



**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

“Participación de los canales de Ca^{2+} axonales en los potenciales de acción de las neuronas sensoriales de ratas neuropáticas”

TESIS

Que presenta

Julia Anai Ojeda Alonso

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de tesis

Dr. Rodolfo Delgado Lezama.

México, D. F.

Septiembre, 2015.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindando durante estos dos años sin el cual este trabajo no hubiera sido posible.

A mi tutor, Dr. Rodolfo Delgado Lezama, por haberme recibido en su laboratorio además de su dedicación a la elaboración de este trabajo y a mi formación académica.

A mis padres, por todo su apoyo durante este proceso y toda mi vida. De no ser por ellos simplemente no hubiera alcanzado ninguno de mis objetivos.

A mi hermano, Antonio y su esposa Hilda, porque siempre acuden a mi rescate y me reciben con una sonrisa.

A todos los integrantes, actuales y antiguos, del laboratorio 9: Emanuel, Carlos y Alberto; que no solo colaboraron con sus comentarios sino también en brindarme su amistad durante el tiempo que he estado trabajando con ellos.

También agradezco la colaboración de Ernesto Raya y Guadalupe Raya, que durante cada experimento trabajaron junto conmigo.

Al laboratorio del Dr. Vinicio Granados y sus integrantes, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarnos ante las dudas y cuestiones que surgieron durante el proyecto.

A mis sinodales, Dr. Benjamín Garduño y el Dr. Ricardo Félix, por participar en la realización de este trabajo.

A todos mis amigos y compañeros dentro del Cinvestav, en especial a Dani, Mau y Kenia, que siempre me apoyaron, aconsejaron y alegraron los días de trabajo.

A todos mis amigos siempre presentes, particularmente a Karla, Irene, Marie, Axel, Ana, Abril y Ara, que siempre tienen el tiempo para buscarme.

Y finalmente, muchas gracias Diego por siempre estar aquí.

Índice

Abstract/Resumen	5
Introducción	8
Neuronas del ganglio de la raíz dorsal.....	9
Transducción del dolor en las neuronas nociceptivas: receptores y sustancias liberadas...	11
Canales iónicos presentes en las aferentes nociceptivas.....	12
Mecanismos del dolor neuropático.....	14
Cambios en la expresión de canales iónicos de Na ⁺ y K ⁺ en las neuronas sensoriales.....	16
Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje en el dolor neuropático.....	16
Expresión de canales de calcio HVA en el dolor neuropático.....	16
Expresión de canales de calcio tipo LVA en el dolor neuropático.....	18
Planteamiento del problema	20
Hipótesis	20
Objetivo General	20
Objetivos particulares	20
Método	21
Animales de experimentación.....	21
Inducción de dolor neuropático mediante la ligadura de los nervios espinales....	21
Prueba de umbral táctil.....	22
Registro electrofisiológico de los PAC del nervio in vitro.....	22
Análisis de los PAC.....	22
Resultados	24

Efecto del dolor neuropático en el umbral de activación y área del PAC en fibras sensoriales A β y C.....	24
Efecto de los bloqueadores para de los canales de calcio tipo T y N en el PAC de fibras sensoriales rápidas.....	27
Efecto en el nervio neuropático contralateral de LNE y el uso de bloqueadores de los bloqueadores, mibefradil y ω -CTX-GVIA, en fibras sensoriales rápidas y lentas....	31
Discusión	34
Umbral de activación de las fibras A α/β y C.....	34
Área del PAC en ratas sham y neuropáticas.	36
Los canales de calcio dependientes de voltaje tipo T modulan la excitabilidad de las fibras sensoriales rápidas A β	40
Participación de los canales de Ca ²⁺ tipo N en los PAC evocados en fibras sensoriales rápidas A β	42
Los canales de calcio dependientes de voltaje tipo T y N no afectan de manera particular el PAC de las fibras sensoriales lentas.....	43
Sensibilización central y la posible participación del nervio contralateral en el dolor neuropático.....	46
Conclusiones	49
Bibliografía	51

