
PKC	Proteína kinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PTX	Picrotoxina
RMS	Reflejo monosináptico
SCG	Ganglio cervical superior
TEA	Tetraetilamonio
TTX	Tetrodotoxina
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

RESUMEN

La médula espinal es el lugar donde se produce la primera integración de la información somatosensorial procedente de los receptores periféricos. Entre estos receptores se encuentran los nociceptores que se encargan de detectar estímulos dañinos o potencialmente dañinos para la integridad de los tejidos. El procesamiento temprano de la información nociceptiva tiene lugar en las neuronas espinales, por lo que una actuación a este primer nivel puede condicionar el resto de la transmisión nociceptiva. Por esta razón la modulación de los circuitos espinales se ha convertido en una estrategia de gran interés para la generación de fármacos analgésicos y anestésicos. En esta Tesis Doctoral se explora la posibilidad de regular los circuitos espinales nociceptivos utilizando moduladores de la corriente M de potasio. La corriente M de potasio, producida por asociaciones de canales dependientes de voltaje de la familia KCNQ (Kv7), posee unas características funcionales que le confieren la capacidad de actuar como un freno de la excitabilidad neuronal.

Los objetivos de esta Tesis Doctoral consistían en estudiar la presencia de corrientes M de potasio funcionales en los diferentes elementos que forman parte de la médula espinal y conocer los efectos de la modulación de la corriente sobre cada uno de ellos.

Para cumplir estos objetivos se utilizaron diferentes técnicas electrofisiológicas y farmacológicas en un modelo de médula espinal hemiseccionada extraída de ratas jóvenes (de 7 a 12 días de edad). La médula era mantenida en condiciones *in vitro* en el interior de una cámara de registro electrofisiológico. En estas condiciones se activaban las aferentes primarias utilizando estimulación eléctrica aplicada a través de un electrodo situado en una raíz dorsal. Se utilizaron dos tipos de estimulación para activar únicamente fibras no nociceptivas o fibras aferentes de todos los tipos (nociceptivas y no nociceptivas). Se registraron los reflejos espinales y las respuestas de la raíz dorsal utilizando electrodos extracelulares y las respuestas de neuronas del asta dorsal y de motoneuronas utilizando electrodos intracelulares.

El estudio de la corriente M se realizó utilizando el facilitador de la corriente M retigabine y el bloqueador de la corriente XE-991. Los compuestos se aplicaban sobre la médula espinal a concentraciones conocidas.

Utilizando registros extracelulares de la raíz ventral hemos comprobado la existencia de corrientes M en la médula espinal de ratas neonatales. En nuestras condiciones retigabine deprime los reflejos espinales producidos por la activación de las fibras aferentes de tipo nociceptivo. XE-991 tiene los efectos opuestos y revierte los producidos por retigabine indicando una modulación específica de la corriente M.

Con los registros intracelulares demostramos la presencia de corrientes M en neuronas dorsales y motoneuronas de la médula espinal. La modulación de las corrientes M presentes en las neuronas espinales afecta a su capacidad para transmitir la información sináptica. Retigabine produce hiperpolarización y una reducción de la excitabilidad de las neuronas espinales. XE-991 es capaz de producir despolarización en ambos tipos neuronales, pero sin embargo el efecto sobre la excitabilidad es mayor sobre motoneuronas que sobre neuronas del asta dorsal.

Las diferencias observadas en la sensibilidad de ambos tipos neuronales por XE-991 pueden reflejar diferencias en los canales presentes en estas neuronas.

Con los registros extracelulares de la raíz dorsal hemos mostrado que las fibras aferentes primarias sufren hiperpolarización con la aplicación de retigabine, este efecto se produce actuando sobre corrientes M presentes en las propias fibras aferentes. Los resultados también sugieren la expresión de corrientes M en las interneuronas implicadas en la generación de reflejos de raíz dorsal. La presencia de corrientes en las aferentes primarias contribuye a la reducción general de la excitabilidad que produce retigabine sobre la transmisión somatosensorial espinal.

En conclusión, en la presente Tesis Doctoral se presentan resultados experimentales que demuestran la expresión de corrientes M de potasio en los componentes funcionales de la médula espinal. La activación de estas corrientes produce una importante reducción de la excitabilidad de los circuitos espinales que podría ser útil para reducir la hiperexcitabilidad que se desarrolla en los estados de hiperalgesia.

ABSTRACT

The spinal cord is the first relay centre for somatosensory inputs from peripheral receptors. These include nociceptors that detect harmful or potentially harmful stimuli. Spinal neurons carry out the first processing of nociceptive information and therefore, acting at this early level can determine nociceptive transmission.

Modulation of spinal circuits has become a very important strategy to design analgesic and anaesthetic compounds. In this Thesis we have tested the possibility of regulating spinal circuits using modulators of M type potassium current. M currents emerge from assemblies of KCNQ (Kv7) protein subunits. Due to its functional characteristics, M-currents have been shown to act as a brake on neuronal excitability.

The aims of this Thesis were (1) to study the presence of functional M-currents in the different components of the spinal cord and (2) to determine how modulation of the M-current affects the functioning of these components.

To these purposes several electrophysiological and pharmacological techniques were used in a hemisected spinal cord preparation obtained from rat pups (7 to 12 days old). The spinal cord was maintained under *in vitro* conditions pinned down to a sylgard-bottom recording chamber. Primary afferent fibers were electrically activated using suction electrodes located on the dorsal root. Different intensity stimuli were used to activate specifically non-nociceptive fibers or all fibers present in the dorsal root (nociceptive and non-nociceptive). Spinal reflexes and dorsal root responses were recorded using extracellular electrodes. Single dorsal horn and motor neurons responses were recorded using intracellular electrodes.

Pharmacological assays were performed using retigabine, a M-channel opener, and XE-991, a M-channel blocker. Both compounds were bath applied to the entire spinal cord at known concentrations.

Results indicate the expression of functional M-currents in the neonatal rat spinal cord using extracellular recordings from ventral roots. Retigabine depressed spinal reflexes in response to nociceptive primary afferents activation. XE-991 showed opposite effects and reverted those of retigabine, indicating a specific modulation of M-currents.

Using intracellular recordings we obtained evidence of the presence of functional M-currents on dorsal horn and motor neurons of the spinal cord. Modulation

of M-currents located in these neurons altered their ability to transmit synaptic inputs. Retigabine hyperpolarized the resting potential and reduced the excitability of spinal neurons. XE-991 depolarized the resting potential of spinal neurons, however the effect of this compound on the excitability of motor neurons was stronger than that observed in dorsal horn neurons. We believe that differences in the sensitivity to XE-991 expressed by dorsal and motor neurons may reflect differences in the structure of channels located in these neurons.

Extracellular recordings from dorsal roots indicated that M-currents are also expressed by primary afferent fibers. Retigabine application hyperpolarized primary afferent fibers. Retigabine produced this effect acting on M-currents present in primary afferent terminals. Results also suggest the expression of M-currents in the interneurons that mediate dorsal root reflexes. We believe that the existence of M-currents in primary afferents could partially explain the depressing effect of retigabine on somatosensory transmission.

In conclusion, the present Thesis contains experimental results that show the expression of functional M type potassium currents in the main components of the spinal cord, i.e. primary afferents, dorsal horn neurons and motor neurons. M-current activation leads to a strong reduction in the excitability of spinal circuits. This property of retigabine may be useful to reduce the neuronal hyperexcitability that characterize hyperalgesic states.

ÍNDICE

Abreviaturas	iii
Resumen	v
Abstract	vii
Índice	ix

INTRODUCCIÓN

1. La médula espinal	3
1.1 La transmisión segmental en la médula espinal	4
1.2 Receptores somatosensoriales	4
1.3 Fibras aferentes	7
1.4 Ganglios de la raíz dorsal o ganglios raquídeos.....	8
1.5 Organización de la médula espinal	9
1.6 Asta dorsal de la médula espinal.....	10
1.7 Asta ventral de la médula espinal.....	18
1.8 Zona intermedia de la médula espinal.....	22
1.9 Vías ascendentes y descendentes en la médula espinal	22
1.10 Principales neurotransmisores implicados en la transmisión sináptica segmental	23
2. Canales de potasio	26
2.1 Aspectos generales.....	26
2.2 Canales de potasio y excitabilidad neuronal	33
2.3 Canales de potasio y nocicepción	35
3. Corriente M de potasio	37
3.1 Sustrato molecular de la corriente M.....	38
3.2 Estructura de los canales KCNQ.....	39
3.3 Otras características de los canales KCNQ	40
3.4 Fisiopatología de los canales KCNQ.....	41
3.5 Localización de las subunidades KCNQ en el sistema nervioso	42
3.6 Modulación de los canales de potasio KCNQ neuronales	45
3.7 Moduladores directos de la corriente M.....	47
3.8 Corriente M y transmisión nociceptiva.....	52

OBJETIVOS	57
------------------------	----

MÉTODOS GENERALES

1. Animales.....	61
2. Anestesia.....	61
3. Extracción de la médula espinal	62
4. Mantenimiento de la médula espinal.....	63
5. Estimulación eléctrica de la raíz dorsal	65
6. Tipos de registros electrofisiológicos	67
6.1 Registros de la raíz ventral.....	68
6.2 Registro de la raíz dorsal	72
6.3 Registros extracelulares de neuronas del asta dorsal	74
6.4 Registros intracelulares.....	76
7. Preparación y aplicación de los fármacos	80
8. Procedimientos histológicos.....	81
8.1 Recuperación del marcaje de pontamina	81
8.2 Recuperación del marcaje intracelular con biocitina.....	82

CAPÍTULO 1. Efectos de los moduladores de la corriente M sobre los reflejos espinales.

1. Introducción	87
2. Métodos.....	88
2.1 Diseño de los experimentos	88
A. Estudio de los efectos de los moduladores sobre los reflejos Espinales	89
B. Estudio de la especificidad de los efectos de los moduladores.....	90
C. Estudio de la presencia de corrientes M en elementos del asta dorsal y ventral de la médula espinal.....	91
2.2 Análisis estadístico de los datos.....	92
3. Resultados.....	93
3.1 Influencia de la aplicación de los moduladores de la corriente M sobre el potencial basal y la actividad espontánea	93
3.2 Efectos de los moduladores sobre los reflejos originados por activación de fibras A.....	94
3.3 Efectos de los moduladores sobre los reflejos espinales mediados por activación de fibras C.....	96
A. Efectos sobre la estimulación individual.....	96
B. Efectos sobre la estimulación repetitiva	97
C. Efectos de retigabine sobre los reflejos espinales tras el bloqueo	

de receptores GABA-A con picrotoxina.....	103
3.4 Efectos de la aplicación local de los moduladores sobre los reflejos espinales	103
3.5 Efectos de los moduladores de la corriente M sobre la actividad de neuronas del asta dorsal.....	105
4. Discusión.....	106

CAPÍTULO 2. Efectos de los moduladores de la corriente M sobre la excitabilidad de neuronas espinales sensoriales y motoras.

1. Introducción.....	113
2. Métodos.....	114
2.1 Diseño de los experimentos	114
A. Caracterización de las neuronas estudiadas	114
B. Protocolo de estimulación.....	116
C. Descripción de los experimentos.....	116
D. Variables estudiadas	117
2.2 Análisis estadístico de los datos.....	118
3. Resultados	119
3.1 Características de las poblaciones de neuronas estudiadas	119
A. Características electrofisiológicas.....	119
B. Posición, morfología y tamaño de las neuronas estudiadas	120
C. Respuestas basales de las neuronas estudiadas	121
3.2 Efectos de los moduladores de la corriente M sobre el potencial de membrana y sobre la actividad espontánea	122
A. Efectos sobre el potencial de membrana.....	122
B. Efectos sobre la actividad espontánea	123
3.3 Efectos del facilitador de la corriente M retigabine sobre la excitabilidad neuronal	124
3.4 Efectos del bloqueador de los canales KCNQ XE-991 sobre la excitabilidad neuronal	126
A. Efectos de XE-991 sobre las neuronas dorsales	127
B. Efectos de XE-991 sobre las motoneuronas.....	128
C. Experimentos de reversión con retigabine.....	129
3.5 Efectos de los moduladores de la corriente M sobre la estimulación de baja intensidad de la raíz dorsal.....	130
3.6 Efectos de los moduladores de la corriente M sobre la estimulación de	

alta intensidad de la raíz dorsal.....	131
A. Efectos sobre los potenciales excitadores postsinápticos.....	131
B. Efectos sobre el disparo de potenciales de acción.....	132
C. Experimentos de reversión.....	134
3.7 Relación entre la excitabilidad neuronal y las respuestas a la activación sináptica.....	134
4. Discusión.....	135

CAPÍTULO 3. Efectos de los moduladores de la corriente M sobre las terminales de las aferentes primarias.

1. Introducción.....	143
2. Métodos.....	145
2.1 Diseño de los experimentos.....	145
A. Caracterización de las respuestas de la raíz dorsal.....	145
B. Efectos de los moduladores de la corriente M.....	148
2.2 Variables analizadas y análisis estadístico de los datos.....	149
3. Resultados.....	150
3.1 Características basales de los registros de la raíz dorsal.....	150
3.2 Efectos de los moduladores de la corriente M sobre el potencial basal.....	150
3.3 Efectos de los moduladores de la corriente M sobre la actividad espontánea.....	152
3.4 Caracterización fisiológica de las respuestas de la raíz dorsal.....	153
3.5 Caracterización farmacológica de las respuestas de la raíz dorsal.....	156
3.6 Efectos de los moduladores sobre las respuestas de la raíz dorsal a la estimulación de la raíz dorsal adyacente.....	157
4. Discusión.....	161

DISCUSIÓN GENERAL.....	169
-------------------------------	------------

CONCLUSIONES GENERALES.....	175
------------------------------------	------------

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	179
--	------------

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado la corriente M de potasio en el marco de la médula espinal y el procesamiento de la información nociceptiva. Este trabajo se ha realizado sobre los elementos sensoriales y los elementos motores presentes en la médula espinal utilizando técnicas electrofisiológicas e histológicas.

En esta introducción se van a comentar aspectos generales de la organización y el funcionamiento de la médula espinal así como de sus vías aferentes procedentes de la periferia. Después se explicarán las características de los canales de potasio y su relación con la excitabilidad neuronal. Finalmente se introduce con detalle la corriente M y los canales KCNQ que la originan, tratando de resaltar el interés que puede tener esta corriente en la regulación de la excitabilidad de diversos sistemas neuronales.

La médula espinal

La médula espinal de los vertebrados forma parte del sistema nervioso central y está contenida dentro del canal raquídeo de la columna vertebral. La médula espinal está dividida de forma parcial en dos mitades laterales simétricas. A ambos lados de la médula entran las raíces dorsales y salen las ventrales, después estas raíces se unen formando los nervios raquídeos.

La sección transversal de la médula espinal muestra que está formada por una parte central de color gris que contiene los cuerpos neuronales y por otra parte periférica blanca compuesta por axones mielinizados de las vías neuronales que discurren a su través.

La médula espinal recibe información sensorial procedente de la periferia constituyendo el primer centro de relevo de la información somatosensorial, particularmente la nociceptiva. Pero la médula espinal es más que un centro de relevo puesto que existen numerosos mecanismos de procesamiento que son capaces de modificar significativamente el mensaje generado a nivel periférico. Además recibe información desde los centros superiores llevando a cabo una gran actividad integradora y de modulación.

Tras un proceso de integración más o menos complejo la médula espinal envía la información sensorial procedente de la periferia a centros superiores en el cerebro. Además la médula espinal integra señales sensoriales de la periferia y señales de

control descendente procedentes del cerebro para producir respuestas motoras adaptadas al entorno sensorial y al estado del individuo.

A continuación se define la transmisión segmental espinal y se detallan las características generales de las diferentes partes que intervienen en este tipo de transmisión, desde los receptores somatosensoriales a las motoneuronas espinales que producen la respuesta de este sistema activando los músculos.

Como referencia general para confeccionar esta sección se ha utilizado la última edición el libro de Willis y Coggeshall (2004) titulado “sensory mechanisms of the spinal cord”. Para complementar esta información se han añadido referencias puntuales a otros trabajos de investigación en lugares específicos.

La transmisión segmental en la médula espinal

La médula espinal está organizada en segmentos metaméricos. Cada segmento cuenta con dos raíces dorsales procedentes cada una de ellas de un lado del cuerpo. Las raíces dorsales están formadas por las fibras aferentes primarias que conectan los receptores sensoriales periféricos con la médula espinal. Cada raíz dorsal contiene las aferentes primarias procedentes de su correspondiente dermatoma (área concreta de la piel inervada por las fibras que componen una sola raíz dorsal). La información sensorial que portan las aferentes primarias se transmite principalmente a las neuronas del asta dorsal.

La transmisión segmental se refiere a la integración de información que tiene lugar dentro de un segmento metamérico. La información sensorial tratada procede de los receptores sensoriales y las aferentes primarias y se realiza en neuronas dorsales y ventrales de un determinado segmento espinal. Nosotros hemos estudiado los segmentos lumbares de la médula espinal que reciben la información de las patas traseras del animal. Las respuestas de estos segmentos están ampliamente estudiadas y documentadas.

Receptores somatosensoriales

Para esta introducción se han agrupado los receptores somatosensoriales según se encuentren en piel, músculo, articulación o víscera. Posteriormente dentro de esta primera clasificación los receptores se han clasificado basándose en la naturaleza del estímulo que los activa.

Cutáneos

Los receptores presentes en la piel incluyen mecanorreceptores, nociceptores, termorreceptores y quimiorreceptores. Algunos de éstos están encapsulados y otros no.

– Mecanorreceptores: El estímulo adecuado para la activación de los mecanorreceptores cutáneos es la aplicación de pequeñas fuerzas mecánicas sobre la piel. Estos receptores constituyen la terminal periférica de las fibras aferentes primarias gruesas y mielinizadas (A β). Los mecanorreceptores cutáneos se clasifican según su velocidad de adaptación frente a la estimulación constante. Así existen:

Receptores de adaptación lenta: Estos receptores codifican bien los estímulos sostenidos sobre la piel. Se han descrito dos tipos de mecanorreceptores de adaptación lenta: (1) los **corpúsculos de Merkel** que codifican con precisión el lugar donde se aplica el estímulo y constan de una célula epidérmica especializada (célula de Merkel) y una terminal nerviosa que se invagina en ésta, y (2) los **receptores de Ruffini** que consisten en una terminación nerviosa encapsulada y detectan desplazamientos de la piel sin determinar con precisión el lugar de estimulación.

Receptores de adaptación rápida: Estos receptores son adecuados para detectar la textura y forma de los objetos. Existen varios tipos de receptores de adaptación rápida. Los principales son los corpúsculos de Meissner y los de Pacini, junto con los mecanorreceptores de los folículos pilosos. Los **corpúsculos de Meissner** y los **corpúsculos de Pacini** son terminaciones encapsuladas y responden a estímulos de baja y alta frecuencia respectivamente.

– Nociceptores: Los nociceptores son los receptores sensoriales que responden a estímulos potencialmente, o de hecho, dañinos para los tejidos (véase Belmonte y Cervero, 1996). La característica común a los nociceptores es que poseen un umbral de respuesta muy alto. Además pueden mostrar actividad espontánea y postdescarga y son capaces de sensibilizarse con la estimulación repetida o intensa. Algunos nociceptores se encuentran silentes hasta que se sensibilizan. Los nociceptores son terminaciones nerviosas libres que constituyen las terminales de fibras A δ y C. Existen diferentes tipos de nociceptores de acuerdo con los estímulos que los activan: **mecánicos** (responden únicamente a estímulos mecánicos de alta intensidad), **termomecánicos** (responden a estímulos nocivos mecánicos y térmicos), **térmicos**

(responden solo a estimulación térmica nociva) y **polimodales** (responden a estímulos mecánicos, térmicos o químicos de carácter lesivo).

– Termorreceptores: Estos receptores están implicados en la generación de sensaciones térmicas y en la termorregulación. Los termorreceptores se encuentran siempre activos y codifican la información térmica variando la frecuencia de disparo. Están formados por terminaciones libres de fibras no mielinizadas o fibras C y de fibras escasamente mielinizadas o fibras A δ . Existen dos tipos de termorreceptores (1) los **receptores de frío** (sensibles a los descensos de temperatura) y (2) los **receptores de calor** (sensibles a las elevaciones de la temperatura).

– Quimiorreceptores: Existe un tipo de receptores que inicialmente se clasificaron como nociceptores polimodales y que se ha descubierto que pueden servir como receptores de picor más que como receptores de dolor en sí mismo. Estos receptores son terminaciones libres de fibras de tipo C.

Musculares

– Mecanorreceptores musculares: Son los receptores de estiramiento de los músculos. Contribuyen a la actividad refleja y a la propiocepción. Existen dos tipos de mecanorreceptores musculares:

Husos musculares: Están situados en el interior del músculo. Poseen dos tipos de terminales: (1) las primarias o de tipo “Ia” producidas por axones muy mielinizados y que informan de la velocidad de estiramiento del huso y de la nueva longitud de éste y (2) las secundarias o de tipo II que son de menor calibre e informan de la longitud del músculo.

Órganos tendinosos de Golgi: Se encuentran en el tejido conjuntivo de los tendones y de la membrana que rodea los músculos. Sus fibras aferentes son axones muy mielinizados clasificados como fibras “Ib”. Responden con un umbral alto al estiramiento pasivo del músculo y con un umbral bajo a la contracción de las fibras musculares próximas al tendón donde se encuentra el receptor.

– Nociceptores musculares: Estos nociceptores proyectan información a través de fibras tipo III y tipo IV. Los originados por fibras de tipo IV pueden responder a

sustancias algésicas y a estímulos térmicos. Ambos tipos de terminaciones se encuentran en las fascias y en la adventicia de los vasos de los músculos.

Articulares

– Mecanorreceptores articulares: Se trata de receptores encapsulados que incluyen receptores de Ruffini, corpúsculos de Pacini y órganos tendinosos de Golgi que ya se han descrito anteriormente. Como en el caso de los mecanorreceptores cutáneos se dividen según su velocidad de adaptación en receptores de adaptación lenta o rápida.

– Nociceptores articulares: Son terminaciones libres de fibras escasamente mielinizadas o sin mielina que inervan la cápsula articular y que responden a movimientos de la articulación que pueden considerarse nocivos. Hay nociceptores que no se activan con todos los movimientos de la articulación, ni siquiera en situaciones de inflamación. Algunos de estos nociceptores se excitan por capsaicina.

Viscerales

– Mecanorreceptores viscerales: Son sobre todo terminaciones de fibras tipo A encapsuladas en corpúsculos de Pacini. Se sitúan en el mesenterio y en el tejido conectivo que rodea al órgano y también a lo largo de los vasos sanguíneos. Parecen codificar la distensión, la contracción o el movimiento de las vísceras, aunque no son muy precisos ya que se encuentran alejados de la zona contráctil. También los hay que están insertados entre las fibras lisas, como por ejemplo en la vejiga.

– Nociceptores viscerales: Hay nociceptores viscerales en numerosos órganos como corazón, tracto digestivo y órganos reproductores. Son fibras A δ y C que terminan en receptores de tipo polimodal. Responden a estímulos mecánicos, químicos y térmicos.

Fibras aferentes

Las fibras aferentes comienzan en los receptores periféricos y después se van uniendo para formar los nervios periféricos. Estos nervios periféricos se van agrupando progresivamente a medida que se aproximan a la médula espinal y tras atravesar los ganglios raquídeos forman las raíces dorsales que alcanzan la médula.

Estas fibras son los axones de las neuronas sensoriales cuyos somas están localizados en el ganglio de la raíz dorsal o ganglio raquídeo.

Las fibras aferentes se encargan de portar la información sensorial desde los receptores periféricos hasta el sistema nervioso central. Como hemos mencionado antes, no todos los receptores sensoriales son iguales y del mismo modo no todas las fibras aferentes son del mismo tipo. Las fibras aferentes pueden ser mielinizadas o no mielinizadas, además las fibras tienen diferentes diámetros, lo que les confiere a su vez velocidades de conducción diferentes. Los diferentes diámetros de las fibras aferentes también se relacionan con el tipo de receptor sensorial del que proceden.

Las fibras aferentes se clasifican según su calibre y su procedencia de receptores sensoriales cutáneos o musculares (y tendinosos) a pesar de tener calibres y velocidades de conducción semejantes. Las aferentes que proceden de receptores cutáneos se designan con caracteres latinos para el tipo y griegos para el subtipo resultando en fibras A β , A δ y C. Las aferentes procedentes de tendones y músculos se designan con números romanos para el tipo y con caracteres latinos para el subtipo. Las características de cada uno de los tipos se muestran en la tabla 1.1.

Axones sensoriales	Axones musculares	Calibre (μm)	Velocidad de conducción (m/s)	Mielinizados	Receptores
	Tipo I	10-20	80-120	Sí	Propioceptores musculares
Fibras A β	Tipo II	5-15	30-100	Sí	Mecanorreceptores sensoriales
Fibras A δ	Tipo III	1-5	5-30	Ligeramente	Terminaciones libres
Fibras C	Tipo IV	0.5-2	0.5-2.5	No	Terminaciones libres

Tabla 1.1. Características de las fibras aferentes primarias de origen sensorial y muscular. Los valores han sido adaptados de Willis y Coggeshall, 2004; Delgado y cols, 1998; Bear y cols, 1998.

Ganglios de la raíz dorsal o ganglios raquídeos

Como ya se ha mencionado, las aferentes primarias son los axones de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal o raquídeo. Los somas de estas neuronas se encuentran agrupados en los ganglios independientemente del tipo de fibras que originen. Estas neuronas son de tipo pseudomonopolar, poseen un proceso periférico

por el que transmiten la información de los receptores y un proceso central por el que transmiten la información a la médula espinal. Los tipos neuronales se han tratado de relacionar con los distintos tipos de fibras aferentes basándose en varios factores que se detallarán a continuación pero hasta la fecha no existe una clasificación totalmente acertada.

Las neuronas de ganglio raquídeo se han clasificado habitualmente en neuronas grandes y pequeñas. Las grandes se han asociado de modo general con axones de mayor tamaño y más mielinizados que permitirían velocidades de conducción más rápidas. Las pequeñas al contrario se han asociado con axones de menor calibre y mielinización que tendrían velocidades de conducción menores. Una relación lineal firme entre el tamaño del soma y el tipo de fibra no se ha podido conseguir por completo.

Utilizando tinción con colorantes básicos se ha comprobado que existen neuronas claras y oscuras. Esta diferencia se debe a que las neuronas claras presentan muchos neurofilamentos que se tiñen con poca intensidad dando un aspecto claro a las neuronas. Se ha comprobado que hay neuronas claras de todos los tamaños, pero sin embargo las neuronas oscuras son siempre pequeñas. Se cree que las neuronas grandes y claras originan las fibras A β , mientras que las pequeñas y oscuras darían las fibras C. Las fibras A δ se originarían de ambos tipos de neuronas.

También existen diferencias electrofisiológicas entre las neuronas que forman las fibras aferentes de cada tipo. Entre las neuronas pequeñas es común encontrar potenciales de acción más duraderos y con mayores hiperpolarizaciones después del potencial de acción.

La caracterización farmacológica de las neuronas del ganglio raquídeo tampoco ha dado aun resultados definitivos, aunque se ha comprobado la expresión de péptidos como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) o sustancia P en las neuronas pequeñas. Estos péptidos se han relacionado con fibras nociceptoras (para una revisión ver Maggi, 1995).

Organización de la médula espinal

Dentro de la sustancia gris de la médula espinal existen diferentes tipos de neuronas. Según su función hay interneuronas (neuronas que conforman los circuitos espinales), neuronas de proyección (que mandan información ascendente a centros

superiores) y motoneuronas (que producen las respuestas motoras de la médula espinal).

Esta aceptado que la médula espinal posee una organización laminar característica. Rexed (1952, 1954) descubrió un patrón citoarquitectónico muy concreto en la sustancia gris de la médula espinal de gatos que le permitió dividirla en 10 láminas que numeró en sentido dorso-ventral (fig 1.1). Esta estructura se ha aceptado con ligeras diferencias en todos los mamíferos.

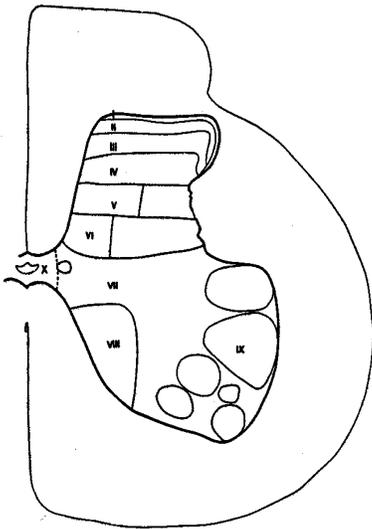


Figura 1.1. Esquema de una sección transversal de la médula espinal de gato (tomado de Rexed, 1952). En la figura se indican las distintas láminas descritas por Rexed y su numeración. En la imagen, la parte dorsal se sitúa hacia arriba y la ventral hacia abajo. La parte medial se observa en la parte izquierda. Nótese el menor espesor de las láminas superficiales.

Las láminas I a VI formarían el asta dorsal de la médula, mientras que las láminas de la VII a la IX constituirían el asta ventral. Además existe una zona intermedia con funciones principalmente vegetativas que se situaría en la lámina VII y una zona que rodea el canal central (X). A continuación se detallan las características del asta dorsal y del asta ventral, así como las características principales de las neuronas de la zona intermedia.

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 que se produce en la médula. En esta región existen numerosos tipos neuronales que se pueden caracterizar basándose en su morfología (ver Willis y Coggeshall, 2004) y en sus propiedades electrofisiológicas (para una revisión ver Russo y Hounsgaard, 1999). En este punto

además presentamos una clasificación de las neuronas del asta dorsal según los tipos de estímulos a los que responden.

Tipos de neuronas según los estímulos a los que responden

La clasificación de las neuronas dorsales más aceptada hasta la fecha se basa en el rango de intensidad de estímulos a los que responde una neurona. Según este criterio habría:

Neuronas de clase 1 o de bajo umbral: Este tipo de neuronas se excitan solo por estímulos de baja intensidad conducidos por fibras gruesas mielinizadas, los órganos receptores para las neuronas de clase 1 son mecanorreceptores de la piel o propioceptores (Handwerker y cols, 1975).

Neuronas de clase 2 o de amplio rango dinámico: Son las neuronas que se excitan tanto por estímulos de baja intensidad conducidos por fibras gruesas mielinizadas como de alta intensidad conducidos por fibras amielínicas. Estas neuronas son excitadas por una gran variedad de receptores mecánicos así como por nociceptores (Handwerker y cols, 1975).

Neuronas de clase 3 o nociceptivas específicas: Esta clase de neuronas dorsales fue incluida por Cervero y cols (1976) ampliando la terminología utilizada por Handwerker y cols (1975). Este tipo de neuronas solo se excita por estímulos de alta intensidad (nocivos) conducidos por fibras aferentes finas. Las neuronas de esta clase a su vez se pueden dividir en: (1) 3a las que reciben información de nociceptores mecánicos A δ y que no responden a estímulos térmicos nocivos y (2) en 3b que son excitadas por fibras A δ y C respondiendo a estímulos térmicos y mecánicos nocivos, además de por fibras de grupo III y IV del músculo.

Estructura del asta dorsal

Lámina I

Las neuronas presentes en esta lámina se han clasificado de acuerdo con criterios morfológicos en 3 o 4 tipos dependiendo de los autores. Existen neuronas fusiformes, multipolares y piramidales, y para algunos autores también habría neuronas aplanadas. Según Han y cols (1998) las neuronas fusiformes serían nociceptivas específicas, las piramidales termorreceptoras específicas y las multipolares serían bien polimodales o bien nociceptivas específicas. Los axones de

algunas de estas neuronas viajan por el tracto espinotalámico hacia centros superiores. En esta lámina se encuentran terminaciones de fibras finas (A δ y C) de nociceptores y termorreceptores. La procedencia de estas fibras es tanto cutánea como visceral, y posiblemente también muscular. Las sinapsis más comunes en esta lámina son axodendríticas aunque también se ven sinapsis de tipo glomerular. Las sinapsis de tipo glomerular son sinapsis complejas entre un cierto número de dendritas y varias terminales axónicas periféricas.

Las neuronas de lámina I se han clasificado recientemente según su respuesta a la inyección de pulsos de corriente intracelular por Prescott y DeKoninck (2002). Los autores diferenciaron 4 tipos de neuronas según su patrón de disparo y las agruparon en tónicas (las que responden a lo largo de toda la estimulación), fásicas (las que adaptan la frecuencia de disparo), de espiga única (las que disparan unos pocos potenciales de acción al comienzo de la estimulación) y de comienzo retrasado (que disparan de forma irregular, observándose un retraso desde que la neurona se despolariza hasta que dispara).

Dentro de las neuronas de lámina I una pequeña proporción son neuronas que envían proyecciones al cerebro. Estas neuronas de proyección son especialmente interesantes puesto que envían información nociceptiva de las aferentes primarias directamente a los centros nociceptivos del cerebro. Además se ha demostrado que en estas neuronas se producen mecanismos de plasticidad sináptica que conducen a la aparición de hiperalgesia en condiciones de inflamación y neuropatía (Ikeda y cols, 2003). Estas neuronas de proyección de lámina I expresan receptores NK-1. La activación de estos receptores es esencial para la inducción de la plasticidad sináptica puesto que producen el incremento de calcio intracelular necesario para que se produzca la potenciación. Estas neuronas también expresan canales de calcio tipo T, que junto con los receptores de NMDA, contribuyen al aumento de calcio intracelular.

Las neuronas de proyección de lámina I presentan unas propiedades electrofisiológicas diferentes al resto de las neuronas presentes en esta lámina, y dentro de las neuronas de proyección también existen ciertas diferencias dependiendo del lugar al que proyecten. Ruscheweyh y cols (2004) identificaron dos patrones de disparo que no habían sido identificados anteriormente en la médula espinal: neuronas con una ráfaga de disparos inicial seguido de disparo tónico y neuronas con un amplio intervalo entre el primer potencial de acción y los siguientes. Las neuronas

con una ráfaga de disparos son sobre todo neuronas que proyectan a la sustancia gris periacueductal, estas neuronas presentan potenciales de acción estrechos y con hiperpolarizaciones después del potencial de acción muy marcadas. Las neuronas del otro tipo proyectan al área parabraquial aunque algunas también lo hacen a la sustancia gris periacueductal. Las neuronas con amplio intervalo inicial poseen potenciales de acción más anchos y no presentan hiperpolarización después del potencial de acción. El patrón de disparo con ráfaga inicial se produce por la presencia en estas neuronas de la corriente T de calcio, mientras que el patrón de disparo con amplio intervalo inicial se debe a la presencia de una corriente de potasio tipo A con una cinética lenta (Ruscheweyh y cols, 2004).

Por último, en un reciente trabajo, Baccei y Fitzgerald (2005) han comprobado utilizando rodajas de médula espinal *in vitro* que las propiedades electrofisiológicas de las neuronas superficiales no sufren cambios profundos durante el desarrollo postnatal temprano.

Lámina II

La lámina II, también llamada sustancia gelatinosa, fue la primera región de la médula espinal que se describió como tal. Las neuronas de esta zona han sido ampliamente estudiadas debido a su implicación en la transmisión nociceptiva. Cervero y cols (1979) trabajaron con estas neuronas *in vivo* y observaron que una amplia proporción de ellas presentaban un comportamiento distinto al que se había descrito para neuronas de otras zonas de la médula espinal. Por esta razón las denominaron neuronas inversas. Estas neuronas inversas presentaban disparo basal de potenciales de acción y su actividad se inhibía por la estimulación de la piel. El estudio de las neuronas de esta zona ha sido difícil debido al reducido tamaño que presentan.

Los principales tipos de neuronas son: neuronas de tallo (del inglés “stalked”) y neuronas islote (del inglés “islet”). Las **neuronas de tallo** son interneuronas de tipo nociceptivo específico o de amplio rango dinámico que no poseen dendritas presinápticas, sin embargo tienen unas ramificaciones dendríticas en forma de cono que se dirigen hacia láminas más profundas, mientras que el axón se dirige normalmente hacia lámina I. Las **neuronas islote** son neuronas inhibitoras que poseen dendritas presinápticas. Los árboles dendríticos de estas neuronas se

disponen rostro-caudalmente por toda la lámina II. Son neuronas nociceptivas específicas o mecanorreceptivas. Los axones de estas neuronas son cortos y terminan principalmente en la misma lámina II. Además de estos tipos principales existen otros como células arbóreas, frontera II-III, espinosas, filamentosas, rizadas y estrelladas.

Se pensaba que esta lámina recibía únicamente aferentes de tipos C, pero se ha demostrado la presencia de fibras aferentes gruesas. La información que recibe proviene de termorreceptores, mecanorreceptores y de nociceptores. Los tipos de contactos sinápticos presentes son axodendríticos y sobre todo de tipo glomerular.

En las neuronas de lámina II el bloqueo de canales de potasio con TEA produce un ensanchamiento del potencial de acción y despolarización después del potencial de acción (ADP). En estas neuronas también se han descrito espigas resistentes a TTX que son producidas por corrientes de calcio (Munase y Randic, 1983). Las neuronas de la lámina II pueden tener despolarizaciones o hiperpolarizaciones después del potencial de acción que pueden ser rápidas o lentas. La hiperpolarización lenta está mediada probablemente por una conductancia de potasio dependiente de calcio (Sah, 1996), mientras que las despolarizaciones son dependientes de calcio. Según el patrón de disparo repetitivo en respuesta a despolarizaciones directas en la lámina II existen 4 tipos de neuronas. Hay neuronas de disparo retardado, neuronas que producen una ráfaga inicial de disparos, neuronas que solo producen 1 o 2 potenciales de acción por despolarización (neuronas de espiga única) y neuronas con ráfagas discontinuas (Ruscheweyh y Sandkuhler, 2002). El disparo retardado en las neuronas dorsales se debe a que expresan una corriente dependiente de voltaje de salida que se activa y desactiva de forma rápida (Yoshimura y Jessell, 1989), se trata de la corriente de potasio tipo A y su activación produce que el disparo se retarde hasta su inactivación (Ruscheweyh y Sandkuhler, 2002). Las neuronas de espiga única tendrían este patrón de disparo por la presencia de una corriente de salida transitoria de activación lenta, que por sus características se podría tratar de la corriente D de potasio (Ruscheweyh y Sandkuhler, 2002). Además de estas corrientes que condicionan el patrón de disparo, las neuronas de la lámina II disponen de otras corrientes iónicas. Estas neuronas presentan dos clases distintas de corrientes de potasio rectificadoras internas o anómalas, una dependiente de tiempo y otra rápida (Yoshimura y Jessell, 1989). Ambas se activan con la

hiperpolarización, pero la dependiente de tiempo está activa al potencial de reposo por lo que contribuye al mantenimiento del potencial de membrana.

Lámina III

Constituida por neuronas de mayor tamaño que las de la lámina II. Las neuronas de esta lámina poseen campos dendríticos complejos. Existen dos tipos particulares de neuronas: **neuronas del tracto espinotalámico** y **postsinápticas de las columnas dorsales**. Las primeras poseen dendritas dorsales que podrían llegar hasta lámina I y recibir información nociceptiva. El segundo tipo manda sus dendritas hacia láminas I y II, y actúan como neuronas antena posiblemente realizando contactos monosinápticos con fibras finas. Además de estos dos tipos de neuronas existen neuronas piramidales que no pertenecen a ninguno de estos dos tipos y que podrían recibir información directa de todos los tipos de fibras aferentes primarias. Sobre esta lámina terminan fibras aferentes gruesas (mielinizadas), aunque también puede haber algunas fibras finas. Existen diferentes tipos de contactos sinápticos como axodendríticos, axoaxónicos, axosomáticos e incluso glomérulos.

No existen trabajos en los que se hayan realizado estudios electrofisiológicos específicos sobre las neuronas de lámina III, los trabajos disponibles engloban todas las neuronas del asta dorsal profunda de la médula espinal incluyendo generalmente neuronas de láminas III, IV y V. Por esta razón las características que se presentan a continuación se aplican para las neuronas de láminas profundas del asta dorsal.

Los potenciales de acción de las neuronas del asta dorsal profunda muestran hiperpolarizaciones después del potencial de acción (AHP) rápidas y lentas. Además, la despolarización después del potencial (ADP) puede aparecer siguiendo la fase de repolarización, después de la hiperpolarización rápida o entre las hiperpolarizaciones rápida y lenta (Jiang y cols, 1995).

Las neuronas del asta dorsal profunda se han clasificado en cuatro tipos (Lopez-Garcia y King, 1994). El tipo A presenta un patrón de disparo tónico con poca adaptación en la frecuencia de disparo. El tipo B presenta un disparo fásico con una fuerte adaptación en la frecuencia de disparo que permite que normalmente solo produzca un potencial de acción por respuesta. El tipo A-B presenta un patrón intermedio con disparo al comienzo de la despolarización pero que sufre adaptación en la frecuencia de disparo incrementándose el intervalo de tiempo entre potenciales

de acción. El tipo C presenta un disparo relativamente tónico pero con cierta adaptación, aunque su principal característica es que produce potenciales de acción al recuperar el potencial de reposo después de las hiperpolarizaciones transitorias. Esta clasificación se realizó utilizando una preparación *in vitro* de la médula espinal de ratas neonatales como la que se ha utilizado en los experimentos electrofisiológicos de esta Tesis y es una clasificación que ha sido ampliamente utilizada en trabajos posteriores. Siguiendo esta clasificación Hochman y cols (1997) estudiaron las propiedades de las neuronas dorsales profundas en los primeros días después del nacimiento y comprobaron que la distribución de patrones de disparo en estas neuronas no cambia en las primeras etapas del desarrollo postnatal.

Más recientemente Schneider (2003) en preparaciones *in vitro* de médula espinal de hámster observó 3 patrones de disparo y clasificó las neuronas dorsales profundas en tónicas, neuronas con disparo fásico y neuronas con disparo retardado. Además comprobó que las posibles neuronas de proyección tenían patrones de disparo tónico, mientras que las interneuronas eran mayoritariamente fásicas o de disparo retardado.

Lopez-Garcia y King (1994) también estudiaron las neuronas dorsales profundas en relación con sus respuestas frente a la estimulación natural de la piel. Así encontraron neuronas de amplio rango dinámico que se correspondían sobre todo con neuronas con patrones de disparo de tipo A y neuronas nociceptivas específicas que tenían mayoritariamente un patrón de disparo de tipo A-B. Las neuronas de bajo umbral se distribuían entre los grupos A y A-B. Además encontraron neuronas que presentaban actividad inhibitoria y presentaban un disparo de tipo C y neuronas con excitación subumbral que presentaban patrones de disparo A y B.

Utilizando una preparación de médula espinal aislada de hámster, Schneider (2005) ha mostrado que las neuronas con disparo tónico responden a la estimulación estática y dinámica sobre la piel y que reciben tanto de receptores de alto como de bajo umbral. Las neuronas fásicas responderían mejor a estímulos en movimiento y recibirían información principalmente de receptores de bajo umbral. Por último, las neuronas con disparo retardado tendrían una sensibilidad frente a los estímulos cutáneos similar a las neuronas tónicas.

Lámina IV

Es una capa relativamente gruesa que dispone de neuronas de diferentes tamaños. En esta capa los tamaños de las neuronas presentes son muy heterogéneos. Según el patrón dendrítico existen 3 tipos de neuronas: neuronas tipo antena (que lanzan sus prolongaciones dendríticas a láminas superficiales para realizar sinapsis con axones de neuronas centrales y de aferentes finas), células con dendritas orientadas longitudinalmente y células con dendritas transversales. Además existen neuronas del tracto espinotalámico y postsinápticas de las columnas dorsales como las descritas para la lámina III. Las terminales que llegan a esta lámina son de fibras aferentes gruesas. Los axones de estas neuronas forman parte de las columnas dorsales y del tracto espinotalámico. Las sinapsis presentes en esta lámina son como las de la III pero los glomérulos son aun menos frecuentes.

Lámina V

Las neuronas presentes en esta capa son aun más heterogéneas que las de la capa anterior. Se ha descrito que (1) las neuronas multirreceptivas (o clase 2) son más grandes y con las dendritas extendiéndose en todas direcciones, (2) las neuronas que responden solo a estimulación nociva son más pequeñas y con dendritas en todas direcciones y (3) las neuronas que solo responden a estímulos inocuos son aun más pequeñas y con campos dendríticos menos extensos. Las neuronas de lámina V responden a estímulos tanto nocivos como no nocivos cutáneos. Además reciben fibras tipo III y IV de músculo, articulación y vísceras. Estas neuronas proyectan al tálamo, núcleos de las columnas dorsales, núcleo cervical lateral y otros destinos dentro de la médula espinal. Los contactos sinápticos son como los de la lámina IV pero sin glomérulos.

Lámina VI

Esta lámina es más evidente en los engrosamientos cervical y lumbar. Las neuronas de esta capa se organizan de un modo similar a las de lámina V. No se han descrito tipos neuronales diferentes. Estas neuronas tienen prolongaciones dendríticas muy extensas en el plano dorsoventral y mediolateral pero no en sentido longitudinal. Estas células reciben información de diversas zonas del asta dorsal, pero no de láminas superficiales y por tanto no reciben información procedente de fibras

aferentes finas. En esta capa terminan muchas colaterales de axones de aferentes primarias que van hacia el asta ventral, sobre todo fibras de tipo "la". Las proyecciones de las neuronas de esta lámina probablemente alcancen el tálamo o el núcleo cervical lateral.

Asta ventral de la médula espinal

El asta ventral de la médula espinal 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 de las **motoneuronas**, que son las encargadas de producir la activación del músculo esquelético, en el asta ventral se encuentran las neuronas **propioespinales** y las **interneuronas** que se encargan de modular y coordinar la actividad de las motoneuronas (Delgado y cols, 1998). Las únicas terminales de aferentes primarias que se encuentran en esta zona son de fibras gruesas mielinizadas, algunas de origen cutáneo y en su mayoría de origen muscular.

Motoneuronas

Las motoneuronas son neuronas de tamaño relativamente grande que se encuentran en la lámina IX. Estas neuronas reciben información sensorial a través de fibras aferentes, directamente o pasando por neuronas del asta dorsal, y a su vez reciben información descendente procedente de centros superiores.

La excitación de las motoneuronas produce potenciales de acción que salen desde la médula espinal hasta los músculos a través de las raíces ventrales. La llegada de potenciales de acción a las terminales axónicas desencadena la contracción de las fibras musculares que inervan. La contracción se produce mediante una sinapsis neuromuscular que utiliza como neurotransmisor la acetilcolina.

Las motoneuronas se disponen con una organización anatómica característica, pudiéndose situar en la parte medial o lateral del asta ventral. Dependiendo de su función se localizan en una posición o en otra. Así las motoneuronas que se localizan en la parte medial inervan músculos axiales y proximales que intervienen en el control postural. Las motoneuronas que se encargan de regular las actividades llevadas a cabo por la musculatura distal de los miembros se sitúan lateralmente. Los núcleos laterales se encuentran principalmente en los segmentos cervicales inferiores y en los lumbosacrales. En ambos núcleos motores las motoneuronas que inervan músculos

extensores se encuentran en posiciones más ventrales que las que inervan músculos flexores.

Dependiendo de las fibras contráctiles que inervan existen 3 tipos de motoneuronas:

Motoneuronas α : Son las que inervan las fibras contráctiles extrafusales y son las principales responsables de la contracción muscular. Las motoneuronas α de menor tamaño inervan un número bajo de fibras musculares rojas por lo que ejercen tensiones pequeñas, pero presentan un comportamiento tónico que les permite ser muy resistentes a la fatiga. Las motoneuronas α de tamaño intermedio inervan mayor cantidad de fibras musculares y ejercen una tensión intermedia, al tener un comportamiento tónico-fásico son bastante resistentes a la fatiga. Por último, las motoneuronas α grandes son las que inervan gran número de fibras musculares, las fibras que inervan son también grandes y blancas, estas fibras musculares ejercen tensiones muy grandes pero se fatigan muy rápido (fásicas).

Motoneuronas β : Son motoneuronas que inervan fibras contráctiles intrafusales (husos musculares) y fibras contráctiles musculares muy resistentes a la fatiga.

Motoneuronas γ : Son neuronas que inervan fibras intrafusales. Se encargan de inervar los husos musculares. Existen dos tipos: estáticas y dinámicas. Las motoneuronas γ estáticas controlan en parte la capacidad de respuesta estática del huso muscular. Las motoneuronas γ dinámicas modulan la sensibilidad dinámica del huso muscular.

Propiedades electrofisiológicas de las motoneuronas

Las motoneuronas α son las motoneuronas que han sido estudiadas en mayor detalle (para una revisión véase Russo y Hounsgaard, 1999). El potencial de acción en estas motoneuronas muestra hiperpolarizaciones rápidas y lentas después del potencial de acción. Una despolarización después del potencial de acción no siempre aparece en neuronas de animales adultos, pero es más evidente en neonatos (Fulton y Walton, 1986). Los potenciales de acción se generan por canales de sodio dependientes de voltaje con la contribución de canales de calcio. La repolarización se produce por canales de potasio rectificadores retardados y dependientes de calcio. Las motoneuronas se encuentran silentes en reposo pero son capaces de disparar de forma relativamente tónica con la despolarización, aunque muestran cierta adaptación

producida en parte por la sumación de hiperpolarizaciones lentas después del potencial de acción durante el disparo continuado.

Otras neuronas del asta ventral

Neuronas propioespinales: Son neuronas intraespinales que se encargan de conectar entre sí núcleos motores de distintos segmentos espinales, siendo una de sus principales funciones la comunicación intersegmental. Estas neuronas también se dividen en mediales y laterales. En la zona lumbar las neuronas propioespinales laterales tienen sus somas en las partes laterales de las láminas V-VII de los segmentos L3-L5. Estas neuronas laterales reciben gran cantidad de información descendente por lo que parecen especializadas en la transmisión de órdenes motoras descendentes, independientes de la información sensorial periférica. Las neuronas propioespinales mediales se encuentran en los segmentos L4 y L5 en las partes ventromediales de la lámina VII, su papel es esencialmente coordinar el funcionamiento de los núcleos motores en varios segmentos medulares.

Interneuronas: Las interneuronas tienen gran importancia porque permiten modular la actividad de las motoneuronas. Existen varios tipos, aunque las principales son las interneuronas inhibitoras “Ia”, las interneuronas inhibitoras de Renshaw y las interneuronas “Ib”. Las **interneuronas inhibitoras “Ia”** se activan por fibras aferentes de tipo “Ia”, después hacen sinapsis con las motoneuronas de los músculos antagonistas del músculo del que proviene la fibra tipo “Ia”, y las inhiben para permitir la relajación del músculo antagonista reduciendo la rigidez de la articulación. Las **interneuronas inhibitoras de Renshaw** se activan principalmente por colaterales de motoneuronas α que inervan fibras blancas y producen una inhibición recurrente sobre las propias motoneuronas. Al regular la actividad de las motoneuronas, las neuronas de Renshaw regulan la fuerza muscular que se produce. Las **interneuronas “Ib”** reciben sinapsis de fibras aferentes de tipo “Ib” procedentes de los órganos tendinosos de Golgi y su función principal es inhibir las motoneuronas que inervan el músculo del que procede la fibra, produciendo un mecanismo de retroalimentación negativo que regula la tensión muscular.

Tipos de respuestas de motoneuronas a la estimulación aferente

Las motoneuronas se encuentran muy reguladas por mecanismos supraespinales para controlar los movimientos voluntarios, pero también existen mecanismos de activación que se encuentran en la propia médula espinal. Estos mecanismos que se desencadenan por estímulos sensoriales específicos y provocan una respuesta muscular rápida y estereotipada se llaman reflejos espinales.

Existen varios tipos de reflejos como son:

Reflejo miotático o de estiramiento: Es un reflejo monosináptico. El estiramiento del músculo estimula los husos musculares y se produce la activación de fibras aferentes "Ia". Estas fibras realizan contactos monosinápticos con motoneuronas α del mismo músculo del que procede la fibra aferente, lo que se traduce en la contracción del músculo hasta que el huso muscular retorna a su posición inicial. Durante la fase estática de estiramiento también se activan fibras tipo II indicando la nueva longitud que ha alcanzado el músculo.

Reflejo miotático polisináptico: Se produce por la activación de fibras de tipo II presentes en el huso muscular. Las fibras tipo II activan las motoneuronas γ por medio de vías polisinápticas lo que produce la contracción de las fibras intrafusales del huso. Este reflejo forma parte de la regulación del reflejo miotático y sirve para mantener la sensibilidad de los husos musculares en un rango de respuesta óptimo.

Reflejo miotático inverso: Se trata de un reflejo disináptico. Se produce por la activación de las fibras "Ib" del órgano tendinoso de Golgi. Produce la inhibición del músculo del que procede y de sus sinérgicos, y la activación de los músculos antagonistas. Este reflejo sirve para regular la tensión del músculo con una tendencia a mantener una tensión constante.

Reflejo flexor o de retirada: Es un reflejo producido mediante circuitos polisinápticos complejos que se produce sobre todo por activación de receptores de tipo nociceptivo. Este reflejo actúa coordinadamente sobre motoneuronas de músculos antagonistas de un miembro para producir la retirada del mismo. Se trata de un reflejo más complejo y más lento que los anteriores y es el que hemos estudiado en los registros de reflejos espinales obtenidos de la raíz ventral.

Zona intermedia de la médula espinal

En esta zona se encuentra la lámina X de Rexed así como los somas de las neuronas preganglionares.

La lámina X se encuentra en la zona medial intermedia de la médula espinal, en torno al canal central. Sobre esta lámina proyectan nociceptores mecánicos A δ y fibras aferentes viscerales no mielinizadas, por lo que las neuronas situadas en esta zona serían importantes en la transmisión nociceptiva visceral.

Las neuronas preganglionares se sitúan en la zona intermediolateral de la médula, en los segmentos torácicos y lumbares. Estas neuronas forman parte del sistema nervioso simpático conectando los centros superiores con las neuronas postganglionares presentes en los ganglios de relevo simpático. Los axones de las neuronas preganglionares son mielínicos (Delgado y cols, 1998).

Vías ascendentes y descendentes en la médula espinal

La médula espinal esta conectada con los centros superiores en el cerebro por medio de vías ascendentes (de la médula al cerebro) y por vías descendentes (del cerebro a la médula).

Existen varias vías ascendentes hacia centros superiores, dentro de ellas destacan la vía de las columnas dorsales y el tracto espinotalámico. La **vía de las columnas dorsales** manda información sensorial no nociceptiva procedente de colaterales de aferentes primarias y de neuronas de segundo orden procedentes principalmente de las láminas III, IV y V. Estas ramas alcanzan los núcleos de la columna dorsal y posteriormente llegan al tálamo. El **tracto espinotalámico** porta información mecánica, térmica y nociceptiva hasta el tálamo. Está formado por axones de neuronas de segundo orden de la médula, presentes en prácticamente todas las láminas. Estas neuronas son nociceptivas específicas y también existen neuronas de amplio rango dinámico que contribuyen a discriminar diferentes intensidades de estímulos. Esta vía asciende de modo contralateral tras cruzar de un lado al otro de la médula espinal.