Resumen

El dolor, es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial. El dolor puede ser agudo o crónico, el primero tiene una función protectora alertándonos de daños que requieren de la evasión. El crónico no tiene una función útil, puede ser incapacitante. Dentro de este tipo estaría el neuropático, que se produce por una lesión del sistema nervioso central o periférico. Presenta dos cualidades, la alodinia sensación de dolor ante estímulos no dolorosos y la hiperalgesia dolor exacerbado ante estímulos dolorosos. Las neuronas sensoriales son las encargadas de transmitir al sistema nervioso central los estímulos mecánicos, químicos, térmicos y electromagnéticos. Estas neuronas por su velocidad de conducción y tamaño se clasifican en rápidas, grandes y mielinizadas $A\alpha/\beta$ y $A\delta$, con bajo umbral de activación y en lentas, pequeñas y no mielinizadas C, con alto umbral de activación. Estas últimas son las que transmiten la información de dolor. Durante el dolor neuropático se producen cambios en los potenciales de acción de las fibras sensoriales asociados a una expresión diferencial de canales dependientes de voltaje como los de Ca^{2+} tipo T y N, que parecen encontrarse sobre expresados en el axón de las neuronas sensoriales, incrementando su excitabilidad y amplitud del potencial de acción.

Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo explorar la participación de los canales de calcio tipo T y N en el potencial de acción compuesto (PAC) durante el mantenimiento del dolor neuropático. El dolor neuropático se indujo por ligadura de los nervios espinales L5 y L6 de rata. Se registró el PAC en la raíz dorsal L5 ipsi y contralateral de las ratas neuropáticas 15-20 días después de la lesión y en la raíz dorsal L5 de las ratas sham, evocados por la estimulación del respectivo nervio espinal. La aplicación consecutiva de mibefradil, bloqueador de los canales de Ca^{2+} tipo T y de ω -conotoxinaGVIA, bloqueador de los canales de Ca^{2+} tipo N, produjo una disminución diferencial de la excitabilidad y área del PAC en los distintos tipos de fibras. En las rápidas el área del PAC se deprimió en un 70 % con mibefradil, indicando una posible sobre expresión de los canales tipo T durante el mantenimiento del dolor neuropático. Las fibras C presentaron un incremento del área del PAC con respecto a las sham, observándose una menor depresión del PAC (30 %) en presencia de los dos bloqueadores de los canales de Ca^{2+} .

Abstract

Pain describes the unpleasant sensory and emotional experiences associated with actual or potential tissue damage. Pain can be sharp or chronic; the first serves an important protective function, alerting us to injuries that require evasion or treatment. One of the last types is the neuropathic pain, produced by central or peripheral nervous system lesion. Two pathologic states of pain are present in the neuropathy, allodynia a pain response to stimuli that are normally innocuous, and hyperalgesia an exaggerated response to noxious stimuli. Sensory neurons are responsible for transmitting to the central nervous system mechanical, chemical, thermal and electromagnetic stimuli. These neurons by its speed and size are classified as fast, large and myelinated A α / β and A δ , with low activation threshold and in slow or unmyelinated type C, with high activation threshold. The latter are those that transmit pain information. During neuropathic pain changes in action potentials in sensory fibers associated to a differential expression of voltage-dependent channels such as T-type calcium channels and N are produced. These channels seem to be overexpressed in the axon of sensory neurons, increasing their excitability and action potential duration.

Therefore, this study aimed to explore the participation of T- and N-type calcium channels in the maintenance of neuropathic pain. This was induced by ligation of rat spinal nerves L5 and L6. The compound action potential (CAP), from L5 ipsi- and contralateral-dorsal root of neuropathic rats 15-20 days after injury and L5 dorsal root sham rats, evoked by stimulation of the respective spinal nerve was recorded. Consecutive application of mibefradil, Ca²⁺ channel blocker of T- type and ω -conotoxinaGVIA, Ca²⁺ channel blocker of N-type produced a differential decrease in excitability and PAC area of different types of fibers. In fast fibers PAC area was depressed by 70% with mibefradil, indicating a possible over-expression of T-type channels during maintenance of neuropathic pain. Fibers C showed increased PAC area with respect to sham rat and presented minor depression of PAC (30%) in the presence of the two Ca²⁺ channel blockers.