El control descendente desde el cerebro hacia la médula espinal dispone también de numerosas vías. Este control puede ser excitador o inhibitor. Algunos de los sistemas descendentes utilizan serotonina, noradrenalina u opioides como transmisores, pero pueden existir otras sustancias presentes en los axones

descendentes. Es importante tener en cuenta que el control descendente sobre una neurona puede ser directo o indirecto, por ejemplo las vías descendentes pueden liberar transmisores excitadores para activar interneuronas inhibitoras de la médula espinal.

El control descendente sobre las motoneuronas de la médula espinal de ratas neonatales adquiere mucha importancia a partir de la primera semana de vida (Vinay y cols, 2000), aunque en muchos casos las vías descendentes ya se encuentren formadas desde el nacimiento.

Principales neurotransmisores implicados en la transmisión sináptica segmental

En la médula espinal existe un gran número de moléculas que pueden actuar sobre la excitabilidad de las neuronas espinales funcionando como neurotransmisores o neuromoduladores.

A continuación se describen los principales neurotransmisores implicados en la transmisión segmental a través de la médula espinal (de Willis y Coggeshall, 2004).

Aminoácidos

Dentro de los aminoácidos existen algunos que producen generalmente respuestas excitadoras y otros que producen respuestas inhibitoras.

Aminoácidos excitadores: El principal aminoácido excitador en la médula espinal es el glutamato. El glutamato es liberado tanto por las aferentes primarias como por las neuronas presentes en la médula espinal. El glutamato posee receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos de glutamato se han clasificado comúnmente dependiendo de su sensibilidad por el análogo sintético de glutamato el ácido N-metil-D-aspartico (NMDA). Con esta clasificación existen receptores tipo NMDA y tipo no NMDA. Dentro de los receptores tipo no-NMDA existen receptores de AMPA y de kainato, basándose de nuevo en la sensibilidad que presentan por los compuestos ácido aminometilfosfórico (AMPA) y por el ácido kaínico, respectivamente. En la médula espinal está aceptado que en general las aferentes primarias realizan contactos sinápticos con las neuronas de primer orden a través de receptores de tipo no-NMDA, y que los contactos entre las neuronas espinales son mediados por receptores de 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 y Long, 1989). La relación de los diferentes tipos de receptores de glutamato con los componentes de la respuesta de las neuronas espinales se ha comprobado también en una preparación *in vitro* de médula espinal de ratas neonatales como la que se ha utilizado en los experimentos de esta Tesis Doctoral (King y Lopez-Garcia, 1993).

Aminoácidos inhibidores: Los aminoácidos inhibidores presentes en la médula espinal son GABA y glicina. GABA se concentra más dorsalmente, mientras que glicina lo hace más ventralmente. Ambos se liberan por interneuronas y actúan abriendo una conductancia para Cl^- generalmente produciendo inhibición, aunque GABA es capaz de producir despolarización de las aferentes primarias. Los receptores de GABA están mejor caracterizados y existen 3 tipos: GABA-A, GABA-B y GABA-C. Los receptores A y C son ionotrópicos mientras que los B son metabotrópicos. En los primeros días en torno al nacimiento se ha observado que tanto GABA como glicina tienen una acción despolarizante sobre las motoneuronas debido a la elevada concentración de Cl^- en el interior celular en esta etapa temprana. En la segunda semana después del nacimiento GABA y glicina adquieren ya su acción inhibitoria definitiva sobre las motoneuronas espinales (Vinay y cols, 2000). Sin embargo, en el asta dorsal superficial solo se ha observado despolarización por GABA en el día postnatal 2 en un 40% de las neuronas (Baccei y Fitzgerald, 2004), y más recientemente se ha comprobado que la transmisión inhibitoria mediada por GABA sobre neuronas dorsales ya es funcional a partir del día postnatal 3, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro* (Bremner y cols, 2006).

Péptidos

Se conocen con el nombre de neuropéptidos. Dentro de los neuropéptidos, al igual que con los aminoácidos, los hay excitadores e inhibidores.

Neuropéptidos excitadores: Producen efectos muy potentes por lo que se necesitan en pequeñas cantidades. Se liberan por las aferentes primarias, interneuronas y vías descendentes. Los principales son la sustancia P, CGRP y el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP). Los principales en la médula espinal son sustancia P y CGRP. La sustancia P actúa a través de receptores de neurokininas del

tipo 1 (NK-1), que son metabotrópicos, produciendo un aumento de la excitabilidad neuronal. La sustancia P se libera desde fibras aferentes nociceptivas ante una estimulación intensa y sostenida. CGRP se encuentra principalmente en las terminales de las aferentes primarias donde suele colocalizar con sustancia P, su principal función a nivel central es potenciar la acción de sustancia P (Maggi, 1995).

Neuropéptidos inhibidores: Son sobre todo péptidos opioides como leu-enkefalina, met-enkefalina y dinorfina. Las enkefalinas pueden ser liberadas cuando se aplican estímulos nocivos. Actúan a través de receptores opioides μ , δ y κ presentes sobre todo en el asta dorsal superficial, tanto en interneuronas como en aferentes primarias. A nivel presináptico pueden producir la inhibición de la liberación de neurotransmisores y a nivel postsináptico podrían producir hiperpolarización. Además de los péptidos opioides existen otros neuropéptidos inhibidores como son somatostatina, galanina, nociceptina o el neuropéptido Y. Los receptores opioides están presentes en las primeras etapas de desarrollo en ratas. En los primeros días después del nacimiento, en la médula espinal de ratas existen receptores opioides μ y κ (Marsh y cols, 1997), aunque los efectos depresores de la excitabilidad en animales neonatos son producidos actuando a través de receptores μ (Briggs y Barnes, 1987). Sin embargo en animales adultos cambia la expresión y predominan los receptores μ y δ (Marsh y cols, 1997). El control descendente relacionado con los opioides está 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 y cols, 1997).

Monoaminas

Algunas de ellas tienen funciones como hormonas y como neurotransmisores. Estas sustancias se liberan en general desde sistemas descendentes. Dentro de este grupo se incluyen acetilcolina, adrenalina, noradrenalina, serotonina y dopamina. La **acetilcolina** es el principal neurotransmisor del sistema nervioso periférico, sobre todo en la unión neuromuscular. En la médula espinal no existe un sistema descendente de acetilcolina pero existen interneuronas que la liberan. Existe un sistema descendente de **dopamina** que manda proyecciones a la médula espinal, sobre todo a láminas superficiales. Tanto **serotonina** como **noradrenalina** han mostrado que pueden jugar un papel muy importante en la modulación de los reflejos espinales (Hedo y Lopez-García, 2001 y 2002) utilizando la misma preparación que se ha utilizado en los

experimentos electrofisiológicos de esta Tesis. Los sistemas descendentes de serotonina y noradrenalina se comienzan a desarrollar en etapas embrionarias y en torno al nacimiento ya se encuentran terminaciones en la médula espinal. Posteriormente continúa su desarrollo, que finaliza entre las 3 y las 4 semanas de vida. Por tanto estos sistemas descendentes ya son funcionales en los primeros días de vida (ver Lakke, 1997).

Canales de potasio

Aspectos generales

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que forman poros, permitiendo la difusión pasiva de iones a través de las membranas biológicas.

Los canales de potasio están constituidos por 4 subunidades α que se encargan de formar el poro. A menudo estas subunidades α pueden estar acompañadas de otras subunidades auxiliares β . Las subunidades auxiliares intervienen en la modulación de la actividad del canal y también en la correcta expresión del canal en la superficie de la membrana (Biggin y cols, 2000).

En todos los genomas que se han secuenciado hasta el momento existe al menos un canal de potasio, incluso en los microorganismos más simples. Además se cree que el resto de canales iónicos han evolucionado a partir de los canales de potasio (Miller, 2000).

Los canales de potasio forman la familia de canales iónicos más diversa en mamíferos, habiéndose descrito hasta 75 genes diferentes. Además, mediante mecanismos como el procesamiento diferencial del ARN mensajero en la transcripción y como las variaciones en las subunidades que forman el canal, incluyendo sus proteínas accesorias, se consigue aun más diversidad (Jenkinson, 2006).

Los canales de potasio se encuentran en multitud de células y llevan a cabo funciones muy diferentes. Sin embargo una característica común es que forman una corriente transmembrana extremadamente específica para potasio. Debido a que, por norma general, las células mantienen la concentración de potasio en el interior de la membrana mucho más alta que en el exterior, la apertura de los canales de potasio produce un cambio eléctrico a través de la membrana, produciendo una hiperpolarización de la célula. Esta hiperpolarización tiene unas consecuencias muy claras en las células eléctricamente excitables finalizando el potencial de acción en

neuronas, células cromafines adrenales, músculo y células pancreáticas β . Pero además los canales de potasio intervienen en otras múltiples funciones en células no excitables eléctricamente. En células del epitelio renal intervienen en el balance osmótico. En linfocitos T y B la hiperpolarización es un requisito para la mitosis y la proliferación en la respuesta inmune. En los eritrocitos sirven para mantener la forma de la célula y para regular el volumen. Y en plantas regulan el flujo osmótico para el intercambio de gas y agua de las hojas (Miller, 2000).

Los canales de potasio se pueden dividir según los mecanismos de apertura del canal en canales dependientes de voltaje y canales dependientes de ligando. En los canales dependientes de ligando, el poro se abre por la unión de: (1) un ion (por ejemplo calcio), (2) pequeñas moléculas orgánicas o (3) una proteína. Por esta razón los canales dependientes de ligando tienen un dominio citoplasmático o extracelular para unirse a los ligandos. En los canales de potasio dependientes de voltaje la energía para abrir el poro proviene del movimiento dentro de la membrana de un sensor con carga eléctrica. Los canales dependientes de voltaje poseen dominios transmembrana que se encargan de detectar las diferencias en el voltaje (MacKinnon, 2003).

Nomenclatura y clasificación

Los canales de potasio han sido nombrados de diferentes formas desde que se descubrieron. Antes de adoptarse unas normas para la nomenclatura cada descubridor otorgaba el nombre que consideraba más adecuado, en ocasiones estos nombres aun persisten junto con los nombres que se han adoptado en las sucesivas nomenclaturas.

La primera nomenclatura como tal nombraba exclusivamente a los canales de potasio dependientes de voltaje y su criterio era filogenético. Esta nomenclatura usaba las letras Kv seguidas por un número para cada familia y un segundo número para cada miembro de la familia (Kv1.1, Kv1.2, ..., Kv2.1, ...).

La segunda nomenclatura se introdujo a raíz de la creación de claves para la nomenclatura del genoma humano y se desarrolló por la Organización del Genoma Humano (HUGO). Según esta nomenclatura (ver White y cols, 1997) todos los canales de potasio se nombran con las letras KCN. Después cada familia recibe una letra más

(KCNA, KCNB, ...). Luego a cada miembro de una familia se le nombra añadiendo un número en caracteres latinos.

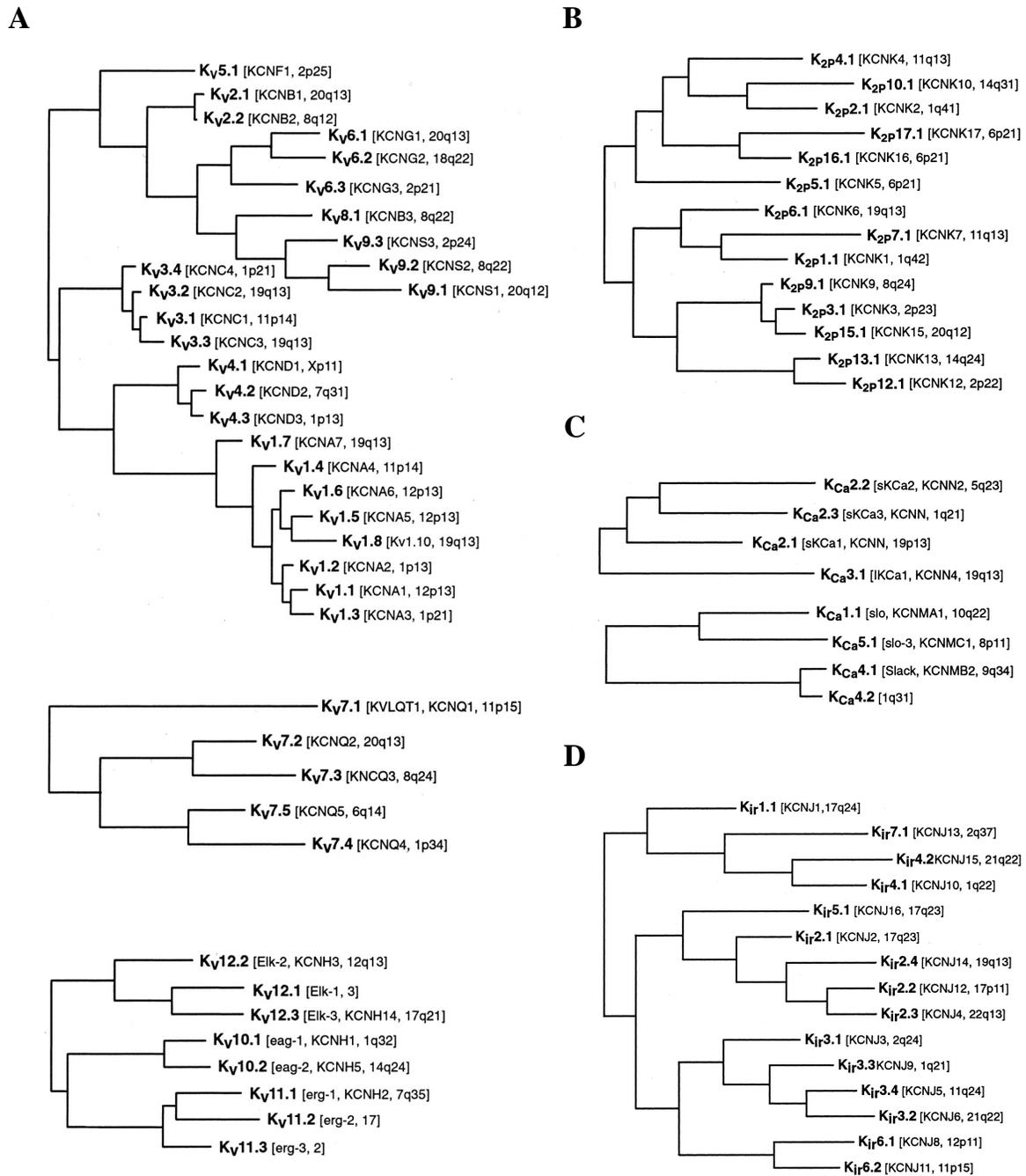


Figura 1.2. Clasificación estructural y filogenética de los canales de potasio (tomado de Gutman y cols, 2003). En la figura se muestran las familias de canales de potasio dependientes de voltaje (**A**), los canales de potasio con dos poros (**B**), los dependientes de calcio (**C**) y los rectificadores internos (**D**).

Esta segunda nomenclatura tiene detractores (vease Gutman y cols, 2003), que argumentan que esta clasificación ignora las relaciones filogenéticas y estructurales de las proteínas.

Más recientemente la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) ha propuesto una nomenclatura estándar basándose en los árboles filogenéticos (Gutman y cols, 2003, ver figura 1.2).

La nueva propuesta de nomenclatura agrupa los canales de potasio en primer lugar por su estructura y en segundo lugar por sus relaciones filogenéticas. Así existirían hasta 4 grupos diferentes (fig 1.2): (1) canales de potasio dependientes de voltaje, (2) canales de potasio sensibles a calcio, (3) los canales de potasio con 2 poros y (4) los canales de potasio rectificadores internos ("inward rectifier"). Dentro de la de los canales de potasio dependientes de voltaje existen 3 árboles filogenéticos distintos, uno de los cuales incluiría únicamente a los miembros de la familia Kv7 o KCNQ.

Estructura proteica de los canales de potasio

Los canales de potasio presentan diferencias estructurales. Se han encontrado hasta 5 tipos estructurales diferentes según su número de dominios transmembrana (Robbins, 2001):

Canales con 6 dominios transmembrana y un segmento formador de poro (6TMD-1P, siglas en inglés): Son los mejor caracterizados y se dispone de información de la función de las diferentes partes de la proteína. En este grupo se encuentran los canales de potasio dependientes de voltaje, y por tanto los canales KCNQ. Su estructura se presenta en mayor detalle más adelante. También se encuentran en este grupo los canales de potasio activados por calcio como son el SK (K_{Ca2}) y IK ($K_{Ca3.1}$).

Canales con 7 dominios transmembrana y un segmento formador de poro (7TMD-1P, siglas en inglés): A este grupo pertenece el canal que produce la gran conductancia de potasio activada por calcio (BK_{Ca}). En principio se creyó que era un miembro de la familia anterior pero se comprobó que posee un segmento

transmembrana adicional en su parte N terminal. Se piensa que la sensibilidad a calcio reside en su extremo C terminal.

Canales con 2 dominios transmembrana y un poro (2TMD-1P, siglas en inglés):

Los canales de este tipo forman por sí solos una familia completa, la familia K_{ir} o los canales de potasio rectificadores internos o anómalos. Los canales funcionales se forman por la unión de cuatro subunidades. Los miembros de esta familia también se pueden asociar a subunidades β para formar por ejemplo los canales funcionales K_{ATP} .

Canales con 4 dominios transmembrana y dos segmentos formadores de poros (4TMD-2P, siglas en inglés): Los miembros de esta familia presentan dos segmentos formadores de poros en cada subunidad, lo que indica que con la unión de dos subunidades se podría formar el poro o que si se unieran cuatro subunidades se podrían formar dos poros. Son canales que se modulan por ligandos como protones, ácido araquidónico o anestésicos volátiles.

Canales con 8 dominios transmembrana y dos segmentos formadores de poros (8TMD-2P, siglas en inglés): Estos canales solo se encuentran en levaduras. Se piensa que la apertura se produce por potasio extracelular.

Estructura de los canales de potasio dependientes de voltaje

En 1998 Doyle y cols publicaron la estructura del canal de potasio KcsA procedente de *Streptomyces lividans*, mostrando la estructura del poro del canal de potasio en tres dimensiones. Se ha comprobado que esta estructura del poro está muy conservada a lo largo de la evolución y que es la que determina la enorme selectividad de los canales de potasio por su ion.

Casi al mismo tiempo Kreuzsch y cols (1998) presentaron la estructura de otro dominio muy importante para los canales de potasio. Se trata del dominio de tetramerización que permite la asociación de las 4 subunidades necesarias para formar canales de potasio funcionales.

A partir de este momento se consiguió la estructura de otros 3 canales de potasio más. En primer lugar fue la estructura de un canal de potasio activado por

calcio (Jiang y cols, 2002), después la de un canal dependiente de voltaje (Jiang y cols, 2003) y por último se presentó la estructura de un rectificador interno (Kuo y cols, 2003).

A continuación se describe la estructura general de los canales de potasio dependientes de voltaje (fig 1.3). Estos canales poseen 6 dominios transmembrana y los extremos N y C terminal hacia el interior celular (Miller, 2000). Empezando por el extremo N terminal, poseen una bola de inactivación, un dominio de tetramerización T1, después le siguen 3 hélices transmembrana, y un sensor de voltaje, la hélice S4. Por último está el dominio que forma el poro. De las 3 hélices transmembrana S1-S3 no se conocen sus funciones específicas, y de la bola de inactivación solo se sabe que permite una inactivación rápida y dependiente de voltaje de los canales. El resto de elementos se encuentran más estudiados y caracterizados y se describirán en detalle a continuación. Pero además de estos elementos existen otras secuencias que constituyen señales para el transporte desde el retículo endoplásmico a la membrana plasmática. Estas secuencias se encargan de aumentar la presencia de canales en la membrana celular mejorando su transporte. También existen secuencias que se encargan del correcto ensamblaje de subunidades necesario para formar canales funcionales. Por tanto estas secuencias son importantes para regular el tipo, el número y la distribución de los canales en las células, lo que finalmente va a determinar las respuestas eléctricas que presenten (Griffith, 2001).

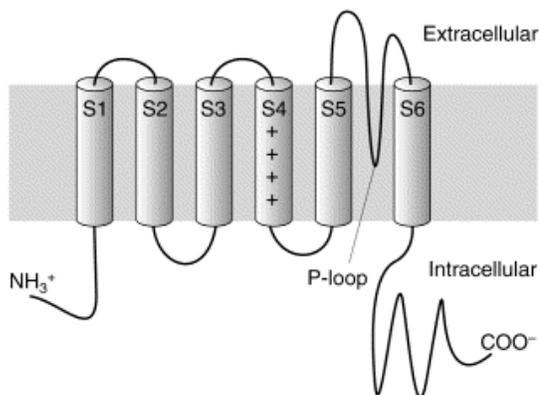


Figura 1.3. Estructura general de los canales de potasio dependientes de voltaje (figura tomada de Rogawski, 2000). Los canales de potasio dependientes de voltaje disponen de 6 dominios transmembrana con los extremos N y C terminal hacia el interior celular. El segmento 4 (S4) constituye el sensor de voltaje, mientras que el canal se forma por los segmentos 5 y 6 además del poro el lazo P (P-loop, en inglés).

Dominio de tetramerización T1: Éste es un dominio que determina las subunidades que se asocian para formar los canales funcionales, en él reside la capacidad de las subunidades para unirse entre sí. Tiene una gran importancia funcional puesto que el ensamblaje heteromérico de subunidades de canales de

potasio dependientes de voltaje es un mecanismo muy importante para producir diversidad en estos canales (para una revisión ver Sansom, 1998). Basándose en la estructura cristalina de este dominio se piensa que puede tener una función en la permeabilidad del canal. Los 4 dominios T1 procedentes de las 4 subunidades que forman el canal se unen formando una especie de poro justo debajo del poro en sí. De ser así, los iones de potasio tendrían que pasar este supuesto poro en primer lugar para salir de la célula.

Sensor de voltaje: Esta parte de los canales dependientes de voltaje presenta las mismas características en canales para diferentes iones (para una revisión véase Bezanilla 2000 y 2002). El principal componente del sensor es el segmento transmembrana S4 con sus residuos con carga positiva. El desplazamiento de este segmento S4 en respuesta a cambios en el campo eléctrico produce un cambio conformacional en el poro del canal controlando el flujo de iones. Aunque aun se desconoce como se realiza este movimiento se piensa que el segmento S4 no sufre grandes desplazamientos. El movimiento del sensor produce corrientes eléctricas de muy pequeña magnitud al desplazarse las cargas que posee, estas corrientes se denominan corrientes de apertura.

Poro de conducción de los iones: Hay que hacer constar que la fuerte selectividad de los canales de potasio por su ion se consigue sin comprometer la velocidad de conducción del poro, que se aproxima al límite de difusión para ese ion (para una revisión ver MacKinnon, 2003). El poro de los canales de potasio se forma por la unión de 4 subunidades que forman una vía de conducción de iones en el centro (fig 1.4 A). La parte central de esta vía consiste en una cavidad ocupada por moléculas de agua.

Hacia el exterior de la cavidad central se sitúa el filtro que condiciona la selectividad por los iones de potasio (fig 1.4 B), este filtro se forma por una región del canal que está muy conservada a lo largo de la evolución. En este filtro los iones se encuentran en una forma deshidratada y se mantienen estabilizados por 8 átomos de oxígeno que forman una estructura a su alrededor similar a la que forma el agua, así el ion se encuentra como si estuviera en solución (como en el exterior o en la cavidad central del poro). El filtro posee 4 lugares de unión para iones de potasio situados en fila. Los iones se unen a estos lugares de forma alternada con moléculas de agua, de modo que en el filtro siempre se encuentran como máximo 2 iones. Los iones y las

moléculas de agua se van desplazando en fila y cuando sale un ion del filtro entra otro por la parte opuesta. Por supuesto la dirección del flujo de iones viene determinada por el gradiente electroquímico para potasio.

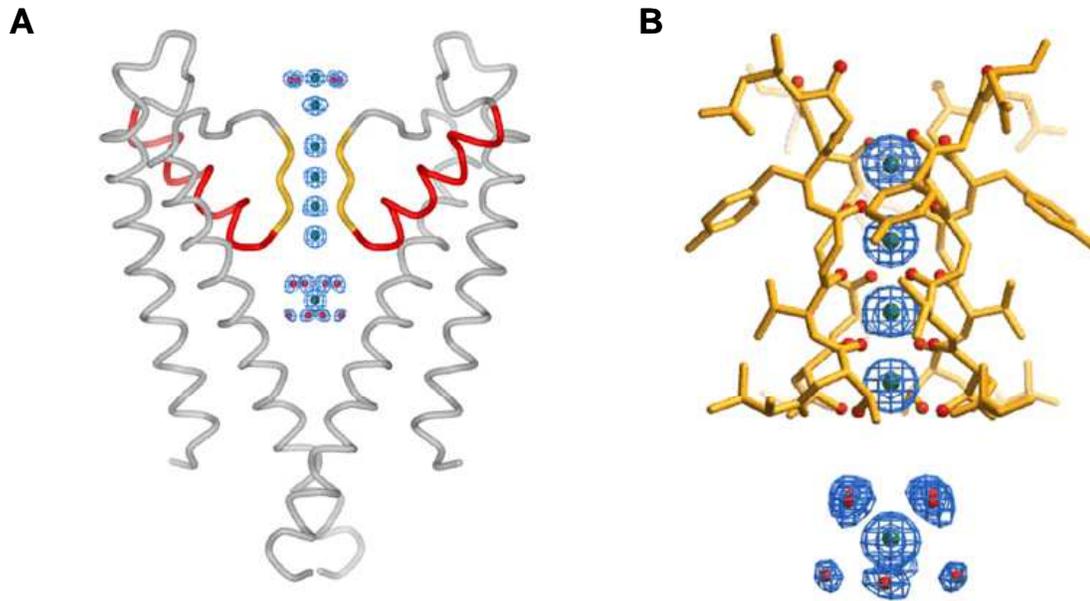


Figura 1.4. Estructura del poro de conducción de iones y del filtro selectivo de los canales de potasio (imagen tomada de MacKinnon, 2003). En **A** se muestra la estructura del poro representando 2 de las 4 subunidades que lo forman y con la parte extracelular en la parte superior. Cada subunidad contiene (desde el lateral hacia el centro de la figura) una hélice externa cercana a la membrana, una hélice interna cercana al poro, la hélice del poro y el filtro selectivo. En **B** se muestra una imagen ampliada del filtro, donde se pueden observar los iones de potasio y como se ajusta la estructura proteica sobre ellos, estabilizándolos en el interior de la membrana. En la parte interior se observa como se rehidratan los iones al alcanzar la cavidad central del poro que se encuentra llena de agua.

Canales de potasio y excitabilidad neuronal

En las neuronas se encuentran diversos tipos de canales de potasio pertenecientes a las cuatro familias mencionadas anteriormente. Debido a que estos canales producen mayoritariamente la salida de potasio del interior celular, la principal función de estos canales es regular la excitabilidad neuronal. La regulación de la excitabilidad se puede producir por diversos caminos como puede ser hiperpolarizando las neuronas, estrechando el potencial de acción o reduciendo la frecuencia en el disparo de potenciales de acción. Además, defectos en los canales de potasio se han asociado con varias enfermedades neurológicas (Benatar, 2000),

resaltando la importancia que tienen estos canales en la regulación de la actividad neuronal.

Por un lado existen canales de potasio que determinan el potencial de reposo y la resistencia de la membrana de las neuronas (ver Lesage, 2003). Estos canales se denominan canales de fuga o de fondo (“leak” o “background” en inglés). Tienen un papel importante en la regulación del potencial de reposo puesto que algunos de ellos se encuentran abiertos al potencial de reposo. Además pueden activarse por diferentes mecanismos como pueden ser la presión sobre la célula, el pH o la temperatura. La inactivación de estos canales produce despolarización. Estos canales pertenecen a la familia K_{2P} ya que son canales con 4 segmentos transmembrana y dos dominios formadores del poro.

Los canales de la familia K_{ir} se activan generalmente con la hiperpolarización y producen despolarización puesto que permiten la entrada de potasio a la célula, lo que contribuye al mantenimiento del potencial de membrana. En neuronas de la lámina II de la médula espinal se localizan dos tipos de estas corrientes rectificadoras anómalas (Yoshimura y Jessell, 1989). También existen algunos miembros de esta familia como los canales GIRK (K_{ir3}), que se activan por proteínas G y que regulan la excitabilidad neuronal (Dascal, 1997).

Los canales de potasio activados por calcio contribuyen a generar las hiperpolarizaciones que se producen después del potencial de acción en las neuronas (Sah, 1996). Estos canales regulan la excitabilidad neuronal participando en el intervalo entre potenciales de acción y por tanto en la adaptación en la frecuencia de disparo (para una revisión ver Vergara y cols, 1998). Las hiperpolarizaciones producidas después del potencial de acción que se observan en numerosas neuronas del asta dorsal (para una revisión ver Russo y Hounsgaard, 1999) y en motoneuronas (Gao y Ziskind-Conhaim, 1998) están producidas por corrientes de potasio dependientes de calcio, entre otras la I_{AHP} , que determinan la frecuencia de disparo. También hay una conductancia de potasio dependiente de calcio, la conductancia grande de potasio (BK_{Ca}), que contribuye a la repolarización del potencial de acción.

Por último, dentro de la familia de los canales de potasio dependientes de voltaje existen varios miembros que intervienen en la regulación de la excitabilidad. En las motoneuronas espinales de rata está presente la corriente de potasio tipo K que se encarga de producir el estrechamiento de los potenciales de acción lo que

permite incrementar la frecuencia de disparo (Gao y Ziskind-Conhaim, 1998). También están las corrientes de potasio tipo A que intervienen en la regulación de la excitabilidad neuronal puesto que, como hemos mencionado anteriormente, condicionan el disparo retardado que se observa en algunas neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Ruscheweyh y Sandkuhler, 2002). Pero además existen otros canales como los KCNQ que hemos estudiado en esta Tesis que regulan la frecuencia de disparo de potenciales de acción.

Debido a su función en el control de la excitabilidad neuronal, en los últimos años son muchos los trabajos que han estudiado la función de los canales de potasio en relación con la nocicepción. Se ha comprobado que los efectos antinociceptivos de una amplia gama de compuestos se deben a la modulación de determinadas corrientes de potasio. Entre estos compuestos se encuentran los opioides, adrenalina, serotonina, dopamina, cannabinoides, GABA, así como antiinflamatorios no esteroideos y determinados anestésicos (para una revisión ver Ocaña y cols, 2004).

Canales de potasio y nocicepción

Pese a que se ha demostrado la relación entre determinadas drogas analgésicas y determinados canales de potasio (ver Ocaña y cols, 2004), aun son relativamente pocos los trabajos que han estudiado los canales de potasio en relación con la nocicepción.

Una línea de trabajo muy interesante en este sentido consiste en el estudio de determinados canales de potasio en situaciones que producen sensibilización de las vías nociceptivas como inflamación o neuropatía.

En un reciente trabajo de Hu y cols (2006) se demuestra la implicación de unos canales de potasio en la plasticidad neuronal que tiene lugar en la médula espinal en condiciones de inflamación. En neuronas superficiales del asta dorsal de la médula espinal la corriente de potasio A se produce a través de canales de potasio dependientes de voltaje Kv 4.2. Esta corriente interviene en la regulación de la excitabilidad neuronal puesto que la mutación de este canal produce que las neuronas sean más excitables. Ésto se corresponde con el aumento en la sensibilidad a estímulos térmicos y mecánicos que presentan en experimentos comportamentales los animales mutantes para este canal.

Por otro lado, las kinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) se han relacionado con el desarrollo de la sensibilización central que produce dolor persistente. En las neuronas espinales la activación de las ERKs produce una reducción de la amplitud de la corriente A lo que se traduce en un aumento de la excitabilidad. Este efecto de las ERKs no se produce en mutantes del canal Kv4.2 lo que indica que las ERKs producen el aumento en la excitabilidad actuando sobre este canal. Además los animales mutantes para Kv4.2 no presentan hiperalgesia tras la inflamación como comprobaron con experimentos comportamentales utilizando modelos animales de inflamación.

Como conclusión, en este trabajo (Hu y cols, 2006) se correlaciona la hiperalgesia producida en situaciones de inflamación con la modulación de la corriente A de potasio, lo que demuestra que corrientes iónicas concretas pueden ser determinantes de la hiperexcitabilidad que se produce en situaciones de dolor crónico.

También existe otro trabajo en el que se pudo comprobar un proceso similar que tenía lugar en otro tipo de canales como son los K_{ir} 3.1. Ippolito y cols (2005) observaron una fosforilación de estos canales de potasio en situaciones de inflamación y neuropatía. La fosforilación de estos canales produce una reducción en su actividad lo que aumenta la excitabilidad neuronal.

Además se han descrito cambios en la expresión y localización de canales de potasio en situaciones de dolor neuropático. El dolor neuropático se caracteriza por un aumento en la excitabilidad neuronal. Existen varios trabajos que han observado una reducción en las corrientes de potasio de diferentes tipos en las células del ganglio de la raíz dorsal tras realizarse neuropatías periféricas experimentales (Everill y Kocsis, 1999; Abdulla y Smith, 2001). Otros grupos han constatado una regulación a la baja en la expresión de diferentes canales de potasio en situaciones de neuropatía analizando secuencias de ARN mensajero (Kim y cols, 2002; Park y cols, 2003) o mediante técnicas de inmunohistoquímica (Rasband y cols, 2001). Esta reducción en la actividad y/o expresión de los canales de potasio puede ser responsable, al menos en parte, del aumento en la excitabilidad característico de las situaciones de daño neuropático. Además se han observado cambios en la distribución de canales de potasio en neuromas procedentes de seres humanos (England y cols, 1998), que podrían intervenir en el dolor anormal producido en condiciones de neuropatía. Por último, en casos de daños a la médula espinal también se han observado cambios en

la expresión y en la distribución de canales de potasio (Karimi-Abdolrezaee y cols, 2004).

Corriente M de potasio

La corriente M fue descrita por Brown y Adams en 1980 en neuronas disociadas de ganglio simpático lumbar de anfibio. Era sabido que la activación de receptores muscarínicos de acetilcolina producía excitación disminuyendo una conductancia para iones potasio. Estos autores identificaron una corriente de potasio dependiente de voltaje diferente de las que se conocían hasta ese momento. Esta corriente era el efector de los receptores muscarínicos y la denominaron corriente M.

Al año siguiente, Constanti y Brown (1981) detectaron esta corriente M en neuronas simpáticas de rata. Posteriormente, se publicaron las características detalladas de esta corriente en neuronas disociadas de ganglio simpático lumbar de anfibio (Adams y cols, 1982a). Finalmente en el mismo año se describieron (1) los efectos de diferentes compuestos como muscarina, la hormona liberadora de la hormona luteinizante y nucleótidos de uridina sobre la corriente M (Adams y cols, 1982b) y (2) una forma de inhibición de la corriente mediada por la actividad sináptica (Adams y Brown, 1982).

La corriente M es una corriente de potasio dependiente de voltaje, pero que además está regulada por numerosos ligandos a través de múltiples vías de señalización. Desde un estado inactivado esta corriente se activa con una cinética relativamente lenta en respuesta a la despolarización, pero mantiene su activación hasta que finaliza el estímulo que la ha activado. Su umbral de activación es bajo, ya que se encuentra parcialmente activa al potencial de reposo, con lo que contribuye al mantenimiento del potencial de membrana. Puesto que es la única corriente sostenida activa en el rango de iniciación de los potenciales de acción, la corriente M actúa como un freno sobre el disparo repetitivo de potenciales de acción, siendo una pieza clave en regular la excitabilidad de gran número de neuronas. El bloqueo de esta corriente produce la despolarización y un aumento en la resistencia de la membrana de la neurona, lo que se traduce en un aumento de la excitabilidad (Brown y Yu, 2000).

Sustrato molecular de la corriente M

En 1998 Wang y cols relacionaron la corriente producida por la expresión de las subunidades KCNQ 2 y 3 con la corriente M de potasio. La corriente producida por la expresión en oocitos de subunidades KCNQ 2 y 3 presentaba las mismas características biofísicas y sensibilidad farmacológica que la corriente M que se encuentra de forma natural en neuronas de ganglio cervical superior. Además comprobaron la expresión de subunidades KCNQ 2 y 3 en neuronas de ganglio cervical. En conjunto, los resultados presentados indicaban que la corriente M se producía por unión de subunidades KCNQ 2 y 3.

Posteriormente se observó, en cerebros humanos, que las subunidades KCNQ 2 y 3 co-localizaban y que eran capaces de unirse entre sí de modo natural en otros tejidos nerviosos (Cooper y cols, 2000).

Otra subunidad de la misma familia, la subunidad KCNQ 4, es capaz de asociarse con la subunidad 3 contribuyendo a la diversidad de las corrientes M (Kubisch y cols, 1999)

Enseguida apareció un miembro más de la familia KCNQ, en este caso la subunidad 5, que podía contribuir a la diversidad de la corriente M neuronal (Lerche y cols, 2000; Schroeder y cols, 2000). Esta subunidad se encontraba ampliamente distribuida por el cerebro, y cuando se expresaba en oocitos producía corrientes funcionales con un patrón de comportamiento similar a la corriente M. Además era capaz de asociarse con la subunidad 3 para producir corrientes de mayor magnitud.

Después, hubo varios trabajos que se encargaron de localizar estas nuevas subunidades en diferentes zonas del cerebro, sobre todo en neuronas de hipocampo, para relacionar la corriente M y las subunidades KCNQ expresadas de forma natural en neuronas propias de tejidos nerviosos (Shah y cols, 2002; Roche y cols, 2002).

Pero la variabilidad de la corriente M no se queda ahí, existen trabajos que muestran que ciertas proteínas de otras familias de canales de potasio como erg (Kv11) o subunidades β como KCNE2, se pueden asociar con las subunidades KCNQ para producir corrientes de potasio tipo M (Selyanko y cols, 1999; Tinel y cols, 2000). Además las proteínas KCNQ pueden sufrir un procesamiento diferencial en el proceso de transcripción de su ARN mensajero que puede dar lugar a subunidades KCNQ con

diferentes propiedades biofísicas que también contribuirían a la diversidad funcional de la corriente M (Pan y cols, 2001; Smith y cols, 2001).

Estructura de los canales KCNQ

Según la nomenclatura propuesta por la IUPHAR los canales KCNQ recibirían el nombre de Kv7 (véase figura 1.2, pag 28). En esta Tesis se utiliza la denominación KCNQ puesto que es la forma de uso común en la literatura. Estos canales constituyen su propia familia dentro de los canales de potasio (fig 1.5). Su estructura general es la misma que tienen los canales de potasio dependientes de voltaje, presentando 6 dominios transmembrana y los extremos N y C terminal hacia el citoplasma (para una revisión ver Rogawski, 2000). Además presentan una serie de características particulares que se encuentran localizadas preferentemente en el extremo C terminal.

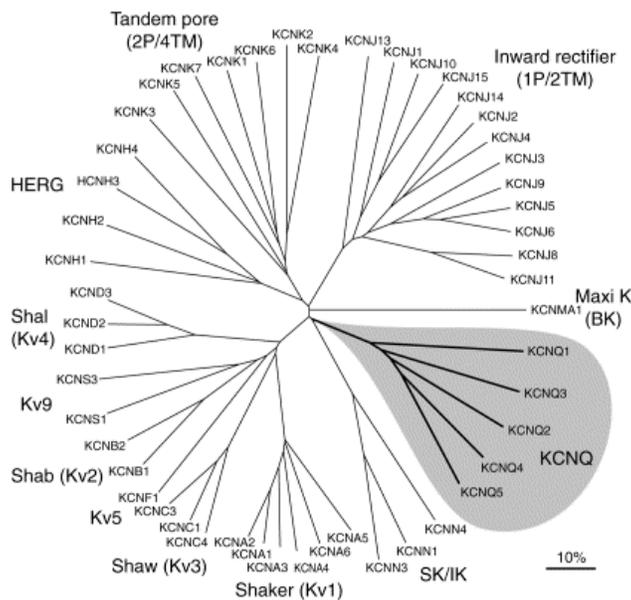


Figura 1.5. Canales de potasio KCNQ dentro de la superfamilia de los canales de potasio (figura tomada de Rogawski, 2000). En la figura se muestran las distintas familias de canales de potasio y sus relaciones filogenéticas.

Por un lado estos canales poseen varios lugares de fosforilación que pueden ser utilizados para modular la actividad del canal. En la subunidad 2 existe un lugar de fosforilación en el extremo N terminal (Schroeder y cols, 1998). La subunidad 3 posee también un lugar específico en el extremo C terminal cerca del dominio de tetramerización (Surti y cols, 2005). Común a todas las subunidades se encuentra otro

sitio de fosforilación que se sitúa entre los dominios transmembrana 4 y 5 (Surti y cols, 2005).

Los canales también poseen dominios de unión a calmodulina que se sitúan en su extremo C terminal y que contribuyen a la regulación de la actividad de la corriente por calcio. Estos dominios se encuentran en una región que se supone que contiene una estructura de dos hélices α (Yus-Najera y cols, 2002).

Varios grupos han comprobado mayor magnitud de la corriente M cuando se expresan las subunidades KCNQ 2 y 3 juntas que cuando lo hacen por separado, este aumento de la corriente se produce porque la formación de canales heteroméricos favorece el transporte de los canales a la membrana celular. La formación de los canales heteroméricos y el consecuente aumento de la expresión en superficie de los canales se debe a señales que se encuentran en el extremo C terminal (Schwake y cols, 2000; Chung y cols, 2006). Existen dos dominios de interacción entre subunidades que se encuentran en este extremo C-terminal. Estos dominios son de gran importancia puesto que son los que permiten la unión entre subunidades y determinan la especificidad de esa unión. Schwake y cols (2006) sugieren más concretamente que uno de los dominios es necesario para formar uniones funcionales entre subunidades y que el otro facilita el transporte de los canales a la membrana mejorando su expresión en superficie.

Etxeberria y cols (2004) comprobaron que los canales KCNQ 2 y 3 presentan 3 mecanismos que determinan la magnitud de la corriente que pueden producir. El primero de ellos consiste en el aumento en el número de canales que se produce tras la heteromerización del extremo C terminal. Por otro lado el extremo N terminal de la subunidad 2 podría afectar a la probabilidad máxima de apertura condicionando el nivel de corriente en canales homoméricos para la subunidad 2 y en canales heteroméricos con la 3. Por último existe un residuo que se localiza en la zona del poro de la subunidad 3 que dificulta el flujo de iones en las asociaciones homoméricas de subunidades 3, pero que es permisivo cuando se asocian subunidades 2 y 3.

Otras características de los canales KCNQ

Pese a presentar una estructura similar, cada una de las subunidades KCNQ puede presentar diferente sensibilidad por determinados compuestos como por ejemplo TEA (Hadley y cols, 2000). La subunidad más sensible al bloqueo por este

compuesto es la 2, mientras que la 3 es 100 veces menos sensible (valores de IC50 (mM): KCNQ1, 5.0; KCNQ2, 0.3; KCNQ3, > 30; KCNQ4, 3.0; KCNQ2/3, 3.8). La unión de las dos subunidades produce una sensibilidad intermedia. Esta diferencia en la sensibilidad por determinados compuestos de las subunidades KCNQ puede utilizarse para determinar la expresión de subunidades presente en determinadas células (Hadley y cols, 2003).

Las propiedades de permeabilidad de los canales KCNQ 2 y 3 son similares a las de otros canales de potasio, mostrando una gran especificidad por los iones de potasio. Pero al igual que otros canales de potasio se cree que su selectividad no es absoluta (ver Prole y Marrion, 2004). Otra característica particular es que estos canales pueden ser bloqueados por Ba²⁺ de un modo independiente de voltaje (Kotani y cols, 2000) ocupando la parte externa del poro (Prole y Marrion, 2004).

Selyanko y Brown (1999) propusieron un modelo acerca del funcionamiento del canal. La cinética del canal resultaría bastante compleja presentando al menos 3 estados cerrados separados entre sí por otros dos estados abiertos y cada uno de ellos con constantes de tiempo diferentes.

Fisiopatología de los canales KCNQ

Los canales KCNQ se encuentran ligados desde su descubrimiento a determinadas enfermedades congénitas. El primer miembro de la familia que se descubrió fue la subunidad 1. La pérdida de la función de la subunidad KCNQ 1 produce una enfermedad del corazón que se denomina síndrome QT largo, en la que se produce una repolarización más lenta de las células del músculo cardíaco (para una revisión ver Jentsch, 2000). Otras 3 de las 4 subunidades restantes también se han asociado con diferentes enfermedades en este caso del sistema nervioso.

Por un lado mutaciones en las subunidades 2 y 3 se relacionan con una enfermedad llamada convulsiones neonatales familiares benignas (BFNC en sus siglas en inglés). Ésta es una enfermedad autosómica dominante que produce ataques epilépticos durante las primeras semanas de vida, pero que habitualmente termina remitiendo (Cooper y Jan, 2003). En primer lugar se asoció esta enfermedad con diferentes mutaciones en la subunidad 2 (Singh y cols, 1998; Biervert y cols, 1998), pero en seguida se relacionó también con mutaciones en la subunidad 3 (Charlier y cols, 1998). La indicación de que ambas subunidades se localizan en las

mismas zonas del cerebro en humanos y que se asocian entre sí (Cooper y cols, 2000) se corresponde con el hecho de que la aparición de la enfermedad se produce en mutantes para cada una de las subunidades. Las mutaciones en estas subunidades se han encontrado sobre todo en los aminoácidos que forman el poro y los que se encuentran en el extremo C terminal (para una revisión ver Jentsch, 2000). Pero también se han descrito mutaciones situadas en el segmento transmembrana S4 (sensor de voltaje) de la subunidad 2 que producen epilepsia (Dedek y cols, 2001; Castaldo y cols, 2002), una de estas mutaciones produce además contracciones musculares involuntarias (miokimia) durante el desarrollo posterior de los individuos (Dedek y cols, 2001).

En un reciente trabajo se muestra que se puede inducir actividad epiléptica de similares características que la producida por BFNC utilizando bloqueadores de la corriente M como linopirdine (Pena y Alavez-Perez, 2006).

Finalmente, mutaciones en la subunidad 4 son responsables de producir pérdidas de audición asociadas con factores genéticos (Kubisch y cols, 1999), aunque se cree que esta enfermedad se debe a problemas en el oído cabe la posibilidad de que tenga también un componente central (Kharkovets y cols, 2000).

Localización de las subunidades KCNQ en el sistema nervioso

La familia de canales de potasio KCNQ está compuesta por cinco miembros numerados del 1 al 5. La subunidad KCNQ 1 se localiza principalmente en corazón, en pulmones y riñón. En cambio las otras cuatro subunidades se han localizado en el sistema nervioso, tanto a nivel central como periférico.

Sistema nervioso central

Con el descubrimiento de que mutaciones en las subunidades KCNQ 2 y 3 estaban relacionadas con un tipo de epilepsia se produjo un gran interés en estudiar estas dos subunidades en el cerebro. Por ello los primeros trabajos que estudiaron la localización de subunidades KCNQ en el sistema nervioso lo hicieron en el cerebro y centrándose especialmente en las subunidades 2 y 3. En el mismo año que se describió la relación de las subunidades KCNQ 2 y 3 con la epilepsia varios grupos estudiaron la expresión de estos canales en el cerebro utilizando hibridación *in situ*. Schroeder y cols (1998) en rata y Tinel y cols (1998) en ratón observaron que ambas

subunidades se localizaban en las mismas zonas del cerebro por lo que parecía probable que se asociaran entre sí. La expresión se centraba principalmente en hipocampo, neocortex y corteza del cerebelo (Tinel y cols, 1998), además también observaron que la subunidad 3 se expresaba más tarde en el desarrollo que la subunidad 2.

Posteriormente, Cooper y cols (2001) precisaron más la localización de la subunidad 2 utilizando técnicas de inmunohistoquímica. Además observaron que la expresión de esta proteína estaba relacionada con zonas concretas del cerebro involucradas en el control de la actividad neuronal rítmica. El marcaje para KCNQ 2, aunque se encontraba muy extendido, se concentraba en ganglios basales, septo, tálamo e hipocampo.

La subunidad KCNQ 4 por el contrario presenta una distribución más restringida. Su localización se centra en el oído interno y en la mayoría de los núcleos de las vías auditivas centrales en el cerebro (Kharkovets y cols, 2000).

Finalmente, la subunidad 5 se localiza ampliamente distribuida en neocortex y en hipocampo en humanos (Yus-Najera y cols, 2003).

Recientemente se han publicado dos trabajos que han estudiado la expresión de las subunidades 2 y 3 durante el desarrollo. En el primero de ellos se muestra la expresión de la subunidad 2 en hipocampo, caudado, putamen, corteza, tálamo, hipotálamo y tallo del encéfalo en animales postnatales (Weber y cols, 2006). En animales adultos la expresión se restringe al caudado, al putamen y al hipocampo, con un patrón de expresión concentrado en el axón. El trabajo de Geiger y cols (2006) estudia la expresión de la subunidad 3, el marcaje para esta subunidad aparece gradualmente y va en aumento durante el desarrollo. En el animal adulto existe tinción en hipocampo, tálamo, corteza y cerebelo concentrada sobre todo en el neuropilo, en cambio en animales jóvenes la tinción se concentra más en el soma.

En la médula espinal existen pocos trabajos hasta el momento en relación con la localización de las subunidades KCNQ. Por un lado se ha indicado la expresión de las subunidades 2 y 3 utilizando hibridación *in situ*. La subunidad 2 se ha detectado en asta ventral, dorsal y en la zona intermedia, aunque la señal más fuerte se encontró en la zona ventral. La subunidad 3 prácticamente se solapa con la 2, pero su marcaje es menos intenso (Dedek y cols, 2001). Utilizando inmunohistoquímica, Devaux y cols

(2004) observaron poco marcaje para la subunidad 3 y además localizado en la sustancia blanca. La subunidad 2 se localizaba más en nodos de Ranvier y en el segmento inicial de axones de motoneuronas, mientras que en los somas el marcaje era muy ligero.

Sistema nervioso periférico

En cultivos de neuronas de ganglio de la raíz dorsal se ha demostrado la expresión de las subunidades 2, 3 y 5 (Passmore y cols, 2003). Estas subunidades se localizan juntas en muchas neuronas sugiriendo la existencia de canales heteroméricos, pero en algunas neuronas no se ha podido comprobar la existencia de más de una subunidad indicando que también pueden existir canales homoméricos.

Por otro lado existen trabajos que han estudiado los canales KCNQ en los propios nervios. Devaux y cols (2004) describieron la presencia de subunidades KCNQ 2 y 3 en los nervios periféricos, y en el caso de la subunidad 2 pudieron precisar que se localizaba en los nodos de Ranvier. La presencia de las subunidades KCNQ en los nodos se relaciona con la presencia de la proteína ankirina G (Devaux y cols, 2004). Ankirina G retiene los canales en estas zonas del axón porque interacciona con una región presente en el extremo C terminal de los canales KCNQ 2 y 3 (Pan y cols, 2006). En este trabajo de Pan y cols (2006) también se indica la localización de subunidades KCNQ 3 en los nodos y en los segmentos iniciales del axón junto con la subunidad 2. Por último, Schwarz y cols (2006) muestran que la subunidad KCNQ 3 se encuentra en los nodos junto con la subunidad 2, pero su expresión se reduce en las fibras más gruesas, observándose solo la presencia de canales KCNQ 2 en estas fibras.

La presencia de los canales KCNQ en los nodos de Ranvier se ha relacionado con la corriente de potasio dependiente de voltaje I_{K_S} . La corriente I_{K_S} es una corriente de potasio presente en los nodos de Ranvier con unas características que se asemejan a las de la corriente M. La presencia de subunidades 2 y 3 en los nodos, junto con la sensibilidad que presenta la corriente I_{K_S} por los moduladores de la corriente M dan soporte a la relación entre los canales KCNQ y esta corriente (Schwarz y cols, 2006).

Modulación de los canales de potasio KCNQ neuronales

La actividad de la corriente M en general, y de los canales KCNQ en particular, se encuentra ligada a la activación de numerosos receptores de membrana. Desde el principio, la corriente M se describió por su inhibición por receptores muscarínicos (Brown y Adams, 1980). A partir de aquí se comenzó a relacionar la corriente M con la activación de receptores para diferentes compuestos como uridina trifosfato y sustancia P (Adams y cols, 1982b; Nowak y MacDonald, 1982). Actualmente son muy numerosos los receptores que se han relacionado con la modulación de esta corriente en diferentes tipos neuronales, en la mayoría de los casos inhibiéndola (para una revisión de los receptores ligados a la corriente M ver Brown y Yu, 2000; Marrion, 1997). Entre ellos se encuentran receptores de cannabinoides, de bradikina, de histamina o el receptor σ (Schweitzer, 2000; Cruzblanca y cols, 1998; Guo y Schofield, 2002; Soriani y cols, 1999).

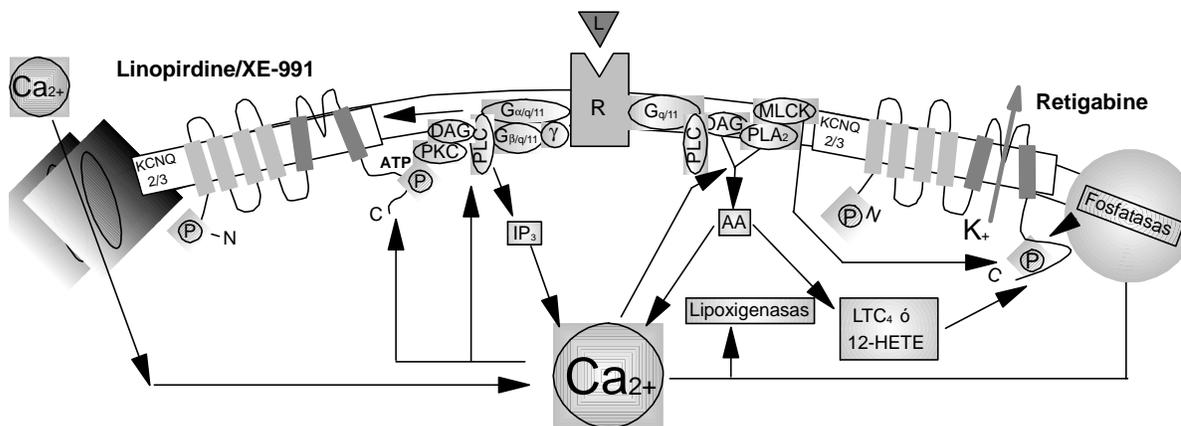


Figura 1.6. Modulación mediada por receptor de la corriente M (adaptado de Brown y Yu, 2000). En la figura se muestran las diferentes vías de señalización intracelular que producen la apertura y el cierre de los canales KCNQ 2/3. Además se indican ciertos compuestos que bloquean (Linopirdine y XE-991) y facilitan (retigabine) la corriente M. El calcio intracelular es capaz de abrir o cerrar los canales dependiendo de la concentración final que alcance. La fosforilación (P) de los canales en diferentes posiciones también puede producir la apertura o el cierre de los canales. Abreviaturas: L, ligando; R, receptor; PKC, proteína quinasa C; DAG, diacil glicerol; PLC, fosfolipasa C; PLA₂, fosfolipasa A2; IP₃, inositol trifosfato; MLCK, quinasa de la cadena ligera de miosina; AA, ácido araquidónico; LTC₄, leucotrieno C4; G, proteína G.

La modulación de los canales KCNQ por la activación de diferentes receptores se produce por diversas vías de señalización intracelular (fig 1.6). Entre estas vías se encuentra la vía de la fosfolipasa C (PLC) relacionada con fosfatidil inositol difosfato

(PIP₂), también intervienen vías de proteínas kinasas como protein kinasa C (PKC) o tirosina kinasas y vías que tienen como segundo mensajero intracelular al calcio (Marrion, 1997; Brown y Yu, 2000; Delmas y Brown, 2005).

Modulación por calcio

En el extremo C terminal de los canales KCNQ se encuentra un lugar de unión para calmodulina que interviene en la regulación de los canales. Este sitio de unión se ha encontrado en todas las subunidades KCNQ (Yus-Najera y cols, 2002), aunque posiblemente solo resulte importante en la regulación de la actividad de las subunidades 2, 4 y 5 (Gamper y cols, 2005). La presencia de estos lugares de unión de calmodulina es determinante para la modulación dependiente de calcio que sufren los canales KCNQ, puesto que es calmodulina la que confiere la sensibilidad a este ion (Gamper y Shapiro, 2003). Calmodulina funciona como el sensor de calcio de los canales KCNQ y cuando las moléculas de calcio se unen a calmodulina se produce la inhibición de la corriente (Gamper y Shapiro, 2003). Recientemente se ha indicado que la unión de calmodulina a los canales KCNQ incrementa la densidad de la corriente M (Shahidullah y cols, 2005). La regulación de los canales KCNQ por calmodulina se ha comprobado en neuronas de ganglio cervical superior (Gamper y Shapiro, 2003) y en neuronas de hipocampo (Shahidullah y cols, 2005).

Modulación por activación de fosfolipasa C (PLC)

PLC produce la ruptura de fosfatidil inositol difosfato (PIP₂) en inositol trifosfato (IP₃) y diacil glicerol (DAG). La activación de esta vía se ha relacionado con la inhibición de la corriente M producida por muscarina (para una revisión ver Brown y Yu, 2000).

Actualmente se cree que el compuesto sobre el que recae la importancia en la modulación de la corriente M es PIP₂ (Delmas y Brown, 2005). Primero se observó que la recuperación de la actividad de la corriente tras la inhibición producida por muscarina requería la síntesis de PIP₂ (Suh y Hille, 2002). Zhang y cols (2003) comprobaron que PIP₂ era capaz de activar los canales KCNQ y que su hidrólisis intervenía en la inhibición de las corrientes M mediada por receptor, además reconocieron un residuo presente en el extremo C-terminal como el responsable de la sensibilidad por PIP₂.

En el año 2005 se publicaron otros dos trabajos que confirmaban la implicación de PIP_2 en la regulación de la actividad de los canales KCNQ. Winks y cols (2005) relacionaron la cantidad de PIP_2 en la membrana con el grado de activación de las corrientes M. Li y cols (2005) mostraron que PIP_2 incrementaba la corriente estabilizando la forma abierta de los canales KCNQ 2/3, además observaron que las distintas subunidades KCNQ tenían una afinidad diferente por PIP_2 .

Más recientemente se ha descartado la implicación de DAG en la regulación de los canales KCNQ (Suh y Hille, 2006).

Modulación por fosforilación

Como ya se ha mencionado al describir la estructura de los canales KCNQ existen varias posiciones de fosforilación presentes en las distintas subunidades.

Schroeder y cols (1998) observaron un aumento en la corriente producida por canales KCNQ 2/3 tras la fosforilación de la subunidad 2 en el extremo N terminal. El aumento de AMPc en el interior de la célula activa la proteína kinasa A que fosforila a la subunidad KCNQ 2 incrementando la corriente producida.

Gamper y cols (2003) estudiaron la regulación de la actividad de las subunidades KCNQ por Src tirosina kinasas. La fosforilación Src tirosina kinasa disminuye la amplitud de la corriente M y enlentece su activación. Las subunidades sensibles a esta modulación son la 3, 4 y 5.

Moduladores directos de la corriente M

Por el momento no se han descrito ligandos endógenos directos para los canales KCNQ. Sin embargo si existen ciertas moléculas exógenas que se han ido desarrollando a lo largo de los años y que se ha demostrado que interaccionan con mayor o menor afinidad con los canales KCNQ. La aparición de estos moduladores directos exógenos ha permitido un gran avance en el conocimiento de los procesos fisiológicos en los que se encuentran implicados la corriente M y los canales KCNQ. Dentro de estos moduladores hay compuestos que producen un bloqueo mientras que otros producen una facilitación de la corriente.

A lo largo de esta Tesis Doctoral se utilizarán las denominaciones de bloqueador y de facilitador para cada uno de los tipos de moduladores de la corriente

M, ya que los términos agonista y antagonista están relacionados con los receptores de membrana.

Compuestos facilitadores de la corriente M: Retigabine

El compuesto facilitador que más se ha utilizado para el estudio de la corriente M es el etil ester del ácido N-(2-amino-4-(4-fluorobencilamino)-fenil)carbámico o retigabine (fig 1.7A). Retigabine es un análogo estructural de flupirtine, un compuesto que se ha utilizado como analgésico desde los años 80 (para una revisión ver Wickenden y cols, 2004).

En un primer momento retigabine se diseñó como un compuesto antiepiléptico. Se mostró que este compuesto incrementaba la síntesis de GABA (Kapetanovic y cols, 1995), un efecto que podía intervenir en su función como antiepiléptico, y posteriormente se comprobó que tenía una fuerte actividad antiepiléptica en numerosos modelos animales de ataques epilépticos (Rostock y cols, 1996). Más adelante se comprobó su eficacia en otros modelos de epilepsia *in vitro* (Dost y Rundfeldt, 2000).

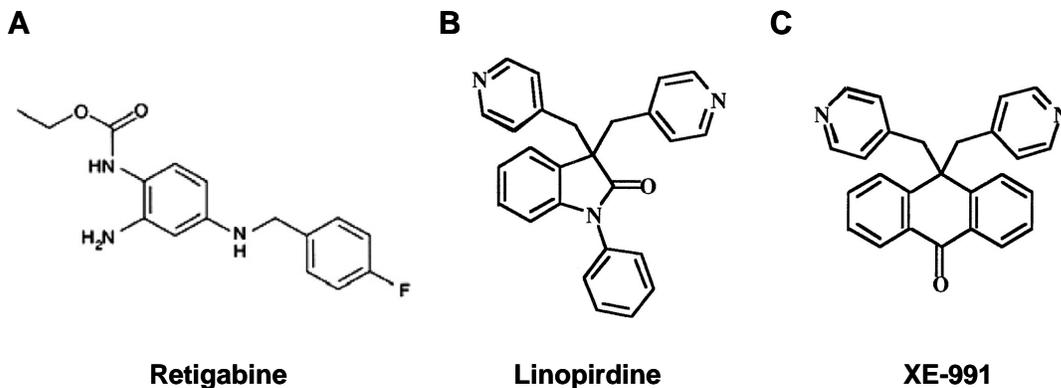


Figura 1.7. Estructura molecular de los principales moduladores de la corriente M. En la figura se muestra la estructura del facilitador de la corriente M retigabine (etil ester del ácido N-(2-amino-4-(4-fluorobencilamino)-fenil)carbámico) y de los bloqueadores linopirdine (3,3-bis(4-piridinilmetil)-1-fenilindolin-2-ona) y XE-991 (10,10-bis (4-piridinilmetil)-9(10H)-antracena).

La primera indicación acerca de su mecanismo de acción vino de la mano de Rundfeldt (1997), quien observó que retigabine producía la apertura de canales de potasio en células neuronales. Pero la identidad de los canales de potasio sensibles a

este compuesto permanecía desconocida. En el año 2000 tres grupos identificaron estos canales de potasio sensibles a retigabine como los canales KCNQ. Retigabine facilitaba las corrientes producidas por la expresión de canales KCNQ 2 y 3 en determinadas líneas celulares (Rundfeldt y Netzer, 2000a; Wickenden y cols, 2000; Main y cols, 2000). Estos autores observaron que retigabine, a concentraciones entre 0.1 y 10 μM , modificaba la dependencia de voltaje de estos canales, produciendo la apertura de los canales KCNQ a potenciales de membrana más negativos que los potenciales a los que se abren en condiciones normales. Retigabine también aumentaba la velocidad de activación de la corriente y retardaba su desactivación. En un estudio más reciente utilizando registros de canales KCNQ 2/3 individuales, Tatulian y Brown (2003) han mostrado que retigabine favorece la configuración abierta del canal, disminuyendo la duración y la contribución de uno de los estados cerrados del canal y aumentando la probabilidad de los estados abiertos.

Sin embargo retigabine, a concentraciones a partir de 10 μM , es capaz de potenciar las corrientes mediadas por GABA (Rundfeldt y Netzer, 2000b), este efecto, pese a no haberse observado en todas las condiciones testadas (Hetka y cols, 1999), puede contribuir a los efectos generales de retigabine como antiepiléptico. Retigabine además puede interferir con canales de Ca^{++} y de Na^+ a concentraciones aun más elevadas, aunque este efecto puede considerarse no específico (Rundfeldt y Netzer, 2000b). Los efectos de retigabine sobre las corrientes inducidas por GABA se han estudiado posteriormente con mayor detalle. Van Rijn y Willems-van Bree (2003) mostraron que retigabine favorece la unión de GABA al receptor de GABA-A debido a que interacciona con un sitio de receptor de GABA-A que se encuentra acoplado alostericamente con el lugar de unión de GABA.

Como se muestra en la tabla 1.2, retigabine es capaz de activar los canales homoméricos de subunidades KCNQ 2, 3, 4 y los formados por uniones de subunidades 2/3 (Tatulian y cols, 2001), al igual que los canales formados por las subunidades KCNQ 3/5 (Wickended y cols, 2001). Sin embargo retigabine no tiene efecto sobre las corrientes producidas por la subunidad KCNQ 1 que se encuentra en el músculo cardiaco (Tatulian y cols, 2001).

Los efectos generales de retigabine actuando a través de canales KCNQ van encaminados hacia una reducción de la excitabilidad neuronal. Retigabine produce la hiperpolarización y promueve la adaptación en la frecuencia de disparo en diversos

tipos neuronales como son neuronas de la corteza cerebral (Hetka y cols, 1999; Otto y cols, 2002) y de hipocampo (Yue y Yaari, 2004). Además, se ha mostrado que retigabine reduce la liberación de neurotransmisores como aspartato, noradrenalina y GABA de las terminales nerviosas en una preparación *in vitro* de hipocampo (Martire y cols, 2004).

Recientemente se ha determinado el lugar de unión de retigabine a los canales KCNQ. Existen dos trabajos que se han realizado produciendo y expresando proteínas quiméricas construidas con la subunidad 1 y el resto de subunidades. Como la subunidad KCNQ 1 es insensible a retigabine, transfiriendo diferentes regiones de la subunidad 1 a las demás se ha podido comprobar no solo la región, sino también el aminoácido concreto que determina la unión de retigabine a los canales KCNQ. Primero Wuttke y cols (2005) identificaron un residuo de triptófano situado en el segmento transmembrana 5 de la subunidad 2 como el principal responsable de esta unión. Después Schenzer y cols (2005) corroboraron la importancia de este triptófano en la subunidad 2 y en el resto de subunidades neuronales.

Retigabine es un compuesto de gran interés en clínica. Existen varios laboratorios que disponen de diversas patentes para utilizar este compuesto principalmente como antiepiléptico y como analgésico (ver Wickenden y cols, 2004). En el año 2001 retigabine se encontraba en pruebas de fase II tras haber superado pruebas en voluntarios humanos, y se pensaba que en un plazo relativamente corto se podría encontrar en el mercado para el tratamiento de la epilepsia (ver Fatope, 2001).

Visto el potencial terapéutico que puede tener retigabine han surgido nuevos compuestos activadores de canales KCNQ que se están estudiando actualmente. Entre estos compuestos se encuentra BMS-204352, este compuesto es capaz de activar canales homoméricos de las subunidades KCNQ 2, 3, 4 y 5, así como heteroméricos de subunidades 2/3 y 3/4 (Schroder y cols, 2001; Dupuis y cols, 2002). BMS-204352 y retigabine se están estudiando también como compuestos para el tratamiento de la ansiedad (Korsgaard y cols, 2005).

	Ref.	Célula	1	2	3	4	5	2/3	3/4	3/5	Corr M	otros	
Retigabine	3	CHO						1.7					
	4	CHO						1.6					
	5	CHO		2.5	0.6	5.2		1.9					
	5	rSCG									0.74		
	6	CHO								1.4			
Linopirdine	1	Oocitos anfibio	8.9	4.8				4			7	>50	
	2	HEK293		3.4		1.7		2.7	1.4				
	4	CHO						3.5					
	5	CHO						7.3					
	6	CHO								7.7			
	7	Oocitos anfibio					65						
	9	DRG										2.1	
	10	rSCG										3.4	
	11	Oocitos anfibio							10		15		
	12	CA1										8.5	
	XE-991	1	Oocitos anfibio	0.75	0.71				0.6			0.98	>100
		2	HEK293		1.5		1.2		0.9	1.4			
7		Oocitos anfibio					51						
8		Oocitos anfibio	0.78										
9		DRG									0.26		

Tabla 1.2. Afinidades de los moduladores de la corriente M. En la tabla se muestran los valores de concentración efectiva 50 (en μM) de retigabine, linopirdine y XE-991 para las diferentes asociaciones de subunidades KCNQ, así como para la corriente M y para otros canales iónicos. Los valores se han obtenido en experimentos con líneas celulares transfectadas (CHO, células de ovario de hámster chino, en sus siglas en inglés; Oocitos de *Xenopus*; HEK293, células de riñón embrionario humano, en sus siglas en inglés) o con neuronas que expresan la corriente M de forma natural (DRG, células de ganglio de la raíz dorsal, en sus siglas en inglés; rSCG, células de ganglio simpático cervical superior de rata, en sus siglas en inglés; CA1, neuronas piramidales de hipocampo).

Referencias (Ref.): 1. Wang y cols, 1998; 2. Schroder y cols, 2001; 3. Rundfeldt y Netzer, 2000a; 4. Wickenden y cols, 2000; 5. Tatulian y cols, 2001; 6. Wickenden y cols, 2001; 7. Schroeder y cols, 2000; 8. Wang y cols, 2000; 9. Passmore y cols, 2003; 10. Lamas y cols, 1997; 11. Lerche y cols, 2000; 12. Aiken y cols, 1995.

Compuestos bloqueadores de la corriente M: linopirdine y XE-991

Linopirdine o DuP 996 (3,3-bis(4-piridinilmetil)-1-fenilindolin-2-ona; ver fig 1.7B) es un compuesto que incrementa la liberación de neurotransmisores actuando como un potenciador de la cognición (para una revisión ver Wickenden y cols, 2004), por lo que se ha propuesto su valor terapéutico en el tratamiento de enfermedades como el

Alzheimer. Su efecto está mediado principalmente por el bloqueo dependiente de voltaje de la corriente M, aunque puede actuar sobre otras corrientes de potasio con una afinidad menor (Aiken y cols, 1995; Lamas y cols, 1997; Schnee y Brown, 1998). El efecto de linopirdine sobre la corriente M se debe a un bloqueo directo de la corriente desde el exterior de la membrana (Costa y Brown, 1997).

Se han identificado nuevos compuestos análogos a linopirdine, entre los que se encuentra XE-991 (fig 1.7C), que presentan una mayor potencia como liberadores de neurotransmisores (Zaczek y cols, 1998).

Como se puede observar en la tabla 1.2, ambos compuestos son capaces de bloquear con distintas afinidades las corrientes producidas por las distintas subunidades KCNQ formando canales homoméricos y heteroméricos (Robbins, 2001; Schroder y cols, 2001). Estos bloqueadores también actúan sobre la subunidad 1 por lo que podrían afectar el funcionamiento del corazón. Sin embargo la subunidad KCNQ 1 se asocia habitualmente con otras subunidades accesorias como por ejemplo minK. Esta asociación disminuye la sensibilidad que presenta la subunidad 1 por XE-991 (Wang y cols, 2000).

Los efectos de los bloqueadores de la corriente M linopirdine y XE-991 sobre células neuronales consisten en una despolarización y una reducción de la adaptación en la frecuencia de disparo (Aiken y cols, 1995; Wang y cols, 1998; Alaburda y cols, 2002). Sin embargo, Romero y cols (2004) han observado que en neuronas simpáticas de ratón cultivadas ambos compuestos son capaces de despolarizar ligeramente las neuronas pero en cambio no producen ningún efecto sobre la adaptación en la frecuencia de disparo.

En los trabajos que se presentan en esta Tesis se ha utilizado XE-991 debido a la mayor potencia que presenta sobre linopirdine.

Corriente M y transmisión nociceptiva

Tras el descubrimiento de la corriente M rápidamente se sugirió la presencia de estas corrientes en neuronas del asta dorsal de la médula espinal de ratones. La presencia de estas corrientes se relacionó con la despolarización que se producía por sustancia P (Nowak y MacDonald, 1982) y por muscarina (Nowak y MacDonald, 1983). Otros autores estudiaron los efectos de sustancia P sobre la excitabilidad de neuronas del asta dorsal de la médula espinal de ratas y también indicaron un efecto

sobre corrientes M, pero en su caso este efecto no era el principal y no sucedía en todas las neuronas que estudiaron (Murase y cols, 1986).

Al comenzar esta Tesis Doctoral la información sobre la corriente M y la médula espinal era muy escasa. Además de lo mencionado en el párrafo anterior únicamente se había indicado la expresión de subunidades KCNQ 2 y 3 en neuronas de la médula espinal de ratón utilizando hibridación *in situ* (Dedek y cols, 2001) y la presencia de corrientes tipo M en motoneuronas de tortuga utilizando registros electrofisiológicos (Alaburda y cols, 2002). Sin embargo en los últimos años la información disponible sobre la corriente M en la médula espinal ha crecido considerablemente, así como el interés acerca de su función en la transmisión nociceptiva en condiciones de dolor neuropático.

Como ya hemos mencionado anteriormente las subunidades KCNQ se han localizado en diferentes elementos dentro del sistema nervioso. Entre ellos cabe destacar la presencia de las subunidades 2 y 3 en el tálamo donde se recibe la información asociada con el dolor. Además se han localizado las subunidades 2, 3 y 5 en neuronas de ganglio de la raíz dorsal y las subunidades 2 y 3 en los nervios periféricos. Estos datos indican que los canales KCNQ pueden tener un papel importante en el procesamiento de la información nociceptiva a nivel central y periférico. En la médula espinal la información sobre localización de subunidades KCNQ utilizando técnicas de inmunohistoquímica es escasa y únicamente hay datos de la presencia de canales en el segmento inicial del axón de motoneuronas (Devaux y cols, 2004).

Actualmente existen pruebas farmacológicas que otorgan un papel a los canales KCNQ en el procesamiento de la información nociceptiva. Passmore y cols (2003) estudiaron las respuestas de neuronas de ganglio de la raíz dorsal y de neuronas del asta dorsal de la médula espinal. Las neuronas del ganglio de la raíz dorsal presentaban una corriente con unas características funcionales y una sensibilidad farmacológica a retigabine, XE-991 y linopirdine similares a las descritas para la corriente M en otros tipos celulares como neuronas de ganglio cervical superior. Además en modo de pinzamiento de corriente comprobaron que la aplicación de retigabine sobre neuronas de ganglio de la raíz dorsal producía hiperpolarización y una reducción en el disparo de potenciales de acción durante la despolarización, y linopirdine y XE-991 tenían los efectos opuestos sobre el disparo y

revertían los producidos por retigabine. Por último utilizando inmunohistoquímica observaron expresión de las subunidades KCNQ 2,3 y 5 en estas neuronas, donde pueden combinarse para formar canales heteroméricos y homoméricos.

Passmore y cols (2003) también estudiaron las respuestas de neuronas del asta dorsal de la médula espinal utilizando registros extracelulares *in vivo*. En estos experimentos utilizaron 2 grupos de animales unos con neuropatía experimental y otros control. Retigabine redujo las respuestas frente a la estimulación eléctrica y natural tanto de tipo nocivo como no nocivo, aunque los efectos fueron mayores sobre los animales sometidos a una neuropatía.

Por otro lado existen estudios comportamentales en los se ha comprobado que retigabine posee efectos anti-nociceptivos. Blackburn-Munro y Jensen (2003) mostraron que retigabine reduce la hipersensibilidad producida en diferentes modelos experimentales de dolor neuropático o persistente, mientras que no observaron grandes efectos sobre la función nociceptiva normal. Además a las dosis utilizadas en estos experimentos no constataron ningún efecto sobre la función motora.

Passmore y cols (2003) también obtuvieron resultados similares en animales sometidos a una inflamación experimental con carragenina. En este caso la administración de retigabine producía un efecto analgésico que era revertido por XE-991.

Nielsen y cols (2004) han comprobado la eficacia de retigabine en un modelo de alodinia producido por la inyección de ácido en el interior del músculo. En estas condiciones la administración intraperitoneal de retigabine produce también efectos analgésicos pero en este caso, quizá por la concentración utilizada, los autores si observaron déficit en la actividad motora en la mitad de los casos estudiados.

Finalmente, existe otro trabajo que relaciona la corriente M con la nocicepción. Peretz y cols (2005) han comprobado que dos compuestos que se han utilizado como fármacos anti-inflamatorios como son el ácido meclofenámico y el diclofenaco actúan sobre corrientes M de potasio. Además estos compuestos presentan diferencias en la sensibilidad entre las distintas subunidades KCNQ.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Como se ha indicado en la introducción, las corrientes de potasio juegan un papel muy importante en la regulación de la excitabilidad neuronal. Dentro de las corrientes de potasio, la corriente M es especialmente interesante debido a sus características funcionales, puesto que es una corriente sostenida que se encuentra activa al potencial de reposo y cuya magnitud aumenta con la despolarización. Gracias a sus características, la activación de esta corriente funciona como un freno de la excitabilidad neuronal.

Por otro lado, la médula espinal juega un papel muy importante en la transmisión de la información somatosensorial, particularmente nociceptiva, ya que constituye el primer punto de integración de la información procedente de los receptores periféricos. Por esta razón el control de la excitabilidad de las neuronas espinales puede determinar la percepción del dolor en situaciones normales y de hiperalgesia.

La posibilidad de regular la excitabilidad de las neuronas de la médula espinal modulando la corriente M de potasio puede ser interesante para la utilización de facilitadores de esta corriente como analgésicos. Además de ser una observación que refuerza la posibilidad de diseñar fármacos analgésicos dirigidos específicamente contra canales iónicos.

El objeto principal de esta Tesis Doctoral era estudiar la corriente M en el marco de la médula espinal, para lo cual nos planteamos los siguientes objetivos:

- (1) Conocer los efectos de los moduladores de la corriente M retigabine y XE-991 sobre la transmisión espinal nociceptiva.
- (2) Determinar si los efectos de los moduladores se producen actuando específicamente sobre corrientes M presentes en elementos espinales o si se deben a un efecto de los compuestos actuando a través de otros mecanismos.
- (3) Estudiar la presencia de corrientes M funcionales en neuronas del asta dorsal y del asta ventral de la médula espinal.
- (4) Estudiar los efectos de los moduladores de la corriente M sobre las terminales de las aferentes primarias y sobre el circuito sináptico implicado en la generación de los potenciales y los reflejos de la raíz dorsal.

MÉTODOS GENERALES

MÉTODOS GENERALES

Todos los procedimientos experimentales que se realizaron durante el trabajo de esta Tesis doctoral se llevaron a cabo con las regulaciones vigentes sobre el bienestar de los animales de experimentación y la conformidad del Comité Ético de Experimentación Animal. Se trató de reducir en la medida de lo posible el estrés y sufrimiento innecesario de los animales de experimentación y procurando utilizar el número mínimo de animales que producía resultados estadísticamente viables.

Animales

Para la realización de los experimentos se utilizaron ratas de la cepa Wistar. 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.

La mayor parte de los animales utilizados para este trabajo fueron de muy corta edad, debido a que la preparación de médula espinal hemiseccionada *in vitro* es inviable en animales adultos y complicada en animales que, pese a encontrarse en un rango de edad apto, presentan un peso elevado porque existe un problema de oxigenación cuando el tejido tiene un grosor excesivo.

Los experimentos electrofisiológicos que forman parte de esta Tesis doctoral se llevaron a cabo utilizando una preparación de médula espinal hemiseccionada de animales neonatos (entre 7 y 12 días de edad y entre 13 y 26 gramos de peso) que se mantenía en condiciones *in vitro* durante todo el experimento.

Anestesia.

Antes de la extracción de la médula espinal se procedía a producir un profundo estado de anestesia general, tanto para evitar el sufrimiento innecesario del animal como para inmovilizarlo permitiendo el proceso extracción. En todos los casos el proceso terminaba con la muerte del animal por decapitación.

Para la inducción de la anestesia se utilizó uretano disuelto en suero salino. Este compuesto produce una anestesia rápida, profunda y de lenta recuperación. El uretano se aplicaba a dosis de 2 g/kg por medio de una inyección intraperitoneal utilizando una jeringa de 1 ml de capacidad y una aguja de 0.3 mm de grosor. Tras la

desaparición de los reflejos se iniciaba el proceso de extracción. En casos excepcionales, cuando la primera inyección no producía una anulación completa de los reflejos, se procedía a realizar una segunda inyección con $\frac{1}{4}$ o $\frac{1}{2}$ del volumen inicial, dependiendo del grado de anestesia conseguido con la primera aplicación.

Una vez anestesiado, el animal se situaba en hielo sobre su parte dorsal para disminuir el metabolismo celular, reduciendo así la necesidad de oxígeno, así mismo el enfriamiento servía para producir anestesia por frío y para reducir el flujo sanguíneo en la zona, disminuyendo el sangrado durante el proceso de extracción y mejorando la visibilidad.

Extracción de la médula espinal.

El animal se retiraba del hielo tras 3-4 minutos y se le colocaba con la parte ventral sobre una superficie de corcho, donde se iba a realizar la primera parte de la extracción y donde se fijaban las patas usando cinta adhesiva.

Con el animal en estas condiciones se le retiraba la mayor parte de la piel que recubre el dorso y se aplicaba líquido cefalorraquídeo artificial enfriado previamente a 4 °C (LCRA, la composición de este líquido se detalla más adelante) con una pipeta pasteur para enfriar la zona, este proceso se repetiría tantas veces como fuera necesario durante el resto del proceso para limpiar la zona mejorando la visibilidad y también para evitar la desecación de la médula espinal.

Una vez que estaba expuesta la mayor parte de la columna vertebral del animal, se procedía a realizar una laminectomía bajo una lupa binocular utilizando material de microcirugía. Se realizaba un corte transversal con la tijera sobre la parte más rostral de la columna, intentando con este primer corte romper el arco vertebral sin seccionar la médula espinal, una vez que se había producido la apertura de la columna se continuaba seccionando el resto de vértebras por ambos laterales en sentido caudal, para ello se introducía la punta de la tijera en el espacio entre la médula espinal y las vértebras. Las tijeras se mantenían con poca inclinación y paralelas a la columna vertebral en todo momento para evitar dañar la médula espinal accidentalmente.

Ya con la médula espinal expuesta se realizaba una sección total de ésta en la zona más rostral posible. Después se sujetaba por las capas de meninges que la rodean utilizando unas pinzas curvadas finas. Con la médula sujeta por las pinzas se

utilizaba de nuevo la tijera para liberarla del tejido circundante y para cortar los nervios espinales. Se procedía de este modo en sentido rostro-caudal hasta tener la médula espinal liberada completamente.

La médula era entonces transferida a una placa petri acondicionada con una base de Sylgard (Sylgard 184 silicone elastomer kit, Dow Corning, USA) llena de líquido cefalorraquídeo artificial enfriado a 4 °C, a la cual llegaban dos tuberías para la oxigenación constante. La médula se fijaba a la placa por medio de alfileres de 0,1 mm de grosor clavadas en las meninges a ambos lados en la zona rostral y uno más en el extremo caudal, después se procedía a retirar las capas meníngeas más externas (duramadre y aracnoides) a lo largo de toda la médula espinal utilizando unas tijeras.

Una vez que la médula se encontraba libre de las meninges externas se realizaba una pequeña incisión (menos de 1 cm) con un bisturí en la zona media, justo para empezar a separar ambas hemimédulas. Finalmente utilizando alfileres, pinzas y tijeras se continuaba la hemisección separando progresivamente las dos mitades tirando de los alfileres y cortando cuando era necesario para no ejercer tensión sobre el tejido nervioso.

Mantenimiento de la médula espinal.

La preparación de médula espinal hemiseccionada se sabe que es una preparación viable durante más de 7 horas, siendo útiles para experimentación ambas mitades. De las dos mitades obtenidas tras la hemisección, una de ellas se colocaba en un vaso de precipitados lleno de LCRA con una vía de oxigenación para ser utilizada en caso necesario y la otra mitad se transfería al baño de órganos, que se encontraba con un flujo constante de LCRA oxigenado, donde se fijaba con alfileres de 0.1 mm y se mantenía *in vitro* durante el resto del experimento.

La composición del líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) era (en mM): NaCl (128), KCl (1.9), KH₂PO₄ (1.2), MgSO₄ (1.3), CaCl₂ (2.4), NaHCO₃ (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% O₂ – 5% CO₂) 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 hemiseccionada 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 (fig 2.1). La tubería de entrada conectaba el baño con el sistema de perfusión y la de salida llevaba el líquido a un depósito de recogida.

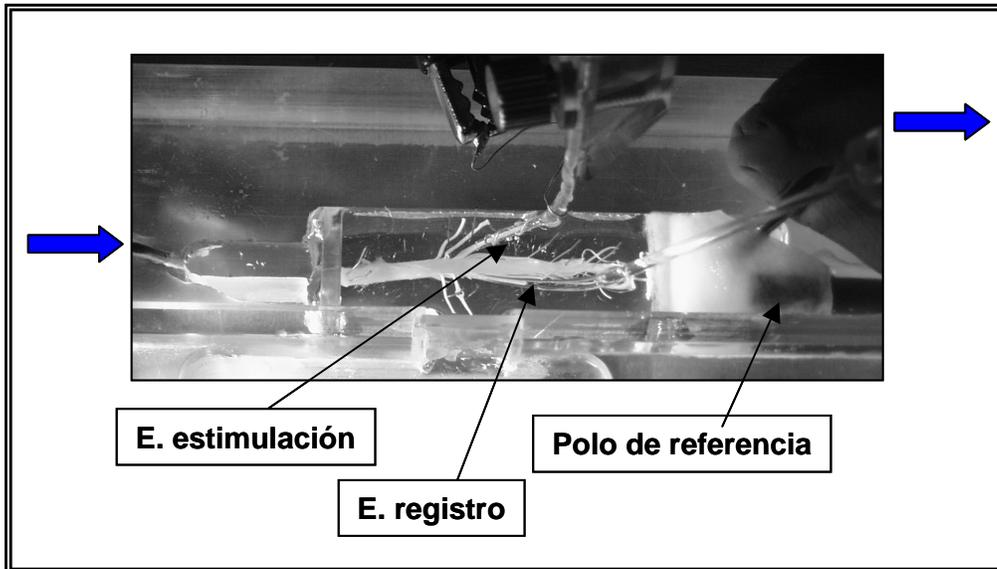


Figura 2.1. En la fotografía se muestra la disposición de la médula espinal hemiseccionada en el interior de la cámara de registro. Las flechas de los laterales indican el lugar de entrada (izquierda) y salida (derecha) del líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA). La médula esta dispuesta con su parte dorsal hacia arriba. En esta parte superior se observa como una raíz dorsal se encuentra introducida en un electrodo de estimulación (E. estimulación). En la parte inferior se aprecia la raíz ventral del mismo segmento dentro de otro electrodo de succión en este caso de registro (E. registro). Nótese como el electrodo de estimulación tiene una espiral de hilo de plata alrededor. Por último se muestra la posición del polo de referencia en la cámara accesoria (debajo de la pieza de papel).

El sistema de perfusión funcionaba por gravedad con una velocidad de flujo ajustada a 4 ± 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 dos 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 (fig 2.2).

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 solo dejaba un lateral abierto para permitir trabajar dentro de ella, la caja de Faraday a su vez estaba conectada a tierra.

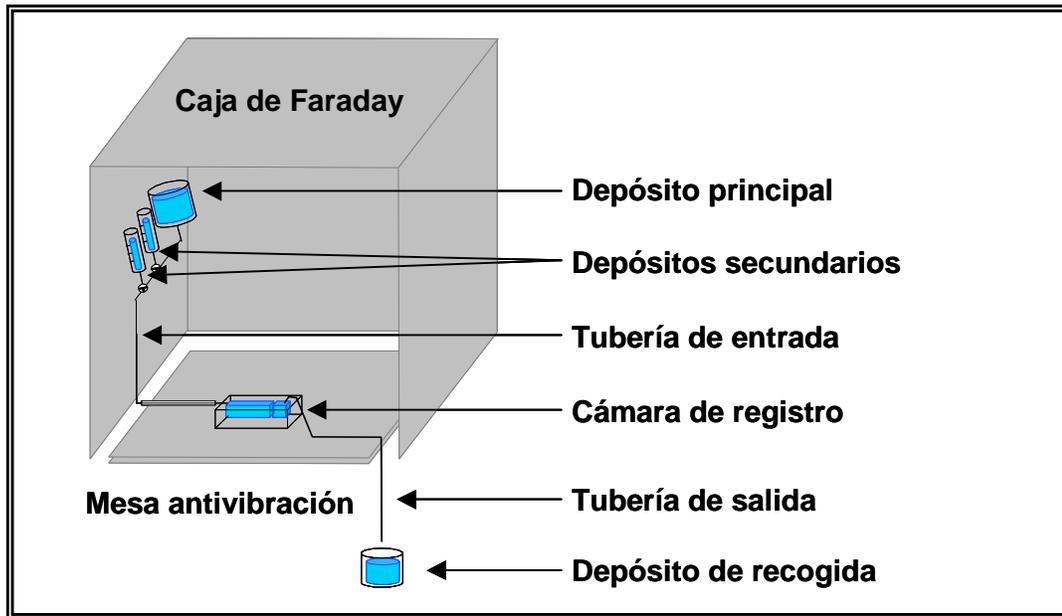


Figura 2.2. En la figura se muestra de modo esquemático la disposición de los elementos del sistema de perfusión. Todo el sistema se encuentra montado sobre una mesa antivibratoria y situado en el interior de una caja de Faraday para conseguir estabilidad mecánica y para evitar el ruido eléctrico, respectivamente. El LCRA se encuentra permanentemente burbujeado con carbógeno en los depósitos superiores. Los depósitos secundarios se utilizan para la perfusión de fármacos mediante llaves de 3 vías situadas en el circuito de perfusión. La cámara de registro consta de 2 partes, una para el tejido y la otra para permitir la evacuación del líquido sin cambios bruscos de nivel.

Estimulación eléctrica de la raíz dorsal

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 pero 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 de succión 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 dorsal.

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.

Tipos de estímulos sobre la raíz dorsal

La duración, la frecuencia y el intervalo de los pulsos eléctricos de estimulación se controlaban con un sistema Master-8 (fig 2.3); la intensidad de los pulsos era controlada por un estimulador ISO-flex (ambos de AMPI, Israel).

Los pulsos de corriente que se administraban a la raíz dorsal eran de dos tipos, que genéricamente serán denominados de baja y de alta intensidad. El pulso de baja intensidad era lo suficientemente bajo como para estimular una proporción de las fibras A exclusivamente. El de alta intensidad tenía una intensidad suficiente para estimular tanto fibras A como fibras C. Para estimular fibras A exclusivamente se utilizaban normalmente pulsos de 50 μ s de duración y de intensidad variable por encima y por debajo del umbral. Para la estimulación de alta intensidad se utilizaban pulsos de 200 μ s y 300 μ A según se determinó en experimentos anteriores (Hedo y cols, 1999).

Además de estímulos individuales también se aplicaban trenes de estímulos de alta intensidad a baja frecuencia (1 Hz), que nos permitían observar un fenómeno de tipo Wind-up (Mendell y 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 que se puede observar tanto en neuronas del asta dorsal como en motoneuronas.

Tipos de registros electrofisiológicos

Para la realización de esta Tesis se han realizado diferentes tipos de experimentos electrofisiológicos utilizando la médula espinal. La médula espinal recibe información por las aferentes primarias que transcurren por la raíz dorsal y, después de la integración que tiene lugar en ella, la salida de información se realiza por los axones de las motoneuronas, que transcurren por las raíces ventrales, y también por las proyecciones de neuronas dorsales que envían información a centros superiores.

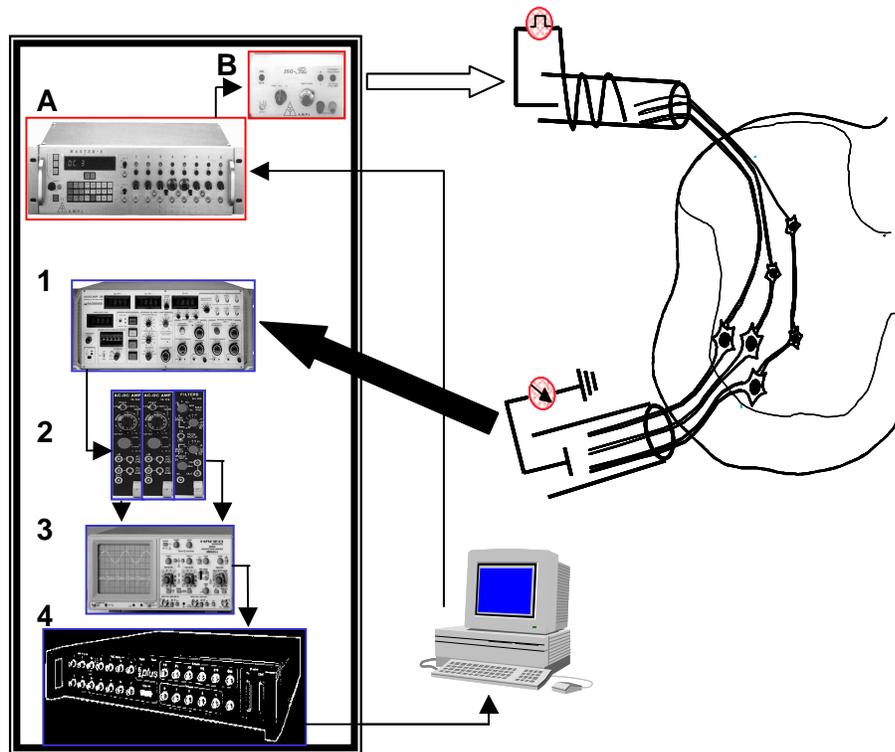


Figura 2.3. En la figura se muestra la disposición del equipo utilizado para el registro y la estimulación. En la parte derecha se muestra un esquema de un segmento lumbar de la médula espinal que tiene situado un electrodo de succión para estimular la raíz dorsal (parte superior) y otro electrodo en la raíz ventral para el registro (parte inferior). La señal registrada de la raíz ventral pasa por diferentes componentes del equipo antes de ser transferida al ordenador. Estos componentes son: 1.- amplificador AxoClamp 2B, 2.- amplificadores y filtros NeuroLog, 3.- osciloscopio, 4.- convertidor analógico-digital CED. Para la estimulación se utilizaba el sistema Master-8 (A) acoplado a un estimulador Iso-Flex (B). La estimulación se podía controlar con el ordenador a través del sistema Master-8.

La estimulación eléctrica de la raíz dorsal genera una serie de respuestas sinápticas en las neuronas espinales, que durante la realización de esta Tesis se han registrado como (1) reflejos espinales por medio de electrodos de succión situados en la raíz ventral, (2) respuestas de neuronas dorsales o ventrales utilizando electrodos

finos extracelulares o (3) intracelulares y (4) como potenciales de la raíz dorsal utilizando electrodos de succión sobre una raíz dorsal adyacente a la raíz de estimulación.

En todos los casos el polo de referencia para los electrodos de registro era un electrodo de plata (Ag/AgCl pellet, WPI, Inc., USA) que se encontraba sumergido en el baño de registro (figura 2.1).

Registros de la raíz ventral

Para el registro de reflejos espinales se introducía una raíz ventral dentro del electrodo de succión buscando un buen ajuste pero sin llegar a comprimir las fibras, en estos experimentos se obtenía la respuesta de los axones de las motoneuronas de un segmento espinal frente a la activación eléctrica de las aferentes primarias del mismo segmento.

Tratamiento de las señales

Las señales registradas de la raíz ventral (fig 2.3) se amplificaban por (1) un amplificador DC (AxoClamp 2B, Axon Instruments Inc.; CA, USA) y (2) un amplificador AC-DC (Neurolog system, Digitimer Ltd., Inglaterra) en modo DC hasta conseguir una amplificación final de 50 veces la señal registrada. Esta señal, sin filtrado posterior, da una idea de los cambios lentos de potencial originados por la activación sináptica de las motoneuronas tras la estimulación de la raíz dorsal.

Derivada de esta primera señal se podía obtener otra destinada a detectar la despolarización rápida producida por disparos de potenciales de acción. Para ésto, la señal DC se amplificó nuevamente (x50) por medio de otro amplificador en modo AC y posteriormente se eliminaron las frecuencias menores de 200 Hz y mayores de 3 KHz por medio de un filtrado analógico (Neurolog system, Digitimer Ltd., Inglaterra).

Las señales bioeléctricas se monitorizaban en un osciloscopio 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 de nuevo utilizando un programa de adquisición de señales bioeléctricas (Spike 2, versión 3.14 Cambridge Electronics Design Ltd, UK). Las respuestas AC y DC se digitalizaban y almacenaban a una frecuencia de 3.3 KHz

para su posterior análisis con aplicaciones informáticas construidas en nuestro laboratorio.

Características de las respuestas y definición de las variables estudiadas

Las respuestas obtenidas registrando de la raíz ventral consisten en un potencial basal que refleja el potencial de membrana de los axones de las motoneuronas. Los cambios en el potencial de membrana de las motoneuronas (despolarizaciones e hiperpolarizaciones) producidos por la aplicación de algunos fármacos se observaban en el canal DC, estos cambios fueron cuantificados en términos de amplitud máxima desde la línea base previa a la aplicación de los compuestos.

Los registros de la raíz ventral suelen presentar en modo DC actividad espontánea en forma de potenciales de baja amplitud y corta duración, la aparición de actividad espontánea en registros AC es menos frecuente. La actividad espontánea se caracterizaba en términos de amplitud y frecuencia en modo DC.

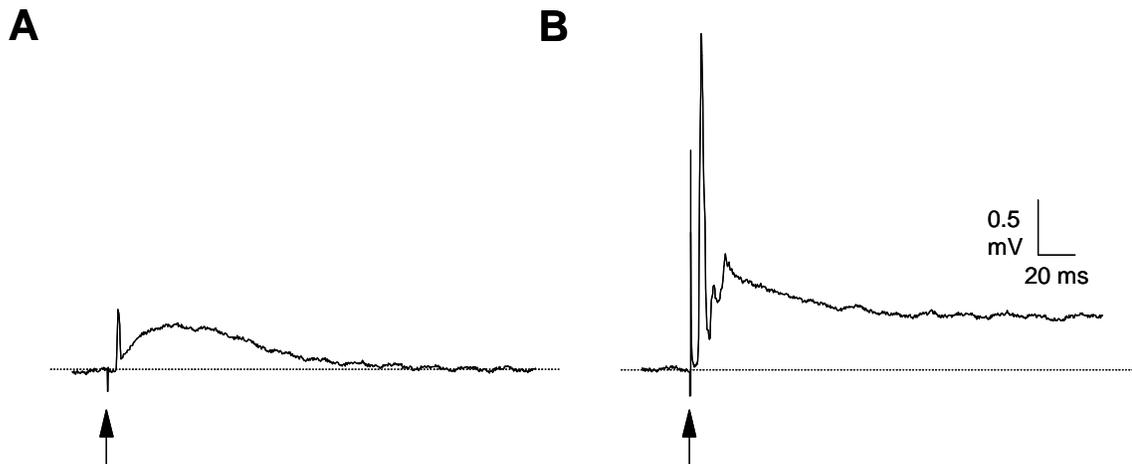


Figura 2.4. En la figura se muestran las respuestas de la raíz ventral tras la estimulación de la raíz dorsal correspondiente con diferentes intensidades de estímulo. Se observa la respuesta obtenida frente a la estimulación en **A** de baja intensidad (50 μ s; 50 μ A) y en **B** de alta intensidad (200 μ s; 300 μ A). Se puede comprobar como la respuesta cambia cuantitativa pero no cualitativamente con intensidades de estimulación superiores. Las flechas indican el artefacto del estímulo.

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 α (RMS) y una onda lenta de baja amplitud originada por potenciales postsinápticos excitatorios asincrónicos en las motoneuronas, producidos por activación de circuitos polisinápticos. El aumento de la intensidad del estímulo hace variar cuantitativamente la respuesta, pero no cualitativamente (fig 2.4). Las variables analizadas en estas respuestas a estímulos simples eran: (1) el área de la onda lenta hasta los 4 s para la alta intensidad (fig 2.5 A) y (2) la amplitud del RMS, que fue tomada desde la línea base y en un intervalo entre 4 y 9 ms tras el artefacto del estímulo (fig 2.5 B).

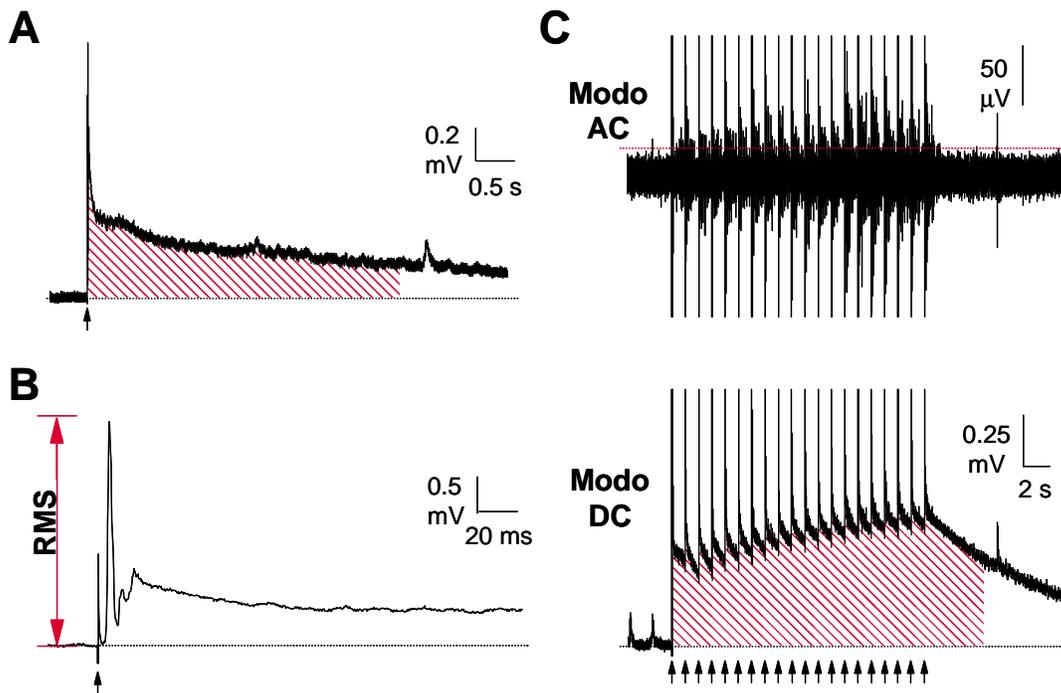


Figura 2.5. Medidas realizadas de los registros extracelulares de la raíz ventral. En **A** está indicada la medida de área integrada de 4 s utilizada para los estímulos individuales de alta intensidad, que se corresponde con la zona rayada. En **B** se puede observar como fue tomada la medida del reflejo monosináptico. Por último en **C** se muestran las medidas tomadas para la estimulación repetitiva de alta intensidad. En modo AC se midió el número de potenciales de acción compuestos, contando aquellos que superaban un umbral situado por encima del nivel del ruido (línea discontinua sobre el registro). En modo DC se midió el área integrada de la respuesta desde el artefacto del primer estímulo hasta 24 segundos después. Las flechas indican el artefacto del estímulo en todos los apartados.

En cuanto a la estimulación repetida de la raíz dorsal con estímulos de alta intensidad en modo DC se medía el área integrada de la respuesta desde el artefacto del primer estímulo hasta los 24 s del inicio del tren (fig 2.5 C).

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 (≤ 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 (fig 2.5 C). Para estímulos singulares se medía el número de potenciales por respuesta. En el caso de los trenes de estímulos el número de eventos suele ir en incremento progresivo ante la repetición del estímulo. Las cuentas eran calculadas para cada estímulo y posteriormente sumadas para tener un total de potenciales de acción por tren de estímulos. 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 100-990 ms desde el artefacto del estímulo.

El mecanismo que se utilizaba para estudiar la transmisión no nociceptiva era por medio del estudio de umbrales. El umbral lo hemos definido aquí como la intensidad mínima de estimulación, en μA , que producía una respuesta visible en motoneuronas (alrededor de $10 \mu\text{V}$), utilizando una duración del estímulo fija de $50 \mu\text{s}$. Las fibras aferentes necesitan intensidades de activación diferentes dependiendo de su diámetro, siendo las fibras más gruesas las que se activan con menor intensidad de estimulación, por tanto al buscar la primera intensidad que produce respuesta de motoneuronas tenemos la seguridad de que las fibras que estimulamos son gruesas exclusivamente (posiblemente fibras "Ia"). En los protocolos de estimulación para los umbrales lo que hacíamos era dar estímulos de diferentes intensidades por encima y por debajo de la intensidad umbral, en incrementos o decrementos de $5 \mu\text{A}$. Tras la aplicación de las diferentes drogas se medían las variaciones producidas en la intensidad umbral.

Registro de la raíz dorsal

En este tipo de experimentos tanto la estimulación como el registro eléctrico se realizaban utilizando electrodos de succión del mismo tipo que para los registros de la raíz ventral. En este caso ambos electrodos se colocaban sobre raíces dorsales, el de estimulación sobre una raíz más caudal que el de registro (normalmente la estimulación se realizaba sobre la raíz del segmento lumbar 5, o L5, y el registro de la raíz del segmento lumbar adyacente, L4).

Tratamiento de las señales

El tratamiento de las señales fue el mismo que se ha descrito para los registros de la raíz ventral.

Las señales AC-DC resultantes se digitalizaban y almacenaban con diferentes frecuencias de muestreo para recrear con suficiente fidelidad las respuestas registradas. La frecuencia de muestreo del canal DC era de 6 KHz para permitir el análisis adecuado de las respuestas, mientras que el canal AC se utilizaba con una frecuencia de muestreo menor, 3 KHz, ya que en este caso su valor no fue tan importante.

Características de las respuestas y definición de las variables estudiadas

En primer lugar el registro de la raíz dorsal presenta una línea base que se relaciona con el potencial de membrana de las terminales de las aferentes primarias. Las diferencias producidas sobre este potencial basal con la aplicación de las distintas drogas se medían como diferencias respecto al control (en mV) teniendo en cuenta la deriva de las señales eléctricas que se producía en algunos casos.

Como en el caso de los registros de la raíz ventral, el registro obtenido de la raíz dorsal presenta actividad espontánea. Esta actividad espontánea se observa en forma de despolarizaciones en el modo DC y en forma de potenciales de acción o reflejos de la raíz dorsal en el modo AC. La actividad espontánea se caracterizaba en términos de amplitud, duración y frecuencia en modo DC y como área integrada en modo AC.

Las respuestas de la raíz dorsal frente a la estimulación eléctrica de la raíz dorsal adyacente presentaban en todos los casos un patrón característico.

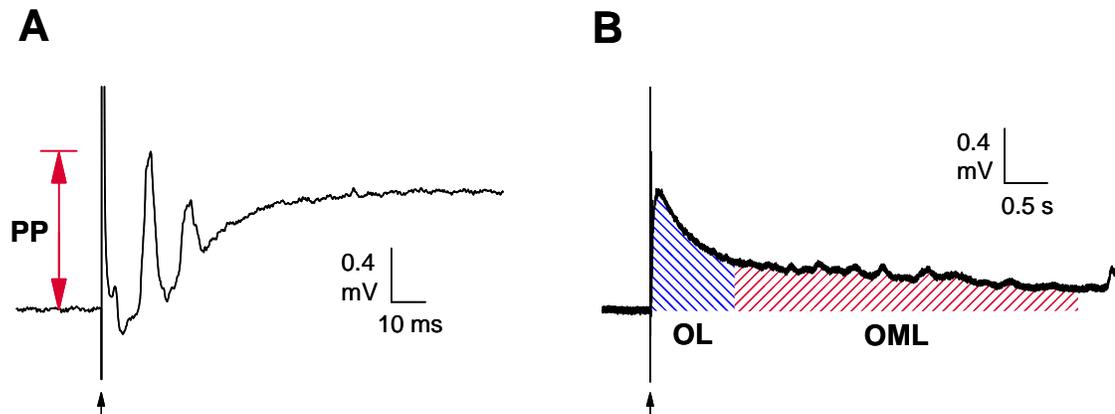


Figura 2.6. Medidas tomadas en los registros extracelulares de una raíz dorsal frente a la estimulación eléctrica de la raíz dorsal adyacente. En **A** se muestran los primeros milisegundos de la respuesta y la medida realizada del primer pico. En **B** se pueden observar las medidas de área integrada de la onda lenta (OL, el primer segundo desde el artefacto del estímulo) y de la onda muy lenta (OML, entre 1 y 5 segundos). Las flechas indican los artefactos del estímulo.

En modo DC la señal así registrada presenta dos picos rápidos, seguidos de una onda lenta con una duración aproximada de 1 s que se resuelve formando un componente más tardío, con una duración aproximada de 10 s, al que hemos denominado onda muy lenta. Las medidas analizadas sobre este canal DC consistían en medir la amplitud del primero de los picos rápidos y el área integrada de la onda lenta (hasta 1s) y de la onda muy lenta (de 1s a 5 s) desde el artefacto del estímulo (fig 2.6).

En modo AC la señal consiste en una serie de oscilaciones sobre la línea base que se corresponden con el disparo de potenciales de acción antidrómicos (lo que se conoce como reflejos de la raíz dorsal) en las aferentes primarias. El parámetro utilizado para el análisis sobre el modo AC era el área integrada por respuesta entre 8 y 100 ms.

Estos parámetros se medían del mismo modo para respuestas de alta intensidad (200 μ s; 300 μ A) y para respuestas del doble de la intensidad umbral (2T).

La intensidad umbral se determinaba en situación control buscando la intensidad mínima que producía una respuesta en forma de potenciales de acción en modo AC. Además de para determinar la intensidad de 2T el umbral también se

utilizaba en los experimentos con los moduladores de la corriente M para estudiar los efectos sobre estímulos de muy baja intensidad. Los efectos de los moduladores sobre el umbral se cuantificaban como incrementos o decrementos sobre la intensidad umbral en control.

Registros extracelulares de neuronas del asta dorsal

En una serie de experimentos se utilizaron electrodos extracelulares finos con el fin de estudiar los efectos de los moduladores de la corriente M sobre las respuestas de las neuronas dorsales. Estos electrodos disponían de dos barriles que permitían realizar el registro por uno de ellos y con el otro marcar la posición del registro con la inyección de azul de pontamina.