Introducción

El dolor es una respuesta ante estímulos potencialmente dañinos originados sobre tejidos, tal como la piel y las vísceras, que se transmite al sistema nervioso central (SNC) por neuronas con somas en el ganglio de la raíz dorsal (GRD; Fig. 1). Esta forma de dolor, conocido como nociceptivo, es autoprotector y puede tratarse con fármacos como opioides o antiinflamatorios no esteroideos. En contraste, el dolor neuropático es un fenómeno en el que hay sensación de dolor aún sin un estímulo doloroso. La función de las fibras nociceptivas y no nociceptivas está alterada, presentándose dos fenómenos: alodinia, dolor ante estímulos no nociceptivos; e hiperalgesia, respuesta exacerbada a los estímulos nocivos. Además, este dolor puede ser un efecto secundario a enfermedades como diabetes, cáncer, herpes, entre otras (Julius y Basbaum, 2001; Ueda, 2006; Hogan, 2007; Todorovic y Jevtovic-Todorovic, 2013). El dolor neuropático se produce principalmente por una lesión del tejido nervioso central o periférico, no obstante se desconoce cómo se inicia, desarrolla y mantiene. Los estudios enfocados en entender la génesis y mantenimiento del dolor neuropático tienen como fin, determinar los cambios que se producen en las fibras aferentes primarias lesionadas y no lesionadas adyacentes, en las neuronas de segundo orden dentro del asta dorsal de la médula espinal, donde se procesa la información de dolor que es enviada a los centros supraespinales, y que pueden presentar cambios plásticos relevantes para el procesamiento de la información.

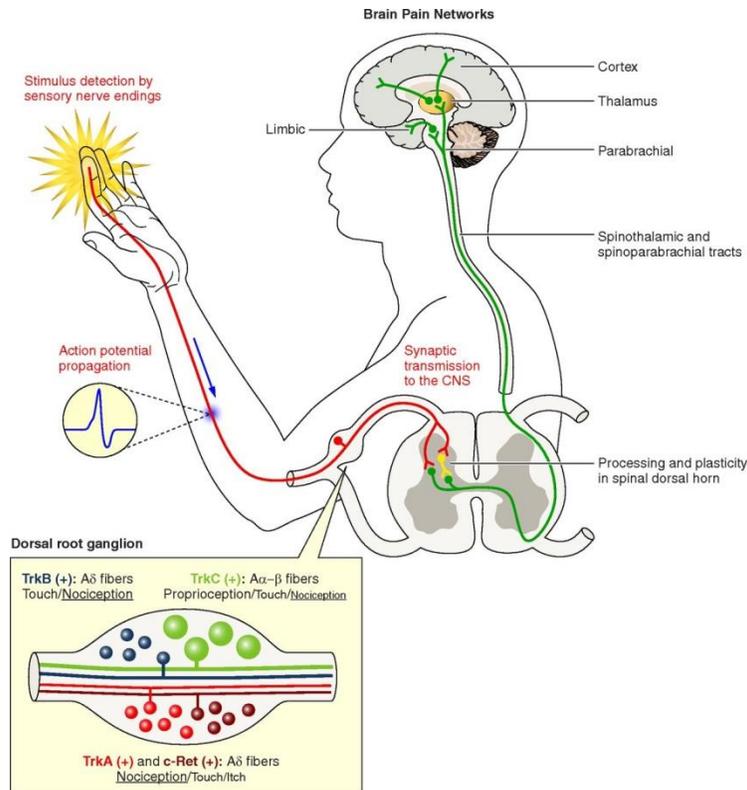


Figura 1. Transmisión de un estímulo doloroso. En la periferia, el estímulo es traducido a potenciales de acción (PA) que viajan a través de las fibras aferentes primarias hasta la médula espinal, pasando por el GRD. Al llegar a la médula espinal activa neuronas de segundo orden que llevan el mensaje hasta centros de integración superiores como el tálamo y la corteza (Imagen tomada de: Bourinet et al., 2014).

Neuronas del ganglio de la raíz dorsal

Las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GDR) son células pseudo monopolares, con el soma dentro del ganglio trigeminal o espinal, y un axón que va desde la periferia hasta llegar a la médula espinal donde hace sinapsis con neuronas de segundo orden. Estas neuronas son heterogéneas dentro del ganglio, pero en general, se pueden clasificar en no nociceptivas, responden a estímulos de baja intensidad mecánicos, térmicos o químicos, y nociceptivas, responden a estímulos de alta intensidad. Por su velocidad de conducción (VC) y el umbral de activación se pueden dividir en cuatro grupos, dentro de los

mamíferos: $A\alpha$ (30-55 m/s); $A\beta$ (14-30 m/s); $A\delta$ (2.2-8 m/s) y C (< 1.4 m/s) (Djouhri y Lawson, 2004; Fang et al., 2005; Bourinet et al., 2014). Las fibras de conducción rápida incluyen las aferentes cutáneas o del huso muscular, están mielinizadas, con somas grandes a medianos (> 25-30 μm) y bajo umbral de activación. Las fibras $A\alpha$ son más rápidas que las $A\beta$, pero el rango en el que conducen es similar en comparación con otras aferentes. Las fibras de conducción lenta regularmente son nociceptivas, fibras C y $A\delta$, tienen una VC baja, alto umbral de activación, somas pequeños (<25 μm), con axones no mielinizados (Julius y Basbaum, 2001; Djouhri y Lawson, 2004). Sin embargo, tanto el tamaño como la VC de las diferentes aferentes se llegan a traslapar, dificultando su identificación. Por lo tanto, estas variables no son suficiente para distinguir entre los diferentes tipos de celulares sensoriales, es necesario incluir otros parámetros electrofisiológicos y citohistoquímicos (Harper y Lawson 1985b). Además, las variaciones en VC de las fibras de aferentes primarias en diferentes individuos de la misma especie puede estar afectada por factores como la edad, peso, tipo de nervio, temperatura de la preparación y el sitio donde se mide la latencia.

Por otro lado, la proyección hacia la médula espinal de las fibras aferentes primarias no es homogénea. Las fibras nociceptivas tipo C, $A\delta$ y $A\beta$ (en parte) proyectan principalmente hacia las láminas I y II, en ese orden, y las fibras $A\alpha/\beta$ de bajo umbral pueden proyectar hacia la lámina III y IV (Djouhri y Lawson, 2004) o la IX, donde se localizan las motoneuronas, como son las aferentes Ia, que inervan a los husos musculares y están dentro de las más rápidas.

Transducción del dolor en las neuronas nociceptivas: receptores y sustancias liberadas

Los PA de fibras nociceptivas como las C y algunas fibras A β , comparados con los de las fibras A α y δ , tienden a ser de mayor duración y con presencia de inflexiones. Estas inflexiones se han relacionado con una corriente entrante de calcio que podría indicar la dependencia al calcio del PA (Matsuda et al., 1976).

El glutamato y sustancia P (SP) son los neurotransmisores liberados por las fibras nociceptivas. Además, otras sustancias químicas se expresan en las fibras nociceptivas que pueden ser liberadas como: bradiquinina, histamina, ATP, prostanoïdes, protones, iones de potasio, entre otros (Ueda et al., 2006).

Desde el punto de vista químico, las fibras C se pueden dividir en una subpoblación peptidérgica que contiene SP y expresa TrkA (receptor tirosincinasa A); y otra, que se identifica por expresar receptores P2X₃ (canales iónicos dependientes de ATP) e isolectina B₄ (IB4) (Julius y Basbaum, 2001). Todas estas fibras se consideran sensibles a capsaicina, la sustancia activa del chile, que estimula canales de potencial de receptor transitorio (TRP) como TRPV1 y TRPV2 sensible a estímulos térmicos y TRPV4, a estímulo mecánico (Djouhri y Lawson, 2004; Julius y Basbaum, 2001). Ante la presencia de estímulos térmicos y mecánicos estos canales se activan permeando cationes como calcio, sodio y magnesio que despolarizan las terminales y generan potenciales de acción que pueden producir la liberación de sustancias proinflamatorias en las terminales periféricas (Ueda, 2006). El ATP, ligando de los receptores P2Y y P2X, es liberado por las fibras nociceptivas produciendo la activación parácrina de estos receptores en fibras vecinas aumentando su excitabilidad (Julius y Basbaum, 2001). También, la excitabilidad de las neuronas nociceptivas se incrementa por la presencia de protones liberados al medio

extracelular, por la acidosis generada en el tejido dañado (Julius y Basbaum, 2001; Nickel et al., 2007).

Otros factores importantes que participan en la algesia son: el factor de crecimiento neural (NGF, por sus siglas en inglés), promoviendo la hipersensibilidad térmica a capsaicina; prostaglandina E₂ (PGE₂) que contribuye a la sensibilización periférica, por medio de proteínas G, modificando la dependencia al voltaje de canales de Na⁺ y reduciendo el umbral de disparo para generar un PA (Bourinet et al., 2014).