Estos electrodos de doble punta eran fabricados a mano utilizando dos capilares de vidrio (capilares de boro-silicato con filamento interno, Clark Electromedical Instruments, GC100F) unidos entre sí, que se estiraban tras calentarlos con un mechero de gas. La punta del electrodo tenía un diámetro conjunto inferior a 30 μm , lo que permitía introducirlo en la médula espinal sin dañarla excesivamente, posibilitando el registro de la actividad de neuronas del asta dorsal. La médula espinal se situaba con la parte hemiseccionada hacia arriba para permitir la entrada del electrodo a través de la sustancia gris que presenta menos resistencia a la penetración (fig 2.7 A). El registro de neuronas de láminas más superficiales no resultó posible debido a la incapacidad de penetrar las columnas dorsales.

Cuando el electrodo se había situado en la posición deseada, se iba introduciendo poco a poco hasta llegar a alguna localización que diera respuestas estables en forma de potenciales de acción en respuesta a la estimulación eléctrica de la raíz dorsal.

El electrodo de registro se rellenaba de LCRA, que permite la conducción de las señales eléctricas, y presentaba una resistencia de entre 8 y 12 $\text{M}\Omega$. El otro electrodo se rellenaba con azul de pontamina disuelto al 4% en acetato de sodio y se conectaba por medio de una tubería a un picoinyector de presión (PM2000B, MicroData Instruments Inc.). Una vez terminado el registro se aplicaban unos pulsos a baja presión (entre 1 y 3 psi) y de corta duración (entre 0.5 y 2 s) para inyectar una pequeña cantidad de azul de pontamina marcando la zona donde había estado situado el electrodo. El procedimiento histológico que se llevaba a cabo para revelar la

zona de estudio se detallará más adelante (véase procedimientos histológicos, pag 81).

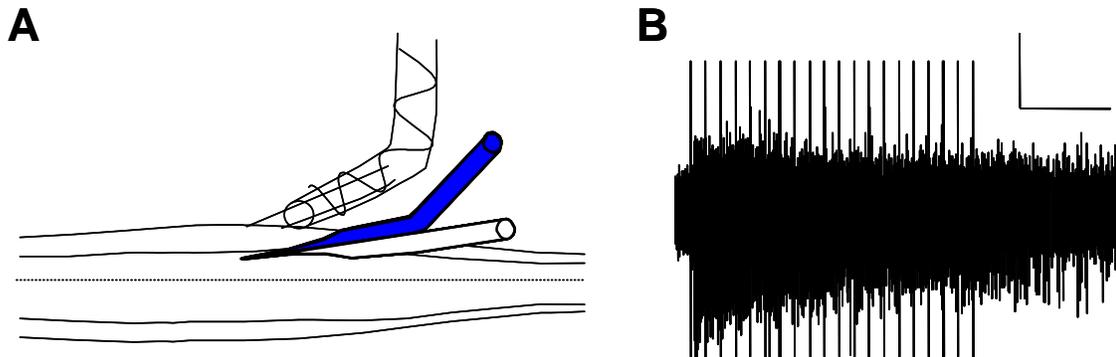


Figura 2.7. Disposición experimental y medidas tomadas en los registros extracelulares de la actividad de neuronas dorsales. En **A** se muestra un esquema con la disposición de los electrodos en estos experimentos. En la representación la zona dorsal se sitúa hacia arriba y la línea de puntos indicaría aproximadamente el límite entre asta dorsal y asta ventral. Las líneas continuas aproximadamente paralelas al borde de la médula indican los límites de la sustancia blanca. La raíz dorsal se representa en el interior de un electrodo de succión para la estimulación eléctrica. El registro se realizaba con una pipeta de vidrio estirada a mano con dos tubos, uno recto para el registro y otro en ángulo para la inyección de azul de pontamina. La pipeta se introducía desde la parte medial hemiseccionada de la médula. En **B** se muestra un ejemplo de un registro en modo AC de la actividad de neuronas dorsales en respuesta a la estimulación repetitiva de alta intensidad de la raíz dorsal. Se pueden observar los potenciales de acción compuestos como un engrosamiento de la línea base. Las líneas verticales grandes se corresponden con el artefacto de los estímulos. Barras de calibración: 0.5 mV; 6 s.

Tratamiento de las señales

El tratamiento de las señales era el mismo que se ha descrito para los registros AC de la raíz ventral. Las señales obtenidas se digitalizaban y se almacenaban solamente en modo AC a 10 KHz para su posterior análisis.

Características de las respuestas y definición de las variables estudiadas

En este tipo de experimentos se estudiaba el número de potenciales de acción que disparaban las neuronas dorsales tras la estimulación de la raíz dorsal con trenes de estímulos de alta intensidad, para lo cual utilizábamos únicamente el modo de registro AC (fig 2.7 B).

Debido al tamaño de la punta del electrodo, en la mayoría de las ocasiones los registros recogían la actividad de más de una neurona a juzgar por el tamaño y/o forma de los potenciales de acción obtenidos. Para realizar un análisis adecuado de los registros obtenidos utilizábamos una aplicación de nuestro programa de

adquisición de datos (Spike 2), que permite por medio de un análisis de forma diferenciar los potenciales de acción producidos por las distintas neuronas. El análisis se realizaba contando el número de potenciales de acción de cada neurona en respuesta al tren de estímulos.

Registros intracelulares

En estos experimentos el registro se realizaba utilizando electrodos intracelulares que se obtenían estirando capilares de vidrio con filamento interno de 1 mm de diámetro externo (Clark Electromedical Instruments, GC100F). Los electrodos se preparaban en un aparato para estirar electrodos (Sutter Instruments Co., modelo P-97) para producir puntas de tamaño menor de 0.1 μm , adecuadas para el registro intracelular.

Los electrodos se rellenaban con acetato potásico 3M y tenían unas resistencias entre 70 y 100 M Ω o entre 120 y 180 M Ω . Los de menor resistencia se utilizaban para el registro de motoneuronas debido a que permitían la aplicación de corrientes mayores, necesarias para trabajar con neuronas de gran tamaño. En gran parte de los experimentos los electrodos se rellenaban con biocitina disuelta en el acetato potásico 3M. La biocitina permitía el marcaje de las neuronas estudiadas y la recuperación de su forma, tamaño y posición dentro de la médula espinal tras un procedimiento histológico. Las condiciones de aplicación de biocitina y del proceso de recuperación se detallan más adelante en la parte de procedimientos histológicos (pag 81).

Los electrodos se situaban visualmente sobre la parte dorsal o ventral de la médula espinal dependiendo del tipo de neuronas que quisiéramos estudiar.

Después de ajustar los parámetros de resistencia y de capacitancia de los electrodos, éstos se introducían en la médula espinal con ayuda de un micromanipulador, se iban realizando desplazamientos de 2-4 μm , conociendo en todo momento la profundidad del registro. La medida de profundidad se realizaba contando desde la superficie medial de la médula.

Durante el avance, se aplicaban pulsos de corriente a través del electrodo intracelular de 10 ms de duración y -0.05 nA de intensidad a alta frecuencia (25 Hz) a través del electrodo. Aumentos de la resistencia se interpretaban como proximidad a una célula. La penetración se facilitaba con un mecanismo controlado de

descompensación de la capacitancia. Tras la penetración se administraba una corriente continua negativa para estabilizar el registro y facilitar el sellado de la membrana. Esta corriente de estabilización se iba retirando progresivamente hasta que la neurona se mantenía estable a un potencial de al menos -60 mV. Las neuronas que mantenían potenciales de membrana más despolarizados o que tenían potenciales de acción de amplitud menor de 60 mV eran descartadas.

Como en los experimentos extracelulares, en estos experimentos también se estudiaban las respuestas mediadas por activación de las aferentes primarias tanto nociceptivas como no nociceptivas, para lo cual se introducía la raíz dorsal del segmento espinal que interesase estudiar en un electrodo de succión de vidrio. Además, en los experimentos de motoneuronas, la raíz ventral correspondiente también se introducía en otro electrodo de succión para permitir la activación antidrómica de los axones de las motoneuronas, lo que nos permitía identificar las motoneuronas. Esta respuesta antidrómica tiene la característica de resistir frecuencias de estimulación muy altas puesto que no hay implicación de ningún contacto sináptico (Brock y cols, 1953), se utilizaban trenes de 4 o 5 estímulos (normalmente $100\ \mu\text{s}$ y $100\ \mu\text{A}$) sobre la raíz ventral a $10\text{-}30$ Hz (fig 2.8).

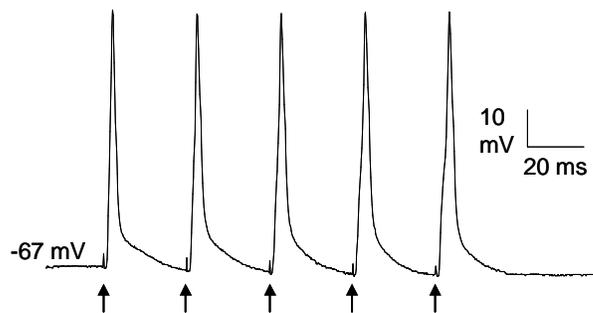


Figura 2.8. Registro de potenciales de acción antidrómicos en una motoneurona tras la estimulación de la raíz ventral mediante un electrodo de succión. Los estímulos ($100\ \mu\text{s}$; $100\ \mu\text{A}$) se aplicaron a una frecuencia de 30 Hz. Las flechas indican el artefacto de los estímulos.

Tratamiento de las señales

Estos experimentos se realizaban utilizando un AxoClamp 2B (Axon Instruments Inc.; CA, USA) que permitía controlar tanto el registro como el paso de corriente a través del electrodo intracelular.

Las señales tras pasar por el convertidor analógico-digital (CED 1401 plus, de Cambridge Electronics Design Ltd, UK) se almacenaban en el ordenador a una frecuencia de 6 KHz para su posterior análisis.

Al mismo tiempo se registraba la corriente aplicada en cada punto del experimento, para lo cual utilizábamos un canal en el que se monitorizaba la

intensidad de corriente que se estaba aplicando a cada momento a través del AxoClamp 2B.

Características de las respuestas y definición de las variables estudiadas

En los registros intracelulares se monitorizaba continuamente el potencial de membrana. Sobre este potencial de membrana normalmente se observaba la presencia de actividad espontánea de origen sináptico en forma de despolarizaciones, a veces supraumbrales. Con menor frecuencia se observaban potenciales postsinápticos inhibitorios.

En estos experimentos se estudiaban los efectos de los moduladores sobre el potencial de reposo de las neuronas, cuantificándose los efectos como amplitud de la variación del potencial en mV. También se estudiaba la actividad espontánea en términos de amplitud y de frecuencia, en control y tras la aplicación de los moduladores.

La estimulación eléctrica de la raíz dorsal producía en las neuronas un potencial excitador postsináptico compuesto que se observaba como una despolarización de amplitud y duración características en cada neurona. En la mayoría de los casos se producía al menos un potencial de acción a corta latencia y en más contadas ocasiones también se podía observar el disparo de más potenciales a larga latencia.

Las respuestas a la estimulación individual de alta intensidad de la raíz dorsal se estudiaban como número de potenciales de acción y como área integrada de la despolarización (fig 2.9), el análisis del área despolarizada se dividía en corta (menos de 500 ms) y larga latencia (desde 500 ms).

Además de estímulos individuales también se estudiaban umbrales y respuestas a la estimulación repetitiva de alta intensidad de la raíz dorsal. De los umbrales se estudiaban las variaciones en la intensidad umbral con la aplicación de las drogas. En las respuestas a los trenes de estimulación se medía tanto el área despolarizada como el número de potenciales de acción, aunque el parámetro utilizado para el análisis era únicamente los potenciales de acción. Los trenes se utilizaban sobre todo para provocar el disparo en neuronas en las que la estimulación individual no consiguió provocar el disparo de potenciales de acción a larga latencia, aun así hubo ocasiones en las que tampoco fue posible. El disparo de potenciales de

acción a larga latencia era recomendable para intentar apreciar algún efecto de los moduladores.

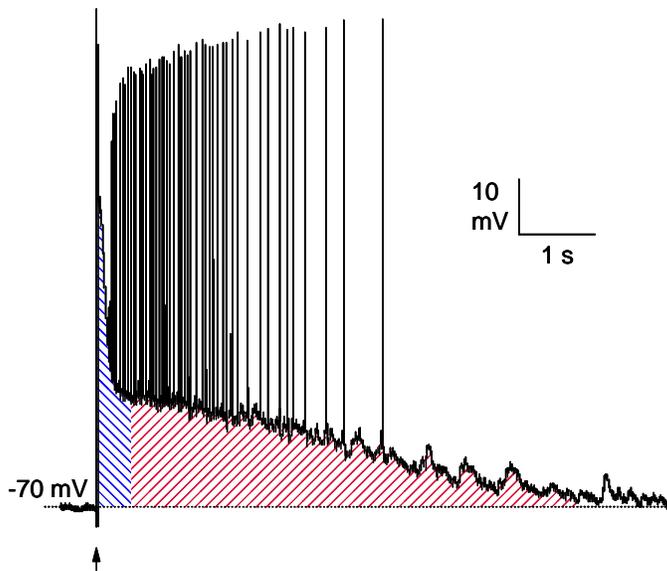


Figura 2.9. Mediciones realizadas de las respuestas registradas intracelularmente frente a la estimulación individual de alta intensidad ($200 \mu\text{s}$; $300 \mu\text{A}$) sobre la raíz dorsal. En la figura se muestran las medidas de área integrada a corta (hasta 0.5 segundos) y larga latencia (desde 0.5 segundos). También se cuantificaron los potenciales de acción totales por respuesta. La flecha indica el artefacto del estímulo.

La utilización de esta técnica de registro intracelular nos permite estudiar las respuestas basales y las respuestas frente a la estimulación de la raíz dorsal de las neuronas espinales, pero además podemos estudiar la excitabilidad de la propia neurona aplicando pulsos de corriente a través del electrodo intracelular.

La aplicación de corriente a través del electrodo de registro permite estudiar cambios en la excitabilidad de la neurona de forma aislada del resto de elementos espinales. La corriente altera transitoriamente el potencial de la neurona pudiendo estudiar como se comporta la neurona ante una despolarización o ante una hiperpolarización.

Con pulsos despolarizantes aplicados a través del electrodo intracelular podemos inducir el disparo de potenciales de acción, y contar su número en control y tras la aplicación de los moduladores de la corriente M. Además del número de potenciales se estudiaban cambios en la rheobase (intensidad mínima que producía potenciales de acción) producidos por los moduladores. Los pulsos despolarizantes aplicados a través del electrodo intracelular se aplicaban en sucesión, incrementando la intensidad de los mismos, para construir curvas con el número de potenciales de acción frente a la intensidad del pulso aplicado a través del electrodo intracelular.

Preparación y aplicación de los fármacos.

Los compuestos particulares que se utilizaron específicamente en cada tipo de experimento serán mencionados en su respectivo capítulo, pero hay dos compuestos que se han empleado sistemáticamente en la mayor parte de los experimentos y son la base de los resultados obtenidos y por tanto se mencionan en esta sección general. Estos compuestos son los moduladores de la corriente M:

- (1) El facilitador de la apertura de los canales KCNQ etil ester del ácido N-(2-amino-4-(4-fluorobencilamino)-fenil)carbámico o retigabine.
- (2) El bloqueador de los canales KCNQ 10,10-bis (4-piridinilmetil)-9(10H)-antracena o XE-991.

Retigabine y XE-991 fueron donados por el Dr. B.S. Jensen de los laboratorios NeuroSearch en Dinamarca. Ambos compuestos se disolvían en DMSO a una concentración de 10 mM y se mantenían congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alícuotas de 100 μl hasta el momento de su utilización.

En todos los casos los compuestos que se utilizaban eran disueltos previamente en alícuotas de alta concentración (10^{-3} o 10^{-2}) en sus respectivos solventes, bien agua ultrapura, dimetil sulfóxido (DMSO) o una solución de NaOH a 1N, y posteriormente conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización. La aplicación de los solventes sobre la preparación durante largos periodos de tiempo en ningún caso producía ninguna alteración observable de las respuestas. Todos los fármacos eran diluidos a su concentración final en LCRA instantes antes de ser perfundidos sobre la preparación. La aplicación de los compuestos se realizaba de dos formas diferentes dependiendo del tipo de experimento.

- En la mayoría de los casos las drogas, una vez diluidas en LCRA hasta la concentración deseada, se aplicaban utilizando los depósitos secundarios del sistema de perfusión. Los compuestos se aplicaban durante el tiempo necesario en cada caso a todo el baño, consiguiéndose una aplicación uniforme sobre la médula espinal completa.
- En algunos experimentos la aplicación de los compuestos se producía localmente utilizando un inyector por presión MDI PM2000B (MicroData Instruments Inc.). Este tipo de aplicación nos permite que las drogas alcancen solo zonas concretas de la médula espinal actuando únicamente sobre ciertas poblaciones de neuronas y no otras. Tras la colocación de las respectivas

raíces para la estimulación y el registro se procedía a situar la pipeta de inyección sobre la zona que interesase. Se utilizaron pipetas con 2 cañones y un diámetro total por debajo de 80 μm . La pipeta se introducía utilizando un micromanipulador hasta la profundidad deseada (medida desde la parte medial). Las condiciones concretas de aplicación se detallarán en el capítulo correspondiente. El volumen de inyección se calculaba pesando el volumen total aplicado tras la misma serie de inyecciones que se utilizaba en los experimentos.

Procedimientos histológicos

En paralelo y complementando los experimentos electrofisiológicos también se realizaban diferentes procedimientos histológicos con diversas finalidades.

- En los experimentos de registro extracelular de neuronas dorsales el objetivo era localizar la zona en la que se había realizado previamente el trabajo electrofisiológico en la médula espinal hemiseccionada, para lo cual se utilizaba el marcaje con azul de pontamina.
- En los experimentos de registro intracelular se realizaba el marcaje con biocitina de las neuronas que eran objeto de estudio, y tras el proceso histológico se podía recuperar la imagen de la neurona.

Recuperación del marcaje de pontamina

Después de la inyección de azul de pontamina se seccionaba la zona de la hemimédula en la que se había realizado el registro y se congelaba a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente se incluía la pieza de médula espinal en un bloque de medio embebedor sintético (OCT, EMS, UK) y se cortaba en secciones transversales de 60 μm de grosor en un criostato a -20°C . Los cortes se montaban sobre portaobjetos de vidrio gelatinizados y se mantenían en el horno a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ para que se adhiriesen bien. Después se dejaban enfriar a temperatura ambiente y se comenzaba el proceso.

Primero se hidrataban los cortes pasando los portaobjetos por alcoholes de concentración decreciente y después por agua destilada. Posteriormente se teñían los cortes con rojo neutro que nos permitía identificar las principales características morfológicas de la médula espinal. Tras lavar con agua destilada se procedía a una

nueva deshidratación de los cortes y finalmente se pasaban por xileno para permitir una mayor eficacia al pegar el cubreobjetos con DPX (Panreac, España).

Utilizando un sistema de cámara lucida (Leitz, Alemania) se dibujaban los cortes con las marcas de azul de pontamina recuperadas. Estas marcas servían para localizar en que láminas del asta dorsal de la médula espinal se realizaban los registros extracelulares.

Recuperación del marcaje intracelular con biocitina

En gran parte de los experimentos intracelulares realizados el electrodo intracelular se rellenaba con biocitina (5.5 mg/ml, Sigma) disuelta en acetato potásico 3M. La biocitina se mantenía en alícuotas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el comienzo del experimento y cuando se descongelaba se comprobaba el pH, que se tenía que ajustar alrededor de 10. La biocitina es un compuesto que a pH básicos queda cargada con carga negativa, ésto permite que al aplicar corriente negativa a través del electrodo las moléculas de biocitina salgan del electrodo hacia el interior de la célula por iontoforesis. Normalmente se utilizaban aplicaciones continuas de corriente negativa, entre -0.6 y -1.2 nA, durante 15-20 minutos.

Tras la aplicación de biocitina la neurona se dejaba un tiempo produciendo potenciales de acción (mediante estímulos a la raíz dorsal, pulsos aplicados a través del electrodo intracelular o ambos) para favorecer la difusión del compuesto por toda la neurona. Después de ésto se sacaba el electrodo de la neurona y se cortaba una zona de 2-3 mm de longitud de médula conteniendo la neurona marcada. Este fragmento se introducía en fijador frío (4% paraformaldehído, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) toda la noche, seguido de 24h en tampón fosfato salino con 30% de sacarosa. Después el bloque se rodeaba con un medio embebedor sintético (OCT, EMS, UK) y se realizaban cortes seriados de 40-60 μm de grosor en un criostato. Las secciones se montaban en porta-objetos gelatinizados y se introducían en el horno a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora.

Posteriormente las secciones se procesaban en los siguientes medios:

- (1) 10% metanol/1% H_2O_2 /en tampón fosfato salino (PBS) durante 30 minutos para la inactivación de la peroxidasa endógena.
- (2) 1% triton X-100 (Sigma, España) en PBS 1h para permeabilizar las membranas de las células a los diferentes compuestos.

- (3) Complejo avidina-biotina peroxidasa (Vectastain ABC Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) en PBS 1h para producir complejos de la enzima que se utilizaba para el revelado, en este caso peroxidasa. Avidina es un compuesto que se une a la biocitina del interior de la neurona marcada y a otras biotinas del complejo, con las uniones sucesivas de más moléculas de avidina y enzima finalmente se consigue formar grandes complejos de enzima. El marcaje inespecífico en estos experimentos está muy reducido puesto que es necesaria en un primer paso la biocitina para que se formen los complejos de enzima sobre ella.
- (4) Solución cromagen (0.05% diaminobencidina + 0.16% acetato de cobalto + 0.005% H₂O₂ en tampón Tris-HCl) 1 minuto, en esta solución la peroxidasa cataliza una reacción en la cual la diaminobencidina libera electrones y se oxida, produciendo un precipitado de color marrón o negro, los electrones los utiliza la peroxidasa para reducir el H₂O₂.

Los cortes se lavaban en tampón fosfato salino 0.1 M (pH 7.4) entre los tratamientos. Por último los cortes se deshidrataban y se montaban con DPX (Panreac, España).

Las neuronas recuperadas se dibujaban utilizando un sistema de cámara lucida (Leitz, Alemania) acoplado al microscopio, en algunos casos se encontraban prolongaciones de una neurona hasta en 3 cortes diferentes, las neuronas se dibujaban con la zona de la médula espinal donde se encontraban para poder localizarlas. Se incluían en una base de datos el tamaño, la forma y la posición de las neuronas recuperadas.

CAPÍTULO 1

EFFECTOS DE LOS MODULADORES DE LA CORRIENTE M SOBRE LOS REFLEJOS ESPINALES

INTRODUCCIÓN

Desde que la corriente M se describió en neuronas simpáticas de anfibio (Brown y Adams, 1980) son pocos los trabajos que han indicado la presencia de corrientes M en neuronas de la médula espinal. Los primeros, contemporáneos al descubrimiento de la corriente, no se centraron directamente en estudiar la corriente M como tal, sino que mostraban que en algunas neuronas espinales muscarina y sustancia P actuaban sobre la excitabilidad neuronal posiblemente modulando la corriente M (Nowak y Macdonald, 1983; Murase y cols, 1986).

En los últimos años el estudio de la corriente M en la médula espinal ha cobrado cierto interés y son varios los grupos que han realizado trabajos más concretos en este campo. Por un lado existen pruebas de la expresión de proteínas KCNQ en la médula de ratón (Dedek y cols, 2001), que se relacionan con el hecho de que mutaciones de ciertas subunidades KCNQ dan lugar a miokimia (contracciones involuntarias del músculo esquelético). También se ha indicado la presencia de corrientes M en motoneuronas de tortuga (Alaburda y cols, 2002), donde contribuyen a la regulación de la excitabilidad.

Sin embargo en ninguno de estos trabajos estudiaron el papel que pueden jugar estas corrientes sobre el procesamiento de información somatosensorial que tiene lugar en la médula espinal.

Blackburn-Munro y Jensen (2003) se centraron en el estudio de los efectos antinociceptivos que presenta el facilitador de la corriente M retigabine sobre animales sometidos a modelos de neuropatía experimental como son la constricción crónica y la ligación-transección de nervio periférico. En este trabajo se observó la efectividad de la administración oral de retigabine en el tratamiento del dolor neuropático, pero el uso de técnicas comportamentales sobre un animal entero dificulta atribuir el efecto antinociceptivo a una acción espinal.

Passmore y cols (2003) dieron un paso más y además de comprobar los efectos antinociceptivos en modelos animales de dolor, también aportaron pruebas acerca de la expresión de subunidades KCNQ y corrientes M funcionales en neuronas de ganglio de la raíz dorsal. Por otro lado realizaron experimentos electrofisiológicos *in vivo* en los que observaron que retigabine reduce las respuestas de neuronas dorsales frente a la estimulación eléctrica de las aferentes primarias y a la estimulación natural.

Aunque el conocimiento sobre el papel de la corriente M en la transmisión somatosensorial se estaba desarrollando, la información disponible al comenzar esta Tesis era aun bastante incompleta y fragmentada. Las pruebas acerca de la presencia de corrientes M funcionales en las propias neuronas espinales no eran del todo concluyentes y se sabía poco de la capacidad de esta corriente para controlar la excitabilidad en los diversos tipos de neuronas espinales.

La parte presentada en este capítulo se centra en el estudio de la corriente M en los reflejos espinales y en neuronas dorsales mediante registros extracelulares. Los objetivos que nos planteamos cumplir en esta primera parte fueron los siguientes:

- Saber de una manera rápida si se podía esperar algún efecto de los moduladores de la corriente M sobre la transmisión espinal nociceptiva. Para ello se estudiaron a modo global los efectos de los moduladores de la corriente M sobre los reflejos espinales realizando experimentos de concentración respuesta y de curso temporal con cada uno de los moduladores.
- Determinar si los efectos de los moduladores se producían actuando sobre corrientes M presentes en elementos espinales o si se debían a un efecto inespecífico de los compuestos. En este sentido se realizaron experimentos de reversión con ambos moduladores y experimentos de aplicación de retigabine tras el bloqueo de receptores GABA-A con picrotoxina.
- Obtener alguna información preliminar sobre la presencia de corrientes M funcionales en elementos del asta dorsal y del asta ventral de la médula espinal. En este caso se utilizaron experimentos de aplicación local de los moduladores y también registros extracelulares de la actividad de neuronas dorsales.

MÉTODOS

Diseño de los experimentos

A lo largo de este capítulo se presentan los resultados obtenidos con registros extracelulares en la médula espinal. Concretamente se utilizaron registros de la raíz ventral en la mayoría de los casos, y también registros extracelulares de neuronas del asta dorsal. Las características de ambas técnicas y de las mediciones utilizadas en cada una de ellas se detallan en la sección de métodos generales (Registros de la raíz ventral, pag 68, y registros extracelulares de neuronas del asta dorsal, pag 74).

En ambos tipos de experimentos la estimulación eléctrica se realizaba utilizando electrodos de succión de vidrio acoplados a la raíz dorsal del mismo segmento espinal en que se realizaba el registro, las condiciones de estimulación se detallan en la sección de métodos generales (estimulación eléctrica de la raíz dorsal, pag 65).

Para cumplir los objetivos planteados se diseñaron los siguientes experimentos:

(A) Estudio de los efectos de los moduladores sobre los reflejos espinales

El protocolo de estimulación eléctrica constaba de 2 estímulos individuales y de un tren de estímulos de alta intensidad, este protocolo se repetía cada 20 minutos. En los casos que se utilizaban estímulos de baja intensidad éstos se aplicaban antes que los de alta intensidad en los puntos del experimento donde se esperaba un efecto máximo.

Para este primer paso se diseñaron 2 tipos de experimentos:

- En primer lugar se realizaron experimentos piloto en los que se estudiaba la relación entre la concentración de los moduladores y la respuesta obtenida. Se utilizaban 3 concentraciones crecientes de los moduladores y cada concentración se aplicaba durante 15 minutos, a intervalos de 40 minutos, en un protocolo de tipo acumulativo (fig 3.1 A). Los resultados de estos experimentos se utilizaban preferentemente para analizar los efectos de los moduladores sobre los reflejos espinales puesto que nos permitían realizar análisis de varianza y constatar la dependencia de concentración de los efectos. En estos experimentos se medía el área integrada y los potenciales de acción para la estimulación de alta intensidad y el umbral para la estimulación de baja intensidad.
- En un segundo paso se realizaron experimentos de curso temporal, en los que las drogas se aplicaban a una concentración de 10 μ M una sola vez durante 15 minutos y se seguían los efectos hasta al menos 2 horas después (fig 3.1 B). En estos experimentos se realizaba únicamente una aplicación de droga, lo que permitía observar los efectos de la concentración más elevada sobre una preparación fresca, sin la influencia de un protocolo acumulativo. Por ello los datos así obtenidos son los que se han utilizado para el análisis de los efectos sobre el potencial de membrana y la actividad espontánea de las

motoneuronas, y para estudiar la evolución temporal de los efectos de los moduladores sobre las respuestas producidas por la estimulación eléctrica de la raíz dorsal. Además se realizaron estudios de umbrales en algunos casos.

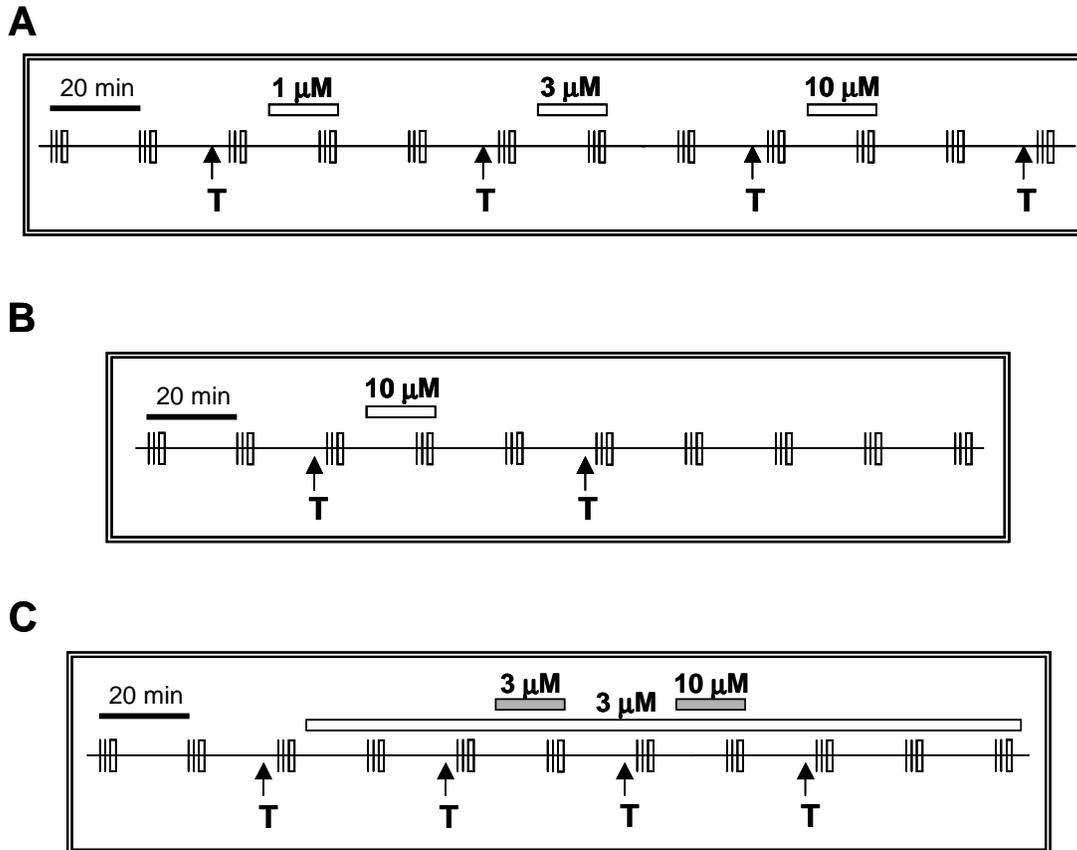


Figura 3.1. En la figura se muestran los esquemas generales de los principales experimentos con los moduladores de la corriente M. **(A)** Esquema de los experimentos de concentración-respuesta. **(B)** Esquema de los experimentos de curso temporal. **(C)** Esquema de los experimentos de reversión. Para los tres apartados: las dos líneas verticales se corresponden con estímulos individuales de alta intensidad y los rectángulos verticales con trenes de estímulos de alta intensidad sobre la raíz dorsal. Las flechas con la letra T indican los puntos del experimento en los que se realizaron los estudios de umbrales, en los casos en los que se llevaron a cabo. Los rectángulos horizontales en **A** y **B** indican el tiempo de aplicación de retigabine o de XE-991 y la concentración utilizada. En **C** el rectángulo grande blanco indica la perfusión continua con retigabine 3 μ M y los rectángulos grises pequeños los puntos de aplicación de XE-991 durante 15 minutos a las concentraciones indicadas.

(B) Estudio de la especificidad de los efectos de los moduladores

- Para comprobar que retigabine producía sus efectos actuando sobre canales KCNQ en algunos experimentos se estudió la reversibilidad de los efectos de retigabine por XE-991. Primero se perfundía con retigabine 3 μ M

continuamente y después de dos ciclos de estimulación en retigabine 3 μM (40 min) se aplicaba XE-991 a 3 y 10 μM durante 15 minutos, realizando un protocolo acumulativo (fig 3.1 C). El protocolo de estimulación utilizado en estos experimentos era el mismo que se ha descrito en el experimento anterior. Se realizaban medidas de área integrada y número de potenciales de acción para estímulos de alta intensidad. Además se estudiaban umbrales y la actividad espontánea.

- Posteriormente se hicieron unos experimentos adicionales para estudiar si los efectos depresores producidos por retigabine sobre los reflejos espinales se debían a una interacción inespecífica con receptores GABA-A. Para ello se bloqueaban los receptores GABA-A con picrotoxina antes de la perfusión con retigabine. Picrotoxina 20 μM se comenzaba a aplicar al menos 40 minutos antes de retigabine (10 μM , 15 min) y se mantenía hasta el final del experimento. En estos experimentos de nuevo se utilizaba el protocolo de estimulación descrito anteriormente pero sin la estimulación de baja intensidad. Se realizaban medidas de área integrada así como de número de potenciales de acción para los trenes de estímulos.

(C) Estudio de la presencia de corrientes M en elementos del asta dorsal y ventral de la médula espinal

- En primer lugar se estudiaron los efectos de la aplicación local de los moduladores sobre los reflejos espinales. La aplicación local de retigabine y XE-991 por inyección a presión era controlada por un picoinyector MDI PM2000B (MicroData Instruments Inc.). La presión y duración de la inyección se ajustaba para producir gotas de muy pequeño tamaño, de tal modo que una serie de 10 inyecciones producían un volumen total menor de 4 μl . Los moduladores se aplicaban intermitentemente durante periodos de 3-6 minutos (de 5 a 10 inyecciones). Uno de los depósitos de rellenaba con retigabine o XE-991 ambos a 20 μM y el otro con ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) 50 μM (de RBI-Sigma). NMDA excita las neuronas espinales y se utilizaba inyectándolo una sola vez para establecer la proximidad de la punta del electrodo con los núcleos motores o con neuronas dorsales conectadas sinápticamente con motoneuronas. Después de la aplicación de NMDA se realizaban controles de

las respuestas frente a la estimulación eléctrica de la raíz dorsal hasta conseguir respuestas estables con anterioridad a la aplicación de los moduladores. Se utilizaban únicamente estímulos de alta intensidad. Los estímulos individuales se aplicaban a intervalos de 3 minutos para ir comprobando el efecto de las inyecciones y los trenes de estímulos se aplicaban con un intervalo de 15-20 minutos entre sí. Para el análisis de los efectos se han utilizado exclusivamente los datos de área integrada y potenciales de acción procedentes de los trenes de estímulos.

- En los experimentos anteriores no pudimos constatar que la aplicación local de los moduladores en el asta dorsal afectara a los reflejos espinales. Por eso realizamos una serie de registros extracelulares de neuronas dorsales aplicando los moduladores sobre toda la médula espinal. Los registros extracelulares y las mediciones se realizaban como se describe en la sección de métodos generales (registros extracelulares de neuronas del asta dorsal, pag 74). En estos experimentos se utilizaban únicamente estímulos de alta intensidad. Cada 30 minutos se realizaban las pruebas que consistían en 5 estímulos individuales y un tren de estímulos. Para el análisis solo se utilizaban los datos de número de potenciales de acción obtenidos de las respuestas al tren de estímulos. Los registros que presentaban buenas condiciones tras la aplicación de retigabine 10 μ M se continuaron con la aplicación de XE-991 10 μ M para estudiar la reversibilidad.

Análisis estadístico de los datos

Se han descartado los experimentos en los que el valor de cualquier variable sufriera una variación de más del 15% en las respuestas consecutivas en control. Todos los análisis estadísticos se han realizado con los datos reales utilizando el programa Prism 3.0 (GraphPad Software, USA). Para comparar los efectos de los moduladores en los experimentos de concentración-respuesta se han utilizado ANOVA de medidas repetidas con Dunnett's *post hoc* test. También se han utilizado *t*-test pareados no paramétricos para comparar medias. Los resultados están expresados como porcentaje de control \pm EEM (error estándar de la media) o como media \pm EEM.

RESULTADOS**Influencia de la aplicación de los moduladores de la corriente M sobre el potencial basal y la actividad espontánea**

Los registros de raíz ventral presentan unas características básicas presentes aun en ausencia de estimulación eléctrica. Estas características consisten en una línea base relativamente estable que refleja el potencial de reposo de los axones de una población de motoneuronas y una actividad espontánea que se observa como una serie de despolarizaciones de baja amplitud. La actividad espontánea en situación control presentaba una frecuencia media de 0.25 ± 0.02 Hz y una amplitud media de 0.17 ± 0.02 mV ($n=26$) medida en modo DC. La aparición de actividad espontánea en modo AC es menos frecuente y no se realizó ningún análisis sobre este parámetro.

La aplicación del facilitador de canales KCNQ retigabine, a una concentración de $10 \mu\text{M}$ durante 15 minutos, sobre la médula espinal produjo una hiperpolarización lenta y de larga duración de las motoneuronas, con una amplitud media de -0.35 ± 0.12 mV ($n=4$, fig 3.2 A y B).

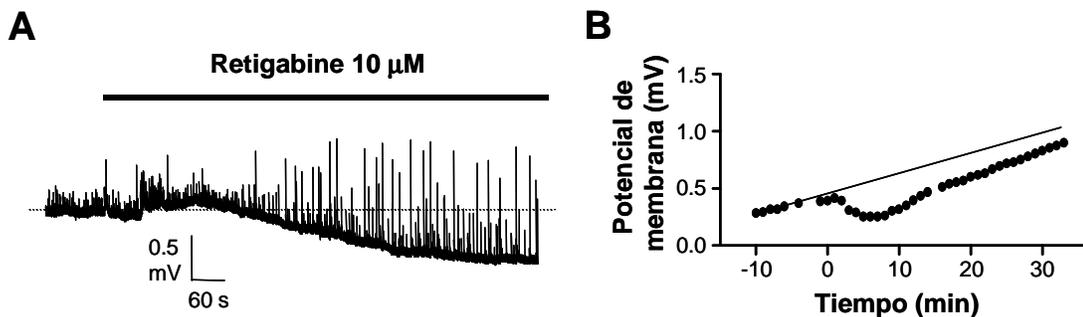


Figura 3.2. Efectos de retigabine sobre el potencial basal registrado de la raíz ventral. (A) Registro original de un experimento de curso temporal con retigabine. La barra sólida encima del registro indica el tiempo de perfusión (15 min) con retigabine $10 \mu\text{M}$. La línea punteada sobre el registro indica la evolución esperada de la línea base sin aplicación de retigabine. Las líneas verticales de tamaños variables que se observan sobre la línea base se corresponden con la actividad espontánea registrada de la raíz ventral. Nótese el aumento en amplitud y la reducción en la frecuencia de la actividad espontánea producidos por la aplicación de retigabine. (B) La gráfica muestra el curso temporal de la hiperpolarización producida por la aplicación de retigabine $10 \mu\text{M}$ durante 15 minutos en un experimento diferente al de (A). Los puntos se corresponden con el potencial basal medido cada minuto. La aplicación de retigabine empieza a tiempo cero. La línea punteada indica la evolución esperada en ausencia de droga. La pendiente de esta línea constituye la deriva eléctrica de la señal ($20 \mu\text{V}/\text{min}$).

La actividad espontánea también sufrió variaciones con la aplicación de retigabine, la frecuencia disminuyó desde 0.30 ± 0.05 Hz en control hasta 0.13 ± 0.01 Hz después de retigabine y la amplitud aumento desde 0.16 ± 0.04 mV en control hasta 0.51 ± 0.17 mV tras la aplicación del facilitador de canales KCNQ (fig 3.2 A). Estos efectos de retigabine sobre la actividad espontánea se observaron en los 4 casos en los que se estudiaron.

El bloqueador de la corriente M, XE-991, aplicado en las mismas condiciones que retigabine, produjo una despolarización de motoneuronas de 0.24 ± 0.05 mV (n=4, fig 3.3 A). Los efectos sobre la actividad espontánea fueron menos claros, aunque con una ligera tendencia hacia la reducción tanto de la frecuencia como de la amplitud (de 0.21 ± 0.03 Hz y 0.13 ± 0.03 mV en control a 0.20 ± 0.04 Hz y 0.11 ± 0.02 mV, n=4, fig 3.3 B) que en ningún caso fue estadísticamente significativo.

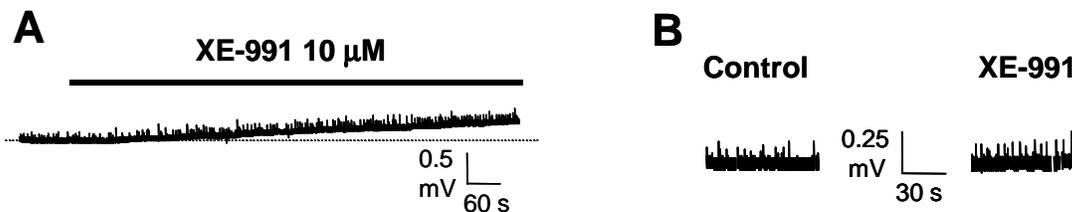


Figura 3.3. En la figura se muestran los efectos de XE-991 sobre el potencial basal y sobre la actividad espontánea. (A) Muestra el efecto despolarizante de XE-991 sobre el potencial basal. XE-991 se aplicó a $10 \mu\text{M}$ durante 15 minutos (indicado por la línea sólida encima del registro). La línea punteada sobre el registro indica la evolución esperable del potencial basal en ausencia del compuesto. (B) Efectos de XE-991 $10 \mu\text{M}$ sobre la actividad espontánea registrada de la raíz ventral.

En los experimentos de reversión se observó que en 2 de los 4 casos estudiados hubo cambios en la actividad espontánea tras la aplicación de retigabina a $3 \mu\text{M}$ durante un periodo prolongado de tiempo, la aplicación posterior de XE-991 a $10 \mu\text{M}$ revirtió los efectos observados en estos dos casos devolviéndolos a los valores control.

Efectos de los moduladores sobre los reflejos originados por activación de fibras A

La aplicación de los moduladores de la corriente M produjo pequeños cambios sobre la amplitud del reflejo monosináptico (RMS). Tanto la perfusión de retigabine

como de XE-991 produjeron una ligera tendencia hacia el aumento en la amplitud del pico, pero por la inconsistencia de los resultados obtenidos no se pudo concluir que existiese ningún efecto claro y sistemático sobre la transmisión no nociceptiva basándose en estas mediciones.

Por el contrario los estudios de los umbrales sí arrojaron resultados valiosos. Gracias a estas pruebas observamos que la aplicación de retigabine producía un aumento en la intensidad mínima de estimulación necesaria para observar una respuesta en motoneuronas (umbral). Solo se produjeron diferencias significativas con la concentración de 10 μM pasando de $27.7 \pm 4.7 \mu\text{A}$ en control a $38.4 \pm 4.3 \mu\text{A}$ en retigabine ($p < 0.05$, $n=6$). En los tres casos en los que se aplicaron las concentraciones de 1 y 3 μM consecutivamente se produjo también un aumento, aunque menor, y que no llego a ser significativo.

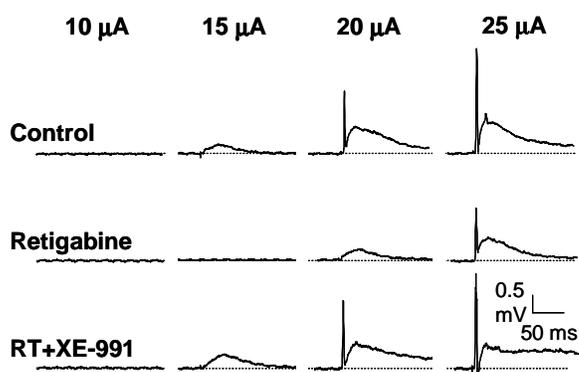


Figura 3.4. Efectos de los moduladores sobre las respuestas umbral. En la figura se muestran registros originales de la raíz ventral obtenidos de un experimento de reversión. La estimulación de la raíz dorsal se produjo con estímulos de 50 μs de duración a las intensidades marcadas en cada caso. Nótese el aumento del umbral tras la aplicación de retigabine 3 μM y la reversión producida tras la aplicación conjunta de retigabine 3 μM y XE-991 10 μM .

La aplicación de XE-991 a 1 y 3 μM en tres preparaciones no provocó cambios importantes sobre el umbral, aunque comenzaba a mostrar una tendencia hacia la aparición de respuesta con intensidades menores. En cambio, a la concentración de 10 μM se produjo claramente el efecto opuesto al de retigabine, reduciendo la intensidad de corriente umbral de $29.4 \pm 7.3 \mu\text{A}$ en control a $23.6 \pm 7.2 \mu\text{A}$ en XE-991 ($p < 0.05$, $n=5$).

Una vez que observamos que ambos moduladores presentaban efectos opuestos sobre el umbral, se estudió si los efectos del facilitador de canales KCNQ retigabine podían ser revertidos por la aplicación del bloqueador XE-991. La aplicación continua de retigabine 3 μM incrementó el umbral de $26.0 \pm 4.8 \mu\text{A}$ en control hasta 33

$\pm 4.9 \mu\text{A}$ en los 4 experimentos realizados. La aplicación conjunta posterior con XE-991 $10 \mu\text{M}$ hizo de nuevo el efecto contrario al de retigabine devolviendo el umbral a $26.8 \pm 4.7 \mu\text{A}$ (fig 3.4).

Efectos de los moduladores sobre los reflejos espinales mediados por activación de fibras C

Los reflejos espinales mediados por activación de fibras C se estudiaron utilizando tanto estímulos individuales como estimulación repetitiva de la raíz dorsal a alta intensidad.

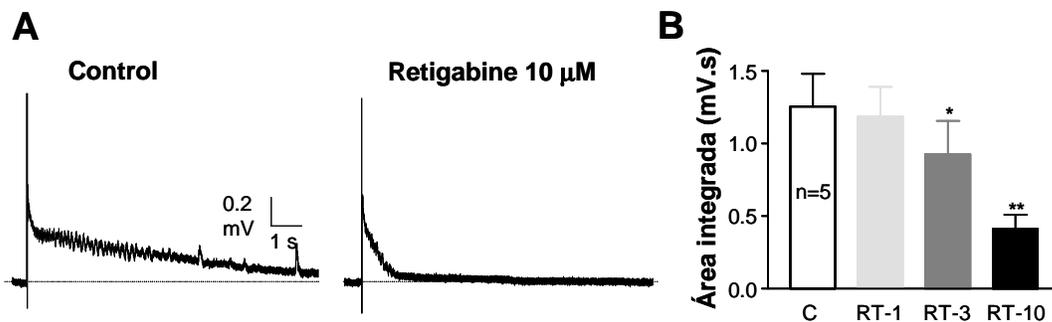


Figura 3.5. Efectos de retigabine sobre las respuestas de la raíz ventral frente a la estimulación individual de alta intensidad de la raíz dorsal. En (A) se muestran registros originales con respuestas en control y después de la aplicación de la concentración más elevada de retigabine ($10 \mu\text{M}$) tras el protocolo acumulativo de aplicación de las drogas utilizado en los experimentos de concentración-respuesta. La gráfica en (B) muestra los datos de área integrada de las respuestas de la raíz ventral a la estimulación individual de alta intensidad de la raíz dorsal. Los efectos de retigabine 1, 3 y $10 \mu\text{M}$ sobre el área integrada se muestran en valores promediados de los 5 experimentos de concentración-respuesta que se realizaron con retigabine. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control obtenidas con el test de Dunnett (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Efectos sobre la estimulación individual.

El área integrada de los estímulos individuales sufrió una reducción desde $1.25 \pm 0.23 \text{ mV}\cdot\text{s}$ en control hasta $0.41 \pm 0.10 \text{ mV}\cdot\text{s}$ después de la aplicación de retigabine a $10 \mu\text{M}$ (fig 3.5 A y B) y presentó un aumento desde $0.98 \pm 0.18 \text{ mV}\cdot\text{s}$ en control hasta $1.13 \pm 0.18 \text{ mV}\cdot\text{s}$ tras la aplicación de XE-991 $10 \mu\text{M}$ (fig 3.6 A y B). Los efectos de ambos moduladores sobre el área fueron dependientes de concentración como se pudo comprobar utilizando el análisis de la varianza (ANOVA global $p < 0.0001$, $n = 5$ para retigabine; $p < 0.01$, $n = 8$ para XE-991).

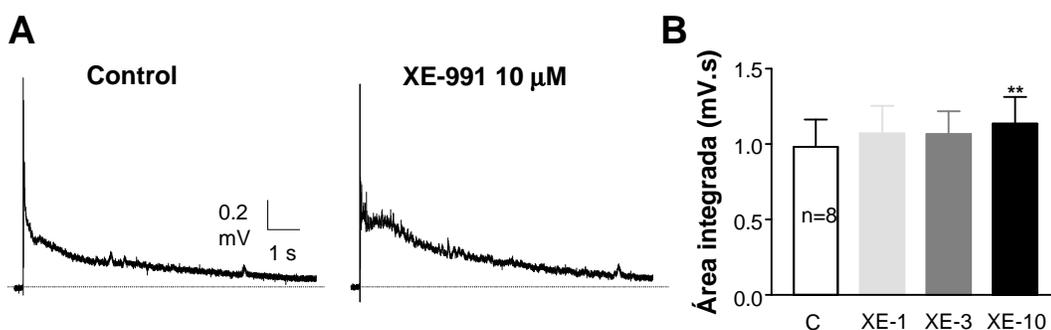


Figura 3.6. Efectos de XE-991 sobre las respuestas de la raíz ventral frente a la estimulación individual de alta intensidad de la raíz dorsal. En (A) se muestran registros originales con respuestas en control y después de la aplicación de la concentración más elevada de XE-991 (10 μ M) tras el protocolo acumulativo de aplicación de las drogas utilizado en los experimentos de concentración-respuesta. La gráfica en (B) muestra los datos de área integrada de las respuestas de la raíz ventral a la estimulación individual de alta intensidad de la raíz dorsal. Los efectos de XE-991 1, 3 y 10 μ M sobre el área integrada se muestran en valores promediados de los 8 experimentos de concentración-respuesta que se realizaron con XE-991. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control obtenidas con el test de Dunnett (** $p < 0.01$).

El número de potenciales de acción provocado por los estímulos individuales es un parámetro que no puede ser utilizado en todos los experimentos puesto que en ocasiones no se produce ninguno, por tanto el análisis de este parámetro no resulta tan interesante como en el caso de la estimulación repetitiva. En los casos que se pudieron contar potenciales de acción, retigabine redujo su número. XE-991 por el contrario indujo el disparo en algunos casos en los que no lo había en control y lo incrementó en los casos que ya existía.

Efectos sobre la estimulación repetitiva.

La estimulación repetitiva de la raíz dorsal a intensidad suficiente para activar fibras C produce una respuesta que va en aumento con los sucesivos estímulos, reflejando un aumento progresivo de la excitabilidad. Con este tipo de estimulación se observa un aumento en el número de potenciales de acción, además de un aumento de la despolarización, con cada estímulo consecutivo. Como se ha mencionado con anterioridad este aumento en el disparo de potenciales de acción se conoce como "wind-up". El área integrada media en control fue de 13.5 ± 1.7 mV*s y el número total de potenciales de acción de 538 ± 121 (n = 22).

En los experimentos de curso temporal se observó que retigabine 10 μM producía un efecto depresor sobre el área y sobre el número de potenciales de acción y que XE-991 10 μM tenía los efectos opuestos. Además estos efectos tienen una duración muy prolongada en el tiempo, alcanzando un máximo alrededor de los 20 minutos desde que se retira el compuesto del liquido de perfusión, y obteniendo únicamente una recuperación parcial de los efectos tras 2 horas de lavado (fig 3.7 A y B).

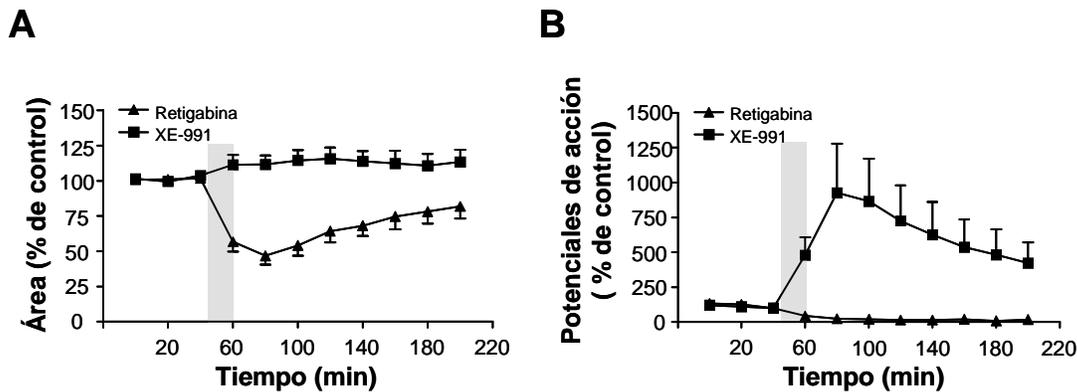


Figura 3.7. Evolución temporal de los efectos de los moduladores sobre las respuestas de la raíz ventral frente a la estimulación repetitiva de alta intensidad de la raíz dorsal. Los gráficos muestran los valores en porcentaje del control para el área integrada (A) y para las cuentas de potenciales de acción (B) con cada uno de los moduladores. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar de la media obtenidos de 4 experimentos con cada uno de los moduladores. Ambos compuestos se aplicaron una sola vez a 10 μM durante 15 minutos (indicado por las áreas sombreadas).

Para estudiar en más detalle los efectos observados utilizamos los experimentos en los que se aplicaron concentraciones crecientes de cada uno de los moduladores. Con ambos moduladores se constató, utilizando el análisis de la varianza, una relación positiva entre la concentración utilizada y la respuesta obtenida, esta relación positiva se obtuvo con ambas drogas tanto para el área integrada como para el número de potenciales de acción (ANOVA global $p < 0.01$, $n = 6$ para retigabine y $n = 8$ para XE-991).