Canales iónicos expresados en las aferentes nociceptivas

Las neuronas nociceptivas expresan un amplio repertorio de canales iónicos que determinan su excitabilidad y forma del PA, los más relevantes son los de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ (Wasman y Samponi, 2014).

Dentro de los canales de sodio se han identificado nueve diferentes tipos denominados Nav1.1 a Nav1.9, con características funcionales y farmacológicas distintas. Particularmente, los canales de Na⁺ resistentes a la tetrodoxina (TTX) se encuentran presentes en las fibras nociceptivas como Nav1.9 que parece ser exclusivo en estas neuronas, además de los canales Nav1.8 y Nav1.7, el segundo de ellos no es resistente a TTX, aunque también se presentan en el resto de las neuronas del GRD (Djouhri y Lawson, 2004). Regularmente los canales de Na⁺ sensibles a TTX como Nav1.1, Nav1.6 y Nav1.7 se expresan en fibras tipo A.

El canal Nav1.7 se localiza en las neuronas sensoriales desde sus arborizaciones periféricas hasta la terminal central en el asta dorsal de la médula espinal, se activa por ligeras despolarizaciones cercanas al potencial de reposo (Waxman y Zamponi, 2007). El canal Nav1.8 se expresa en los somas del GRD y en sus axones, se activa a voltajes

despolarizantes, es resistente a la inactivación y produce la mayor parte de la corriente entrante durante un PA, favoreciendo la aparición de ráfagas en neuronas despolarizadas (Waxman y Zamponi, 2014). Los canales Nav1.9, producen corrientes no inactivantes a potenciales de membrana ligeramente hiperpolarizados o cercanos al potencial de reposo. Estos canales no participan en la generación del PA pero mantienen la despolarización de las células y facilitan pequeñas despolarizaciones incrementando así la excitabilidad (Waxman y Zamponi, 2014).

Los canales de K^+ regulan el potencial de membrana en reposo y la repolarización de la célula después de producir un PA. Estos canales constituyen una familia diversa que puede dividirse en canales de K^+ activados por voltaje (Kv), activados por un ion, canales de K^+ de dos poros y rectificadores de entrada (Waxman y Zamponi, 2014). Los canales Kv presentan una expresión diferencial en las neuronas del GRD, K_{v1-7} y K_{v9} , son determinantes para la frecuencia de disparo, duración de la espiga y activación del PA. Particularmente los canales $K_{v1.1-1.2}$ contribuyen a las corrientes de K^+ en las terminales mecanosensitivas.

Los canales de Ca^{2+} constituyen la vía despolarizante neuronal más importante mediada por la difusión de Ca^{2+} . Por su dependencia al voltaje se dividen en dos grupos: de bajo umbral de activación (LVA, por sus siglas en inglés) o tipo T y de alto umbral de activación (HVA, por sus siglas en inglés) que incluye a los subgrupos L, N, P/Q y R, los que se distinguen por su farmacología y propiedades funcionales. Su distribución es heterogénea dentro del SNC y periférico: los canales N, P y Q se asocian principalmente con las terminales nerviosas presinápticas donde facilitan la liberación de neurotransmisores (NT); los canales tipo L participan en la activación de enzimas dependientes de calcio, transcripción génica, en el músculo esquelético y cardíaco en el acople excitación contracción, y en las

motoneuronas, neuronas de la médula espinal y de núcleos supraespinales como en el estriado, donde producen mesetas de potencial (Hounsgaard y Kiehn, 1988); por último, los canales T modulan la excitabilidad subumbral de las neuronas, al menos en el GRD y tienen un papel relevante en la actividad marcapaso (Bourinet et al., 2013). En general el papel y distribución de cada canal Ca_v depende del subtipo neuronal donde se expresan y pueden participar en el crecimiento neuronal, diferenciación, muerte, expresión génica y plasticidad (Hogan, 2007).

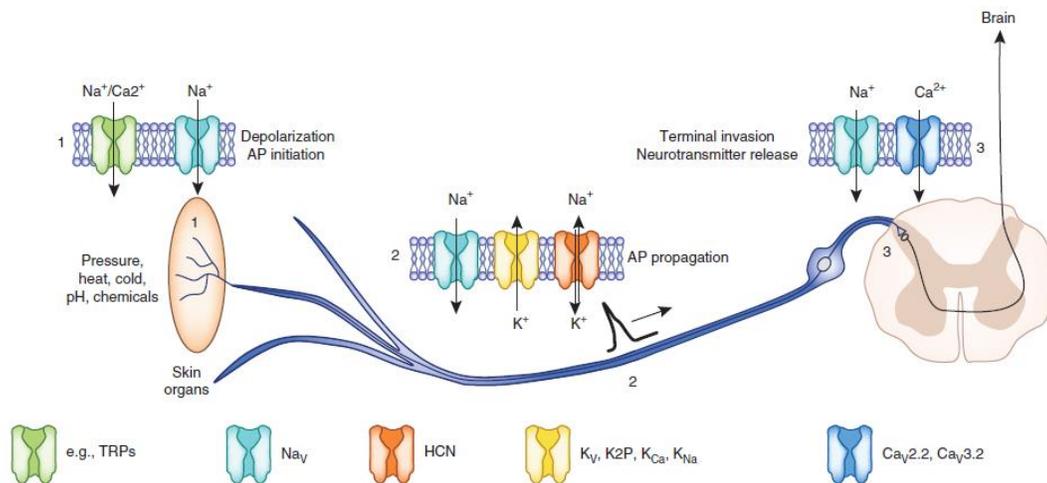


Figura 2. Canales iónicos presentes en las fibras aferentes primarias nociceptivas. La diversidad de canales iónicos presentes en las neuronas nociceptivas no es homogénea a lo largo del axón y son determinantes en la transmisión del estímulo doloroso (Imagen obtenida de Waxman y Zamponi, 2014).

Mecanismos celulares involucrados en el dolor neuropático

En el establecimiento del dolor neuropático se presenta un incremento en la excitabilidad neuronal en el nervio dañado, somas del GRD, médula espinal e incluso en centros de integración ascendentes/descendentes, que producen una sensibilización periférica y central. El aumento de la excitabilidad neuronal involucra muchos procesos que van desde liberación de sustancias proinflamatorias, actividad ectópica, desinhibición central y

periférica y la ramificación de fibras (Nickel et al., 2012). Por ejemplo, la liberación de bradiquinina desde el nervio lesionado causa permeabilidad de tejido, dilatación vascular y estimulación de terminaciones nerviosas sensoriales adyacentes.

En la médula espinal, las fibras nociceptivas liberan CGRP, SP y glutamato, este último activa receptores NMDA en las neuronas de segundo orden, produciendo una despolarización que mantiene a estos receptores activados, contribuyendo a la prolongación de la acción del estímulo doloroso. De acuerdo a lo anterior, la hiperexcitabilidad que se produce en sitio de la lesión, o en el GRD, produce incremento de excitabilidad en las neuronas centrales que reciben información nociceptivas, dando lugar a un aumento en el campo receptivo de los estímulos que antes no eran nociceptivos (alodinia) y en el incremento de la sensación dolorosa (hiperalgesia) (Nickel et al., 2012; Ueda, 2006). Además, es posible que la lesión nerviosa cause una reorganización de las fibras sensoriales aferentes primarias que llegan a las diferentes láminas de la médula espinal, promoviendo la sensibilización, este mecanismo puede incluir diversos fenómenos, como lo proponen Campbell y Meyer (2006), que implican una mayor liberación de NT o un aumento en la eficacia sináptica, involucrando a todo el sistema de comunicación que hay entre un nervio periférico y centros de integración supraespinales.

Además, es posible que el dolor neuropático se facilite por una disminución de la inhibición presináptica de la transmisión nociceptiva, debido a una expresión a la baja de receptores inhibitorios en las terminales de aferentes primarias o a la degeneración de las interneuronas inhibitorias (Ueda, 2006).

Cambios en la expresión de canales iónicos de Na⁺ y K⁺ en las neuronas sensoriales

El comienzo, desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático va acompañado de cambios en la expresión de los canales iónicos en la membrana de las aferentes primarias (Waxman y Zamponi, 2014). Por ejemplo dentro del cambio fenotípico que puede ocurrir en las fibras y somas del GRD, el canal TRPV1, característico de fibras nociceptivas no mielinizadas, comienza a expresarse en fibras no nociceptivas, mielinizadas e insensibles a capsaicina, produciendo una sensibilización de estas fibras ante estímulos térmicos (Ueda, 2006).