Con la aplicación de retigabine el área integrada fue disminuyendo con las concentraciones sucesivas de 1, 3 y 10 μM de $12.18 \pm 1.96 \text{ mV*s}$ en control a $10.51 \pm 1.87 \text{ mV*s}$, $8.57 \pm 1.90 \text{ mV*s}$ y $4.56 \pm 0.86 \text{ mV*s}$, respectivamente. El número de potenciales de acción tuvo un comportamiento similar pasando progresivamente de

606 ± 222 en control a 244 ± 84 con retigabine 1 μM, 77 ± 32 en retigabine 3 μM y finalmente a 13 ± 3 tras la aplicación de retigabine 10 μM (fig 3.8). Para ambos parámetros se compararon los valores obtenidos para cada concentración respecto al control utilizando el test de Dunnett para comparaciones múltiples, siendo significativas las diferencias desde la concentración de 3 μM para las dos medidas (p<0.01, n = 6).

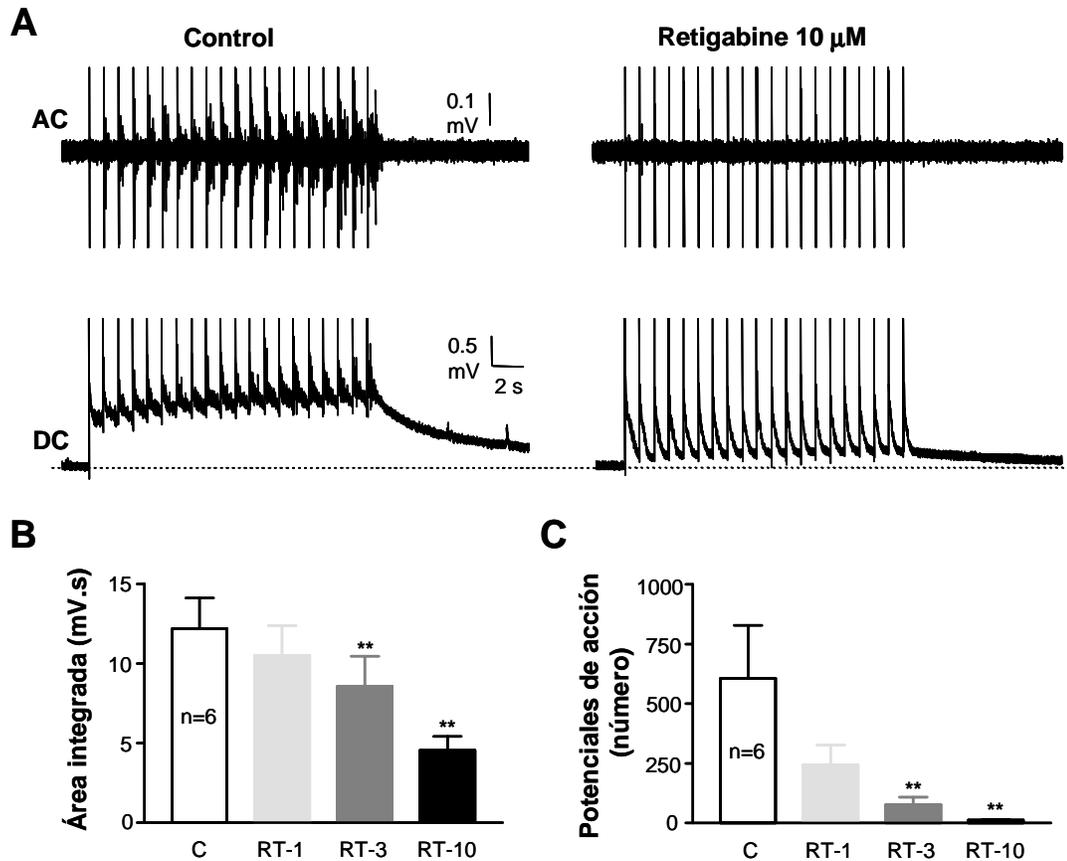


Figura 3.8. Efectos de retigabine sobre las respuestas de la raíz ventral frente a la estimulación repetitiva de alta intensidad de la raíz dorsal. En (A) se muestran registros originales con respuestas en control y después de la aplicación de la concentración más elevada de retigabine (10 μM) tras el protocolo acumulativo de aplicación de las drogas utilizado en los experimentos de concentración-respuesta. Obsérvese la reducción en el área despolarizada en modo DC así como la abolición del disparo en modo AC tras la aplicación de retigabine 10 μM. Las gráficas en (B) y en (C) muestran los datos de área integrada y de cuentas de potenciales de acción para cada una de las concentraciones utilizadas en los experimentos de concentración-respuesta (1, 3 y 10 μM). Se muestran valores promediados de los 6 experimentos de concentración-respuesta que se realizaron con retigabine. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control obtenidas con el test de Dunnett (** p<0.01).

La aplicación de XE-991 produjo un gran aumento en el número de potenciales de acción pasando progresivamente de 288 ± 87 en control a 580 ± 259 con XE-991 $1 \mu\text{M}$, 1026 ± 442 en XE-991 $3 \mu\text{M}$ y finalmente a 2300 ± 737 con la concentración de $10 \mu\text{M}$. El área integrada también presentó un ligero pero progresivo aumento dependiente de la concentración, pasando de $8.76 \pm 1.57 \text{ mV}\cdot\text{s}$ en control a $9.44 \pm 1.63 \text{ mV}\cdot\text{s}$, $9.57 \pm 1.51 \text{ mV}\cdot\text{s}$ y $9.80 \pm 1.63 \text{ mV}\cdot\text{s}$ con las sucesivas concentraciones de XE-991 (fig 3.9). Para la concentración de XE-991 de $10 \mu\text{M}$ hubo significación estadística en el número de potenciales de acción y área integrada ($p < 0.01$, $n=8$), con la concentración de $3 \mu\text{M}$ solo hubo significación en el área integrada ($p < 0.05$, $n=8$).

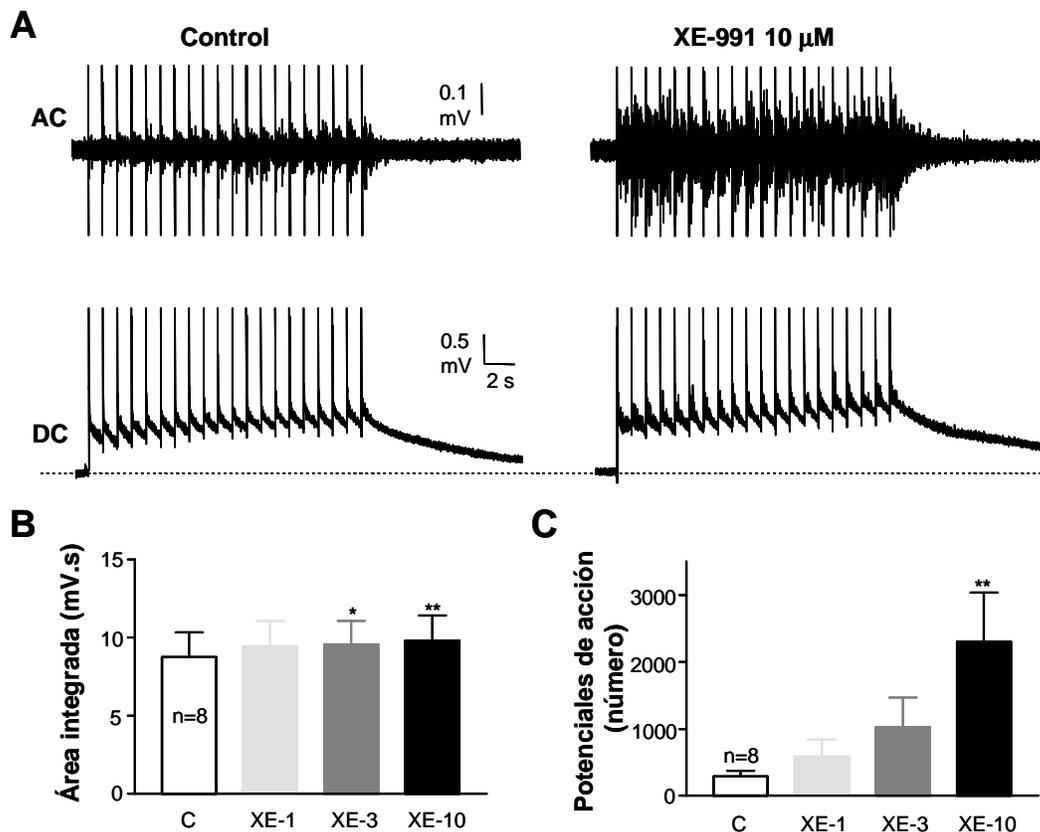


Figura 3.9. Efectos de XE-991 sobre las respuestas de la raíz ventral frente a la estimulación repetitiva de alta intensidad de la raíz dorsal. En (A) se muestran registros originales con respuestas en control y después de la aplicación de la concentración más elevada de XE-991 ($10 \mu\text{M}$) tras el protocolo acumulativo de aplicación de las drogas utilizado en los experimentos de concentración-respuesta. Obsérvese el ligero aumento producido sobre la despolarización acumulada en modo DC así como el fuerte incremento del disparo en modo AC tras la aplicación de XE-991 $10 \mu\text{M}$. Las gráficas en (B) y en (C) muestran los datos de área integrada y de cuentas de potenciales de acción para cada una de las concentraciones utilizadas en los experimentos de concentración-respuesta (1 , 3 y $10 \mu\text{M}$). Se muestran valores promediados de los 8 experimentos de concentración-respuesta que se realizaron con XE-991. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control obtenidas con el test de Dunnet (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

En otros 4 experimentos se estudió la reversión de los efectos producidos por la aplicación continua de retigabine 3 μM con la aplicación conjunta de retigabine 3 μM y XE-991 3 μM y 10 μM sucesivamente. La aplicación en primer lugar de retigabine 3 μM redujo el área integrada desde 24.2 ± 4.1 $\text{mV}\cdot\text{s}$ a 12.4 ± 3.1 $\text{mV}\cdot\text{s}$ y el número de potenciales de acción desde 1242 ± 549 en control hasta 78 ± 26 en retigabine. La aplicación conjunta de retigabine con XE-991, ambos a una concentración de 3 μM , comenzó a revertir los efectos sobre el número de potenciales de acción pero solo parcialmente dejando el número en 265 ± 95 . El área no sufrió ninguna variación con este tratamiento.

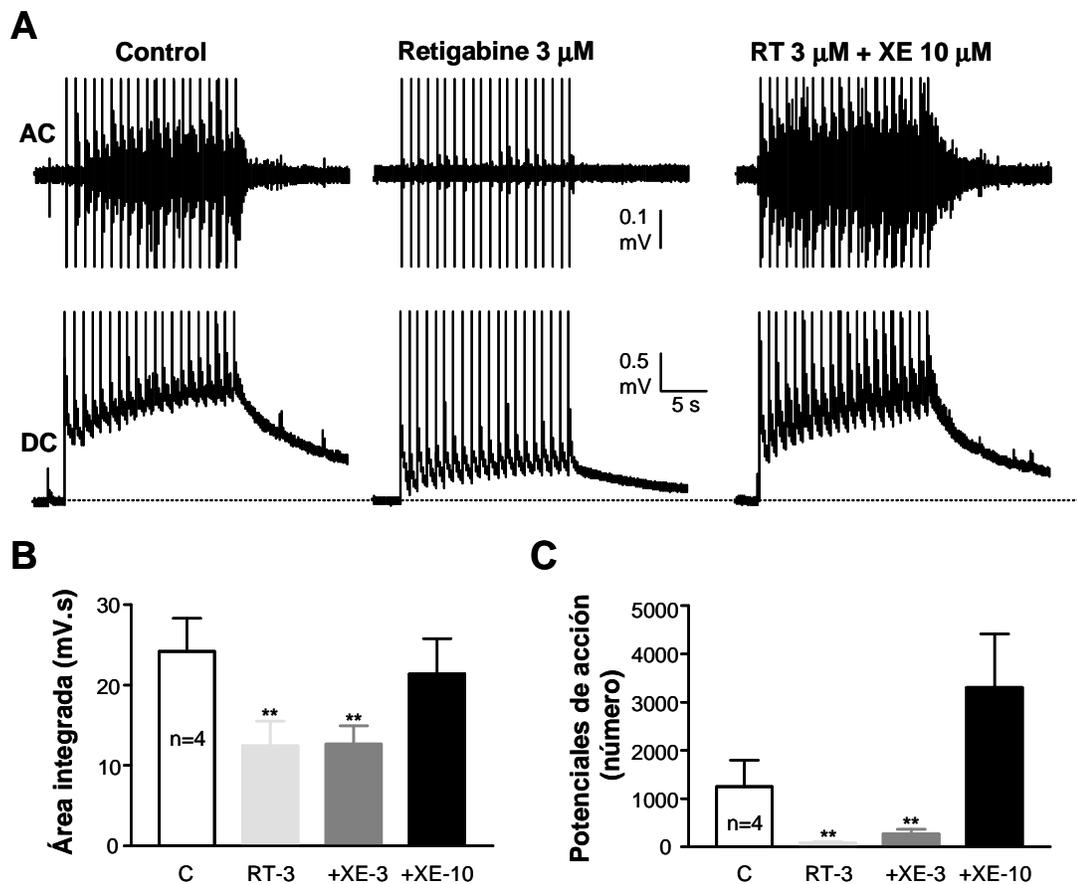


Figura 3.10. Reversión por XE-991 de los efectos de retigabine sobre la estimulación repetitiva de alta intensidad. En (A) se muestran registros originales de la raíz ventral en control, tras la aplicación de retigabine 3 μM y después de la aplicación conjunta de retigabine 3 μM y XE-991 10 μM como se muestra en el esquema de los experimentos de reversión en la figura 3.1. Nótese como la reducción producida por retigabine sobre el área despolarizada se reduce parcialmente por la aplicación conjunta con XE-991 mientras que el disparo se ve fuertemente incrementado sobre los valores control. Los gráficos muestran la cuantificación de los efectos de cada uno de los tratamientos sobre el área integrada (B) y sobre el número de potenciales de acción compuestos (C). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control obtenidas con el test de Dunnett (** $p < 0.01$).

Con la aplicación de XE-991 a $10 \mu\text{M}$ sí se consiguió una reversión parcial de los efectos sobre el área integrada, incrementándola hasta los $21.4 \pm 4.4 \text{ mV}\cdot\text{s}$. En cambio el número de potenciales de acción sufrió un incremento muy fuerte (hasta 3308 ± 1104 potenciales) superando el número obtenido con anterioridad a la aplicación de retigabine (fig 3.10).

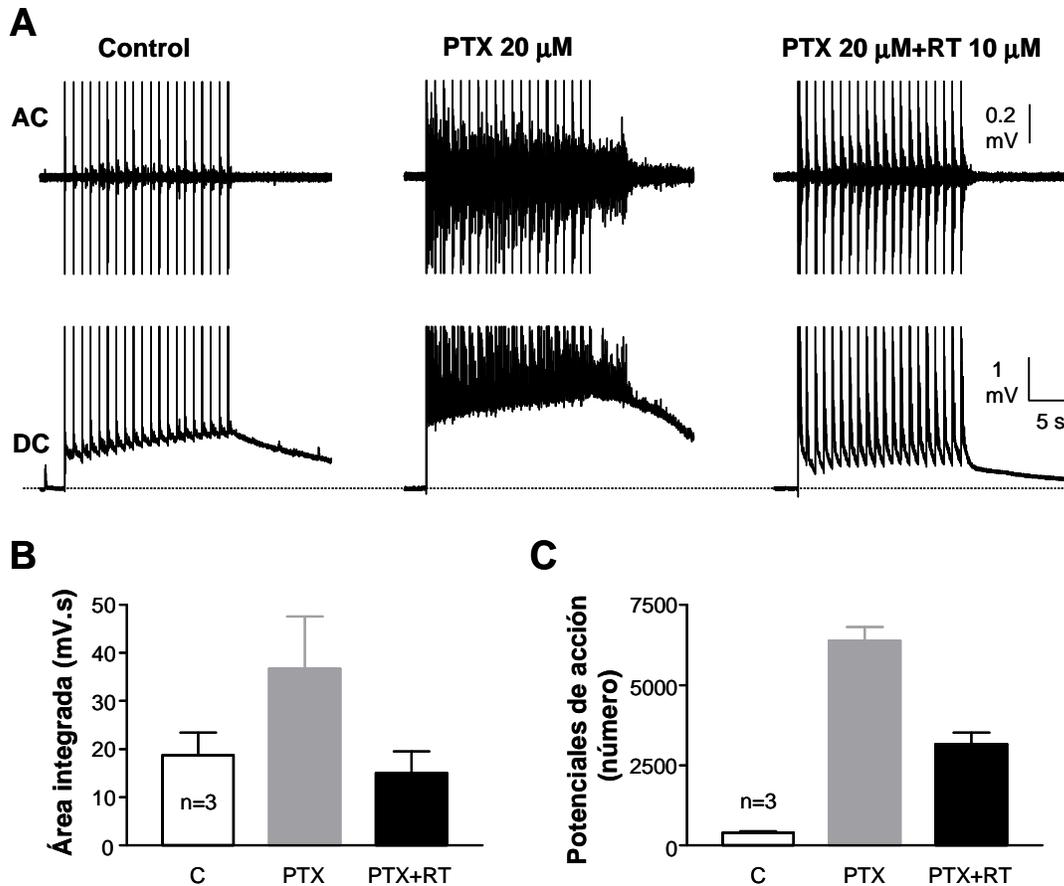


Figura 3.11. Efectos de retigabine sobre las respuestas de la raíz ventral tras el bloqueo de receptores de GABA-A con picrotoxina (PTX). En (A) se muestran las respuestas originales de la raíz ventral en respuesta a la estimulación repetitiva de alta intensidad de la raíz dorsal. Se muestran registros en control, tras 20 minutos de aplicación continua de PTX $20 \mu\text{M}$ y después de la aplicación conjunta de retigabine $10 \mu\text{M}$ y de PTX. Nótese el fuerte efecto depresor de retigabine después de la potenciación producida por PTX. En los gráficos se muestra la cuantificación de los efectos de cada uno de los tratamientos sobre el área integrada (B) y sobre el disparo de potenciales de acción compuestos (C).

Efectos de retigabine sobre los reflejos espinales tras el bloqueo de receptores GABA-A con picrotoxina.

Se realizaron un total de 3 experimentos en los que se bloqueó en primer lugar los receptores de GABA-A con picrotoxina 20 μ M, este bloqueo produjo en todos los casos un gran aumento de los reflejos espinales, tanto en la despolarización como en el disparo de potenciales de acción (fig 3.11). La aplicación posterior de retigabine produjo una gran reducción tanto en el área despolarizada como en los potenciales de acción producidos por motoneuronas, de magnitud similar a la observada en condiciones normales.

Efectos de la aplicación local de los moduladores sobre los reflejos espinales

La inyección local breve (alrededor de 3 s) de NMDA sobre el asta ventral producía una despolarización muy rápida y el disparo de potenciales de acción en motoneuronas (fig 3.12 A). Las mayores respuestas a NMDA se obtuvieron a profundidades de entre 450 y 550 μ m, indicando la zona más próxima a los núcleos de motoneuronas. Una vez localizada la zona de mayor respuesta con NMDA se dejaba un periodo de reposo y posteriormente, tras haber conseguido unas respuestas estables frente a la estimulación de la raíz dorsal, se inyectaba alguno de los moduladores de la corriente M.

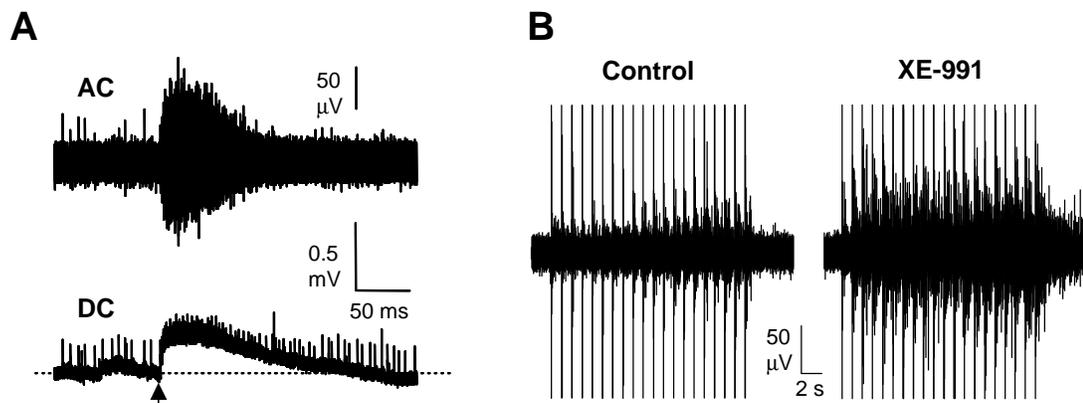


Figura 3.12. Efectos de la aplicación local de los moduladores sobre el asta ventral de la médula espinal utilizando el picoinyector. En (A) se muestran la despolarización (DC) y el disparo de potenciales de acción (AC) que se producen tras la aplicación de una inyección de 3s de NMDA a 500 micras de profundidad en el asta ventral (medidas desde la parte medial de la hemimédula), indicando la proximidad de los núcleos motores. En (B) se muestran a modo de ejemplo los efectos de la aplicación de XE-991 sobre el asta ventral. Se muestran las respuestas en modo AC registradas de la raíz ventral tras la estimulación repetitiva de alta intensidad de la raíz dorsal en control y tras la inyección de XE-991.

Las respuestas frente a la estimulación repetitiva obtenidas antes de la aplicación de los moduladores presentaron unos valores similares a los obtenidos en los experimentos anteriores, con unos valores medios de área integrada y potenciales de acción de $9.54 \pm 1.23 \text{ mV*s}$ y 445 ± 107 potenciales ($n=11$), respectivamente.

La aplicación de XE-991 incrementó en gran medida el número de potenciales de acción desde 263 ± 91 en control hasta 1224 ± 224 con XE-991 ($p<0.05$, $n=5$), sin embargo no produjo ningún efecto sobre el área integrada (de $11.10 \pm 2.11 \text{ mV*s}$ a $10.88 \pm 2.14 \text{ mV*s}$, $n=5$; fig 3.12 B y fig 3.13 A y B).

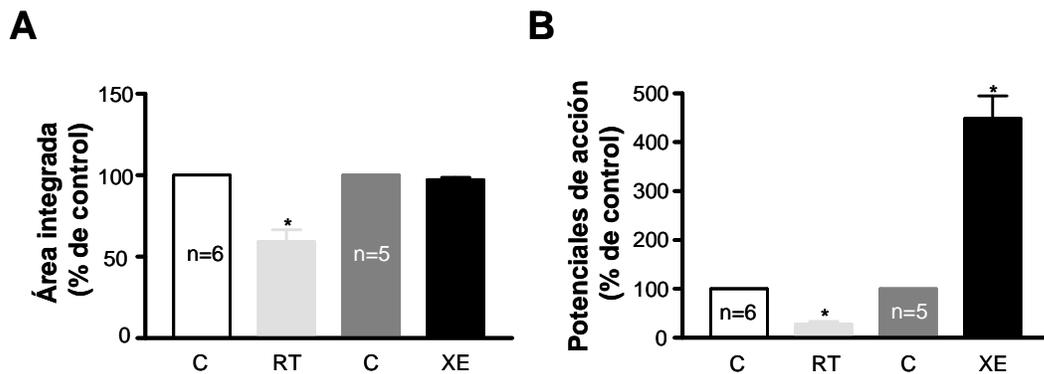


Figura 3.13. Cuantificación de los efectos de la aplicación local de los moduladores sobre el asta ventral de la médula espinal utilizando el picoinyector. Los gráficos representan los valores de área integrada (C) y de potenciales de acción (D) en respuesta a la estimulación repetitiva de alta intensidad de la raíz dorsal. Los valores están representados como porcentaje respecto a sus respectivos controles obtenidos de los experimentos realizados con cada uno de los moduladores. Los asteriscos indican diferencias significativas obtenidas con el test de Dunnett (* $p<0.05$).

La inyección de retigabine sobre los núcleos motores produjo una disminución del número de potenciales de acción desde 598 ± 162 en control hasta 182 ± 77 en el punto de máximo efecto. El área integrada también sufrió una fuerte disminución pasando de $8.50 \pm 1.50 \text{ mV*s}$ en control a $5.00 \pm 1.02 \text{ mV*s}$ (fig 3.13 A y B). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en ambos casos ($p<0.05$, $n=6$).

Las aplicaciones locales de los moduladores se realizaron también en el asta dorsal. Se hicieron 7 experimentos en los cuales se barrió una zona muy extensa en torno a la zona de entrada de la raíz dorsal del segmento espinal utilizado para el registro. Se realizaron inyecciones en 25 posiciones diferentes a profundidades entre 200 y 600 μm . En aproximadamente la mitad de las posiciones se observaba cierta despolarización en motoneuronas tras la inyección de NMDA, pero ni siquiera en

estos casos se observó ningún efecto reseñable tras la aplicación de retigabine ni XE-991.

Efectos de los moduladores de la corriente M sobre la actividad de neuronas del asta dorsal

Con el fin de constatar la posible presencia de corrientes M en el asta dorsal realizamos una serie de experimentos encaminados a estudiar directamente la influencia de los moduladores sobre la actividad de las neuronas del asta dorsal.

Gracias a la tinción con azul de pontamina se pudieron recuperar las posiciones donde se realizaron los registros (fig 3.14 A), que se correspondieron con lámina IV (3/9) y con lámina V (6/9).

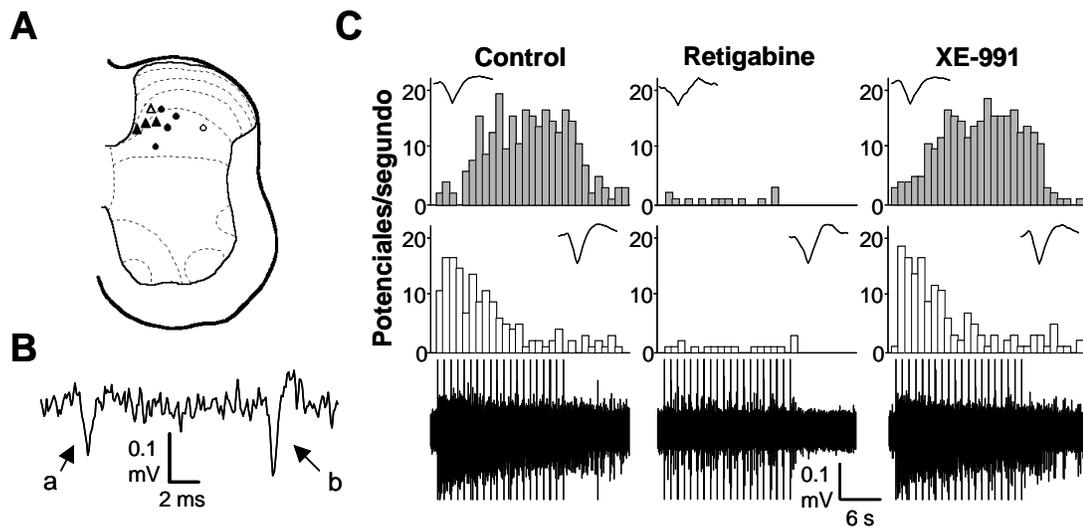


Figura 3.14. Efectos de los moduladores sobre la actividad de neuronas dorsales registrada extracelularmente. En (A) se muestra un esquema general de la médula espinal de ratas neonatales donde se indica con líneas discontinuas los límites aproximados entre las distintas láminas. Sobre este esquema se han indicado los lugares donde se realizaron los registros de neuronas dorsales. La posición del electrodo de registro se recuperó gracias a la aplicación de azul de pontamina al finalizar los experimentos. Los triángulos se corresponden con los lugares de registro en los experimentos con retigabine y los círculos con los de XE-991. Los símbolos abiertos indican lugares donde la aplicación de los moduladores no tuvo efecto. En (B) se muestra un fragmento extendido de un registro original donde se pueden distinguir dos potenciales de acción distintos (a y b) en base a su amplitud y anchura. En (C) se encuentra un experimento original en el que se aplicó retigabine 10 μ M y posteriormente XE-991 10 μ M. En el registro original situado en la fila inferior se muestran las respuestas en forma de potenciales de acción producidas por la estimulación repetitiva de alta intensidad de la raíz dorsal. Los histogramas representan el número de potenciales de acción (por segundo) de cada uno de los tipos mostrados en (B), el potencial de acción a está representado en el histograma superior y el b en el inferior. Los potenciales que se encuentran sobre los histogramas son un promedio de los producidos de cada tipo en cada uno de los tratamientos.

Se realizaron un total de 14 experimentos de los cuales solo se consiguieron registros suficientemente estables para perfundir con los moduladores en 9 de ellos. En algunos registros fue posible comprobar la existencia de hasta 3 potenciales de acción distintos, presumiblemente pertenecientes neuronas diferentes (ejemplo en fig 3.14 B). El análisis de los potenciales de acción nos permitió, además de identificar los potenciales, separarlos por tipos y analizarlos de forma separada. Finalmente, los resultados que se detallan a continuación se refieren a una población de 16 neuronas dorsales.

De estas 16 presuntas neuronas 2 de ellas presentaron un incremento en el disparo frente a la estimulación repetida de la raíz dorsal (“wind-up”), otras 7 presentaron el efecto contrario disminuyendo su respuesta con la repetición y las 7 restantes mantuvieron la respuesta durante el tren.

Retigabine 10 μ M disminuyó el número de potenciales de acción frente a la estimulación repetitiva en 7 de las 8 unidades estudiadas. Los potenciales de acción pasaron de 203 ± 37 en control a 50 ± 19 con retigabine en los 7 casos en los que se observó un efecto ($p < 0.001$, $n=7$; fig 3.14 C).

XE-991 10 μ M produjo el efecto opuesto en 6 de las 8 neuronas testadas, incrementando los potenciales de acción de 86 ± 23 en control a 132 ± 18 ($p < 0.05$, $n=6$).

En 6 de las 7 neuronas sensibles a retigabine se aplicó posteriormente XE-991 10 μ M, en estos 6 casos la aplicación de XE-991 devolvió el número de potenciales de acción aproximadamente a la situación previa a la aplicación de retigabine, incrementado su número desde 72 ± 24 tras retigabine hasta 229 ± 32 en el efecto máximo después de XE-991 (fig 3.14 C).

DISCUSIÓN

Con esta serie de experimentos hemos mostrado la influencia que tienen los moduladores de la corriente M, retigabine y XE-991, sobre la transmisión espinal segmental, tanto sobre la nociceptiva como sobre la no nociceptiva.

En nuestras condiciones, el facilitador de los canales KCNQ retigabine hiperpolariza las motoneuronas y altera la actividad espontánea, aumentando su amplitud y reduciendo su frecuencia. Además deprime las respuestas de motoneuronas frente a la estimulación de alta intensidad y afecta a la transmisión no

nociceptiva, como se puede comprobar por el aumento en la intensidad umbral. Estos efectos son dependientes de la concentración. Todos estos efectos demuestran una reducción general en el estado de excitabilidad de la médula espinal.

Por el contrario el bloqueador de los canales KCNQ XE-991 despolariza las motoneuronas sin afectar significativamente a la actividad espontánea. Las respuestas de motoneuronas frente a la activación de las aferentes primarias con estímulos de alta intensidad aumentaron con XE-991 y además la intensidad de corriente umbral se vio reducida. Estos efectos de XE-991 fueron dependientes de concentración y reflejan un aumento de los reflejos espinales y de la excitabilidad espinal.

Los cambios en el potencial basal que se obtuvieron tras la aplicación de los moduladores son un elemento importante, el registro de despolarizaciones e hiperpolarizaciones es una indicación de la posible presencia de la corriente M en las propias motoneuronas, y aunque no es una prueba definitiva, está en consonancia con trabajos previos (Alaburda y cols, 2002). Además la hiperpolarización y la despolarización de las motoneuronas son factores que contribuyen por sí mismos a modificar los reflejos espinales.

Nuestros resultados, al igual que otros trabajos previos (Blackburn-Munro y Jensen, 2003; Passmore y cols, 2003), indican que retigabine podría utilizarse como fármaco antinociceptivo. Sin embargo, la posible utilización de retigabine como analgésico está supeditada a que se puedan eliminar sus efectos indeseados sobre la función motora.

En nuestras condiciones, se observa que retigabine modifica la transmisión no nociceptiva, estudiada como diferencias en el umbral, aunque sus efectos fueron más ligeros que sobre la transmisión nociceptiva.

En el trabajo de Blackburn-Munro y Jensen (2003) se muestra que a dosis de retigabine efectivas para reducir la hiperalgesia no hay efectos negativos sobre la locomoción, pero a dosis superiores puede existir algún tipo de ataxia motora. En nuestros experimentos a la concentración de retigabine de 10 μ M existen efectos sobre el umbral, lo que podría indicar que la función motora podría verse afectada. Aun así a concentraciones menores de retigabine el efecto sobre la transmisión no nociceptiva es menos importante manteniéndose una gran parte del efecto depresor sobre la transmisión nociceptiva. Por tanto, parece posible conseguir una actividad antinociceptiva importante sin alterar demasiado la función motora.

Los experimentos de reversión se realizaron para estudiar si los efectos observados tras la aplicación de los moduladores se debía a un efecto específico sobre canales KCNQ. En estos experimentos, los efectos de retigabine fueron revertidos por XE-991 en todos los casos, indicando que los efectos observados se deben fundamentalmente a la modulación específica de la corriente M actuando sobre canales KCNQ.

Además en esta preparación, retigabine sigue presentando un potente efecto depresor sobre los reflejos espinales tras el bloqueo de receptores GABA-A con picrotoxina. Los resultados de que disponemos descartan que exista una interacción de retigabine con receptores de GABA-A en las condiciones experimentales utilizadas.

Tras analizar en mayor detalle los datos presentados emerge un punto que debe tomarse en consideración como es la falta de simetría en los efectos de los moduladores. XE-991 y retigabine producen efectos estadísticamente significativos en los distintos parámetros medidos utilizando la estimulación de tipo nociceptivo. Retigabine presenta un efecto homogéneo sobre todos los parámetros analizados, pero XE-991 presenta un efecto muy poderoso sobre el disparo de potenciales de acción y más ligero sobre el área despolarizada.

Además, XE-991 no revirtió todos los efectos de retigabine con la misma potencia. XE-991 tuvo de nuevo un efecto muy potente sobre el número de potenciales de acción producidos por motoneuronas, superando con creces los valores obtenidos previamente a la aplicación de retigabine, sin embargo la reducción en el área despolarizada tras la aplicación de retigabine no llegó a revertirse completamente con la aplicación posterior de XE-991.

Para tratar de comprender a que se puede deber esta asimetría en los efectos de XE-991 conviene comentar ciertos aspectos básicos acerca del funcionamiento de la médula espinal. La señal obtenida en los registros de la raíz ventral se debe a la actividad de las motoneuronas pertenecientes a un segmento espinal. Esta señal de motoneuronas está muy influenciada por las neuronas dorsales puesto que son éstas las que proporcionan la entrada sináptica que reciben las motoneuronas. Se cree que el área despolarizada de motoneuronas es el parámetro que depende en mayor medida de las neuronas dorsales, por tanto, los cambios en la excitabilidad de las neuronas dorsales se reflejan principalmente en este parámetro. En este caso, el

reducido efecto de XE-991 sobre el área despolarizada en motoneuronas podría deberse a una falta de efecto del compuesto sobre los elementos del asta dorsal.

Los experimentos de aplicación local de los moduladores se diseñaron para estudiar la presencia de corrientes M funcionales en elementos del asta dorsal y del asta ventral de la médula espinal y su sensibilidad por los moduladores.

Los efectos tras la aplicación en el asta ventral fueron similares a los obtenidos con aplicación a todo el baño, indicando la presencia de los canales KCNQ en estructuras del asta ventral.

Las aplicaciones locales sobre el asta dorsal no produjeron los efectos deseados. Aunque tras la inyección de NMDA en algunos casos se produjeron pequeñas despolarizaciones en motoneuronas, indicando la conexión de las neuronas de esas zonas con motoneuronas, las aplicaciones posteriores de los moduladores en las mismas posiciones no consiguieron modificar las respuestas. Por un lado estos experimentos nos sirvieron como control de que las aplicaciones locales sobre una zona de la médula espinal fueron realmente locales y no afectaban a la otra, pero por otro lado pusieron en duda la expresión de canales en el asta dorsal.

La falta de sensibilidad a los moduladores en el asta dorsal se podría deber a que las aplicaciones no estuvieran llegando a un número suficiente de neuronas dorsales para alterar la respuesta de las motoneuronas, lo que estaría en consonancia con las reducidas respuestas a NMDA. También podría ser que las neuronas del asta dorsal conectadas sinápticamente con motoneuronas no expresaran canales KCNQ, pero aunque esto fuera cierto no se podría descartar la presencia de canales en otro tipo de neuronas dorsales como neuronas de proyección.

Para intentar dar una respuesta concisa acerca de la posible presencia de la corriente M en el asta dorsal, realizamos una nueva serie de experimentos con electrodos extracelulares finos, con los que conseguimos registros de la actividad de neuronas dorsales tras la estimulación repetitiva de alta intensidad sobre la raíz dorsal. Hay que hacer constar que los electrodos utilizados tenían la punta relativamente grande y cabe la posibilidad de que los registros contuviesen preferentemente neuronas grandes, lo que puede afectar a la diversidad de los tipos neuronales estudiados.

En cualquier caso, gracias a estos registros comprobamos cambios en la actividad de neuronas dorsales por la aplicación de los moduladores de la corriente.

Una gran proporción de las neuronas estudiadas respondieron a los moduladores en la línea de lo esperado, indicando la presencia de corrientes M funcionales en el asta dorsal medular. Esta observación está en consonancia con estudios recientes, donde se ha comprobado la influencia de los moduladores sobre la respuesta de neuronas dorsales mediada por activación de fibras nociceptivas en ratas adultas (Passmore y cols, 2003).

Pero pese a que una proporción de neuronas dorsales presentaron sensibilidad a XE-991, el efecto producido por el bloqueante de la corriente M parecía ser de menor magnitud que el producido en motoneuronas. Aunque al tratarse de diferente tipo de experimento no es posible realizar una comparación adecuada, hemos mostrado un potente efecto potenciador de XE-991 sobre el disparo de potenciales de acción en motoneuronas mientras que el efecto sobre el disparo en neuronas dorsales fue mucho más ligero.

De estos experimentos se extrae que existen corrientes tipo M en la médula espinal de ratas neonatales, tanto en elementos del asta dorsal como del asta ventral, donde contribuyen a la regulación de la transmisión somatosensorial. El reducido efecto de XE-991 sobre las neuronas dorsales indica que pueden existir diferencias de algún tipo, ya sean funcionales o de composición, en los canales que se encuentran en zonas sensoriales y motoras de la médula espinal. Un análisis más detallado de los efectos de los moduladores de la corriente M sobre la excitabilidad de las neuronas dorsales y de las motoneuronas utilizando técnicas más apropiadas, podría arrojar luz acerca de las posibles diferencias en la sensibilidad de los canales presentes en el asta dorsal y en el asta ventral de la médula espinal por XE-991.

CAPÍTULO 2

EFFECTOS DE LOS MODULADORES DE LA CORRIENTE M SOBRE LA EXCITABILIDAD DE NEURONAS ESPINALES SENSORIALES Y MOTORAS

INTRODUCCIÓN

Las técnicas utilizadas en los experimentos del capítulo anterior no nos permitieron confirmar la presencia de los canales en las propias neuronas espinales. Únicamente conseguimos una indicación de la posible presencia de canales KCNQ en las motoneuronas espinales gracias a los cambios en el potencial basal de la raíz ventral tras la aplicación de los moduladores de la corriente M. En este capítulo se presentan los resultados obtenidos con registros intracelulares. La razón para la utilización de este tipo de registros era estudiar en detalle la posible presencia de canales KCNQ en las neuronas espinales y su influencia sobre la excitabilidad de estas neuronas.

Las corrientes M modulan la excitabilidad en los tipos neuronales en los que se ha demostrado su presencia. Estas corrientes son débiles al potencial de reposo, pero la despolarización de la membrana induce la apertura del canal y la salida de potasio, que, a su vez, produce la adaptación en la frecuencia de disparo provocando una reducción de la excitabilidad neuronal. Retigabine facilita la apertura de los canales KCNQ y la adaptación en la frecuencia de disparo reduciendo la excitabilidad neuronal. XE-991 produce el efecto contrario reduciendo la adaptación en la frecuencia de disparo.

La modulación de la excitabilidad neuronal por corrientes M se ha estudiado en varios tipos neuronales utilizando técnicas de pinzamiento de corriente. Se ha descrito una reducción en la excitabilidad producida por retigabine en neuronas corticales (Hetka y cols, 1999; Otto y cols, 2002), en neuronas de ganglio simpático (Tatulian y cols, 2001) y más recientemente en neuronas de ganglio de la raíz dorsal (Passmore y cols, 2003) y en neuronas de hipocampo (Yue y Yaari, 2004).

También se han descrito efectos potenciadores sobre la excitabilidad neuronal de los bloqueadores de la corriente M, XE-991 y linopirdine, en diversos tipos neuronales como neuronas simpáticas de rata (Wang y cols, 1998), en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Passmore y cols, 2003), hipocampo (Aiken y cols, 1995; Yue y Yaari, 2004) y en motoneuronas de tortuga (Alaburda y cols, 2002).

La técnica de registro intracelular permite trabajar con neuronas concretas dentro de la médula espinal y estudiar la influencia de la corriente M directamente sobre ellas. Dadas las características de activación de la corriente M, con el registro intracelular podemos estudiar la influencia del bloqueo o la activación de la corriente

sobre el potencial de membrana. Además podemos estudiar la excitabilidad de las neuronas como la capacidad para producir potenciales de acción en respuesta a despolarizaciones transitorias y los posibles efectos de los moduladores sobre ella. Los cambios en el potencial de membrana y los cambios en la excitabilidad después de la aplicación de los moduladores nos indican la expresión de la corriente M en la propia neurona estudiada puesto que estos parámetros están determinados por las corrientes iónicas presentes en la propia neurona.

Además hemos estudiado las respuestas frente a la activación sináptica de neuronas sensoriales y motoneuronas de la médula espinal. Paralelamente hemos comparado los efectos de los moduladores sobre la excitabilidad de neuronas sensoriales y motoras para explorar en detalle la falta de simetría en los efectos de XE-991 detectada en los experimentos del capítulo anterior.

MÉTODOS

Las características técnicas del registro intracelular así como el procedimiento para conseguir registros de neuronas espinales se detallan en la sección de métodos generales (registros intracelulares, pag 76).

La estimulación eléctrica utilizada para la activación sináptica de las neuronas estudiadas se realizó utilizando electrodos de succión de vidrio acoplados a la raíz dorsal, las condiciones de estimulación se detallan en la sección de métodos generales (estimulación eléctrica de la raíz dorsal, pag 65).

En muchos casos se utilizó biocitina para marcar las neuronas estudiadas. El procedimiento de utilización de biocitina se detalla en la sección de métodos generales (recuperación del marcaje intracelular con biocitina, pag 82).

Diseño de los experimentos

Caracterización de las neuronas estudiadas

Tras empalar la neurona se procedía a estabilizarla aplicando corriente continua negativa. Poco a poco se iba retirando la corriente continua hasta que la neurona se mantenía estable por sí misma en unas condiciones óptimas.

Después de obtener un registro estable se procedía a realizar una caracterización electrofisiológica de las neuronas empaladas. Se midieron el potencial de membrana, la amplitud del potencial de acción y su duración a la mitad de la

amplitud (medida desde el punto de comienzo del potencial de acción). Además utilizando pulsos de corriente aplicados a través del electrodo intracelular se midió la rheobase (intensidad mínima que producía potenciales de acción) y se estimó la resistencia de las neuronas. La medida de resistencia se realizaba utilizando un pulso hiperpolarizante aplicado a través del electrodo intracelular de -0.2 nA en todos los casos. El valor de resistencia se obtenía de la fórmula:

$$R_i = \frac{V_f - V_i}{I_f}$$

Donde R_i es la resistencia de la neurona ($M\Omega$); V_f el potencial de membrana medido en la parte final del pulso (mV); V_i el potencial de reposo antes del pulso (mV); I_f la intensidad del pulso (-0.2 nA).

Las neuronas se clasificaban basándose en su patrón de disparo con la utilización de pulsos aplicados a través del electrodo intracelular de 500 ms de duración. Las neuronas se clasificaron como **tónicas** cuando respondían con una descarga sostenida de potenciales de acción que ocupaban la totalidad del pulso intracelular, **fásicas** cuando la frecuencia en el disparo de potenciales de acción iba disminuyendo a lo largo de la despolarización, produciéndose una obvia adaptación en la frecuencia de disparo, o **de espiga única** cuando solo disparaban un potencial de acción por despolarización o como mucho dos (fig 4.1). Esta clasificación se realizó basándonos en trabajos publicados previamente (véase Lopez-Garcia y King, 1994; Prescott y DeKoninck, 2002).

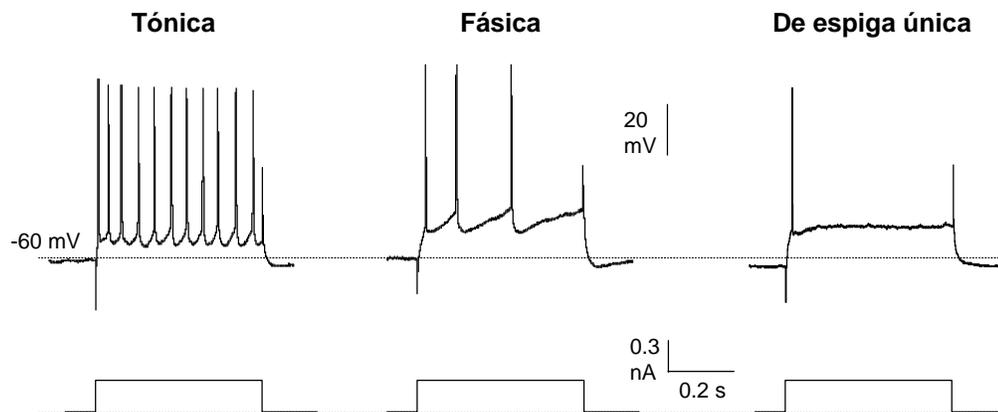


Figura 4.1. En la figura se muestran los patrones de disparo observados en las neuronas del asta dorsal. Las neuronas se clasificaron en tónicas, fásicas o de espiga única en base a su patrón de disparo en respuesta a pulsos de corriente despolarizante de 500 ms de duración. En esta figura y en el resto de figuras del presente capítulo en la parte inferior de la figura se muestra la corriente aplicada, la línea discontinua indicaría el nivel de corriente cero. En el registro de voltaje se indica el potencial de membrana mediante otra línea discontinua (en este caso -60 mV).

En el caso de registros en el asta ventral se utilizaba la estimulación antidrómica de la raíz ventral para la identificación de motoneuronas (véase procedimiento en registros intracelulares, pag 76). Si la neurona registrada respondía con un potencial de acción a la estimulación antidrómica producida a través de un electrodo de succión colocado sobre la raíz ventral se clasificaba como motoneurona.

Protocolo de estimulación

Tras caracterizar las neuronas se procedía a aplicar el protocolo de estimulación que consistía en:

– Estimulación sináptica:

Se han estudiado los efectos de los moduladores sobre las respuestas de las neuronas espinales frente a la activación sináptica producida por la estimulación eléctrica de la raíz dorsal. Se han utilizado (1) estímulos individuales de intensidad próxima al umbral, (2) estímulos individuales de alta intensidad y (3) estimulación repetitiva de alta intensidad.

La estimulación repetitiva no se aplicó en todos los experimentos ya que solo se utilizó para promover el disparo de potenciales de acción a larga latencia en neuronas que no lo producían con estímulos individuales. En los casos en que se utilizó, esta prueba se aplicaba al final del protocolo de estimulación para no interferir con el resto de las pruebas, ya que la estimulación repetitiva produce una potenciación a corto plazo de las respuestas.

– Estimulación intracelular:

Los pulsos de corriente despolarizante aplicados a través del electrodo intracelular se utilizaban para analizar los cambios en la excitabilidad de las neuronas estudiadas. La despolarización transitoria de las neuronas con pulsos intracelulares por encima del umbral de disparo produce en éstas el disparo de potenciales de acción. En estos experimentos se aplicaban pulsos de 500 ms de duración y de intensidad creciente.

Descripción de los experimentos

El protocolo de estimulación se repetía cada 25 minutos hasta obtener respuestas estables. Tras conseguir respuestas estables se comenzaba la perfusión con los moduladores de la corriente M. Para los experimentos que se presentan en

este capítulo se utilizaban únicamente los moduladores de la corriente M retigabine y XE-991. Los compuestos se aplicaban a 10 μ M durante 18 minutos bañando toda la médula espinal.

El protocolo de estimulación se volvía a repetir al final de la aplicación de los moduladores y posteriormente cada 25 minutos.

Los moduladores de la corriente M modificaban el potencial de reposo de las neuronas estudiadas en la mayoría de los casos. Desde la aplicación de los compuestos el protocolo de estimulación se repetía a dos potenciales de membrana distintos (1) el potencial membrana posterior a la aplicación del compuesto y (2) el potencial de membrana previo a la aplicación del compuesto. Para recuperar el potencial de reposo en situación control se aplicaba corriente continua a través del electrodo de registro. En los casos en los que se utilizaron, los trenes de estímulos se aplicaban cada 25 minutos y después del resto de las pruebas. Con esta aproximación conseguimos estudiar los efectos de los moduladores partiendo del mismo potencial de reposo, excluyendo que los efectos se debieran solo al cambio de potencial de membrana.

En las ocasiones en que el registro de una neurona permanecía estable tras la aplicación de uno de los moduladores se procedía a aplicar el segundo modulador para estudiar la reversibilidad de los efectos. La aplicación del segundo modulador se realizaba durante 18 minutos comenzando después de 35 minutos de lavado del primer compuesto. Como en el caso anterior se realizaba el protocolo de estimulación al final de la aplicación del compuesto y posteriormente se repetía cada 25 minutos, corrigiendo de nuevo los cambios en el potencial de membrana producidos respecto a la situación control.

Variables estudiadas

Las características de las respuestas y la definición de las variables estudiadas se detallan en la sección de métodos generales (registros intracelulares, pag 76).

Las variables analizadas en estos experimentos fueron las siguientes:

- Sobre la actividad basal de las neuronas: se estudiaron los cambios en el potencial de membrana y en la actividad espontánea.
- Sobre las respuestas a la estimulación eléctrica de la raíz dorsal: se estudiaron las variaciones en el umbral para los estímulos de baja intensidad. En los

estímulos de alta intensidad se midió el área integrada de los potenciales excitadores postsinápticos y el número de potenciales de acción.

- Sobre las respuestas a la estimulación intracelular: se estudiaron los cambios en la rheobase y en el número de potenciales de acción en respuesta a pulsos intracelulares despolarizantes.

Los efectos sobre el potencial de membrana se medían en el punto de máxima hiperpolarización o despolarización, que coincidía con el final de la aplicación de los compuestos

Los efectos sobre el resto de parámetros se medían cada 25 minutos, aunque para el análisis se han utilizado las medidas tomadas a los 25 minutos después de retirar los moduladores del líquido de perfusión, porque es aproximadamente el tiempo en que se observó un mayor efecto en los experimentos del capítulo anterior.

Análisis estadístico de los datos

Aunque las neuronas dorsales no presentaban en todos los casos el mismo patrón de disparo frente a la despolarización, no encontramos diferencias entre los tipos neuronales y los efectos producidos por la aplicación de los moduladores de la corriente M, por tanto los análisis estadísticos que se presentan están realizados sobre el total de la población de neuronas dorsales estudiadas, independientemente del tipo de respuesta que presentaban.

Los análisis estadísticos se realizaban con los datos reales utilizando Prism 3.0 (GraphPad Software, USA). Las medias se comparaban con *t* de Student cuando el número de observaciones era mayor de 10 (y los datos superaban el test de normalidad). Cuando el número de datos era menor de 10 se utilizaron test no paramétricos pareados (Wilcoxon) o no pareados (Mann-Whitney) según fuese lo más apropiado. Las curvas se comparaban utilizando ANOVA de 2 vías seguido del *post-hoc* test de Bonferroni. Los resultados están expresados como media \pm EEM.

RESULTADOS

Características de las poblaciones de neuronas estudiadas

Para la obtención de los resultados que se detallan en este capítulo se realizaron registros intracelulares tanto de neuronas dorsales como de motoneuronas. Se realizaron registros de 41 motoneuronas clasificadas como tal por responder a la activación antidrómica de la raíz ventral. En el asta dorsal se registraron 98 neuronas.

Además de encontrarse en diferentes localizaciones dentro de la médula espinal y de tener funciones diferentes, estos tipos neuronales presentan también características electrofisiológicas y morfológicas distintas.

Características electrofisiológicas

Las características electrofisiológicas generales de las neuronas estudiadas, como potencial de membrana y resistencia, se muestran en la tabla 4.1. Las neuronas dorsales se clasificaron como tónicas, fásicas o de espiga única basándose en el patrón de disparo que poseían (para más información véase caracterización de las neuronas estudiadas en la sección de métodos de este capítulo, pag 114), las motoneuronas por su parte presentaban en todos los casos patrones de disparo tónicos. Como se puede observar existen grandes diferencias en todas las medidas tomadas entre neuronas dorsales y motoneuronas, pero también existen algunas diferencias entre los distintos tipos de neuronas dorsales. Las neuronas de espiga única presentaban potenciales de acción más anchos y requerían pulsos de corriente aplicados a través del electrodo intracelular mayores que el resto de tipos para producir potenciales de acción. Por otro lado las neuronas fásicas también eran ligeramente menos excitables que las tónicas a juzgar por su rheobase.

Tipo	n	Vm	Ri	PA-A	PA-D	Rheobase
Tónicas	29	-68.1±0.7	78.0±5.5	74.6±1.4	1.77±0.1 ⁺⁺	0.21±0.02 ⁺⁺⁺
Fásicas	19	-68.8±0.9	72.1±5.7	73.2±1.7	1.89±0.08 ⁺	0.34±0.04 ^{++,\$}
Espiga única	38	-69.3±0.6	71.1±4.8	73.2±1.3	2.23±0.08	0.53±0.04
N. dorsales	98	-68.7±0.4	77.0±3.6	72.9±0.8	2.04±0.06	0.38±0.03
Motoneuronas	41	-76.1±0.9 ^{***}	21.7±1.3 ^{***}	88.0±1.2 ^{***}	1.19±0.03 ^{***}	2.40±0.13 ^{***}

Tabla 4.1. Características electrofisiológicas de las neuronas registradas (media ± EEM). Se muestra el número de observaciones (n), el potencial de membrana en mV (Vm), la resistencia en MΩ (Ri), la amplitud del potencial de acción en mV (PA-A), la duración del potencial de acción a la mitad de la amplitud en ms (PA-D) y el valor de rheobase en nA. Las neuronas del asta dorsal están divididas por tipo electrofisiológico. Los valores medios para todas las neuronas dorsales se muestran en la fila 4. Las diferencias entre neuronas dorsales y motoneuronas (***) p< 0.001), entre neuronas de espiga única y otros subtipos de neuronas dorsales (⁺ p< 0.05; ⁺⁺ p< 0.01; ⁺⁺⁺ p< 0.001) y entre neuronas tónicas y otros tipos de neuronas dorsales (^{\$} p< 0.05) se obtuvieron con la prueba t de Student.