En el dolor neuropático la actividad ectópica de neuronas aferentes parece estar relacionada con la sobreexpresión de canales de Na⁺, en la terminal periférica de los axones lesionados, donde se ha encontrado acumulación del canal Nav1.7, disminuyendo el umbral de disparo y aumentando la frecuencia de respuesta ante un estímulo supraumbral (Waxman y Zamponi, 2007). Los canales Nav1.9, también sobreexpresados, juegan un papel importante en generar corrientes persistentes de sodio (Nickel et al., 2012). Además, la expresión 'de novo' del canal Nav1.3, con rápida recuperación de la inactivación, puede facilitar el disparo repetitivo de neuronas del GRD del nervio lesionado y bajar el umbral de activación que causa descargas espontáneas y ectópicas (Ueda, 2006; Waxman y Zamponi, 2014).

Dentro de los cambios que se producen en la membrana celular, parece haber una disminución en la expresión de canales de K⁺. Los canales K_v actúan como inhibidores de la señalización de dolor en fibras aferentes, una expresión a la baja de estos canales produce hiperexcitabilidad neuronal, particularmente hiperalgesia térmica (Waxman y Zamponi, 2014). Por otro lado, los canales de K⁺ de doble poro (K2P) participan en mantener hiperpolarizado el potencial de reposo de la célula y regulan la señalización del dolor mecanosensitivo y térmico. Los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ participan en la AHP

(hiperpolarización postpotencial, por sus siglas en inglés) y por lo tanto en el patrón de disparo neuronal, si estas corrientes se ven disminuidas, aumenta la sensibilidad de las fibras que los poseen. Los canales de $K_{Ca^{2+}}$ también participan en la AHP y en la adaptación de la tasa de disparo (Waxman y Zamponi, 2014).

Expresión de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en el dolor neuropático

Ha sido muy difícil determinar cuál es el papel que juegan los canales de calcio dependientes de voltaje dentro del dolor neuropático, algunos reportes indican que ante un daño neuronal su expresión aumenta en asociación con una sensibilización central y periférica (Nickel et al., 2012). Además, aunque no se ha logrado determinar cómo están distribuidos dentro de las neuronas del GRD, el uso intratecal de bloqueadores produce analgesia, sugiriendo que algunos de ellos se encuentran sobreexpresados a nivel pre y postsináptico (Bourinet et al., 2013; Hogan, 2007; Todorovic y Jevtovic-Todorovic, 2013).

Expresión de canales de calcio HVA en el dolor neuropático

Estudios moleculares han mostrado que los canales HVA constan de tres subunidades: una proteína formadora del poro conductor de iones llamada $Ca_v\alpha_1$ y dos subunidades auxiliares $Ca_v\beta$ y $Ca_v\alpha_2\delta$. En general se considera que los canales N están involucrados en el dolor neuropático, esto se basa en la reducción de la hiperalgesia térmica y la alodinia mecánica por la aplicación de antagonistas de estos canales, reduciendo la hiperalgesia térmica y alodinia mecánica (Ueda, 2006). Al parecer todas las toxinas que bloquean este canal tienen actividad analgésica, como GVIA, MVIIA, FVIA, CVID, CVIE y CVIF. Uno de los principales problemas de utilizar estas toxinas es su interacción con el canal en

múltiples estados, lo que puede producir un abatimiento de su función en el estado fisiológico (Waxman y Zamponi, 2014; Bourinet et al., 2014).

Hogan (2007) registrando las corrientes de Ca^{2+} HVA en neuronas del GRD propone que las corrientes de calcio de alto umbral como la tipo L se manifiestan en células pequeñas; mientras que la corrientes de tipo N en todos los tipos celulares; la del tipo P/Q y R únicamente en células grandes a medianas en ratas control. Mientras que en ratas neuropáticas Hogan y cols. Encontraron que estas corrientes disminuyen en el soma de las neuronas, lo cual puede provocar una menor activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , aumentando la duración del PA y una disminución en la AHP. Sin embargo, en el trabajo de Murali y colaboradores (2014), se propone que durante el dolor neuropático, la corriente N se incrementa en las neuronas medianas y grandes, mientras que la corriente P/Q disminuye. Además, los potenciales postsinápticos registrados en las neuronas de segundo orden, evocados por estimulación de neurona sensoriales, mostraron la misma sensibilidad a la aplicación de un bloqueador de los canales tipo N en ratas control y neuropáticas, sugiriendo que no hay una sobreexpresión de estos canales en la terminal sináptica en el dolor neuropático (Murali et al., 2014).