Posición, morfología y tamaño de las neuronas estudiadas

Con el procedimiento de marcaje con biocitina se recuperaron en total 10 neuronas dorsales y 10 motoneuronas. En la figura 4.2 se pueden observar las zonas de la médula espinal donde se encontraron las neuronas estudiadas sobre un esquema general de la médula espinal de ratas neonatales. La mayor parte de las neuronas dorsales recuperadas se encontraron en láminas IV y V. Las motoneuronas se encontraron en zonas profundas del asta ventral.

Con el bajo número de observaciones de que disponemos no hemos podido establecer ninguna relación entre los tipos electrofisiológicos y los tipos morfológicos, tanto en neuronas dorsales como motoneuronas se encontraron células de tipo esférico, fusiforme, piramidal y estrellado. En la figura 4.2 se puede observar la reconstrucción, utilizando la cámara lucida, de 5 neuronas en las que se pudieron llevar a cabo experimentos farmacológicos.

Un parámetro donde sí se encontraron diferencias significativas entre neuronas dorsales y motoneuronas era en el tamaño del soma, el valor para las 10 neuronas dorsales recuperadas fue de 15.2 ± 1.3 μm y para las motoneuronas fue de 28.6 ± 1.8 μm, siendo esta diferencia significativa (p<0.001, n = 10).

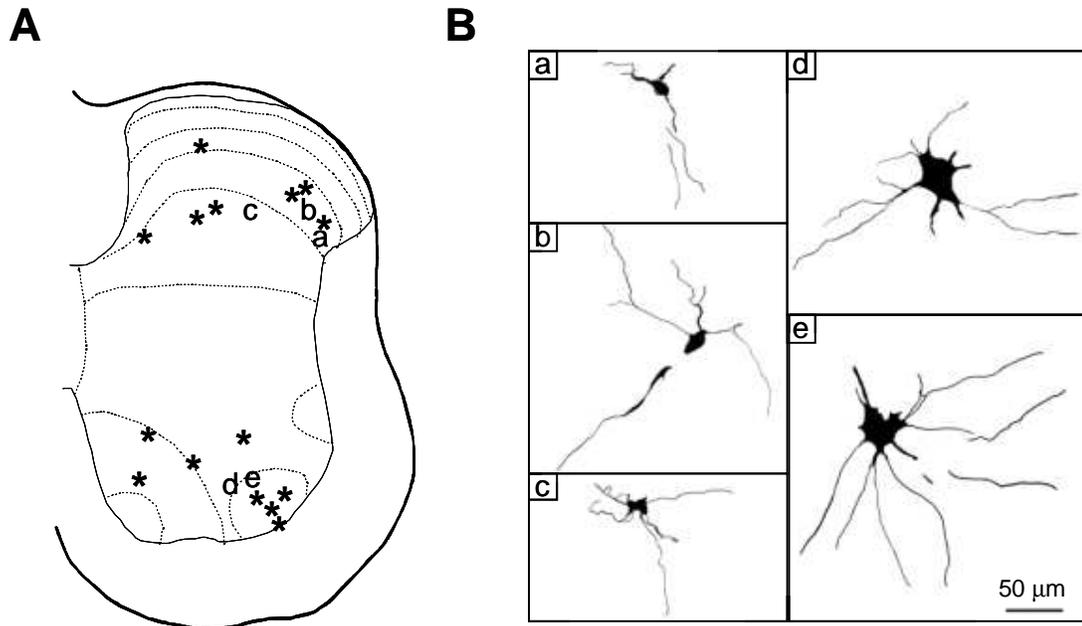


Figura 4.2. En la figura se muestra la posición y la morfología de las neuronas marcadas con biocitina y recuperadas tras el procedimiento histológico posterior. En **A** se muestra la posición de las neuronas recuperadas sobre la representación esquemática de una sección transversal de la médula espinal de animales neonatos. Las líneas punteadas indican aproximadamente los límites de las láminas de Rexed. Las letras y los asteriscos indican la posición aproximada de las neuronas recuperadas. En **B** se observa la reconstrucción de las neuronas indicadas con letras en **A**, realizadas a mano utilizando un sistema de cámara lucida. La disposición espacial de las neuronas es con la parte superior de la figura orientada hacia la parte dorsal. Las neuronas dibujadas consisten en tres neuronas dorsales (a-c) con patrón de disparo tónico que fueron tratadas con retigabine y en 2 motoneuronas, una tratada con retigabine (d) y otra con XE-991 (e). Todas las neuronas mostraron el comportamiento habitual frente a los moduladores. Las respuestas de la neurona dorsal (a) en respuesta a la aplicación de pulsos de corriente intracelular se muestran en la figura 4.6A. Nótese la diferencia de tamaño entre el soma de las neuronas dorsales y el soma de las motoneuronas.

Respuestas basales de las neuronas estudiadas

Tras un periodo de estabilización, las neuronas empaladas presentaban un potencial de membrana estable en todos los casos analizados y en la mayoría de ellos se pudo observar actividad espontánea de frecuencia y amplitud variable (90/98 neuronas dorsales y 39/41 motoneuronas). La actividad espontánea en la mayoría de los casos consistía únicamente en despolarizaciones subumbral (todas las motoneuronas y en 58/90 neuronas dorsales), aunque en algunas neuronas dorsales estas despolarizaciones estaban acompañadas de disparo espontáneo de potenciales de acción (30/90) o se trataba de actividad espontánea inhibitoria (2/90). Se puede observar un ejemplo de cada tipo de actividad espontánea en la figura 4.3.

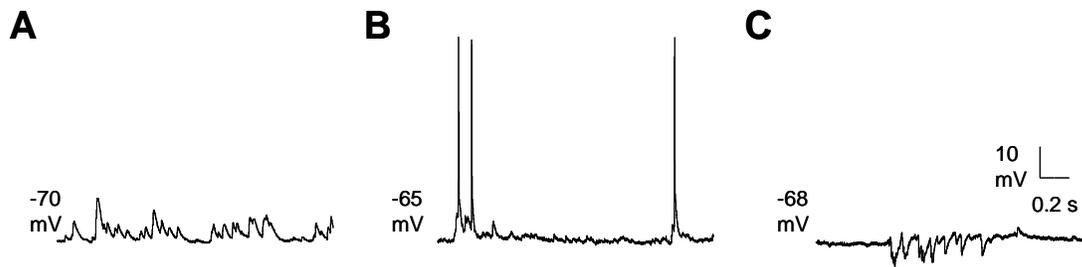


Figura 4.3. En la figura se muestran las tres formas de actividad espontánea observadas en los registros intracelulares. En **A** se observa actividad espontánea excitadora subumbral, en **B** actividad espontánea supraumbral y en **C** actividad espontánea inhibitoria. Cada uno de los registros fue obtenido de una neurona diferente. Las barras de calibración en **C** se aplican a las tres figuras.

Efectos de los moduladores de la corriente M sobre el potencial de membrana y sobre la actividad espontánea

Retigabine produjo una hiperpolarización en la mayor parte de las neuronas dorsales y de las motoneuronas estudiadas. Además redujo la frecuencia y aumentó la amplitud de la actividad espontánea.

XE-991 produjo los efectos opuestos sobre el potencial de membrana y sobre la amplitud de la actividad espontánea, pero sin alterar su frecuencia.

Además los efectos de cada uno de los moduladores se revirtieron tras la aplicación del compuesto contrario.

Efectos sobre el potencial de membrana

Los efectos de retigabine se estudiaron en una población de 12 neuronas dorsales y 7 motoneuronas. Dentro de las neuronas dorsales había 8 tónicas, 3 fásicas y 1 de espiga única. En 11 de las 12 neuronas dorsales y en 6 de las 7 motoneuronas testadas se pudo constatar una hiperpolarización con la aplicación de retigabine. La hiperpolarización comenzaba tras 3-4 minutos de perfusión y en los casos que se pudo seguir el efecto se mantenía durante al menos 1 hora de lavado. Las neuronas dorsales pasaron de -69.5 ± 1.3 mV en control a -72.3 ± 1.2 mV en retigabine ($p < 0.001$) y las motoneuronas de -77.7 ± 1.9 mV a -79.8 ± 1.8 mV ($p < 0.05$, fig 4.4 A). La aplicación posterior de XE-991 en 5 neuronas dorsales y en 3 motoneuronas que se hiperpolarizaron con retigabine consiguió despolarizar las neuronas por encima de los valores control, superando así la hiperpolarización inducida por retigabine.

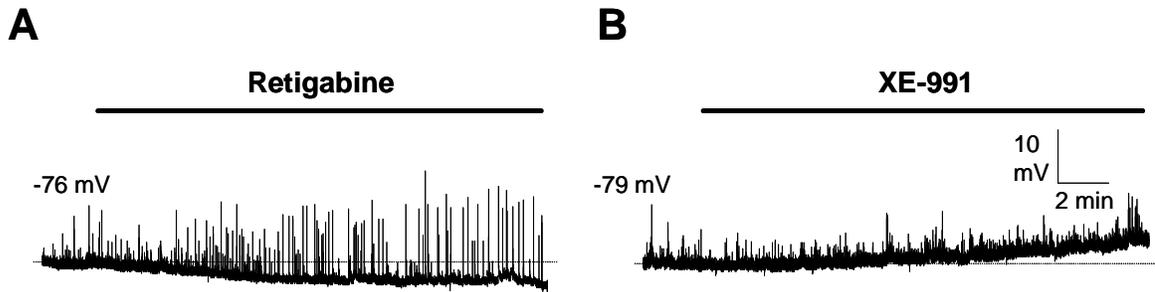


Figura 4.4. Efectos de los moduladores de la corriente M sobre el potencial de membrana. En **A** se muestra la fase inicial de la hiperpolarización producida en una motoneurona por la aplicación de retigabine 10 μ M durante 18 minutos. En **B** se muestra la fase inicial del efecto despolarizante de XE-991 10 μ M producido en otra motoneurona. El tiempo de aplicación de los compuestos está indicado por la barra sólida situada sobre el registro. Las barras de calibración de **B** se aplican para ambas figuras.

La aplicación como primera droga de XE-991 produjo el efecto opuesto en 8 de las 10 neuronas dorsales (4 tónicas, 2 fásicas y 4 de espiga única) y en 6 de las 7 motoneuronas estudiadas. La despolarización comenzaba tras 8-10 minutos de perfusión y se mantenía durante más de 1 hora de lavado. El potencial de membrana de las neuronas que sufrieron despolarización pasó de -69.6 ± 1.2 mV en control a -66.9 ± 1.2 mV en XE-991 para las neuronas dorsales ($p < 0.01$) y de -78.8 ± 1.7 mV a -75.7 ± 1.6 mV para motoneuronas ($p < 0.05$, fig 4.4 B). En las 2 motoneuronas y las 3 neuronas dorsales a las que se aplicó retigabine después de XE-991 la despolarización se revirtió, aunque la potencia del efecto de retigabine sobre el potencial de membrana en estos casos fue menor que el de XE-991.

Efectos sobre la actividad espontánea

La actividad espontánea también se vio alterada por la aplicación de los moduladores de la corriente M. Los efectos producidos sobre la actividad espontánea fueron de larga duración manteniéndose tras más de 1 hora de lavado. Con la aplicación de retigabine la actividad espontánea aumentó su amplitud desde 5.7 ± 0.6 mV en control hasta 9.9 ± 0.7 mV tras retigabine ($p < 0.01$, $n = 10$; fig 4.5) en neuronas dorsales y en motoneuronas pasó de 4.4 ± 0.5 mV a 10.4 ± 1.5 mV ($p < 0.05$, $n = 7$). La frecuencia de la actividad espontánea en neuronas dorsales se redujo desde 13.2 ± 2.0 eventos/min en control hasta 4.2 ± 0.5 eventos/min tras retigabine ($p < 0.01$, $n = 9$), en motoneuronas también se observó este efecto reduciéndose la frecuencia de la actividad espontánea de 12.4 ± 2.3 eventos/min en control hasta 7.0 ± 1.0 eventos/min

tras retigabine ($p < 0.05$, $n = 7$; fig 4.4 A). Ambos efectos de retigabine sobre la actividad espontánea fueron revertidos en las 5 neuronas dorsales (ejemplo en figura 4.5) y las 3 motoneuronas en que se consiguió perfundir con XE-991 después de retigabine.

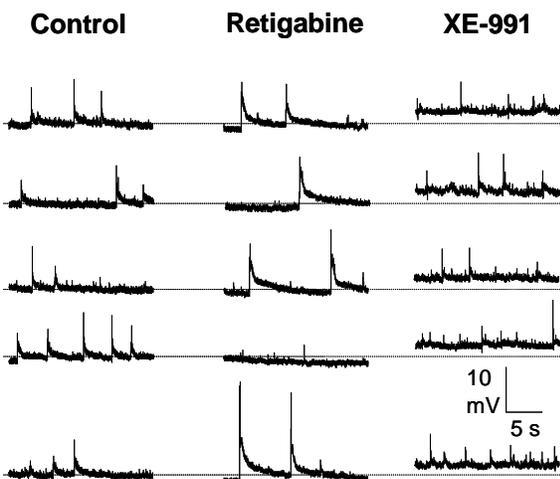


Figura 4.5. Efectos de los moduladores de la corriente M sobre la actividad espontánea registrada intracelularmente. En esta figura se muestran fragmentos de registros originales de una neurona del asta dorsal de espiga única en situación control, tras la aplicación de retigabine y después de la aplicación posterior de XE-991, ambos a 10 μM durante 18 minutos. Nótese la reducción en la frecuencia y el aumento en la amplitud de los potenciales espontáneos con retigabine y como XE-991 revirtió ambos efectos. La línea de puntos refleja el potencial de reposo en situación control (-71 mV) para indicar los cambios producidos por la aplicación de los moduladores.

XE-991 produjo los efectos opuestos sobre la amplitud pero no cambió la frecuencia de los eventos espontáneos. La amplitud de la actividad espontánea se redujo de 4.2 ± 0.8 mV en control hasta 2.9 ± 0.7 mV tras XE-991 en neuronas dorsales ($p < 0.05$, $n = 9$), en motoneuronas el efecto fue similar pasando de 4.2 ± 0.7 mV a 2.9 ± 0.4 mV ($p < 0.05$, $n = 7$; fig 4.4 B). La frecuencia mostró una ligera tendencia hacia el aumento que no llegó a ser significativa en ninguno de los casos (en neuronas dorsales pasó de 13.9 ± 2.6 eventos/min a 15.6 ± 2.7 eventos/min y en motoneuronas de 11.8 ± 3.0 eventos/min a 12.6 ± 3.0 eventos/min). En las dos motoneuronas en las que se aplicó retigabine después de XE-991 los efectos sobre la amplitud de la actividad espontánea se revirtieron. En neuronas dorsales la reversión se intentó en 3 casos pero solo se consiguió una reversión clara en uno de ellos, en otro la actividad espontánea producía potenciales de acción lo que dificultaba la medida de amplitud y en el último caso no se produjo ningún efecto claro.

Efectos del facilitador de la corriente M retigabine sobre la excitabilidad neuronal

La aplicación de retigabine produjo una reducción de la excitabilidad en la mayor parte de las neuronas estudiadas. Esta reducción se manifestó tanto en la

adaptación en el disparo de potenciales de acción como en el incremento en la rheobase utilizando pulsos despolarizantes. La reducción en la excitabilidad producida por retigabine fue de similar magnitud en neuronas dorsales y en motoneuronas.

Retigabine se aplicó en 12 neuronas dorsales (de las que 8 eran tónicas, 3 fásicas y 1 de espiga única) y en 7 motoneuronas, la reducción en la excitabilidad se pudo comprobar en todas las neuronas excepto en el caso de la neurona dorsal de espiga única que resultó insensible al tratamiento.

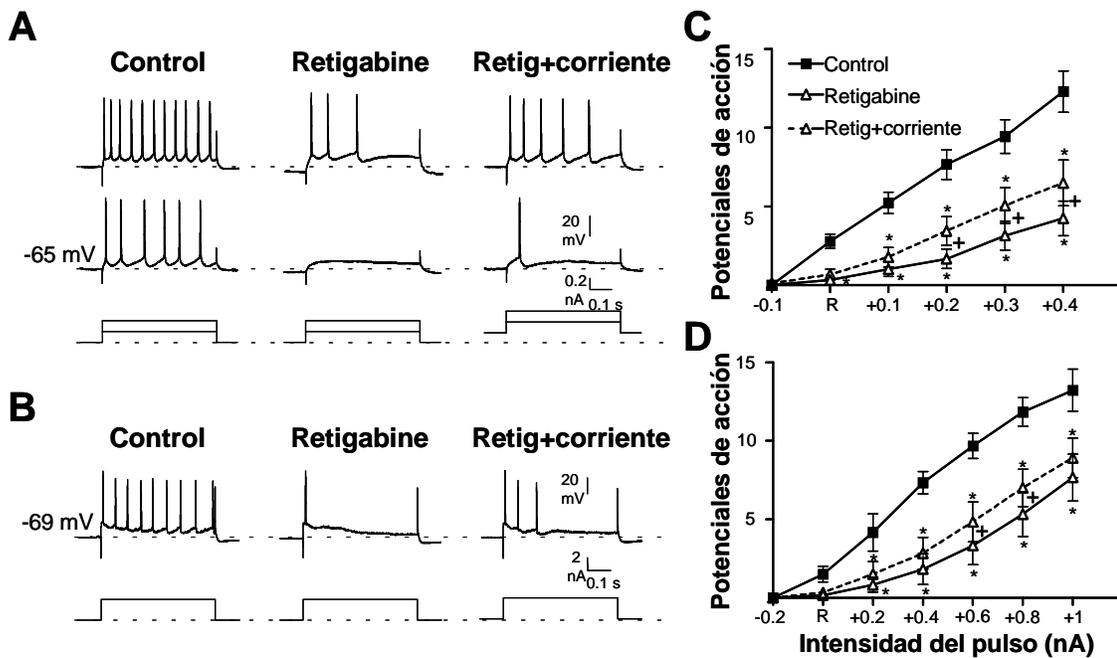


Figura 4.6. Efectos de retigabine sobre la excitabilidad de neuronas dorsales y motoneuronas. En **A** y **B** se muestran registros de voltaje originales de una neurona dorsal con disparo tónico y de una motoneurona, respectivamente, en respuesta a pulsos de corriente despolarizante aplicados a través del electrodo intracelular (la cantidad de corriente utilizada está representada en la parte inferior de cada figura). Se muestran las respuestas en tres situaciones diferentes: en control, después de la perfusión con retigabine 10 μ M y durante la compensación, mediante la aplicación de corriente continua, de la hiperpolarización producida por retigabine. La rectificación que tiene lugar durante la aplicación del pulso de corriente en la motoneurona en **B** se debe a la gran cantidad de corriente que es necesaria para estimularla (3.2 nA). Los gráficos muestran los valores promediados de número de potenciales de acción en respuesta a pulsos despolarizantes de intensidad creciente obtenidos en las tres mismas situaciones de los registros **A** y **B**. Los datos se refieren a una población de 9 neuronas dorsales (**C**) y 6 motoneuronas (**D**). R indica rheobase. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0.05$; Bonferroni *post hoc test*). Los signos + indican diferencias significativas entre los efectos de retigabine sin y con corrección del potencial de membrana ($p < 0.05$; Bonferroni *post hoc test*). La leyenda de **C** se aplica para ambos gráficos.

En la figura 4.6 se muestran los valores promediados de número de potenciales de acción en tres situaciones diferentes (1) control, (2) tras la aplicación de retigabine y (3) tras retigabine compensando el cambio sobre el potencial de membrana. La despolarización hasta el potencial de reposo en situación control no suprimió el efecto depresor de retigabine sobre la excitabilidad, aunque lo redujo ligeramente. Ambas curvas se desplazaron hacia la derecha respecto al control, presentando diferencias significativas prácticamente a todas las intensidades utilizadas. A determinadas intensidades también hubo significación respecto a los valores obtenidos a los distintos potenciales de membrana, aunque las diferencias fueron inferiores que las obtenidas frente al control.

La rheobase se incrementó significativamente en las 11 neuronas dorsales y en todas las motoneuronas. En neuronas dorsales la rheobase aumentó de 0.31 ± 0.04 nA en control a 0.44 ± 0.06 nA en retigabine ($p < 0.01$, $n = 11$). En motoneuronas, el cambio fue desde 2.91 ± 0.22 nA en control hasta 3.26 ± 0.21 nA tras retigabine ($p < 0.05$, $n = 7$).

El número de potenciales de acción para un pulso de intensidad de rheobase + 0.4 nA aplicado a través del electrodo intracelular se redujo considerablemente en neuronas dorsales y en motoneuronas. En las 11 neuronas dorsales sensibles a retigabine el número de potenciales disminuyó de 12.9 ± 1.1 en control a 5.1 ± 1.2 después de retigabine ($p < 0.001$, $n = 11$). En motoneuronas el mismo pulso aplicado a través del electrodo intracelular produjo 7.9 ± 0.8 potenciales de acción en control y 1.9 ± 0.8 tras la aplicación de retigabine ($p < 0.05$, $n = 7$).

Cuando XE-991 se aplicó después de retigabine en 3 neuronas dorsales y en 3 motoneuronas, el efecto depresor inicial de retigabine sobre la excitabilidad neuronal fue totalmente revertido y, de hecho, la excitabilidad alcanzó niveles similares a los logrados con la aplicación de XE-991 como primera droga como se comentará a continuación (fig 4.7). Sin embargo hubo un caso de una neurona dorsal de espiga única que no respondió a retigabine y ni tampoco a la aplicación posterior de XE-991.

Efectos del bloqueador de los canales KCNQ XE-991 sobre la excitabilidad neuronal

La aplicación de XE-991 produjo un aumento en la excitabilidad de motoneuronas y de una proporción de las neuronas dorsales estudiadas, aunque los

efectos sobre las motoneuronas fueron mayores que los observados sobre las neuronas dorsales.

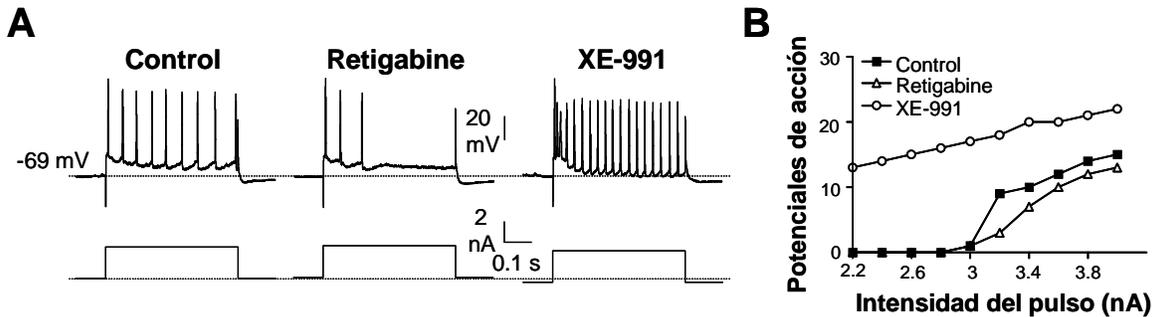


Figura 4.7. Reversión por XE-991 de los efectos de retigabine sobre la excitabilidad. En **A** se muestran las respuestas de una motoneurona frente a pulsos de corriente despolarizante aplicados a través del electrodo intracelular. Se muestran imágenes en control, tras la aplicación de retigabine 10 μ M y después de la aplicación de posterior de XE-991 10 μ M. Las respuestas que se muestran para retigabine y XE-991 tienen corregidos los cambios en el potencial de membrana ocasionados por los moduladores mediante la aplicación de corriente continua a través del electrodo intracelular. La fuerte rectificación que se observa durante la aplicación del pulso se debe a la gran cantidad de corriente pasada (3.2 nA). La intensidad de los pulsos esta indicada en la parte inferior de la figura, al igual que la cantidad de corriente continua aplicada para corregir los cambios en el potencial de membrana. El grafico en **B** muestra el número de potenciales de acción en respuesta a pulsos de corriente de intensidad creciente obtenidos de la misma motoneurona de **A**. El reducido efecto de retigabine se debe en parte a que los valores representados han sido tomados de las respuestas producidas corrigiendo el potencial de membrana.

Efectos de XE-991 sobre las neuronas dorsales

De las 10 neuronas dorsales tratadas con XE-991 (4 de ellas tónicas, 2 fásicas y las 4 restantes de espiga única) solo en 5 se pudo constatar un efecto claro de XE-991 sobre la excitabilidad. En estos 5 casos la rheobase no resultó significativamente alterada con la aplicación de XE-991 (de 0.39 ± 0.11 nA en control a 0.27 ± 0.06 tras XE-991) aunque en 3 de ellos sí se observó una reducción. Como se puede observar en la figura 4.8 la aplicación de XE-991 aumentó el número de potenciales de acción en respuesta a pulsos despolarizantes aplicados a través del electrodo intracelular. Aunque existe un incremento a casi todas las intensidades utilizadas solo se alcanzó significación estadística para los pulsos de mayor magnitud. Para una intensidad de rheobase + 0.3 nA los potenciales de acción se incrementaron desde 5.9 ± 2.0 en control hasta 9.9 ± 2.5 tras XE-991 ($p < 0.05$, $n = 5$).

Este grupo de neuronas dorsales sensibles se componía de 1 tónica, 2 fásicas y 2 de espiga única. Al devolver las neuronas a su potencial de reposo en control se

produjo una reversión parcial de los efectos en 4 de ellas, pero en el caso de una neurona de espiga única esta reversión fue completa.

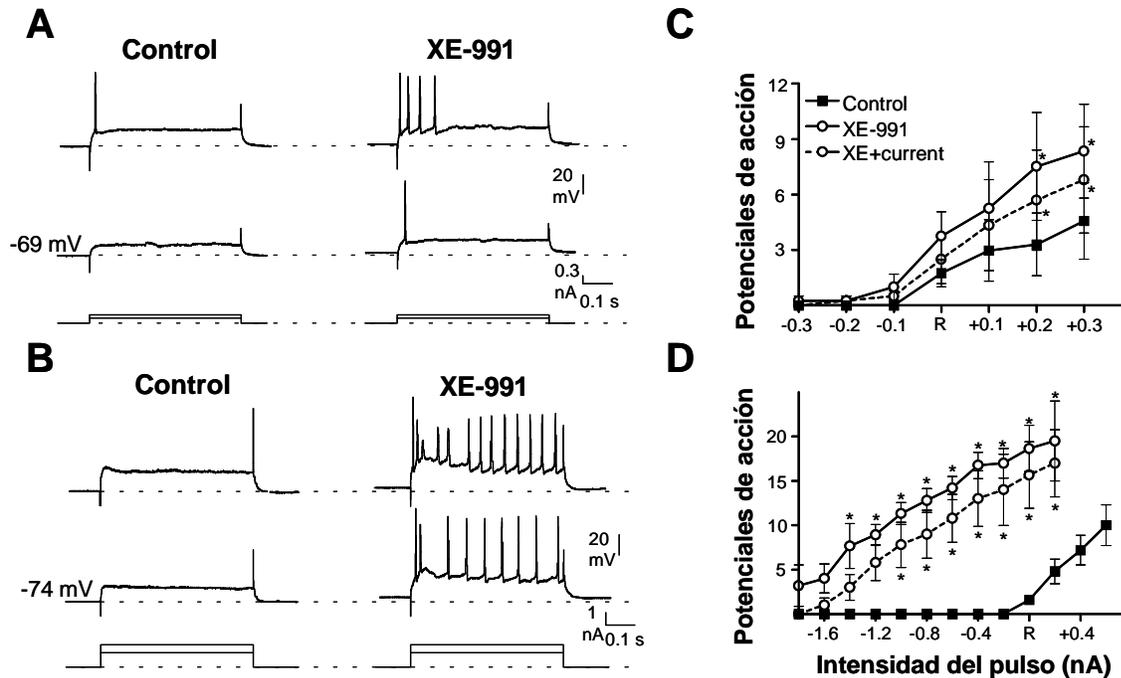


Figura 4.8. Efectos de XE-991 sobre la excitabilidad de neuronas dorsales y de motoneuronas. En la figura se muestran registros de voltaje obtenidos de una neurona dorsal fásica (A) y de una motoneurona (B) en respuesta a pulsos de corriente despolarizante en control y tras la perfusión de XE-991 10 μ M. Los gráficos muestran los valores promediados de número de potenciales de acción en respuesta a pulsos despolarizantes de intensidad variable en las 5 neuronas dorsales sensibles a XE-991 (C) y en 6 motoneuronas (D). Se muestran los valores en control, después de la aplicación de XE-991 y tras la compensación de la despolarización inducida por XE-991. La leyenda de C se aplica para ambos gráficos. R indica rheobase. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (* $p < 0.05$, Bonferroni *post-hoc* test).

Efectos de XE-991 sobre las motoneuronas

Los efectos sobre la excitabilidad de las motoneuronas fueron más claros que sobre las neuronas dorsales como se puede observar en la figura 4.8, donde se observa un claro desplazamiento de las curvas hacia la izquierda.

La rheobase se redujo significativamente desde 2.97 ± 0.26 nA en control hasta 1.29 ± 0.21 nA con la aplicación de XE-991 ($p < 0.05$, $n = 7$). Además el número de potenciales de acción aumentó en gran medida.

Tras la aplicación de XE-991 se producía un gran incremento en la excitabilidad de las motoneuronas, disparando a intensidades muy por debajo de la rheobase en situación control, por lo cual en estos experimentos no se utilizaron pulsos de intensidades por encima de rheobase para evitar desestabilizar el registro. En control, para la rheobase, se produjeron 1.7 ± 0.3 potenciales de acción y tras la aplicación de XE-991 aumentaron hasta 18.7 ± 1.1 ($p < 0.05$, $n = 7$). La repolarización de las motoneuronas hasta el potencial de reposo en situación control produjo una ligera recuperación del efecto sobre el disparo de potenciales de acción.

Experimentos de reversión con retigabine

Retigabine se aplicó después de XE-991 en 2 neuronas dorsales y en 2 motoneuronas en las que se pudo observar un efecto previo provocado por XE-991. En estos casos retigabine no fue capaz de revertir los efectos facilitadores de XE-991 sobre la excitabilidad neuronal por completo, produciendo únicamente una reversión parcial (fig 4.9). Hubo una neurona dorsal tónica a la que se aplicó retigabine aunque la aplicación de XE-991 en primer lugar no produjo ningún efecto, en este caso después de la aplicación de retigabine tampoco se observó ningún cambio en la excitabilidad.

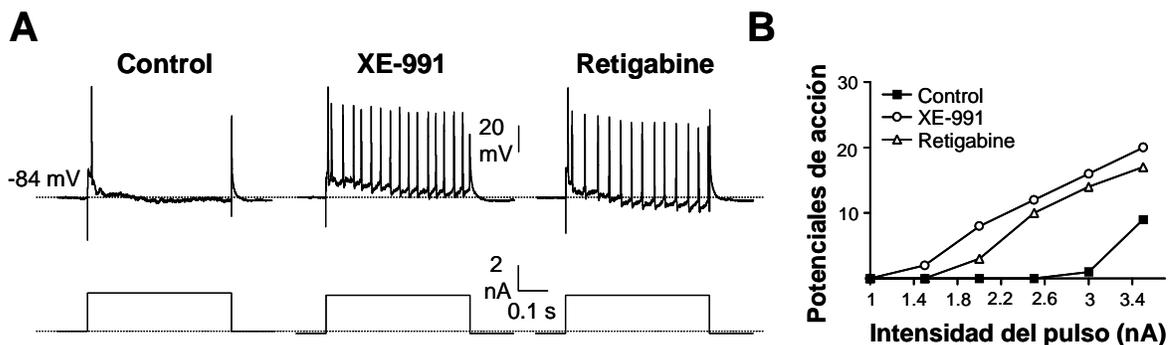


Figura 4.9. Reversión parcial por retigabine de los efectos de XE-991 sobre la excitabilidad neuronal. En **A** se muestra un registro original de voltaje de una motoneurona en respuesta a pulsos de corriente despolarizante en control y tras la aplicación de los moduladores de la corriente M (ambos a $10 \mu\text{M}$). Los registros para ilustrar los efectos de los moduladores están tomados corrigiendo los cambios en el potencial de membrana. La fuerte rectificación producida se debe a la gran cantidad de corriente aplicada a través del electrodo del electrodo intracelular (3 nA), véase la indicación de la corriente en la parte inferior de la figura. En la gráfica en **B** se representa el número de potenciales de acción producidos en respuesta a pulsos de corriente despolarizante de diferente intensidad. Los valores fueron obtenidos de la misma motoneurona de **A**. Los valores utilizados fueron obtenidos corrigiendo los efectos de los moduladores sobre el potencial de membrana.

Efectos de los moduladores de la corriente M sobre la estimulación de baja intensidad de la raíz dorsal

La aplicación de retigabine aumentó el umbral en neuronas dorsales desde $35.8 \pm 3.1 \mu\text{A}$ hasta $45.8 \pm 3.7 \mu\text{A}$ ($p < 0.001$, $n = 12$) y en motoneuronas de $27.1 \pm 2.4 \mu\text{A}$ a $36.4 \pm 2.8 \mu\text{A}$ ($p < 0.05$, $n = 7$; fig 4.10). La aplicación posterior de XE-991 revirtió totalmente los efectos de retigabine sobre el umbral en las 3 motoneuronas y al menos parcialmente en las 4 neuronas dorsales testadas.



Figura 4.10. Efectos de retigabine sobre las respuestas de una motoneurona frente a la estimulación de baja intensidad de la raíz dorsal. En la figura se muestran respuestas de una motoneurona frente a estímulos cercanos al umbral (de 50 μs de duración y de la intensidad indicada en cada caso). Las respuestas fueron obtenidas en control y a los 25 minutos de la aplicación de retigabine 10 μM , corrigiendo la hiperpolarización producida por retigabine mediante la aplicación de corriente continua.

Sin embargo, con la aplicación de XE-991 en la mayoría de los casos no fue posible observar el efecto contrario, solo se produjo una reducción en el umbral en 1 de 11 neuronas dorsales y en 2 de 7 motoneuronas, en el resto de los casos lo habitual fue no observar ninguna variación en este parámetro, aunque en algunas neuronas dorsales se produjo un ligero aumento. La aplicación posterior de retigabine provocó un aumento en la intensidad umbral aun tras la falta de efecto de XE-991 aplicado previamente.

Efectos de los moduladores de la corriente M sobre la estimulación de alta intensidad de la raíz dorsal

Retigabine redujo tanto el área integrada de los potenciales excitadores postsinápticos como el disparo de potenciales de acción en los casos que se produjo. XE-991 también produjo una reducción de los potenciales excitadores postsinápticos, aunque de menor magnitud que la producida por retigabine, y en varios casos incrementó el disparo de potenciales de acción.

Efectos sobre los potenciales excitadores postsinápticos

El área integrada de los potenciales excitadores postsinápticos se dividió en componentes de corta y larga latencia (ver fig 4.11). Los potenciales postsinápticos a corta latencia no sufrieron cambios importantes con ninguno de los compuestos, concentrándose todo el efecto en el componente de larga latencia (fig 4.11).

Retigabine produjo una gran reducción en el área integrada del componente de larga latencia de neuronas dorsales en 13 de las 14 neuronas en las que se aplicó, en estas 13 neuronas el área se redujo de 41.6 ± 4.9 mV*s a 20.2 ± 1.9 mV*s ($p < 0.001$, $n = 13$). El efecto en 7 de 7 motoneuronas fue de similar magnitud disminuyendo de 22.6 ± 3.6 mV*s en control a 9.2 ± 1.6 mV*s tras retigabine ($p < 0.05$, $n = 7$).

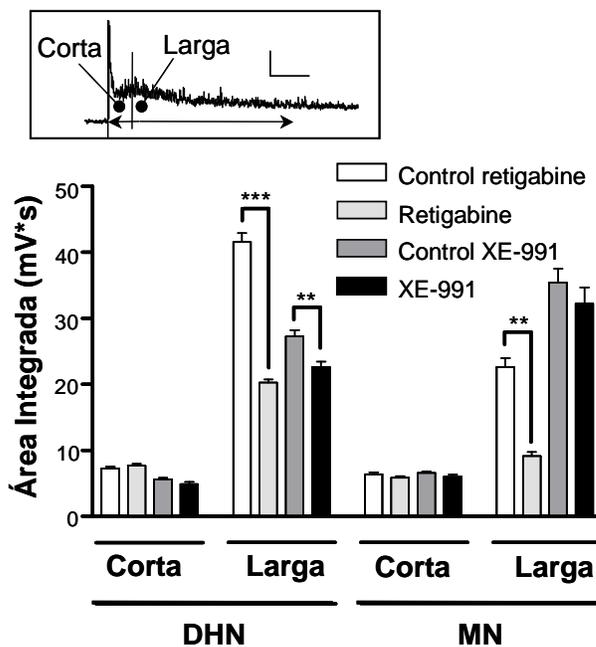


Figura 4.11. En la gráfica se muestra el análisis del área integrada de las respuestas de las neuronas espinales frente a la estimulación individual de alta intensidad de la raíz dorsal. Los resultados se han dividido en un componente de corta y uno de larga latencia como se indica en la figura insertada en la parte superior (la línea de separación está situada a 0.5 s del artefacto del estímulo, calibración: 10 mV; 1 s). Los asteriscos indican diferencias significativas (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; t -test). No existen diferencias significativas entre los controles para retigabine y para XE-991.

XE-991 también produjo una pequeña reducción en el área integrada de los potenciales postsinápticos a larga latencia que resultó significativa en neuronas dorsales (fig 4.11), la reducción fue patente en las 11 neuronas testadas pasando de 27.3 ± 3.2 mV*s en control a 22.7 ± 2.5 mV*s ($p < 0.01$, $n = 11$). La tendencia hacia la reducción también se manifestó en la mayoría de las motoneuronas aunque en este caso fue de menor magnitud y no se llegaron a alcanzar diferencias significativas (de 35.4 ± 5.6 mV*s a 32.3 ± 6.3 mV*s), la reducción se observó en 6 de las 7 motoneuronas, en la restante se produjo un ligero aumento.

Efectos sobre el disparo de potenciales de acción

Los efectos sobre el disparo de potenciales de acción se ajustaron más a lo esperado incrementándose con XE-991 y disminuyendo con retigabine.

De las neuronas dorsales tratadas con retigabine solo en 6 de ellas había disparo de potenciales de acción a larga latencia en los estímulos individuales, tras la aplicación de retigabine los potenciales de acción se redujeron de 36.7 ± 6.5 en control a 7.7 ± 1.7 ($p < 0.05$, $n = 6$; fig 4.12). El disparo de larga latencia con estímulos individuales en motoneuronas es raro y por eso se utilizó sistemáticamente estimulación repetitiva, en los 5 casos en que se consiguió facilitar el disparo de potenciales de acción la aplicación de retigabine disminuyó su número de 26.4 ± 12.7 a 13.4 ± 6.3 ($p < 0.05$, $n = 5$; fig 4.13).

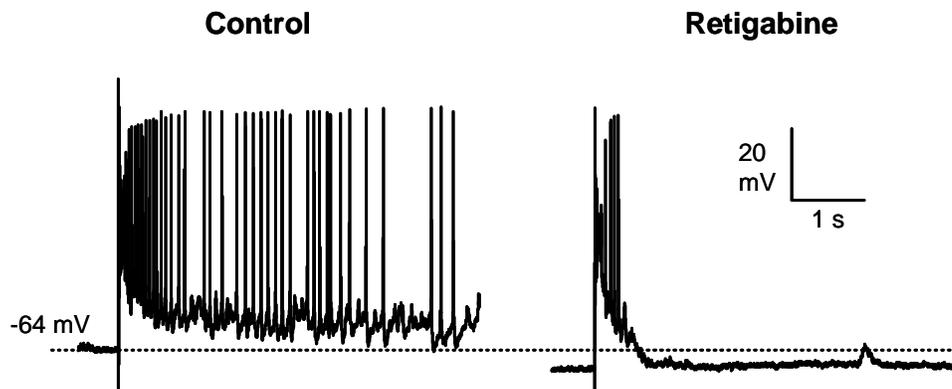


Figura 4.12. Efectos de retigabine sobre las respuestas de una neurona dorsal frente a la estimulación de alta intensidad de la raíz dorsal. Se muestran registros originales de una neurona dorsal con disparo tónico frente a estímulos de 200 μ s y 300 μ A en control y tras 25 minutos de lavado de retigabine 10 μ M. Nótese la reducción producida en el disparo de potenciales de acción y en el potencial excitador postsináptico compuesto.

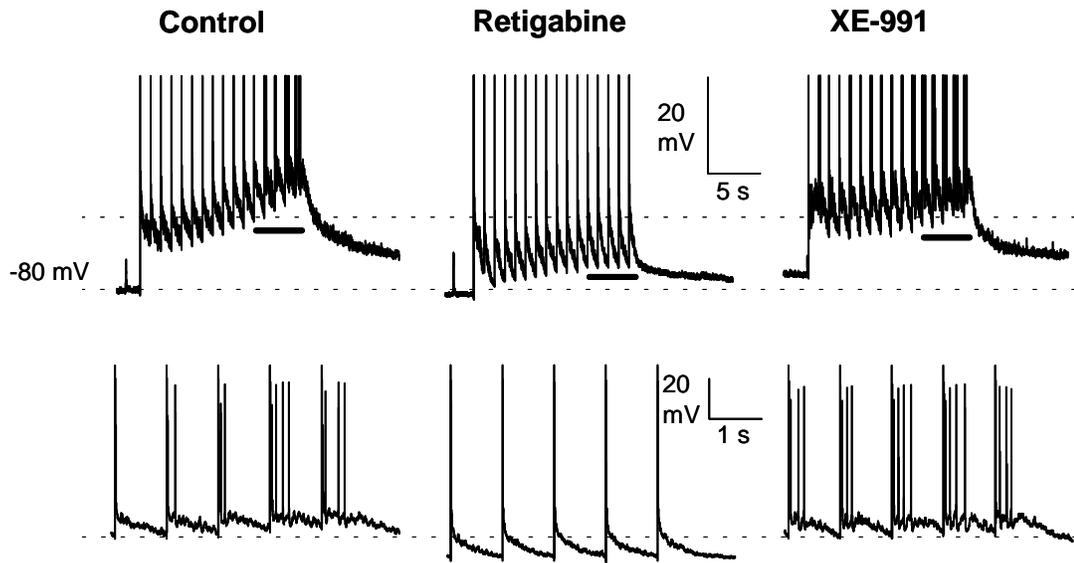


Figura 4.13. Reversión por XE-991 de los efectos de retigabine sobre las respuestas de una motoneurona frente a la estimulación repetitiva de la raíz dorsal. En la figura se muestran registros originales de la respuesta de una motoneurona frente a la estimulación repetitiva (16 estímulos a 1 Hz) de alta intensidad (200 μ s; 300 μ A) de la raíz dorsal. En la parte inferior se muestran en mayor detalle los últimos 5 estímulos (indicado en la figura superior por la línea gruesa). Nótese la reducción en los potenciales de acción y en el potencial excitador postsináptico compuesto con retigabine 10 μ M y la reversión producida por XE-991 10 μ M.

XE-991 consiguió incrementar ligeramente el número de potenciales de acción frente a estimulación individual en 3 neuronas dorsales y en 2 motoneuronas (fig 4.14). En otras 3 neuronas dorsales se consiguió inducir el disparo con la utilización de estímulos repetidos, pero el resultado obtenido tras la aplicación de XE-991 no fue el esperado, produciéndose una ligera reducción en el número de potenciales de acción.

En 5 motoneuronas se pudo inducir el disparo de potenciales de acción a larga latencia con la estimulación repetitiva. En estos 5 casos los potenciales de acción se incrementaron desde 57.0 ± 28.4 en control hasta 93.6 ± 51.3 tras la aplicación de XE-991 ($p < 0.05$, $n = 5$).

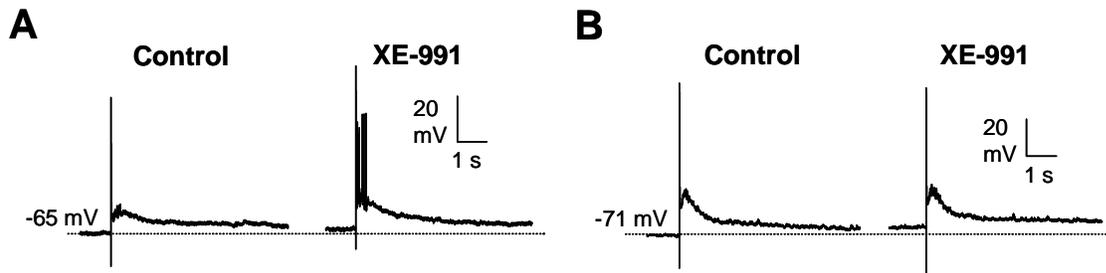


Figura 4.14. Efectos de XE-991 sobre las respuestas sinápticas de neuronas dorsales: En la figura se muestran las respuestas de dos neuronas dorsales con disparo fásico frente a la estimulación de alta intensidad (200 μ s; 300 μ A) de la raíz dorsal, en control y tras 25 minutos de lavado después de la aplicación de XE-991 10 μ M. En **A** se muestra un ejemplo de una neurona que sufrió un aumento en la respuesta con XE-991 y en **B** una neurona cuya respuesta no se vio alterada.

Experimentos de reversión

XE-991 revirtió los efectos de retigabine sobre el área integrada de los potenciales postsinápticos y sobre el disparo de potenciales de acción. La reversión sobre el área integrada fue siempre parcial, sin embargo el disparo de potenciales de acción se incremento por encima de los valores control en algunos casos (fig 4.13).

La aplicación de retigabine después de XE-991 produjo una reducción en el área integrada de los potenciales postsinápticos aun mayor que la producida por XE-991. En los casos en que la aplicación de XE-991 consiguió incrementar el disparo de potenciales de acción retigabine revirtió parcialmente este efecto.

Relación entre la excitabilidad neuronal y las respuestas a la activación sináptica

Al igual que las respuestas frente a la estimulación directa de las neuronas utilizando pulsos de corriente intracelulares, las respuestas frente a la activación eléctrica de las aferentes primarias con estímulos de alta intensidad también se redujeron con retigabine y mostraron una tendencia hacia el aumento con XE-991, aumento más evidente en motoneuronas. La figura 4.15 se ha realizado para ilustrar como se relacionan los cambios en la excitabilidad de una neurona con la capacidad de esa neurona para transmitir la información sináptica. Como se puede observar, en la mayor parte de los casos está relacionado el cambio en la transmisión sináptica con un cambio en la excitabilidad de la propia neurona, aunque esta relación no se

produce en todos los casos estudiados, habiendo neuronas que no sufrieron variaciones en su excitabilidad pero sí en su respuesta sináptica.

En esta figura además se puede observar como el aumento en la excitabilidad producido por XE-991 fue de mayor magnitud en las motoneuronas que en las neuronas dorsales.

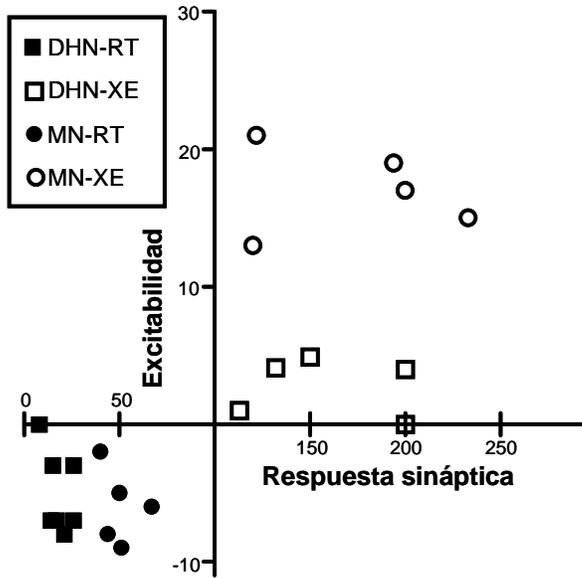


Figura 4.15. Este gráfico se ha realizado para ilustrar la relación entre la excitabilidad neuronal y las respuestas sinápticas. El eje vertical muestra la diferencia entre el número de potenciales de acción en respuesta a un pulso de corriente de intensidad fija en control y después de la aplicación de alguno de los moduladores. El eje horizontal muestra el número de potenciales de acción frente a la estimulación de la raíz dorsal después de la perfusión de droga expresado como porcentaje del control. El gráfico solo incluye neuronas en las que fue posible producir potenciales de larga latencia con estimulación individual o repetitiva. Como se indica en la leyenda, los cuadrados representan neuronas del asta dorsal (DHN) y los círculos motoneuronas (MN). Los símbolos llenos indican neuronas tratadas con retigabine (RT) y los vacíos con XE-991 (XE).

DISCUSIÓN

En esta segunda serie de experimentos hemos estudiado las respuestas de neuronas dorsales y de motoneuronas tras la aplicación de los moduladores de la corriente M retigabine y XE-991.

El facilitador de la corriente M retigabine provoca una hiperpolarización en la mayor parte de las neuronas estudiadas, independientemente del tipo que se trate. Además produce una reducción de las respuestas frente a la inyección de pulsos de corriente despolarizante aplicados a través del electrodo intracelular, promoviendo la adaptación en la frecuencia de disparo de potenciales de acción. Estos efectos van encaminados hacia la reducción de la excitabilidad de gran parte de las neuronas espinales, lo que se refleja en la reducción de las respuestas de neuronas dorsales y motoneuronas frente a la activación sináptica.

XE-991 produjo los efectos opuestos y revirtió los de retigabine indicando que al menos la mayor parte de los efectos observados se deben a la intervención de las corrientes M.

Por tanto estos resultados demuestran que los canales KCNQ se expresan en las propias neuronas de la médula espinal y que su modulación modifica la excitabilidad y la transmisión de información entre las neuronas espinales.

Pese a que hemos indicado que XE-991 mostró una tendencia hacia el incremento de las respuestas sinápticas, en la mayoría de los casos produjo una pequeña reducción en el área integrada de los potenciales excitadores postsinápticos. Este efecto puede deberse a la despolarización sufrida por la mayor parte de las neuronas, que al estar más despolarizadas tienen menos fuerza motriz para el intercambio iónico y por tanto las medidas de área integrada son menores.

Un punto de gran interés está en la falta de simetría de los efectos de XE-991 entre neuronas dorsales y motoneuronas. Retigabine presenta efectos depresores sobre la excitabilidad de similar magnitud en ambos grupos de neuronas, pero en cambio los efectos de XE-991 son más potentes en motoneuronas que en neuronas dorsales.

Estas diferencias no se han podido relacionar en ningún caso con el patrón de disparo de las neuronas dorsales de que se tratasen. En un trabajo previo de Wang y McKinnon (1995) se demostraba, en neuronas simpáticas de rata, que la presencia de la corriente M se asociaba con neuronas que poseían un patrón de disparo fásico, mientras que en neuronas con disparo tónico no se observaba esa corriente. En nuestro caso hemos observado que neuronas de cualquiera de los 3 tipos en que hemos dividido las neuronas dorsales han sido capaces de responder a ambos moduladores, indicando que todos los tipos neuronales pueden expresar la corriente M independientemente de su patrón de disparo.

La activación de la corriente M muestra una fuerte dependencia del potencial de membrana (Brown y Adams, 1980). Por esta razón, se podría pensar que neuronas que presentaran un potencial de membrana más despolarizado podrían presentar mayor sensibilidad al bloqueo por XE-991 que otras en las que la corriente podría estar bloqueada por encontrarse a potenciales muy negativos. En cambio este mecanismo tampoco se ha podido observar en la población que hemos estudiado. De

hecho las motoneuronas, que presentan potenciales de reposo más hiperpolarizados, fueron las que mostraron una mayor sensibilidad por el compuesto.

Aun así existen diversas posibilidades para explicar, por sí solas o combinadas, estas diferencias en la sensibilidad de las neuronas espinales por XE-991.

En primer lugar, ya que no todas las neuronas dorsales presentan la misma variedad de corrientes iónicas (véase Murase y Randic, 1983; Huang, 1987) cabe la posibilidad de que, en una proporción de las neuronas dorsales estudiadas, la influencia de esta corriente sobre la excitabilidad neuronal sea menor que en el resto. En otras palabras, en algunas neuronas, sobre todo dorsales, puede que existan otras corrientes iónicas que intervengan en mayor medida en el control de la excitabilidad que la corriente M y que por tanto un bloqueo de esta corriente muestre poca influencia sobre el disparo de potenciales de acción. En cambio, la activación de la corriente con retigabine podría otorgar un papel más importante a la corriente M sobre las demás y producir un efecto más obvio sobre la excitabilidad.

En segundo lugar, pueden existir diferencias en la composición de subunidades de los canales que podrían ser determinantes en los efectos observados. Estos canales se forman por asociaciones homo o heteromultiméricas de subunidades KCNQ 2-5 (ver Jentsch, 2000). Aunque no todas las subunidades son capaces de unirse entre sí existen diferentes posibilidades de combinación que darían lugar a canales estructuralmente diferentes. Hay que tener en cuenta que dependiendo de la configuración de subunidades que contenga cada canal el funcionamiento puede ser distinto, además, las sensibilidades a diferentes compuestos podrían variar. De hecho, XE-991 no tiene la misma afinidad por todas las subunidades KCNQ (para una revisión véase Robbins, 2001), y esta menor respuesta de algunas neuronas dorsales y la falta de respuesta en otras podría indicar que la composición de los canales no es la misma entre motoneuronas y neuronas dorsales ni dentro de las propias neuronas dorsales.

Diferencias en la distribución de subunidades KCNQ entre neuronas dorsales y motoneuronas ya se han sugerido en trabajos previos (Dedek y cols, 2001), aunque pruebas más concretas acerca de una expresión diferencial de subunidades no se han realizado aun en la médula espinal.

Además en un reciente trabajo de Romero y cols. (2004) se muestra un efecto muy ligero tanto de XE-991 como de linopirdine sobre la excitabilidad de neuronas de

ganglio simpático de ratón. Los autores observaron una ligera despolarización, pero no encontraron efecto sobre la adaptación en el disparo. Estos datos pueden sugerir que los bloqueadores XE-991 y linopirdine no son capaces de bloquear las corrientes tipo M presentes en los distintos tipos neuronales al potencial de reposo.

Por último, existen posibilidades de bloqueo intracelular de los canales KCNQ por diferentes ligandos (Brown y Yu, 2000). Esta inactivación de los canales por receptores de membrana podría ser un suceso diferencial entre el asta dorsal y ventral de la médula espinal, pudiéndose dar el caso de que el bloqueo tuviera lugar sobre todo en neuronas dorsales. Hay que tener en cuenta que una inactivación de los canales dejaría poco margen de actuación a los bloqueadores de la corriente M y, por tanto, podría explicar también la falta de efecto observada.

Otra observación importante que se obtiene del presente trabajo está relacionada con la reversibilidad de los efectos de los moduladores. XE-991 se ha mostrado capaz de revertir los efectos de retigabine sobre la excitabilidad de neuronas de todos los tipos. En cambio el aumento en la excitabilidad neuronal producido por XE-991 solo era revertido parcialmente por retigabine.

Durante la realización de estos experimentos de registro intracelular, varios grupos descubrieron el lugar de unión de retigabine a las subunidades KCNQ que son sensibles a este compuesto (Wuttke y cols, 2005; Schenzer y cols, 2005), es decir todas menos la subunidad KCNQ 1. Utilizando proteínas quiméricas entre las subunidades sensibles y la subunidad 1 encontraron que la sensibilidad a retigabine viene determinada principalmente por un residuo de triptófano presente en la región de la proteína que forma el poro. Sin embargo, el lugar de unión de XE-991 a las subunidades KCNQ no se ha descubierto hasta la fecha.

Una posible explicación para las diferencias en la reversibilidad podría ser que XE-991 actúe como bloqueador uniéndose a una región del canal diferente de la que se une retigabine. Retigabine aumenta la probabilidad de apertura de los canales favoreciendo la forma abierta del canal (Tatulian y Brown, 2003), pero aquellos canales que se encuentren cerrados tras la aplicación de XE-991 permanecerán cerrados aun tras la aplicación de retigabine. En cambio, aunque retigabine favorezca la apertura de los canales la aplicación posterior del bloqueador tendría un efecto predominante sobre la corriente M.

Los resultados obtenidos con estos registros intracelulares también nos ayudan a comprender mejor los datos obtenidos de los experimentos de reflejos espinales. Como se ha mostrado en el capítulo anterior, los efectos de retigabine sobre los reflejos espinales fueron muy homogéneos, sin embargo los efectos de XE-991 no fueron equivalentes en el disparo de potenciales de acción y en el área despolarizada en respuesta a la activación sináptica de motoneuronas.

Por un lado hemos observado que retigabine produce efectos de similar potencia en neuronas dorsales y en motoneuronas. Por tanto los efectos de retigabine sobre los reflejos espinales se deben a un efecto acumulado sobre las neuronas dorsales y sobre las propias motoneuronas, observándose un efecto depresor muy grande sobre los reflejos espinales puesto que está reducida tanto la entrada sináptica a motoneuronas como su propia excitabilidad.

En cambio el efecto de XE-991 sobre las neuronas dorsales es menor y no ocurre en todos los casos estudiados, por tanto la entrada sináptica a las motoneuronas no sufre grandes aumentos y el efecto sobre el área despolarizada es de poca magnitud. Pero como las motoneuronas sí son muy sensibles a XE-991 el disparo de potenciales de acción presenta grandes aumentos tras la aplicación de XE-991.

En este capítulo hemos mostrado la expresión de corrientes M funcionales en las propias neuronas espinales, tanto en áreas sensoriales como motoras. Sin embargo existen diferencias en la sensibilidad de neuronas sensoriales y motoras por el modulador XE-991. Estas diferencias podrían indicar variaciones de los canales dependiendo del tipo neuronal de que se trate. Estas variaciones podrían deberse a (1) diferencias en la composición de subunidades de los canales, (2) diferencias en la modulación de los canales o (3) diferencias en la relevancia de estas corrientes sobre el control de la excitabilidad. La confirmación de estas variaciones en los canales podría abrir nuevos caminos para diseñar moduladores de la corriente M capaces de actuar sobre neuronas dorsales posiblemente sin alterar la actividad motora.

CAPÍTULO 3

EFFECTOS DE LOS MODULADORES DE LA CORRIENTE M SOBRE LAS TERMINALES DE LAS AFERENTES PRIMARIAS

INTRODUCCIÓN

En el primer capítulo hemos mostrado que los moduladores de la corriente M son capaces de alterar los reflejos espinales.

En el segundo capítulo comprobamos que los moduladores de la corriente M actúan a través de canales KCNQ presentes en las propias neuronas espinales regulando su frecuencia de disparo, lo que se refleja en la alteración de los reflejos espinales en conjunto.

Sin embargo, aun no habíamos comprobado si el total de los efectos de los moduladores se debe a la presencia de los canales en las propias neuronas espinales.

En este capítulo estudiamos la posible implicación de las aferentes primarias en los efectos producidos por los moduladores de la corriente M sobre los reflejos y sobre las respuestas sinápticas de las neuronas espinales, ya que la presencia de canales KCNQ en las aferentes primarias podría condicionar la entrada sináptica a la médula espinal, contribuyendo a los efectos de los moduladores observados en las respuestas neuronales tras la estimulación de la raíz dorsal.

La presencia de corrientes M funcionales y la expresión de subunidades KCNQ se ha demostrado en neuronas de ganglio de la raíz dorsal en cultivo (Passmore y cols, 2003). Además, se ha mostrado la presencia de estas subunidades en los nodos de Ranvier y en los segmentos iniciales de axones de neuronas del sistema nervioso central y periférico (Devaux y cols, 2004). Recientemente se ha indicado que los canales KCNQ presentes en los nodos de Ranvier son los responsables de la corriente lenta de potasio I_{Ks} (Schwarz y cols, 2006).

Por otro lado existen trabajos que indican que los canales KCNQ pueden localizarse en las terminales presinápticas donde pueden regular la liberación de neurotransmisores condicionando las respuestas postsinápticas. Se ha demostrado que XE-991 es capaz de aumentar la liberación de neurotransmisores en rodajas de cerebro *in vitro* (Zaczek y cols, 1998), y que canales M compuestos por la subunidad KCNQ 2 modulan la liberación de neurotransmisores de terminales nerviosas de hipocampo (Martire y cols, 2004).

El objetivo de los experimentos de este capítulo era estudiar los efectos de los moduladores de la corriente M sobre las terminales de las aferentes primarias y sobre

el circuito sináptico implicado en la generación de los potenciales y los reflejos de la raíz dorsal.

Los reflejos de la raíz dorsal consisten en potenciales antidrómicos originados por interacciones entre fibras aferentes primarias dentro de la médula espinal. Estos reflejos se producen en fibras aferentes de todo tipo. Los producidos en las fibras no nociceptivas pueden estar relacionados con la locomoción (Rossignol y cols, 1998), mientras que los producidos en fibras nociceptivas se encargan del mantenimiento de la inflamación periférica (Willis, 1999). La implicación de los reflejos de la raíz dorsal en la inflamación se ha comprobado en animales inyectando sustancias que activan las terminales nerviosas nociceptivas periféricas (Rees y cols, 1994; Lin y cols, 1999). La inflamación que se produce por la activación de aferentes nociceptivas se denomina inflamación neurogénica y se consigue por la liberación de mediadores inflamatorios mediante (1) los reflejos axónicos que se producen a través de ramas colaterales de las fibras aferentes nociceptivas al ser activadas y (2) mediante un mecanismo central como son los reflejos de la raíz dorsal.

Los potenciales y los reflejos de la raíz dorsal se producen por un circuito común que es sensible al bloqueo de receptores GABA-A, no-NMDA y también de tipo NMDA (Evans y Long, 1989; Rees y cols, 1995; Lin y cols, 1999). Se piensa que el paso desde la despolarización que produce los potenciales de la raíz dorsal al disparo de potenciales antidrómicos se debe a un aumento en la liberación de GABA de las interneuronas o a una regulación positiva del cotransportador de Na-K-Cl (Willis, 1999).

También se ha propuesto que este mismo circuito espinal puede estar relacionado con la alodinia mecánica y la hiperalgesia secundaria que se produce tras lesiones periféricas (Cervero y Laird, 1996). Estos autores proponen que la alteración del circuito implicado en la interacción de fibras aferentes no nociceptivas con fibras aferentes nociceptivas podría explicar las sensaciones dolorosas que se producen por estímulos no nocivos en situaciones de daño tisular. El daño tisular produciría un aumento de la excitabilidad general de la médula espinal que podría sensibilizar las interneuronas responsables de este circuito provocando el disparo de potenciales de acción en las aferentes finas en respuesta a la estimulación de fibras no nociceptivas. La generación de potenciales de acción en las aferentes finas produciría descargas antidrómicas que, a su vez, producirían sensibilización periférica (hiperalgesia

secundaria), pero también produciría descargas ortodrómicas que serían responsables de la alodinia.

Para obtener los resultados que se presentan en este capítulo en primer lugar realizamos una serie de experimentos encaminados a caracterizar las respuestas producidas tras la activación de este circuito en nuestra preparación. Una vez caracterizadas las respuestas de la raíz dorsal realizamos los experimentos con los moduladores de la corriente M.

MÉTODOS

Diseño de los experimentos

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos utilizando registros extracelulares de una raíz dorsal en reposo o en respuesta a la estimulación eléctrica de la raíz dorsal adyacente. Las características del registro se detallan en la sección de métodos generales (registro de la raíz dorsal, pag 72). La estimulación eléctrica se realizaba mediante electrodos de succión de vidrio acoplados a la raíz dorsal, las condiciones de estimulación se detallan en la sección de métodos generales (estimulación eléctrica de la raíz dorsal, pag 65).

Se realizaron dos tipos principales de experimentos, (1) en primer lugar se hizo una serie de experimentos encaminados a caracterizar las respuestas de la raíz dorsal y (2) posteriormente se realizaron los experimentos con los moduladores de la corriente M retigabine y XE-991.

Caracterización de las respuestas de la raíz dorsal

En esta primera serie de experimentos se utilizaron varios tipos de aproximaciones experimentales para caracterizar cada uno de los componentes de las respuestas de la raíz dorsal frente a la estimulación eléctrica de la raíz dorsal adyacente:

Utilización de diferentes intensidades de estimulación

Las fibras aferentes primarias requieren de intensidades de estimulación diferentes para su activación dependiendo de su calibre. Las fibras mielinizadas más

gruesas son las que se activan con intensidades de estimulación más bajas, mientras que la activación de las fibras finas no mielinizadas requiere de estímulos mayores.

En estos experimentos se calculaba el umbral y posteriormente se aplicaba una serie de estímulos de intensidad creciente tomada como número de veces el umbral. De este modo podíamos establecer una relación entre la intensidad de los estímulos sobre una raíz dorsal y la aparición de cada uno de los componentes de la respuesta registrada de la raíz dorsal adyacente. Después, analizando cada parámetro de la respuesta por separado, pudimos comprobar que tipos de fibras contribuían mayoritariamente a desencadenar cada componente de la respuesta y relacionarlo con los efectos de los moduladores de la corriente M.

Cambios en la distancia del registro

En otra serie de experimentos lo que nos interesaba era conocer el tipo de fibras en las que se producían los diferentes componentes de la respuesta. Para ello, realizábamos el registro de la raíz dorsal en dos posiciones, una más próxima y otra más distal a la médula espinal, incrementando el espacio de conducción, tratando de observar diferencias en la latencia de los distintos componentes. Estas diferencias en la latencia nos servirían para calcular las velocidades de conducción de las fibras que originan cada componente y así poder identificarlas.

Esta aproximación resultó útil únicamente en el caso de los picos, producidos por el disparo de potenciales de acción antidrómicos, debido a que las ondas lentas, producidas por la despolarización subumbral, se reducen e incluso desaparecen al separar el registro de la médula espinal.

Con la médula espinal preparada para el registro y estimulación de las raíces dorsales se aplicaban estímulos de la intensidad más alta (200 μ s; 300 μ A). Tras una serie de repeticiones se promediaban las respuestas y se medían latencias de cada uno de los picos. Posteriormente con la aplicación de presión positiva a través del electrodo de registro se producía una extrusión de la raíz y se aumentaba la distancia de registro (entre 3 y 5 mm respecto a la primera posición). Después se repetían los estímulos midiendo de nuevo las latencias de los picos. Finalmente, con la medida de la distancia que se había desplazado el electrodo, se podían calcular las velocidades de conducción medias de cada pico, lo que nos proporcionaba información del tipo de

fibras que producían cada uno de ellos. Las velocidades de conducción se calcularon utilizando la siguiente formula:

$$\text{Velocidad de conducción} = \text{incremento distancia} / \text{incremento latencia}$$

Registro tras la eliminación de las láminas profundas

Con el procedimiento anterior solo se pudo comprobar que los primeros picos se debían a la intervención de fibras gruesas. Para estudiar la intervención de fibras finas se realizaron registros en los que únicamente se mantenían las láminas superficiales del asta dorsal. Para ello se seccionaban longitudinalmente de forma manual las láminas profundas con ayuda de una cuchilla. La observación al microscopio de los fragmentos cortados indicó que los cortes se realizaban aproximadamente entre las láminas II y IV.

En estos experimentos, tras la colocación de los electrodos, se realizaron una serie de estímulos previos a la sección de la médula, y tras la sección se repetían después de un largo periodo de estabilización (aproximadamente 1 hora). Durante la realización del corte se separaron ligeramente los electrodos para evitar dañar la médula espinal y las propias raíces.

Caracterización farmacológica de las respuestas

Para la caracterización farmacológica de la respuesta se utilizaron agonistas y antagonistas de los principales sistemas de neurotransmisores excitadores e inhibidores que se creen implicados en estos circuitos como son glutamato y GABA.

Los compuestos se aplicaban sobre toda la médula espinal preferentemente en preparaciones frescas, aunque en algunos casos tras la aplicación de un primer compuesto se realizaba la aplicación conjunta con otro compuesto al mismo tiempo, pero en ningún caso se utilizaban más de 2 compuestos diferentes por preparación.

Cada compuesto se aplicaba a una concentración diferente y durante intervalos de tiempo distintos para conseguir un efecto completo.

Los compuestos utilizados eran:

- (1) El antagonista de receptores GABA-A, picrotoxina (PTX, obtenido de Sigma), aplicado a 20 μ M durante 15 minutos.
- (2) El antagonista de receptores de glutamato de tipo no NMDA, CNQX (de RBI), aplicado a 10 μ M 30 minutos.

- (3) El antagonista de receptores de glutamato de tipo NMDA, dAP5 (de RBI), aplicado a 50 μ M 30 minutos.
- (4) El antagonista de receptores de kainato, UBP296 (de Tocris), aplicado a concentraciones desde 10 μ M hasta 100 μ M durante 30 minutos.
- (5) El agonista de receptores de kainato, SYM2081 (de Tocris), aplicado a concentraciones desde 1 μ M hasta 10 μ M durante 30 minutos.

El experimento típico en estos casos constaba de estímulos de baja (2T) y de alta intensidad (200 μ s; 300 μ A) que se aplicaban principalmente en control y en el punto de máximo efecto de cada compuesto. Además los estímulos de baja intensidad se aplicaban cada 4 minutos para ir testando el efecto durante la perfusión con los compuestos.

En una serie de experimentos se aplicó GABA 10-50 μ M (de RBI) para comprobar la capacidad de despolarización de las terminales de las aferentes primarias.

Efectos de los moduladores de la corriente M

Los experimentos realizados se pueden dividir en 3 tipos basándose en el protocolo utilizado para la aplicación de los moduladores:

Experimentos de aplicación directa de los moduladores

En los primeros experimentos era interesante caracterizar los efectos de los moduladores sobre nuestra preparación, para ello los moduladores se aplicaban a 10 μ M durante 18 minutos sobre una preparación fresca. En estos experimentos se utilizaban estímulos individuales de baja y de alta intensidad sobre la raíz dorsal. Tras obtener unas respuestas estables en control se aplicaba alguno de los moduladores. Los estímulos se repetían al final de la aplicación de las drogas, a los 5 minutos de retirar el compuesto y después a los 25 minutos. En los casos en que se realizaron lavados sucesivos los estímulos se aplicaban a intervalos de 25 minutos. En estos experimentos se analizaron los distintos parámetros de la respuesta a la estimulación de la raíz dorsal, así como los umbrales, el potencial basal y la actividad espontánea.

Experimentos de reversión

La reversión se realizó aprovechando los experimentos de aplicación directa mediante la perfusión con el segundo modulador después de unos 35 minutos de lavado del primer compuesto. La estimulación y el análisis fue el mismo que se ha mencionado para la aplicación directa.

Experimentos de prevención de los efectos de retigabine

Los experimentos de prevención se realizaron para comprobar que la hiperpolarización de las aferentes primarias por retigabine se producía actuando sobre canales KCNQ presentes en las propias aferentes, y que no se debía a una interacción con receptores GABA-A ni era un efecto mediado por contactos sinápticos. Los bloqueantes XE-991 10 μ M, PTX 20 μ M o TTX 0.5 μ M se comenzaban a aplicar 30 minutos antes de la aplicación de retigabine 10 μ M. En este caso el objetivo era prevenir el efecto de retigabine sobre el potencial basal, aunque en los casos de prevención con PTX y con XE-991 también se analizaron las respuestas frente a la estimulación de la raíz dorsal. En los experimentos de prevención con XE-991 también se analizaron los efectos de retigabine sobre la actividad espontánea.

VARIABLES ANALIZADAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

En estos experimentos se realizó un análisis de las respuestas basales de la raíz dorsal, presentes en ausencia de estimulación, y de las respuestas producidas por la estimulación eléctrica de la raíz dorsal adyacente.

El análisis de las respuestas basales se realizó sobre todo para estudiar los efectos de los moduladores de la corriente M sobre el potencial basal y sobre la actividad espontánea. Los efectos de los moduladores sobre el potencial basal se midieron como diferencias respecto al control, la actividad espontánea se estudió en términos de frecuencia y amplitud de la despolarización en modo DC y como área integrada de los reflejos de la raíz dorsal en modo AC.

Como se ha indicado en la sección de métodos generales (registros de la raíz dorsal, pag 72), la respuesta de la raíz dorsal producida por la estimulación eléctrica de la raíz dorsal adyacente presenta un patrón característico que en modo DC consiste en dos picos rápidos seguidos de una onda de despolarización lenta que termina formando una cola que puede durar varios segundos. La amplitud del primero

de los picos se ha utilizado como medida de los componentes rápidos de la respuesta. Para cuantificar los componentes lento y muy lento de la respuesta se han utilizado el área integrada hasta 1 s y el área integrada entre 1 y 5 s desde el artefacto del estímulo, respectivamente. Además en modo AC aparecen reflejos de la raíz dorsal a latencias cortas. Estos reflejos se han cuantificado como área integrada de la respuesta.

Todos los análisis estadísticos se han realizado con los datos reales utilizando el programa Prism 3.0 (GraphPad Software, USA). En todos los casos las medias se han comparado con test no paramétricos pareados (Wilcoxon) o no pareados (Mann-Whitney) según fuese lo más apropiado. Los resultados están expresados como porcentaje de control \pm EEM o como media \pm EEM.

RESULTADOS

Características basales de los registros de la raíz dorsal

Los registros de la raíz dorsal consisten en una línea base que es el reflejo del potencial de membrana de las aferentes primarias que constituyen la propia raíz dorsal. La línea base se mantenía relativamente estable a lo largo de los experimentos, con una deriva inferior a 60 μ V por minuto.

Sobre esta línea base se producían potenciales espontáneos de raíz dorsal, que consistían en despolarizaciones transitorias observadas en modo DC. Esta actividad espontánea tenía unos valores medios de amplitud y duración de 0.34 ± 0.04 mV y 0.65 ± 0.01 s, respectivamente. Habitualmente estas despolarizaciones estaban acompañadas de disparo de potenciales de acción compuestos, que se registraban de forma antidrómica como reflejos de la raíz dorsal (RRD) en modo AC. El valor medio de área integrada para los RRD fue de 0.34 ± 0.05 μ V*s.

Efectos de los moduladores de la corriente M sobre el potencial basal

La aplicación de retigabine 10 μ M durante 18 minutos sobre 6 preparaciones produjo en todos los casos una hiperpolarización que empezaba alrededor de los 3 minutos del comienzo de la aplicación, encontrándose el máximo efecto al final de la aplicación (fig 5.1 A y B). La línea base se iba recuperando lentamente tras retirar el compuesto del liquido de perfusión, aunque la recuperación completa se conseguía

tras aproximadamente 60 minutos de lavado. La hiperpolarización producida tuvo un valor promedio de 1.9 ± 0.4 mV, con un rango entre 0.71 mV y 2.86 mV.

La aplicación de XE-991 en las mismas condiciones que retigabine no produjo ningún efecto cuantificable sobre el potencial basal (no mostrado). Es posible que efectos de pequeña magnitud sobre el potencial basal pasaran inadvertidos debido a la deriva de la señal. Para ver si esta falta de efecto se debía a un artefacto producido por nuestro sistema de registro en 2 preparaciones se utilizó GABA para comprobar la capacidad de las aferentes primarias para despolarizarse. GABA se aplicaba durante cortos periodos de tiempo (4-5 minutos) a concentraciones de 10 y 50 μ M y se consiguieron despolarizaciones de hasta 2 mV.

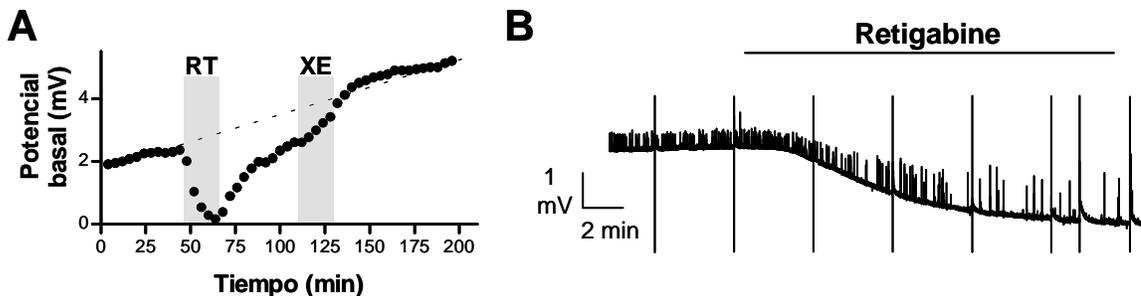


Figura 5.1. Efectos de retigabine sobre el potencial basal de la raíz dorsal. En **A** se muestra una reconstrucción de la evolución temporal del potencial basal en un experimento de reversión. Retigabine 10 μ M primero y XE-991 10 μ M en segundo lugar fueron aplicados durante 18 minutos (indicado por las zonas sombreadas). La línea discontinua trata de reflejar una estimación de la evolución esperada del potencial basal sin la aplicación de los compuestos. Las medidas de potencial basal están tomadas cada 4 minutos. En **B** se muestra un registro original de un experimento en el que se aplicó retigabine 10 μ M durante 18 minutos (indicado por la línea sobre el registro). Las líneas verticales grandes a intervalos regulares se corresponden con artefactos de estímulo, las líneas pequeñas con un patrón irregular se corresponden con la actividad espontánea. Nótese el aumento en amplitud y la reducción en la frecuencia de la actividad espontánea producidos por retigabine.

Con la aplicación de XE-991 tras 30 minutos de lavado de retigabine en algunos casos sí se observó un efecto despolarizante más claro (fig 5.1 A).

En 4 casos se perfundió continuamente con XE-991 previamente a la aplicación de retigabine (fig 5.2 A). En estas condiciones la aplicación de retigabine tuvo un efecto prácticamente nulo sobre el potencial basal (hiperpolarización media de 0.14 ± 0.08 mV; $n = 4$; $p < 0.05$).

Los efectos de retigabine sobre la línea base también se estudiaron tras el bloqueo continuo de la transmisión sináptica con tetrodotoxina (TTX 0.5 μ M) y de

receptores GABA-A con picrotoxina (PTX 20 μ M). En presencia de TTX ($n = 3$) retigabine siguió produciendo una fuerte hiperpolarización de 1.04 ± 0.25 mV con un rango entre 0.77 mV y 1.54 mV (fig 5.2 B). Con PTX ($n = 4$) el efecto fue similar con un valor promedio de 1.05 ± 0.21 mV y un rango entre 0.59 mV y 1.62 mV (fig 5.2 C). Tanto PTX como TTX inhibieron completamente la actividad espontánea. TTX además abolió la actividad inducida por la estimulación eléctrica de la raíz dorsal.

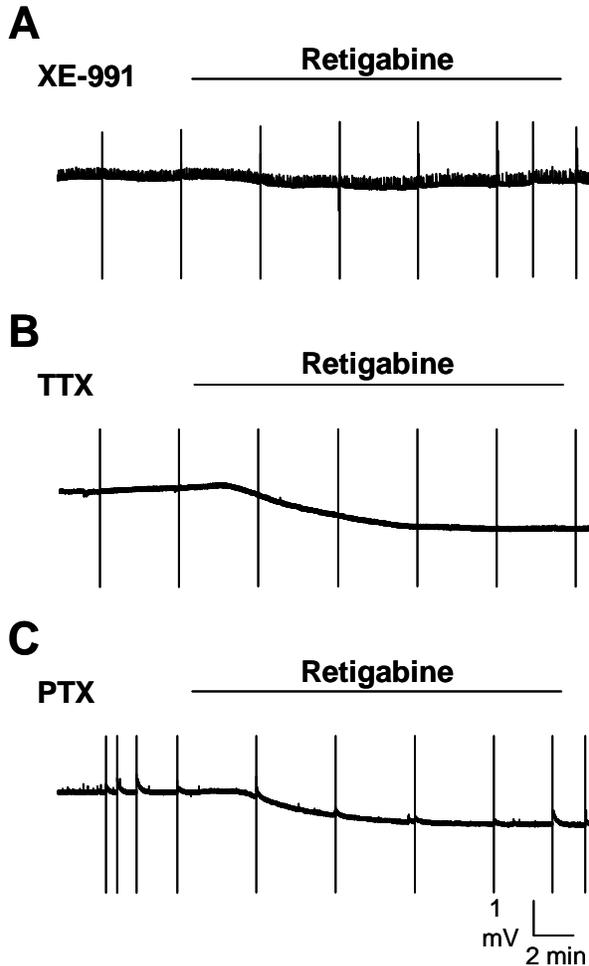


Figura 5.2. Prevención de los efectos de retigabine sobre el potencial basal de la raíz dorsal. Los efectos de retigabine sobre el potencial basal se estudiaron en presencia de los bloqueadores XE-991 (10 μ M), tetrodotoxina (TTX, 0.5 μ M) y picrotoxina (PTX, 20 μ M). Para lograr un efecto de bloqueo completo, la perfusión con los bloqueadores se inició con una antelación de 30 minutos sobre la aplicación de retigabine y se mantuvo hasta el final del experimento. Retigabine 10 μ M se aplicó conjuntamente con los bloqueadores durante 18 minutos (indicado por la línea horizontal situada encima de los registros). Las líneas verticales grandes sobre los registros se deben a los artefactos de los estímulos. El mayor grosor de la línea base que se observa en **A** se debe a la actividad espontánea. La aplicación de los bloqueadores TTX (**B**) y PTX (**C**) abolió la actividad espontánea por completo. TTX además produjo un bloqueo total de la actividad espontánea. Nótese como la aplicación de XE-991 impide los efectos de retigabine sobre el potencial basal y sobre la actividad espontánea mostrados en la figura anterior.

Efectos de los moduladores de la corriente M sobre la actividad espontánea

Retigabine 10 μ M produjo un aumento de la amplitud y una reducción de la frecuencia de la actividad espontánea en los 6 casos que se estudió. La amplitud aumentó de 0.34 ± 0.08 mV a 0.82 ± 0.18 mV y la frecuencia se redujo de 13 ± 1 eventos/min a 6 ± 1 eventos/min ($p < 0.05$ en ambas variables; fig 5.3). Además se observó un incremento de los reflejos de la raíz dorsal medidos como área integrada

en el modo AC, pasando de $0.35 \pm 0.08 \mu\text{V}\cdot\text{s}$ a $0.86 \pm 0.19 \mu\text{V}\cdot\text{s}$ ($p < 0.05$; $n = 5$). Los efectos sobre la actividad espontánea fueron de larga duración, manteniéndose al menos durante 60 minutos de lavado.

La reversión con XE-991 en 5 experimentos devolvió los valores de los tres parámetros a la situación de control (fig 5.3). Igualmente el bloqueo previo con XE-991 previno los efectos de retigabine sobre la actividad espontánea ($n = 4$; fig 5.2 A).

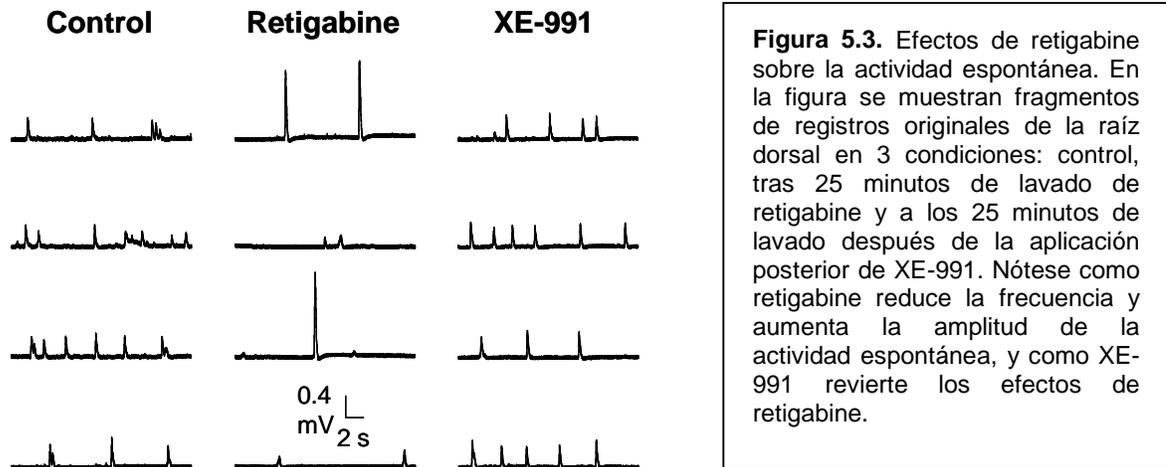


Figura 5.3. Efectos de retigabine sobre la actividad espontánea. En la figura se muestran fragmentos de registros originales de la raíz dorsal en 3 condiciones: control, tras 25 minutos de lavado de retigabine y a los 25 minutos de lavado después de la aplicación posterior de XE-991. Nótese como retigabine reduce la frecuencia y aumenta la amplitud de la actividad espontánea, y como XE-991 revierte los efectos de retigabine.

La perfusión con XE-991 $10 \mu\text{M}$ produjo el efecto contrario a retigabine sobre la amplitud de la actividad espontánea (de $0.34 \pm 0.04 \text{ mV}$ a $0.23 \pm 0.03 \text{ mV}$; $p < 0.05$; $n = 6$) y sobre los reflejos de la raíz dorsal (de $0.32 \pm 0.05 \mu\text{V}\cdot\text{s}$ a $0.27 \pm 0.04 \mu\text{V}\cdot\text{s}$; $p < 0.05$; $n = 5$). Sin embargo la frecuencia de la actividad espontánea no sufrió ninguna variación significativa (de 16 ± 1.9 a 13 ± 1.5 eventos/min; $n = 6$; no mostrado).

Caracterización fisiológica de las respuestas de la raíz dorsal

La respuesta registrada de una raíz dorsal tras la estimulación eléctrica de la raíz dorsal adyacente presentaba en todos los casos un patrón característico. Esta respuesta consistía en primer lugar en dos picos rápidos con una latencia de entre 10 y 30 ms desde el estímulo (fig 5.4). Tras los picos rápidos se originaba una onda lenta con una duración aproximada de 1 s que tenía su máxima amplitud entre 70 y 140 ms. A partir de esta onda lenta se originaba una onda muy lenta de menor amplitud que duraba alrededor de 10 s (fig 5.5 A). En modo AC se observaban eventos rápidos en

forma de potenciales de acción compuestos que se relacionaban con reflejos de raíz dorsal, estos reflejos aparecían a latencias entre 8 y 80 ms (fig 5.4).

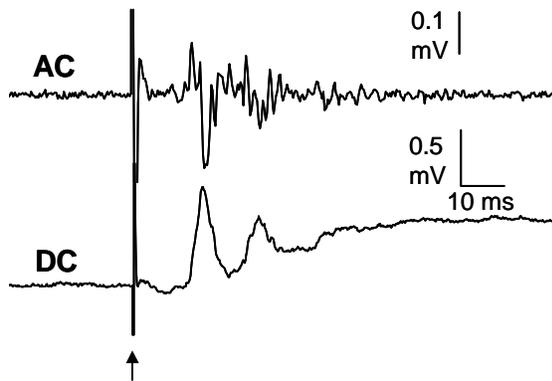


Figura 5.4. Características de las respuestas de una raíz dorsal frente a la estimulación eléctrica de la raíz dorsal adyacente. En la figura se muestran los primeros milisegundos de la respuesta de una raíz dorsal frente a un estímulo de una intensidad de 3 veces el umbral (3T) sobre la raíz dorsal adyacente. En los registros simultáneos AC y DC se pueden observar los reflejos de la raíz dorsal y los dos picos de corta latencia, respectivamente. La flecha indica el artefacto del estímulo.

La utilización de diferentes intensidades de estímulo nos permitió estudiar qué componentes de la respuesta se originaban por la estimulación eléctrica de los distintos tipos de fibras presentes en la raíz dorsal. Cada uno de los componentes de la respuesta se analizaron por separado en relación con la intensidad de estímulo utilizada (fig 5.5 B). La amplitud del pico rápido se desarrollaba completamente a intensidades de estimulación de 3 veces el umbral (3T), mientras que la onda muy lenta lograba sus valores máximos a intensidades de estimulación de 20-30 T. La onda lenta por su parte alcanzaba el máximo a la intensidad de 10 T.

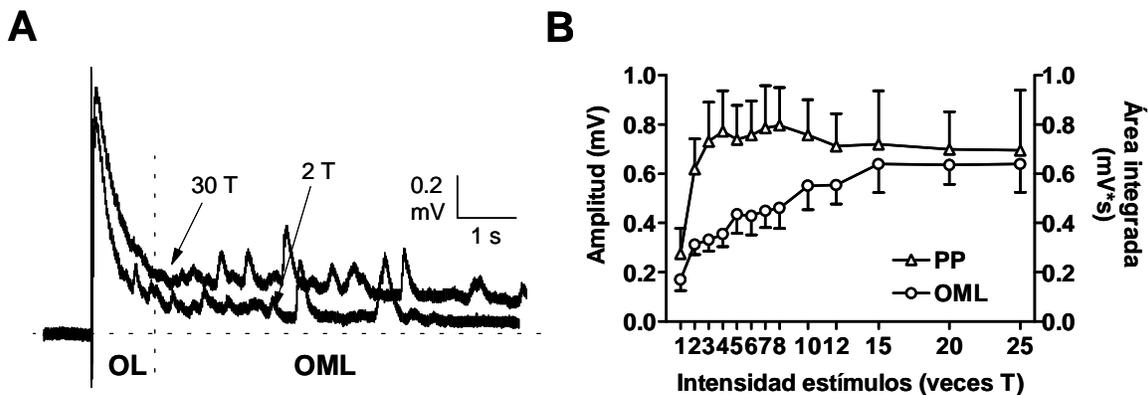


Figura 5.5. Dependencia de la intensidad del estímulo eléctrico de las respuestas de la raíz dorsal. En **A** se muestran superpuestas dos respuestas de la raíz dorsal frente a estímulos de diferente intensidad (2T y 30T). Nótese el gran aumento producido sobre la onda muy lenta (OML) y el aumento de menor magnitud sobre la onda lenta (OL). En **B** se muestra como varían en magnitud el componente rápido (primer pico, PP) y el más lento (onda muy lenta, OML) dependiendo de la intensidad de estimulación utilizada. La amplitud del primer pico alcanza valores próximos al máximo a la intensidad de 3T, mientras que el área integrada de la onda muy lenta necesita una intensidad entre 15-20T para desarrollarse completamente. Los valores que se presentan son un promedio de 7 experimentos.

Los potenciales de acción o reflejos de la raíz dorsal alcanzaban prácticamente en su valor máximo a intensidades de estimulación bajas, siendo el área integrada de la respuesta de $1.25 \pm 0.13 \mu\text{V}\cdot\text{s}$ para 2T y de $1.49 \pm 0.16 \mu\text{V}\cdot\text{s}$ para 20 T.

Con la aplicación de una pequeña presión positiva a través del electrodo de registro se sacaba ligeramente la raíz dorsal fuera del electrodo aumentando la distancia de conducción que tienen que recorrer las fibras registradas. Con esta estrategia se observó un retraso diferente para cada uno de los picos. Estas diferencias en la latencia nos indicaron que cada uno de los picos era producido en fibras con velocidades de conducción diferentes (ver ejemplo en la fig 5.6). Las velocidades de conducción estimadas en los 5 experimentos realizados fueron de $4.8 \pm 0.7 \text{ m/s}$ para el primer pico y $2.5 \pm 0.4 \text{ m/s}$ para el segundo ($p < 0.05$).

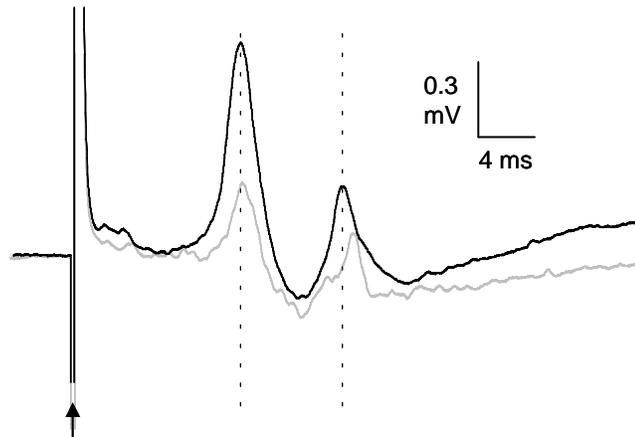


Figura 5.6. Velocidades de conducción de las fibras de la raíz dorsal que producen los picos rápidos. En la imagen se muestran los primeros milisegundos de la respuesta de una raíz dorsal a la estimulación de alta intensidad de la raíz dorsal adyacente ($200 \mu\text{s}$; $300 \mu\text{A}$). Cada uno de los trazos es el promedio de al menos 5 estímulos consecutivos. En negro se muestra la respuesta registrada con el electrodo introducido en la raíz dorsal hasta 1.8 mm de la médula y en gris la respuesta retirando el electrodo de registro 2.5 mm desde la posición anterior. Con esta maniobra se consigue aumentar la distancia de registro, lo que produce un retraso en la aparición de los picos. Las diferencias en las latencias de los picos entre una posición y otra se han utilizado para calcular las velocidades de conducción medias de las fibras que originan los picos. Los valores en este experimento fueron de 5.7 m/s para el primero y de 2.0 m/s para el segundo pico. La flecha indica el artefacto del estímulo

Por medio de una sección longitudinal de la médula espinal se aislaron las láminas más superficiales del asta dorsal junto con las raíces dorsales. En los 4 experimentos en que se llevo a cabo este tratamiento se produjo una eliminación prácticamente completa de los picos rápidos y se redujo la amplitud de la onda lenta (fig 5.7). En cambio, el efecto sobre la onda muy lenta fue de poca consideración.

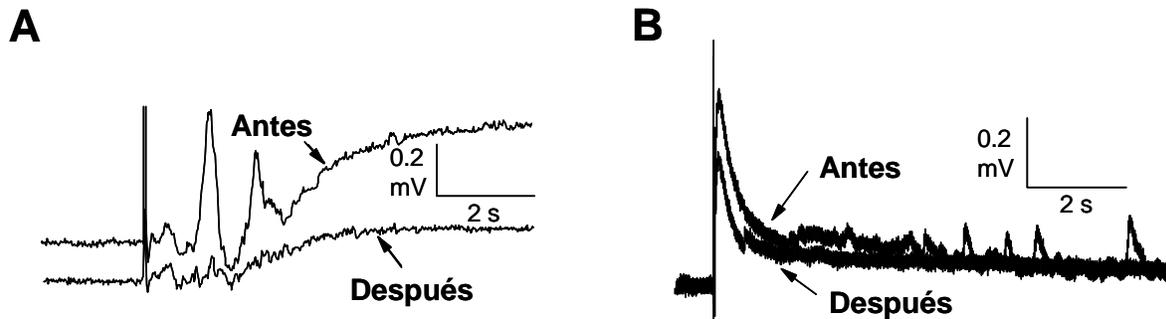


Figura 5.7. Efectos del aislamiento de las láminas superficiales sobre las respuestas de la raíz dorsal. En la figura se muestran las diferencias producidas en las respuestas de una raíz dorsal frente a la estimulación de alta intensidad de la raíz dorsal adyacente después de seccionar completamente el asta dorsal de la médula espinal, aislando únicamente las láminas superficiales. Nótese la abolición total de los picos (A) mientras que la onda muy lenta no sufre grandes cambios (B). La onda lenta también se redujo parcialmente.

Caracterización farmacológica de las respuestas de la raíz dorsal

Para realizar una caracterización farmacológica de las respuestas se utilizaron agonistas y antagonistas de los receptores de los principales grupos de neurotransmisores.

La aplicación de CNQX 10 μ M ($n = 5$) eliminó la actividad espontánea y los componentes rápidos de la respuesta, tanto los picos como los reflejos de la raíz dorsal (fig 5.8 A y B). Además redujo las ondas lenta y muy lenta frente a estímulos de 20-30 T.

dAP5 50 μ M ($n = 5$) produjo únicamente una reducción parcial de las ondas lenta y muy lenta sin afectar a los componentes rápidos (fig 5.8 B).

La aplicación conjunta de dAP5 y CNQX ($n = 4$) eliminó por completo las respuestas frente a estímulos de 2T y redujo en gran medida las respuestas frente a estímulos de alta intensidad, permaneciendo únicamente una porción de los componentes lentos (fig 5.8 A).

Las aplicaciones del antagonista (UBP 296) y el agonista (SYM 2081) de receptores de kainato no produjeron ningún efecto sobre las respuestas estudiadas.

Por último se utilizó picrotoxina (PTX, 20 μ M; $n = 5$) para bloquear los receptores tipo A de GABA (fig 5.8 B y C). Este tratamiento causó la eliminación de la actividad espontánea así como de los componentes rápidos de la respuesta (picos y

RRD). La onda muy lenta se incrementó con PTX mientras que la onda lenta no sufrió variaciones.

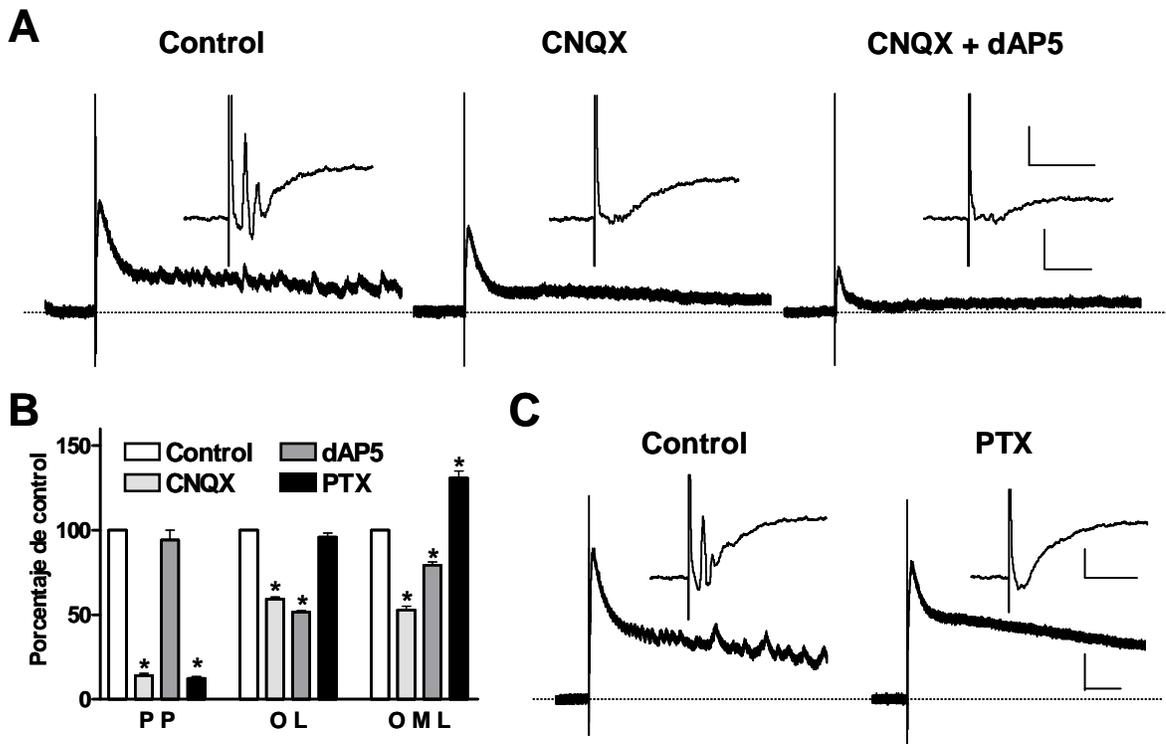


Figura 5.8. Caracterización farmacológica de las respuestas de la raíz dorsal frente a la estimulación de alta intensidad de la raíz dorsal adyacente. En las figuras se muestran registros originales de las respuestas de la raíz dorsal obtenidas en diferentes experimentos, las inserciones muestran los primeros milisegundos de las respuestas. En **A** se muestra el efecto de los bloqueantes de receptores de glutamato CNQX (10 μ M) y dAP5 (50 μ M) sobre los distintos componentes de la respuesta. Nótese el potente efecto de CNQX sobre los picos y la reducción que produce sobre los componentes lentos. La aplicación conjunta con dAP5 produce una reducción casi completa de las respuestas. En **B** se muestra la cuantificación de los efectos de los bloqueantes sobre el primer pico (PP), la onda lenta (OL) y la onda muy lenta (OML). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (* $p < 0.05$; $n = 5$ para todos los compuestos). En **C** se muestran los efectos de picrotoxina (PTX, 20 μ M) sobre las respuestas. PTX produjo una abolición de los picos así como un incremento en el componente más lento. Barras de calibración: 0.2 mV; 1s. Inserciones: 0.4 mV; 50 ms.

Efectos de los moduladores sobre las respuestas de la raíz dorsal a la estimulación de la raíz dorsal adyacente

Retigabine aplicada a 10 μ M produjo un aumento de la intensidad umbral desde $22 \pm 2.5 \mu$ A hasta $31 \pm 2.9 \mu$ A ($p < 0.05$, $n = 5$; fig 5.9). Los efectos sobre el umbral fueron de larga duración, manteniéndose el efecto tras más de 2 horas de lavado. La aplicación de XE-991 10 μ M después de retigabine en 5 experimentos revirtió

parcialmente los efectos producidos por retigabine. En los experimentos de prevención no se realizaron pruebas de umbrales en ningún caso.

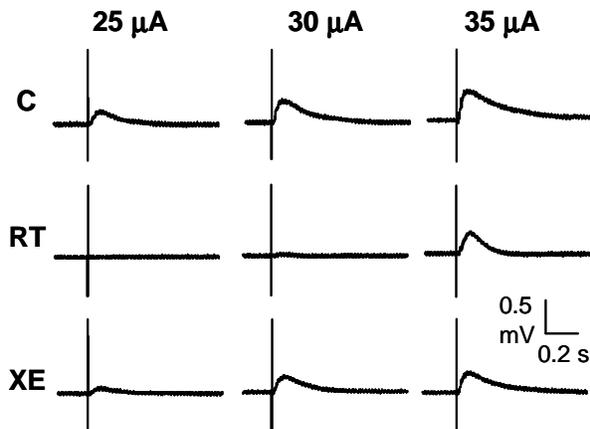


Figura 5.9. Efectos de los moduladores sobre las respuestas de la raíz dorsal frente a estímulos cercanos al umbral. En la figura se muestran registros originales de una raíz dorsal en control (C), tras la aplicación de retigabine (RT, 10 μ M) y después de la aplicación posterior de XE-991 (XE, 10 μ M). Las respuestas se consiguieron estimulando la raíz dorsal adyacente con estímulos de 50 μ s de duración y de la intensidad indicada en la parte superior. Nótese el incremento en la intensidad umbral con retigabine y la reversión parcial producida por XE-991.

XE-991 10 μ M por el contrario no fue capaz de producir ningún efecto claro sobre el umbral por sí mismo (de $22.4 \pm 1.5 \mu$ A a $23 \pm 1.1 \mu$ A; n = 6).

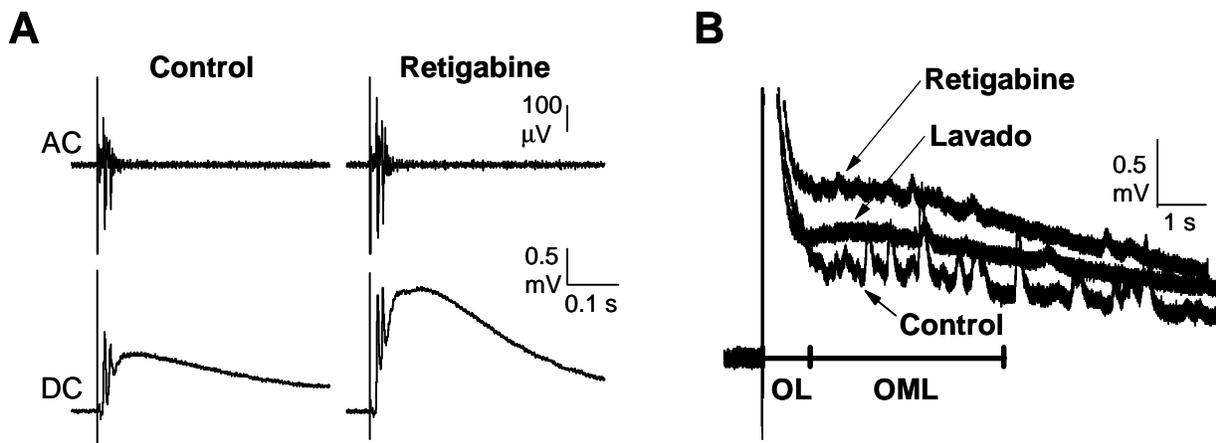


Figura 5.10. Efectos de retigabine sobre las respuestas de una raíz dorsal frente a la estimulación de alta intensidad de la raíz dorsal adyacente. En **A** se muestran los efectos de retigabine 10 μ M sobre los picos rápidos y la onda lenta (modo DC) y sobre los reflejos de la raíz dorsal (modo AC). Los registros fueron obtenidos en control y después de 25 minutos de lavado de retigabine. Nótese el incremento producido sobre los tres componentes. En **B** se muestran los efectos de retigabine sobre la onda muy lenta (OML). En esta figura se puede observar el gran aumento que se produce sobre este componente mientras retigabine aun esta bañando la preparación (retigabine) y como a los 25 minutos de lavado después de retirar retigabine (lavado) el efecto es de menor magnitud.

Todos los componentes de las respuestas de la raíz dorsal inducidas por la estimulación eléctrica de alta intensidad de la raíz dorsal adyacente se incrementaron significativamente con la aplicación de retigabine 10 μ M (fig 5.10 y fig 5.11). Los

efectos sobre los picos y sobre la onda lenta siguieron el curso temporal observado en los experimentos anteriores para los efectos de retigabine, alcanzando el máximo alrededor de los 25 minutos de lavado de retigabine. Sin embargo, el efecto máximo sobre la onda muy lenta se alcanzó al final de la aplicación de retigabine y comenzó a disminuir tras retirar el compuesto del líquido de perfusión (fig 5.10 B). En cualquier caso, a los 25 minutos de lavado aun se mantenía un aumento significativo sobre esta onda respecto a los valores de control. El curso temporal de los efectos sobre la onda muy lenta se asemeja en gran medida al de la evolución de la hiperpolarización, coincidiendo el máximo efecto con el punto de máxima hiperpolarización.

El área integrada de los reflejos de la raíz dorsal también se vio significativamente aumentado, pasando de $1.32 \pm 0.18 \mu\text{V}\cdot\text{s}$ en control a $1.90 \pm 0.2 \mu\text{V}\cdot\text{s}$ tras la aplicación de retigabine ($p < 0.05$; $n = 5$).

Los efectos de retigabine sobre las respuestas inducidas por estímulos de baja intensidad siguieron la misma tendencia hacia el aumento.

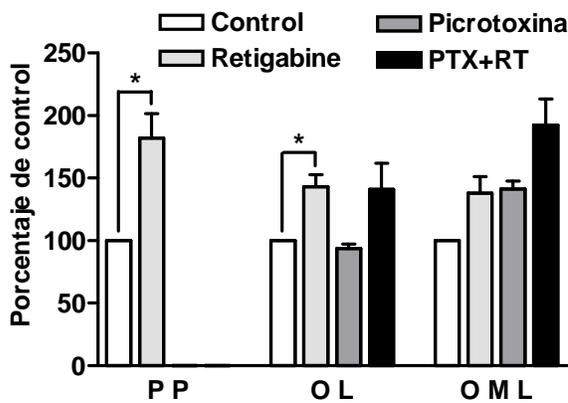


Figura 5.11. Cuantificación de los efectos de retigabine sobre los distintos componentes de la respuesta. Los datos están tomados de dos tipos de experimentos: (1) aplicando retigabine (RT) $10 \mu\text{M}$ directamente sobre una preparación fresca ($n = 5$) y (2) aplicando retigabine $10 \mu\text{M}$ en situación de bloqueo de los receptores de GABA-A con picrotoxina (PTX, $20 \mu\text{M}$; $n = 4$). Retigabine aumentó todos los componentes de la respuesta. Retigabine también mostró un efecto potenciador sobre los componentes de la respuesta resistentes a picrotoxina. Los valores de retigabine se obtuvieron a los 25 minutos de lavado. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (* $p < 0.05$).

Para estudiar la posible interacción de retigabine con receptores de GABA tipo A se utilizaron los resultados de los experimentos de prevención con PTX. Se analizaron los efectos de retigabine sobre las respuestas frente a la estimulación eléctrica de la raíz dorsal en condiciones de bloqueo de los receptores de GABA-A por PTX. En estas condiciones, retigabine $10 \mu\text{M}$ produjo un aumento de los componentes de la respuesta resistentes a PTX (fig 5.11). Este aumento fue de similar magnitud al producido por la aplicación directa de retigabine.

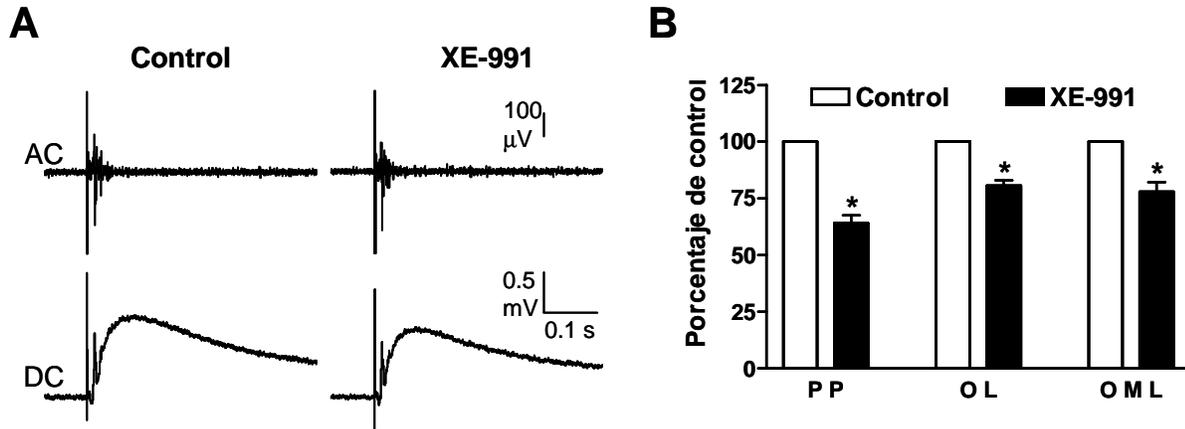


Figura 5.12. Efectos de XE-991 sobre las respuestas de una raíz dorsal frente a la estimulación de alta intensidad de la raíz dorsal adyacente. En **A** se muestra el ligero efecto depresor de XE-991 10 μ M sobre los componentes de la respuesta de un registro original. En el gráfico de **B** están cuantificados los efectos de XE-991 sobre los componentes de la respuesta (PP, primer pico; OL, onda lenta; OML, onda muy lenta). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (* $p < 0.05$, $n = 6$).

En los 6 casos que se utilizó, XE-991 perfundido a 10 μ M produjo los efectos opuestos a retigabine sobre todos los componentes de la respuesta frente a estímulos de alta intensidad (fig 5.12 A). El efecto depresor de XE-991 fue de poca magnitud aunque significativo para todos los parámetros estudiados (fig 5.12 B). Las respuestas frente a estímulos de baja intensidad también siguieron un comportamiento parecido. Además, XE-991 revirtió ($n = 5$) y previno ($n = 4$) todos los efectos de retigabine sobre las respuestas frente a la estimulación de la raíz dorsal (fig 5.13).

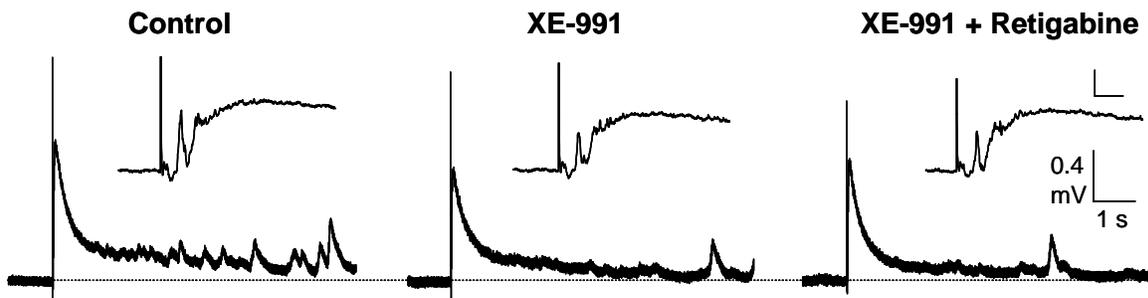


Figura 5.13. Prevención por XE-991 de los efectos de retigabine sobre las respuestas de una raíz dorsal frente a la estimulación de alta intensidad de la raíz dorsal adyacente. En la figura se muestran registros originales en control, después de 30 minutos de aplicación continua de XE-991 10 μ M y tras 25 minutos de lavado de retigabine 10 μ M. Retigabine se aplicó de forma conjunta con XE-991 durante 18 minutos, y después se volvió a perfundir con XE-991 solo. Nótese la ausencia de efecto de retigabine sobre los componentes de la respuesta en estas condiciones. Barras de calibración de las figuras insertadas: 0.4 mV; 20 ms.

DISCUSIÓN

En este capítulo hemos estudiado los efectos de los moduladores de la corriente M sobre las terminales de las aferentes primarias y sobre el circuito implicado en la generación de los potenciales y los reflejos de la raíz dorsal.

En las presentes condiciones, la aplicación de retigabine hiperpolariza en gran medida las aferentes primarias. Esta hiperpolarización es sensible al bloqueo con XE-991 indicando su dependencia de la activación de canales KCNQ. La hiperpolarización inducida por retigabine es resistente al bloqueo de receptores de GABA-A con PTX y al bloqueo de la transmisión sináptica con TTX indicando que este efecto sobre el potencial de membrana de las aferentes primarias se debe a un efecto específico de retigabine sobre canales KCNQ presentes en las propias terminales de las aferentes primarias.

Por el contrario, no se observó un efecto claro de XE-991 sobre el potencial basal de la raíz dorsal. Sin embargo, debido a las limitaciones de la técnica empleada no se puede descartar que XE-991 pueda tener un ligero efecto despolarizante sobre las aferentes primarias que haya podido pasar inadvertido. Con la aplicación de GABA comprobamos que las aferentes primarias eran capaces de despolarizarse de una forma continua y que nuestra técnica era capaz de registrar despolarizaciones cuando éstas eran de una magnitud considerable. Con la aplicación de XE-991 después de retigabine sí se pudo detectar cierta despolarización en algunos casos, indicando que tal vez los canales presentes en las aferentes primarias se encuentran cerrados al potencial de reposo.

Passmore y cols (2003) demostraron la expresión de canales KCNQ en neuronas de ganglio de la raíz dorsal en cultivo. Aquí hemos obtenido evidencias de la presencia de canales KCNQ en las terminales de las aferentes primarias dentro de la médula espinal, indicando que estos canales sufren un transporte centrípeto desde el soma neuronal.

En estos registros retigabine modifica la actividad espontánea de la misma manera que hemos mostrado en los capítulos anteriores. La frecuencia de los eventos espontáneos se redujo mientras que la amplitud aumentó. XE-991, por el contrario, solo fue capaz de reducir la amplitud sin alterar la frecuencia. En cambio, XE-991 consiguió revertir y prevenir los efectos de retigabine sobre la actividad espontánea, tanto sobre la amplitud como sobre la frecuencia de los eventos.

El aumento en amplitud de los potenciales espontáneos puede ser una consecuencia directa de la hiperpolarización, ya que al tener un potencial de membrana más negativo la fuerza para la despolarización aumenta. Estos potenciales son sensibles al bloqueo con PTX indicando, como se ha habido demostrado con anterioridad (para una revisión ver Willis, 1999), que se originan por la activación de receptores de GABA-A. La activación de los receptores ionotrópicos de GABA (tipo A) permite la salida de iones Cl⁻ al exterior de las aferentes primarias por gradiente electroquímico. GABA despolariza las aferentes puesto que la concentración interna de cloro es más elevada que en el exterior, al contrario de lo que sucede en la mayor parte de las células nerviosas en animales adultos. Esta elevada concentración de cloro se debe a la presencia de transportadores de cationes y cloro tipo NKCC1 en estas neuronas (Price y cols, 2005). La hiperpolarización produce una mayor salida de cloro porque incrementa el gradiente eléctrico para este ion produciendo unos potenciales espontáneos de mayor tamaño.

Del mismo modo la hiperpolarización de las interneuronas GABA-érgicas puede explicar la reducción en la frecuencia de la actividad espontánea. La hiperpolarización aleja a las neuronas de su umbral de disparo y por tanto necesitarían de una activación sináptica más fuerte para producir el disparo de potenciales de acción y la liberación de GABA de sus terminales. En estas condiciones no todos los potenciales excitatorios producidos en las interneuronas alcanzarían el umbral de disparo, reduciéndose por tanto la frecuencia en el disparo de potenciales de acción. El aumento en la amplitud de los potenciales de acción producida por la hiperpolarización desencadenaría una liberación mayor de neurotransmisores incidiendo de nuevo en la amplitud de los potenciales registrados. La reducción en la amplitud sin afectar a la frecuencia de los potenciales espontáneos producido por XE-991 podría deberse únicamente a un efecto de despolarización sobre las interneuronas.

El aumento en el umbral y en las respuestas frente a la estimulación eléctrica de la raíz dorsal producido por retigabine podría deberse también a esta hiperpolarización de las aferentes con una probable contribución de las interneuronas.

En unos experimentos como los presentados en este capítulo sería interesante poder precisar el tipo de fibras sensoriales sensibles a los moduladores de la corriente

M. Sin embargo no disponemos de pruebas directas acerca de los tipos de fibras involucradas en las respuestas obtenidas.

En trabajos previos con una preparación como ésta se comprobó que tanto fibras gruesas como finas contribuyen a los cambios en el potencial basal registrados de una raíz dorsal completa (Lopez-Garcia y King, 1996; Khasabov y cols, 1998). Por su parte los reflejos de la raíz dorsal se han descrito en fibras gruesas (Rossignol y cols, 1998) y existen también indicaciones de que se pueden producir en fibras finas sobre todo en condiciones de inflamación (Willis, 1999).

Analizando en mayor detalle los resultados presentados en este capítulo se pueden conseguir algunas indicaciones sobre los tipos de fibras implicados en estas respuestas.

Por un lado las medidas de velocidad de conducción de los dos picos rápidos indican que se producen por la activación de fibras gruesas en ambos casos (Hedo y cols, 1999). Además su desarrollo prácticamente completo a intensidades de estimulación bajas indican que se producen por contactos de fibras gruesas entre sí.

En trabajos previos (Willis, 1999) se ha sugerido que los contactos entre fibras gruesas se producen en láminas profundas de la médula espinal. Otros autores observaron que aislando las láminas superficiales no se observaba actividad de fibras gruesas (Shimizu y cols, 1995). En nuestra preparación hemos comprobado que la eliminación de las láminas profundas suprime los picos rápidos sin afectar demasiado a las ondas más lentas de la respuesta.

Los picos se observan a una latencia corta y además se deben a una actividad muy sincrónica, estas características encajan con la propuesta de Jankowska y cols (1981) de que en los contactos entre fibras gruesas intervienen un número muy limitado de sinapsis. Finalmente, la sensibilidad de los componentes rápidos de la respuesta a antagonistas de receptores de AMPA y GABA-A ha sido descrita por varios autores en registros de fibras gruesas (Willis, 1999; Rudomin y Schimidt, 1999).

Todos estos argumentos refuerzan la idea de que los componentes rápidos de la respuesta se deben a contactos entre fibras gruesas.

También disponemos de argumentos que indican que los componentes lentos de la respuesta se deben a la intervención de fibras de calibre fino, bien en la estimulación bien en el registro.

Por un lado se requieren intensidades de estimulación altas sobre la raíz dorsal para conseguir que se desarrollen completamente los componentes lentos de la respuesta. Las intensidades altas de estimulación son necesarias para la activación de fibras más finas, indicando la implicación de fibras finas para desencadenar estos componentes de la respuesta.

Los componentes más lentos de la respuesta, sobre todo la onda muy lenta, presentan una latencia larga y una evolución lenta. Estas características podrían indicar la intervención de circuitos sinápticos complejos o mecanismos de señalización autocrina o paracrina como los descritos para la despolarización de aferentes primarias finas (Rudomin y Schmidt, 1999). La dependencia de estas ondas por la activación de receptores de tipo NMDA y su sensibilidad al bloqueo con PTX sugiere la existencia de estos circuitos polisinápticos, ya que estas características son comunes a los componentes polisinápticos de las respuestas de neuronas dorsales y motoneuronas originadas por la activación de las fibras aferentes presentes en la raíz dorsal (Evans, 1989).

Además la mayor parte de las ondas lentas se mantiene tras aislar las láminas superficiales del asta dorsal. En estas zonas superficiales es donde terminan mayoritariamente las fibras aferentes finas (Light y Perl, 1979) indicando que estas ondas se deben originar por contactos entre fibras aferentes finas, posiblemente incluyendo fibras no mielinizadas.

En estos experimentos hemos mostrado que retigabine aumenta todos los componentes de las respuestas de la raíz dorsal. Con los argumentos presentados anteriormente podemos decir que probablemente todos los tipos de fibras aferentes presentes en la raíz dorsal son hiperpolarizados por retigabine. Esta observación coincide con un trabajo anterior de Passmore y cols (2003) en el que mostraron que neuronas de ganglio de la raíz dorsal de todos los tamaños pueden expresar proteínas KCNQ y presentar sensibilidad a los moduladores de la corriente M.

Por otro lado, el efecto máximo producido por retigabine sobre la onda muy lenta y el punto de máxima hiperpolarización tienen lugar al final de la aplicación del compuesto. Ésto sugiere que ambos efectos podrían producirse sobre el mismo tipo de fibras con lo que la hiperpolarización se debería mayoritariamente a un efecto sobre fibras aferentes de calibre fino.

En conclusión, hemos mostrado indicios de la expresión de canales KCNQ funcionales en fibras aferentes posiblemente de todos los tamaños, así como en las neuronas espinales responsables de las respuestas de la raíz dorsal a la estimulación eléctrica de la raíz dorsal adyacente.

La hiperpolarización producida por retigabine sobre las fibras aferentes y las interneuronas contribuye a la disminución de la excitabilidad observada en los experimentos de capítulos anteriores, sugiriendo que parte del efecto observado sobre las respuestas de las neuronas espinales frente a la activación sináptica son debidas a un efecto presináptico.

La influencia de retigabine sobre las aferentes primarias y sobre este circuito puede contribuir al efecto analgésico producido por retigabine en condiciones de inflamación y neuropatía en las que la excitabilidad de este circuito se encuentra probablemente alterada (Rees y cols, 1994; Cervero y Laird, 1996).

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

En conjunto los resultados presentados a lo largo de esta Tesis Doctoral indican que los moduladores de la corriente M actúan a varios niveles regulando la transmisión somatosensorial a través de la médula espinal. Los efectos sobre los distintos componentes se van acumulando, de modo que los efectos sobre las motoneuronas se deben a una sumación de los efectos sobre sí mismas y sobre cada uno de los elementos anteriores. A continuación se discutirán los efectos de los moduladores sobre cada una de las partes estudiadas, pero ordenadas según el flujo normal que sigue la información somatosensorial en la médula espinal.

Aferentes primarias

La información somatosensorial procedente de los receptores periféricos es portada hacia la médula espinal por las fibras aferentes primarias. En el capítulo 3 hemos indicado la presencia de corrientes M, y por tanto de canales KCNQ, en fibras aferentes de calibre grueso encargadas de transmitir información no nociceptiva y en fibras finas que se encargan de portar información nociceptiva. La activación de estas corrientes produce la hiperpolarización de las aferentes y la consecuente reducción en su excitabilidad. Esta reducción en la excitabilidad se manifiesta en el requerimiento de estímulos mayores para alcanzar el umbral de disparo de potenciales de acción, necesario para producir la liberación de neurotransmisores sobre las neuronas de la médula espinal.

Pero paradójicamente esta hiperpolarización ocasiona que cuando se alcanza el umbral de disparo y se producen potenciales de acción, éstos sean de mayor amplitud, lo que produce una entrada más fuerte de calcio en las terminales presinápticas y una descarga mayor de neurotransmisores. Este efecto es patente en el aumento en las respuestas de la raíz dorsal frente a la estimulación eléctrica de la raíz dorsal adyacente que se obtiene tras la apertura de los canales KCNQ con retigabine.

XE-991 sin embargo no produjo efectos cuantificables sobre el potencial basal de las fibras aferentes y los efectos sobre las respuestas frente a la estimulación eléctrica fueron ligeros. Estas observaciones indican que las corrientes presentes en estas terminales son poco sensibles al bloqueo con XE-991, lo que unido al hecho de

que XE-991 si es capaz de prevenir y revertir los efectos de retigabine, podría indicar que estos canales se encuentran cerrados al potencial de reposo.

Además de su presencia en las aferentes primarias, también existirían corrientes M en las interneuronas espinales que intervienen en la conexión entre fibras aferentes. Estas interneuronas producen los reflejos de la raíz dorsal y la despolarización de las aferentes primarias, dos fenómenos que están implicados en la inflamación periférica y en la inhibición presináptica, respectivamente. Además los reflejos de la raíz dorsal se han relacionado con la aparición de alodinia. La presencia de corrientes M puede resultar interesante para controlar la excitabilidad de estas interneuronas reduciendo los efectos pronociceptivos que se producen por activación de estas vías en condiciones de inflamación.

Como hemos ido mostrando a lo largo de los diferentes capítulos, la actividad espontánea que se observa en los diferentes registros realizados también se ve alterada por los moduladores de la corriente M. La actividad espontánea posiblemente se produce por contactos sinápticos entre interneuronas espinales y los axones de las aferentes primarias, y a través de las aferentes alcanza a los distintos elementos de la médula espinal.

La hiperpolarización de las interneuronas por retigabine dificulta que los potenciales excitatorios postsinápticos producidos en las interneuronas sobrepasen el umbral de disparo lo que reduce la frecuencia de los eventos espontáneos, pero una vez que se alcanza el umbral, y se produce el potencial de acción, la liberación de neurotransmisores sobre las aferentes es mayor, lo que se refleja en unos potenciales espontáneos de mayor amplitud.

Los efectos de XE-991 sobre la actividad espontánea consisten básicamente en la reducción de su amplitud, efecto que podría deberse a la despolarización de las interneuronas que la originan. Al encontrarse las interneuronas en un potencial de membrana más despolarizado, con la llegada del potencial de acción el gradiente eléctrico para la entrada de calcio en la terminal presináptica es menor lo que produce una liberación menor de neurotransmisores sobre las aferentes primarias.

Neuronas del asta dorsal

Después de las aferentes primarias la información somatosensorial alcanza las neuronas del asta dorsal de la médula espinal. Estas neuronas también presentan

corrientes M como se demuestra por los cambios en el potencial de membrana y en la excitabilidad que se obtienen con la aplicación de los moduladores de la corriente M. La mayor parte de las neuronas del asta dorsal sufrieron una reducción de su excitabilidad con la aplicación de retigabine, pero sin embargo el efecto de XE-991 fue de menor magnitud y no se observó en todas las neuronas.

Los efectos producidos por los moduladores de la corriente M sobre las respuestas sinápticas obtenidas tras la activación de las aferentes primarias reflejan en gran medida los producidos sobre la excitabilidad de las propias neuronas del asta dorsal.

Retigabine hizo necesaria la utilización de estímulos mayores sobre las aferentes para observar una respuesta de las neuronas dorsales. Como se ha comentado antes, este efecto se debe a la hiperpolarización de las aferentes primarias que contactan con las neuronas dorsales. Retigabine produjo además una reducción de las respuestas sinápticas a larga latencia de las neuronas dorsales. La reducción de las respuestas a larga latencia esta influenciada en parte por la reducción en la excitabilidad que sufre la propia neurona dorsal. Pero indudablemente este efecto se debe también a que las redes neuronales que proporcionan la entrada sináptica a la neurona dorsal estudiada se encuentran afectadas por la modulación de la corriente M.

Los efectos de XE-991 sobre las respuestas sinápticas también se deben a un efecto compuesto sobre las vías polisinápticas y sobre la propia neurona estudiada. La reducción en los potenciales excitatorios postsinápticos se relaciona con la despolarización sufrida por las neuronas espinales. La despolarización de las neuronas presinápticas produce una reducción en la liberación de neurotransmisores por potencial de acción, mientras que la modificación del potencial de membrana de la neurona objeto de estudio hasta potenciales más despolarizados produce que el gradiente eléctrico para el intercambio iónico sea menor, lo que se refleja en la reducción en los potenciales excitatorios postsinápticos. El disparo de potenciales de acción tras la activación de las aferentes primarias se incrementó con XE-991 pero solo en algunos casos. Este escaso efecto es debido a que el aumento en la excitabilidad de las neuronas dorsales es ligero y no ocurre siempre. En los casos que se produjo, este aumento se debe posiblemente al incremento en la excitabilidad de la

propia neurona, aunque no se puede descartar que este influenciado por un incremento de la entrada sináptica.

Motoneuronas

El último elemento estudiado en esta Tesis Doctoral en relación con la corriente M son las motoneuronas espinales. Los moduladores de la corriente M modificaron el potencial de membrana y la excitabilidad de las motoneuronas indicando la presencia de la corriente M en estas neuronas. XE-991 presentó un efecto de mayor magnitud sobre la excitabilidad que en el caso de las neuronas dorsales y además este efecto fue homogéneo, observándose en todas las neuronas estudiadas.

Estas neuronas reciben información de algunas fibras aferentes primarias de forma directa y también reciben sinapsis de otras neuronas espinales. De nuevo, los efectos de retigabine sobre el umbral se deben a un efecto presináptico sobre las aferentes primarias debido a la hiperpolarización. Los efectos de retigabine sobre las respuestas sinápticas de larga latencia se deben a un efecto acumulado sobre componentes presinápticos al que contribuye la reducción en la excitabilidad de las propias motoneuronas.

El fuerte incremento de la excitabilidad producido por XE-991 sobre las motoneuronas se refleja en un aumento en el disparo de potenciales de acción tras la activación de las aferentes primarias. La contribución de los componentes presinápticos en este caso parece ser menor.

Es interesante resaltar de nuevo las diferencias en la sensibilidad a XE-991 entre neuronas dorsales y motoneuronas, que indican que las corrientes M presentes en ambos tipos neuronales no son iguales. Esta diferencia es extensible a las corrientes M presentes en las aferentes primarias, que muestran una sensibilidad a XE-991 semejante a las neuronas del asta dorsal. La determinación de la causa de estas diferencias en un sistema en el que se expresa la corriente de forma natural podría ayudar a avanzar en el conocimiento de las implicaciones y el papel fisiológico de la corriente M, además de poder ser útil en el diseño de moduladores de la corriente M capaces de actuar específicamente sobre neuronas sensoriales o motoras.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

- Retigabine, facilitador de la corriente M de potasio, deprime los reflejos espinales en una preparación *in vitro* de médula espinal de ratas neonatales. El bloqueante de la corriente M, XE-991, produce el efecto contrario.
- El efecto de retigabine sobre los reflejos espinales se produce actuando específicamente sobre corrientes de potasio tipo M, como indica el hecho de que XE-991 es capaz de revertir todos sus efectos.
- Retigabine hiperpolariza las neuronas del asta dorsal y reduce su excitabilidad, además XE-991 produce los efectos contrarios en una proporción de las neuronas estudiadas y revierte los efectos de retigabine. Estos resultados indican la expresión de corrientes M funcionales en las neuronas del asta dorsal.
- Las motoneuronas espinales también sufren hiperpolarización con retigabine y reducen su excitabilidad. XE-991 produce un gran aumento de la excitabilidad en estas neuronas. Estos datos indican la presencia de corrientes M en este tipo neuronal.
- Las diferencias observadas en la sensibilidad de neuronas dorsales y motoneuronas por XE-991 indican la existencia de diversidad funcional en las corrientes tipo M presentes en las neuronas espinales.
- Las terminales de fibras aferentes primarias también expresan corrientes M, por lo que la modulación de estas corrientes contribuye a los efectos observados sobre las respuestas de neuronas espinales a la activación de vías aferentes.
- Las interneuronas que componen el circuito neuronal implicado en la generación de potenciales y reflejos de la raíz dorsal presumiblemente disponen de corrientes M. La presencia en estas neuronas puede resultar importante para regular la excitabilidad en condiciones de inflamación en las que este circuito se encuentra alterado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulla, F.A., Smith, P.A., 2001. Axotomy- and autotomy-induced changes in Ca²⁺ and K⁺ channel currents of rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 85, 644-658.

Adams, P.R., Brown, D.A., Constanti, A., 1982. Pharmacological inhibition of the M-current. *J Physiol* 332, 223-262.

Adams, P.R., Brown, D.A., 1982. Synaptic inhibition of the M-current: slow excitatory post-synaptic potential mechanism in bullfrog sympathetic neurones. *J Physiol* 332, 263-272.

Adams, P.R., Brown, D.A., Constanti, A., 1982. M-currents and other potassium currents in bullfrog sympathetic neurones. *J Physiol* 330, 537-572.

Aiken, S.P., Lampe, B.J., Murphy, P.A., Brown, B.S., 1995. Reduction of spike frequency adaptation and blockade of M-current in rat CA1 pyramidal neurones by linopirdine (DuP 996), a neurotransmitter release enhancer. *Br J Pharmacol* 115, 1163-1168.

Alaburda, A., Perrier, J.F., Hounsgaard, J., 2002. An M-like outward current regulates the excitability of spinal motoneurons in the adult turtle. *J Physiol* 540, 875-881.

Baccei, M.L., Fitzgerald, M., 2004. Development of GABAergic and glycinergic transmission in the neonatal rat dorsal horn. *J Neurosci* 24, 4749-4757.

Baccei, M.L., Fitzgerald, M., 2005. Intrinsic firing properties of developing rat superficial dorsal horn neurons. *Neuroreport* 16, 1325-1328.

Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A., 1998. *Neurociencia: explorando el cerebro*. Versión española de la obra original en lengua inglesa *Neuroscience: Exploring the brain*. Williams & Wilkins, Baltimore.

Belmonte C., Cervero F., 1996. *Neurobiology of nociceptors*. Oxford University Press, Oxford.

Benatar, M., 2000. Neurological potassium channelopathies. *QJM* 93, 787-797.

Bezanilla, F., 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 80, 555-592.

Bezanilla, F., 2002. Voltage sensor movements. *J Gen Physiol* 120, 465-473.

Biervert, C., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Berkovic, S.F., Propping, P., Jentsch, T.J., Steinlein, O.K., 1998. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279, 403-406.

Biggin, P.C., Roosild, T., Choe, S., 2000. Potassium channel structure: domain by domain. *Curr Opin Struct Biol* 10, 456-461.

Blackburn-Munro, G., Jensen, B.S., 2003. The anticonvulsant retigabine attenuates nociceptive behaviours in rat models of persistent and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 460, 109-116.

Bremner, L., Fitzgerald, M., Baccei, M., 2006. Functional GABA(A)-receptor-mediated inhibition in the neonatal dorsal horn. *J Neurophysiol* 95, 3893-3897.

Briggs, I., Barnes, J.C., 1987. Actions of opioids on the dorsal root potential of the isolated spinal cord preparation of the neonate rat. *Neuropharmacology* 26, 469-475.

Brock, L.G., Coombs, J.S., Eccles, J.C., 1953. Intracellular recording from antidromically activated motoneurons. *J Physiol* 122, 429-461.

Brown, B.S., Yu, S.P., 2000. Modulation and genetic identification of the M channel. *Prog Biophys Mol Biol* 73, 135-166.

Brown, D.A., Adams, P.R., 1980. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283, 673-676.

Castaldo, P., del Giudice, E.M., Coppola, G., Pascotto, A., Annunziato, L., Tagliatela, M., 2002. Benign familial neonatal convulsions caused by altered gating of KCNQ2/KCNQ3 potassium channels. *J Neurosci* 22, RC199

Cervero, F., Iggo, A., Ogawa, H., 1976. Nociceptor-driven dorsal horn neurones in the lumbar spinal cord of the cat. *Pain* 2, 5-24.

Cervero, F., Iggo, A., Molony, V., 1979. An electrophysiological study of neurones in the Substantia Gelatinosa Rolandi of the cat's spinal cord. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 64, 297-314.

Cervero, F., Laird, J.M., 1996. Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain* 68, 13-23.

Charlier, C., Singh, N.A., Ryan, S.G., Lewis, T.B., Reus, B.E., Leach, R.J., Leppert, M., 1998. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* 18, 53-55.

Chung, H.J., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 2006. Polarized axonal surface expression of neuronal KCNQ channels is mediated by multiple signals in the KCNQ2 and KCNQ3 C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8870-8875.

Constanti, A., Brown, D.A., 1981. M-Currents in voltage-clamped mammalian sympathetic neurones. *Neurosci Lett* 24, 289-294.

Cooper, E.C., Aldape, K.D., Abosch, A., Barbaro, N.M., Berger, M.S., Peacock, W.S., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 2000. Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4914-4919.

Cooper, E.C., Harrington, E., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 2001. M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain. *J Neurosci* 21, 9529-9540.

Cooper, E.C., Jan, L.Y., 2003. M-channels: neurological diseases, neuromodulation, and drug development. *Arch Neurol* 60, 496-500.

Costa, A.M., Brown, B.S., 1997. Inhibition of M-current in cultured rat superior cervical ganglia by linopirdine: mechanism of action studies. *Neuropharmacology* 36, 1747-1753.

Cruzblanca, H., Koh, D.S., Hille, B., 1998. Bradykinin inhibits M current via phospholipase C and Ca²⁺ release from IP₃-sensitive Ca²⁺ stores in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7151-7156.

Dascal, N., 1997. Signalling via the G protein-activated K⁺ channels. *Cell Signal* 9, 551-573.

Dedek, K., Kunath, B., Kananura, C., Reuner, U., Jentsch, T.J., Steinlein, O.K., 2001. Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12272-12277.

Delgado, J.M., Ferrus, A., Mora, F., Rubia, F.J., 1998. *Manual de Neurociencia*. Editorial Síntesis S.A., Madrid.

Delmas, P., Brown, D.A., 2005. Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat Rev Neurosci* 6, 850-862.

Devaux, J.J., Kleopa, K.A., Cooper, E.C., Scherer, S.S., 2004. KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *J Neurosci* 24, 1236-1244.

Dost, R., Rundfeldt, C., 2000. The anticonvulsant retigabine potently suppresses epileptiform discharges in the low Ca⁺⁺ and low Mg⁺⁺ model in the hippocampal slice preparation. *Epilepsy Res* 38, 53-66.

Doyle, D.A., Morais, C.J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R., 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77.

Dupuis, D.S., Schroder, R.L., Jespersen, T., Christensen, J.K., Christophersen, P., Jensen, B.S., Olesen, S.P., 2002. Activation of KCNQ5 channels stably expressed in HEK293 cells by BMS-204352. *Eur J Pharmacol* 437, 129-137.

England, J.D., Happel, L.T., Liu, Z.P., Thouron, C.L., Kline, D.G., 1998. Abnormal distributions of potassium channels in human neuromas. *Neurosci Lett* 255, 37-40.

Etxeberria, A., Santana-Castro, I., Regalado, M.P., Aivar, P., Villarroel, A., 2004. Three mechanisms underlie KCNQ2/3 heteromeric potassium M-channel potentiation. *J Neurosci* 24, 9146-9152.

Evans, R.H., 1989. The pharmacology of segmental transmission in the spinal cord. *Prog Neurobiol* 33, 255-279.

Evans, R.H., Long, S.K., 1989. Primary afferent depolarization in the rat spinal cord is mediated by pathways utilising NMDA and non-NMDA receptors. *Neurosci Lett* 100, 231-236.

Everill, B., Kocsis, J.D., 1999. Reduction in potassium currents in identified cutaneous afferent dorsal root ganglion neurons after axotomy. *J Neurophysiol* 82, 700-708.

Fatope, M.O., 2001. Retigabine (ASTA Medica). *IDrugs* 4, 93-98.

Fulton, B.P., Walton, K., 1986. Electrophysiological properties of neonatal rat motoneurons studied in vitro. *J Physiol* 370, 651-678.

Gamper, N., Shapiro, M.S., 2003. Calmodulin mediates Ca²⁺-dependent modulation of M-type K⁺ channels. *J Gen Physiol* 122, 17-31.

Gamper, N., Stockand, J.D., Shapiro, M.S., 2003. Subunit-specific modulation of KCNQ potassium channels by Src tyrosine kinase. *J Neurosci* 23, 84-95.

Gamper, N., Li, Y., Shapiro, M.S., 2005. Structural requirements for differential sensitivity of KCNQ K⁺ channels to modulation by Ca²⁺/calmodulin. *Mol Biol Cell* 16, 3538-3551.

Gao, B.X., Ziskind-Conhaim, L., 1998. Development of ionic currents underlying changes in action potential waveforms in rat spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 80, 3047-3061.

Geiger, J., Weber, Y.G., Landwehrmeyer, B., Sommer, C., Lerche, H., 2006. Immunohistochemical analysis of KCNQ3 potassium channels in mouse brain. *Neurosci Lett* 400, 101-104.

Griffith, L.C., 2001. Potassium channels: the importance of transport signals. *Curr Biol* 11, R226-R228

Guo, J., Schofield, G.G., 2002. Histamine inhibits KCNQ2/KCNQ3 channel current via recombinant histamine H(1) receptors. *Neurosci Lett* 328, 285-288.

Gutman, G.A., Chandy, K.G., Adelman, J.P., Aiyar, J., Bayliss, D.A., Clapham, D.E., Covarrubias, M., Desir, G.V., Furuichi, K., Ganetzky, B., Garcia, M.L., Grissmer, S., Jan, L.Y., Karschin, A., Kim, D., Kuperschmidt, S., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Lesage, F., Lester, H.A., McKinnon, D., Nichols, C.G., O'Kelly, I., Robbins, J., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M., Seino, S., Stuehmer, W., Tamkun, M.M., Vandenberg, C.A., Wei, A., Wulff, H., Wymore, R.S., 2003. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 55, 583-586.

Hadley, J.K., Noda, M., Selyanko, A.A., Wood, I.C., Abogadie, F.C., Brown, D.A., 2000. Differential tetraethylammonium sensitivity of KCNQ1-4 potassium channels. *Br J Pharmacol* 129, 413-415.

Hadley, J.K., Passmore, G.M., Tatulian, L., Al-Qatari, M., Ye, F., Wickenden, A.D., Brown, D.A., 2003. Stoichiometry of expressed KCNQ2/KCNQ3 potassium channels and subunit composition of native ganglionic M channels deduced from block by tetraethylammonium. *J Neurosci* 23, 5012-5019.

Han, Z.S., Zhang, E.T., Craig, A.D., 1998. Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat Neurosci* 1, 218-225.

Handwerker, H.O., 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.

Hedo, G., Laird, J.M., Lopez-Garcia, J.A., 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.

Hedo, G., Lopez-Garcia, J.A., 2001. Alpha-1A adrenoceptors modulate potentiation of spinal nociceptive pathways in the rat spinal cord in vitro. *Neuropharmacology* 41, 862-869.

Hedo, G., Lopez-Garcia, J.A., 2002. 5-HT(1B) but not 5-HT(6) or 5-HT(7) receptors mediate depression of spinal nociceptive reflexes in vitro. *Br J Pharmacol* 135, 935-942.

Hetka, R., Rundfeldt, C., Heinemann, U., Schmitz, D., 1999. Retigabine strongly reduces repetitive firing in rat entorhinal cortex. *Eur J Pharmacol* 386, 165-171.

Hochman, S., Garraway, S.M., Pockett, S., 1997. Membrane properties of deep dorsal horn neurons from neonatal rat spinal cord in vitro. *Brain Res* 767, 214-219.

Hu, H.J., Carrasquillo, Y., Karim, F., Jung, W.E., Nerbonne, J.M., Schwarz, T.L., Gereau, R.W., 2006. The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity. *Neuron* 50, 89-100.

Huang, L.Y., 1987. Electrical properties of acutely isolated, identified rat spinal dorsal horn projection neurons. *Neurosci Lett* 82, 267-272.

Ikeda, H., Heinke, B., Ruscheweyh, R., Sandkuhler, J., 2003. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science* 299, 1237-1240.

Ippolito, D.L., Xu, M., Bruchas, M.R., Wickman, K., Chavkin, C., 2005. Tyrosine phosphorylation of K(ir)3.1 in spinal cord is induced by acute inflammation, chronic neuropathic pain, and behavioral stress. *J Biol Chem* 280, 41683-41693.

Jankowska, E., McCrea, D., Rudomin, P., Sykova, E., 1981. Observations on neuronal pathways subserving primary afferent depolarization. *J Neurophysiol* 46, 506-516.

Jenkinson, D.H., 2006. Potassium channels - multiplicity and challenges. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S63-S71

Jentsch, T.J., 2000. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 1, 21-30.

Jiang, M.C., Cleland, C.L., Gebhart, G.F., 1995. Intrinsic properties of deep dorsal horn neurons in the L6-S1 spinal cord of the intact rat. *J Neurophysiol* 74, 1819-1827.

Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., MacKinnon, R., 2002. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417, 515-522.

Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., MacKinnon, R., 2003. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423, 33-41.

Kapetanovic, I.M., Yonekawa, W.D., Kupferberg, H.J., 1995. The effects of D-23129, a new experimental anticonvulsant drug, on neurotransmitter amino acids in the rat hippocampus in vitro. *Epilepsy Res* 22, 167-173.

Karimi-Abdolrezaee, S., Eftekharpour, E., Fehlings, M.G., 2004. Temporal and spatial patterns of Kv1.1 and Kv1.2 protein and gene expression in spinal cord white matter after acute and chronic spinal cord injury in rats: implications for axonal pathophysiology after neurotrauma. *Eur J Neurosci* 19, 577-589.

Kharkovets, T., Hardelin, J.P., Safieddine, S., Schweizer, M., El-Amraoui, A., Petit, C., Jentsch, T.J., 2000. KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4333-4338.

Khasabov, S.G., Lopez-Garcia, J.A., King, A.E., 1998. Serotonin-induced population primary afferent depolarisation in vitro: the effects of neonatal capsaicin treatment. *Brain Res* 789, 339-342.

Kim, D.S., Choi, J.O., Rim, H.D., Cho, H.J., 2002. Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Brain Res Mol Brain Res* 105, 146-152.

King, A.E., Lopez-Garcia, J.A., 1993. Excitatory amino acid receptor-mediated neurotransmission from cutaneous afferents in rat dorsal horn in vitro. *J Physiol* 472, 443-457.

Korsgaard, M.P., Hartz, B.P., Brown, W.D., Ahring, P.K., Strobaek, D., Mirza, N.R., 2005. Anxiolytic Effects of BMS-204352 and Retigabine via Activation of Neuronal KV7 Channels. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 282-292.

Kotani, S., Hirasawa, T., Suzuki, T., Sato, K., Sakakibara, M., Tokimasa, T., 2000. Mechanisms underlying the M-current block by barium in bullfrog sympathetic neurons. *Neurosci Lett* 285, 1-4.

Kreusch, A., Pfaffinger, P.J., Stevens, C.F., Choe, S., 1998. Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* 392, 945-948.

Kubisch, C., Schroeder, B.C., Friedrich, T., Lutjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C., Jentsch, T.J., 1999. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96, 437-446.

Kuo, A., Gulbis, J.M., Antcliff, J.F., Rahman, T., Lowe, E.D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F.M., Ezaki, T., Doyle, D.A., 2003. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300, 1922-1926.

Lakke, E.A., 1997. The projections to the spinal cord of the rat during development: a timetable of descent. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 135, 1-143

Lamas, J.A., Selyanko, A.A., Brown, D.A., 1997. Effects of a cognition-enhancer, linopirdine (DuP 996), on M-type potassium currents (IK(M)) and some other voltage- and ligand-gated membrane currents in rat sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 9, 605-616.

Lerche, C., Scherer, C.R., Seebohm, G., Derst, C., Wei, A.D., Busch, A.E., Steinmeyer, K., 2000. Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J Biol Chem* 275, 22395-22400.

Lesage, F., 2003. Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology* 44, 1-7.

Li, Y., Gamper, N., Hilgemann, D.W., Shapiro, M.S., 2005. Regulation of Kv7 (KCNQ) K⁺ channel open probability by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 25, 9825-9835.

Light, A.R., Perl, E.R., 1979. Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J Comp Neurol* 186, 133-150.

Lin, Q., Wu, J., Willis, W.D., 1999. Dorsal root reflexes and cutaneous neurogenic inflammation after intradermal injection of capsaicin in rats. *J Neurophysiol* 82, 2602-2611.

Lopez-Garcia, J.A., King, A.E., 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, J.A., King, A.E., 1996. A novel methodology for simultaneous assessment of the effects of 5-hydroxytryptamine on primary afferent polarisation and synaptic transmission in rat dorsal horn neurones in vitro. *J Neurosci Methods* 68, 1-6.

MacKinnon, R., 2003. Potassium channels. *FEBS Lett* 555, 62-65.

Maggi, C.A., 1995. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol* 45, 1-98.

Main, M.J., Cryan, J.E., Dupere, J.R., Cox, B., Clare, J.J., Burbidge, S.A., 2000. Modulation of KCNQ2/3 potassium channels by the novel anticonvulsant retigabine. *Mol Pharmacol* 58, 253-262.

Marrion, N.V., 1997. Control of M-current. *Annu Rev Physiol* 59, 483-504.

Marsh, D.F., Hatch, D.J., Fitzgerald, M., 1997. Opioid systems and the newborn. *Br J Anaesth* 79, 787-795.

Martire, M., Castaldo, P., D'Amico, M., Preziosi, P., Annunziato, L., Tagliatela, M., 2004. M channels containing KCNQ2 subunits modulate norepinephrine, aspartate, and GABA release from hippocampal nerve terminals. *J Neurosci* 24, 592-597.

Mendell, L.M., Wall, P.D., 1965. Responses of single dorsal cord cells to peripheral cutaneous unmyelinated fibres. *Nature* 206, 97-99.

Miller, C., 2000. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol* 1, REVIEWS0004.1-REVIEWS0004.5

Murase, K., Randic, M., 1983. Electrophysiological properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro: calcium-dependent action potentials. *J Physiol* 334, 141-153.

Murase, K., Ryu, P.D., Randic, M., 1986. Substance P augments a persistent slow inward calcium-sensitive current in voltage-clamped spinal dorsal horn neurons of the rat. *Brain Res* 365, 369-376.

Nielsen, A.N., Mathiesen, C., Blackburn-Munro, G., 2004. Pharmacological characterisation of acid-induced muscle allodynia in rats. *Eur J Pharmacol* 487, 93-103.

Nowak, L.M., Macdonald, R.L., 1982. Substance P: ionic basis for depolarizing responses of mouse spinal cord neurons in cell culture. *J Neurosci* 2, 1119-1128.

Nowak, L.M., Macdonald, R.L., 1983. Muscarine-sensitive voltage-dependent potassium current in cultured murine spinal cord neurons. *Neurosci Lett* 35, 85-91.

Ocaña, M., Cendan, C.M., Cobos, E.J., Entrena, J.M., Baeyens, J.M., 2004. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *Eur J Pharmacol* 500, 203-219.

Otto, J.F., Kimball, M.M., Wilcox, K.S., 2002. Effects of the anticonvulsant retigabine on cultured cortical neurons: changes in electroresponsive properties and synaptic transmission. *Mol Pharmacol* 61, 921-927.

Pan, Z., Selyanko, A.A., Hadley, J.K., Brown, D.A., Dixon, J.E., McKinnon, D., 2001. Alternative splicing of KCNQ2 potassium channel transcripts contributes to the functional diversity of M-currents. *J Physiol* 531, 347-358.

Pan, Z., Kao, T., Horvath, Z., Lemos, J., Sul, J.Y., Cranstoun, S.D., Bennett, V., Scherer, S.S., Cooper, E.C., 2006. A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci* 26, 2599-2613.

Park, S.Y., Choi, J.Y., Kim, R.U., Lee, Y.S., Cho, H.J., Kim, D.S., 2003. Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression by axotomy and neurotrophins in rat dorsal root ganglia. *Mol Cells* 16, 256-259.

Passmore, G.M., Selyanko, A.A., Mistry, M., Al-Qatari, M., Marsh, S.J., Matthews, E.A., Dickenson, A.H., Brown, T.A., Burbidge, S.A., Main, M., Brown, D.A., 2003. KCNQ/M currents in sensory neurons: significance for pain therapy. *J Neurosci* 23, 7227-7236.

Pena, F., Alavez-Perez, N., 2006. Epileptiform activity induced by pharmacologic reduction of M-current in the developing hippocampus in vitro. *Epilepsia* 47, 47-54.

Peretz, A., Degani, N., Nachman, R., Uziyel, Y., Gibor, G., Shabat, D., Attali, B., 2005. Meclofenamic acid and diclofenac, novel templates of KCNQ2/Q3 potassium channel openers, depress cortical neuron activity and exhibit anticonvulsant properties. *Mol Pharmacol* 67, 1053-1066.

Prescott, S.A., 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.

Price, T.J., Cervero, F., De Koninck, Y., 2005. Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr Top Med Chem* 5, 547-555.

Prole, D.L., Marrion, N.V., 2004. Ionic permeation and conduction properties of neuronal KCNQ2/KCNQ3 potassium channels. *Biophys J* 86, 1454-1469.

Rasband, M.N., Park, E.W., Vanderah, T.W., Lai, J., Porreca, F., Trimmer, J.S., 2001. Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13373-13378.

Rees, H., Sluka, K.A., Westlund, K.N., Willis, W.D., 1994. Do dorsal root reflexes augment peripheral inflammation? *Neuroreport* 5, 821-824.

Rees, H., Sluka, K.A., Westlund, K.N., Willis, W.D., 1995. The role of glutamate and GABA receptors in the generation of dorsal root reflexes by acute arthritis in the anaesthetized rat. *J Physiol* 484 (Pt 2), 437-445.

Rexed, B., 1952. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96, 414-495.

Rexed, B., 1954. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 100, 297-379.

Robbins, J., 2001. KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Ther* 90, 1-19.

Roche, J.P., Westenbroek, R., Sorom, A.J., Hille, B., Mackie, K., Shapiro, M.S., 2002. Antibodies and a cysteine-modifying reagent show correspondence of M current in neurons to KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels. *Br J Pharmacol* 137, 1173-1186.

Rogawski, M.A., 2000. KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy. *Trends Neurosci* 23, 393-398.

Romero, M., Reboreda, A., Sanchez, E., Lamas, J.A., 2004. Newly developed blockers of the M-current do not reduce spike frequency adaptation in cultured mouse sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 19, 2693-2702.

Rossignol, S., Beloozerova, I., Gossard, J.P., Dubuc, R., 1998. Presynaptic mechanisms during locomotion. In: Rudomin, P., Romo, R., Mendell, L.M., (Eds), Presynaptic inhibition and neural control. Oxford University Press, New York, pp. 385–397.

Rostock, A., Tober, C., Rundfeldt, C., Bartsch, R., Engel, J., Polymeropoulos, E.E., Kutscher, B., Loscher, W., Honack, D., White, H.S., Wolf, H.H., 1996. D-23129: a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures. *Epilepsy Res* 23, 211-223.

Rudomin, P., Schmidt, R.F., 1999. Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp Brain Res* 129, 1-37.

Rundfeldt, C., 1997. The new anticonvulsant retigabine (D-23129) acts as an opener of K⁺ channels in neuronal cells. *Eur J Pharmacol* 336, 243-249.

Rundfeldt, C., Netzer, R., 2000. The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells transfected with human KCNQ2/3 subunits. *Neurosci Lett* 282, 73-76.

Rundfeldt, C., Netzer, R., 2000. Investigations into the mechanism of action of the new anticonvulsant retigabine. Interaction with GABAergic and glutamatergic neurotransmission and with voltage gated ion channels. *Arzneimittelforschung* 50, 1063-1070.

Ruscheweyh, R., Sandkuhler, J., 2002. Lamina-specific membrane and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro. *J Physiol* 541, 231-244.

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.

Russo, R.E., Hounsgaard, J., 1999. Dynamics of intrinsic electrophysiological properties in spinal cord neurones. *Prog Biophys Mol Biol* 72, 329-365.

Sah, P., 1996. Ca²⁺-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* 19, 150-154.

Sansom, M.S., 1998. Ion channels: a first view of K⁺ channels in atomic glory. *Curr Biol* 8, R450-R452

Schenzer, A., Friedrich, T., Pusch, M., Saftig, P., Jentsch, T.J., Grotzinger, J., Schwake, M., 2005. Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K⁺ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *J Neurosci* 25, 5051-5060.

Schnee, M.E., Brown, B.S., 1998. Selectivity of linopirdine (DuP 996), a neurotransmitter release enhancer, in blocking voltage-dependent and calcium-activated potassium currents in hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 286, 709-717.

Schneider, S.P., 2003. Spike frequency adaptation and signaling properties of identified neurons in rodent deep spinal dorsal horn. *J Neurophysiol* 90, 245-258.

Schneider, S.P., 2005. Mechanosensory afferent input and neuronal firing properties in rodent spinal laminae III-V: re-examination of relationships with analysis of responses to static and time-varying stimuli. *Brain Res* 1034, 71-89.

Schroder, R.L., Jespersen, T., Christophersen, P., Strobaek, D., Jensen, B.S., Olesen, S.P., 2001. KCNQ4 channel activation by BMS-204352 and retigabine. *Neuropharmacology* 40, 888-898.

Schroeder, B.C., Kubisch, C., Stein, V., Jentsch, T.J., 1998. Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* 396, 687-690.

Schroeder, B.C., Hechenberger, M., Weinreich, F., Kubisch, C., Jentsch, T.J., 2000. KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem* 275, 24089-24095.

Schwake, M., Pusch, M., Kharkovets, T., Jentsch, T.J., 2000. Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K⁺ channels involved in epilepsy. *J Biol Chem* 275, 13343-13348.

Schwake, M., Athanasiadu, D., Beimgraben, C., Blanz, J., Beck, C., Jentsch, T.J., Saftig, P., Friedrich, T., 2006. Structural determinants of M-type KCNQ (Kv7) K⁺ channel assembly. *J Neurosci* 26, 3757-3766.

Schwarz, J.R., Glassmeier, G., Cooper, E.C., Kao, T.C., Nodera, H., Tabuena, D., Kaji, R., Bostock, H., 2006. KCNQ channels mediate IKs, a slow K⁺ current regulating excitability in the rat node of Ranvier. *J Physiol* 573, 17-34.

Schweitzer, P., 2000. Cannabinoids decrease the K(+) M-current in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 20, 51-58.

Selyanko, A.A., Hadley, J.K., Wood, I.C., Abogadie, F.C., Delmas, P., Buckley, N.J., London, B., Brown, D.A., 1999. Two types of K(+) channel subunit, Erg1 and KCNQ2/3, contribute to the M-like current in a mammalian neuronal cell. *J Neurosci* 19, 7742-7756.

Selyanko, A.A., Brown, D.A., 1999. M-channel gating and simulation. *Biophys J* 77, 701-713.

Shah, M.M., Mistry, M., Marsh, S.J., Brown, D.A., Delmas, P., 2002. Molecular correlates of the M-current in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* 544, 29-37.

Shahidullah, M., Santarelli, L.C., Wen, H., Levitan, I.B., 2005. Expression of a calmodulin-binding KCNQ2 potassium channel fragment modulates neuronal M-current and membrane excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16454-16459.

Shimizu, T., Yoshimura, M., Baba, H., Shimoji, K., Higashi, H., 1995. Role of A delta afferent fibers in modulation of primary afferent input to the adult rat spinal cord. *Brain Res* 691, 92-98.

Singh, N.A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B.R., Leach, R.J., Melis, R., Ronen, G.M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J.V., McHarg, M.L., Gagnon, D., Rosales, T.O., Peiffer, A., Anderson, V.E., Leppert, M., 1998. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 18, 25-29.

Smith, J.S., Iannotti, C.A., Dargis, P., Christian, E.P., Aiyar, J., 2001. Differential expression of *kcnq2* splice variants: implications to m current function during neuronal development. *J Neurosci* 21, 1096-1103.

Soriani, O., Le Foll, F., Galas, L., Roman, F., Vaudry, H., Cazin, L., 1999. The sigma-ligand (+)-pentazocine depresses M current and enhances calcium conductances in frog melanotrophs. *Am J Physiol* 277, E73-E80

Suh, B.C., Hille, B., 2002. Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron* 35, 507-520.

Suh, B.C., Hille, B., 2006. Does diacylglycerol regulate KCNQ channels? *Pflugers Arch* en prensa,

Surti, T.S., Huang, L., Jan, Y.N., Jan, L.Y., Cooper, E.C., 2005. Identification by mass spectrometry and functional characterization of two phosphorylation sites of KCNQ2/KCNQ3 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17828-17833.

Tatulian, L., Delmas, P., Abogadie, F.C., Brown, D.A., 2001. Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine. *J Neurosci* 21, 5535-5545.

Tatulian, L., Brown, D.A., 2003. Effect of the KCNQ potassium channel opener retigabine on single KCNQ2/3 channels expressed in CHO cells. *J Physiol* 549, 57-63.

Tinel, N., Lauritzen, I., Chouabe, C., Lazdunski, M., Borsotto, M., 1998. The KCNQ2 potassium channel: splice variants, functional and developmental expression. Brain localization and comparison with KCNQ3. *FEBS Lett* 438, 171-176.

Tinel, N., Diochot, S., Lauritzen, I., Barhanin, J., Lazdunski, M., Borsotto, M., 2000. M-type KCNQ2-KCNQ3 potassium channels are modulated by the KCNE2 subunit. *FEBS Lett* 480, 137-141.

van Rijn, C.M., Willems-van Bree, E., 2003. Synergy between retigabine and GABA in modulating the convulsant site of the GABAA receptor complex. *Eur J Pharmacol* 464, 95-100.

Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N.V., Adelman, J.P., 1998. Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 8, 321-329.

Vinay, L., Brocard, F., Pflieger, J.F., Simeoni-Alias, J., Clarac, F., 2000. Perinatal development of lumbar motoneurons and their inputs in the rat. *Brain Res Bull* 53, 635-647.

Wang, H.S., McKinnon, D., 1995. Potassium currents in rat prevertebral and paravertebral sympathetic neurones: control of firing properties. *J Physiol* 485, 319-335.

Wang, H.S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B.S., Wymore, R.S., Cohen, I.S., Dixon, J.E., McKinnon, D., 1998. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282, 1890-1893.

Wang, H.S., Brown, B.S., McKinnon, D., Cohen, I.S., 2000. Molecular basis for differential sensitivity of KCNQ and I(Ks) channels to the cognitive enhancer XE991. *Mol Pharmacol* 57, 1218-1223.

Weber, Y.G., Geiger, J., Kampchen, K., Landwehrmeyer, B., Sommer, C., Lerche, H., 2006. Immunohistochemical analysis of KCNQ2 potassium channels in adult and developing mouse brain. *Brain Res* 1077, 1-6.

White, J.A., McAlpine, P.J., Antonarakis, S., Cann, H., Eppig, J.T., Frazer, K., Frezal, J., Lancet, D., Nahmias, J., Pearson, P., Peters, J., Scott, A., Scott, H., Spurr, N., Talbot, C.J., Povey, S., 1997. Guidelines for human gene nomenclature (1997). HUGO Nomenclature Committee. *Genomics* 45, 468-471.

Wickenden, A.D., Yu, W., Zou, A., Jegla, T., Wagoner, P.K., 2000. Retigabine, a novel anti-convulsant, enhances activation of KCNQ2/Q3 potassium channels. *Mol Pharmacol* 58, 591-600.

Wickenden, A.D., Zou, A., Wagoner, P.K., Jegla, T., 2001. Characterization of KCNQ5/Q3 potassium channels expressed in mammalian cells. *Br J Pharmacol* 132, 381-384.

Wickenden, A.D., Roeloffs, R., McNaughton-Smith, G., Rigdon, G.C., 2004. KCNQ potassium channels: drug targets for the treatment of epilepsy and pain. *Expert Opin Ther Patents* 14, 1-13.

Willis, W.D.J., 1999. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp Brain Res* 124, 395-421.

Willis, W.D., Coggeshall, R.E., 2004. Sensory mechanisms of the spinal cord. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.

Winks, J.S., Hughes, S., Filippov, A.K., Tatulian, L., Abogadie, F.C., Brown, D.A., Marsh, S.J., 2005. Relationship between membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and receptor-mediated inhibition of native neuronal M channels. *J Neurosci* 25, 3400-3413.

Wuttke, T.V., Seebohm, G., Bail, S., Maljevic, S., Lerche, H., 2005. The new anticonvulsant retigabine favors voltage-dependent opening of the Kv7.2 (KCNQ2) channel by binding to its activation gate. *Mol Pharmacol* 67, 1009-1017.

Yoshimura, M., Jessell, T.M., 1989. Membrane properties of rat substantia gelatinosa neurons in vitro. *J Neurophysiol* 62, 109-118.

Yue, C., Yaari, Y., 2004. KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24, 4614-4624.

Yus-Najera, E., Santana-Castro, I., Villarroel, A., 2002. The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. *J Biol Chem* 277, 28545-28553.

Yus-Najera, E., Munoz, A., Salvador, N., Jensen, B.S., Rasmussen, H.B., Defelipe, J., Villarroel, A., 2003. Localization of KCNQ5 in the normal and epileptic human temporal neocortex and hippocampal formation. *Neuroscience* 120, 353-364.

Zaczek, R., Chorvat, R.J., Saye, J.A., Pierdomenico, M.E., Maciag, C.M., Logue, A.R., Fisher, B.N., Rominger, D.H., Earl, R.A., 1998. Two new potent neurotransmitter release enhancers, 10,10-bis(4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone and 10,10-bis(2-fluoro-4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone: comparison to linopirdine. *J Pharmacol Exp Ther* 285, 724-730.

Zhang, H., Craciun, L.C., Mirshahi, T., Rohacs, T., Lopes, C.M., Jin, T., Logothetis, D.E., 2003. PIP(2) activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* 37, 963-975.