La subunidad auxiliar $\text{Cav}\alpha_2\delta_1$, que entre sus funciones está regular el tráfico de la subunidad α_1 del canal tipo N hacia la membrana plasmática de las terminales, se ha reportado que se sobreexpresa en el soma y axón de las neuronas sensoriales durante el dolor neuropático (Bauer et al., 2009). En apoyo a estos resultados, se encontró que la gabapentina y la pregabalina, son drogas de alta efectividad en el tratamiento del dolor neuropático, tienen como blanco la subunidad $\text{Cav}\alpha_2\delta_1$, lo que reduce el tráfico de canales

a la terminal y por consiguiente la liberación de transmisor (Bauer et al., 2009; Luo et al., 2002).

Expresión de canales de calcio tipo LVA en el dolor neuropático

A nivel molecular y bioquímico, los canales de calcio tipo T están conformados por una sola subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$ de aproximadamente 250 KDa. En los mamíferos se expresan tres tipos de canales T que se distinguen por su farmacología y cinética, denominados $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ y $\text{Ca}_v3.3$ (Carbone et al., 2014). Los canales de calcio tipo T se han asociado con la transmisión de estímulos dolorosos en el SCN y periférico, se localizan pre- y postsinápticamente. En las aferentes primarias y son muy importantes por el control que ejercen en la excitabilidad neuronal subumbral, participando en el desarrollo y mantenimiento del dolor nociceptivo y neuropático (Todorovic y Jevtovic-Todorovic, 2013). Particularmente, los canales $\text{Ca}_v3.2$ están presentes en diferentes subtipos neuronales del GDR, se ha sugerido que la actividad de estos canales aumenta bajo el dolor neuropático (Bourinet et al., 2014; Yue et al., 2013). La sobreactivación de los canales de Na^+ por la sobreexpresión de canales de calcio tipo T, parece participar en el aumento de excitabilidad de fibras nociceptoras (Ueda, 2006). Aunque otros autores como Hogan (2007) proponen que estos canales se encuentran principalmente en células medianas y disminuye su densidad de corriente durante el dolor neuropático.

Entre las posibles funciones que se propone pueden desempeñar los canales de calcio tipo T en la señalización neuropática, se encuentran la disminución del umbral de activación de fibras nociceptivas, el aumento de la neurotransmisión de las aferentes primarias en la terminal central, la amplificación del PA, pudiendo participar en la mecanocepción, ya que

se encuentra altamente expresados en células A δ (Waxman y Zamponi, 2014). Sin embargo, aún quedan un número de preguntas por resolver sobre el papel de estos canales en el dolor neuropático, particularmente: cómo interaccionan estos canales con otros tipos de canales iónicos en las neuronas del GRD, si la expresión de estos canales es homogénea en la neurona que los expresa y finalmente, si estos canales se encuentran sobreexpresados en la membrana celular. Además, no se conocen los mecanismos que determinan el incremento de la actividad de los canales tipo T en el dolor neuropático (Bourinet et al., 2014).

Planteamiento del problema

La relevancia atribuida a los canales de Ca²⁺ en el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático y en la analgesia, se sostiene en el empleo de herramientas moleculares, farmacológicas, pruebas de comportamiento y registro electrofisiológico de los somas del GRD. Resaltando la participación de los canales del tipo N y T en la producción de analgesia. Sin embargo, algunas de las evidencias electrofisiológicas presentan datos contradictorios que no apoyan los hallazgos farmacológicos y de comportamiento, particularmente en la participación de estos canales en el PA. Los registros electrofisiológicos del PA en el soma de las neuronas del GRD parece no modificarse lo suficiente como para apoyar la hipótesis que el incremento en su duración produce una mayor liberación de transmisor, y por lo tanto una sensibilización de las neuronas en el asta dorsal. El interés particular de este trabajo, es dilucidar cuál de los cambios observados en las corrientes de Ca²⁺ en el soma durante el dolor neuropático inciden en el PA que viaja a lo largo de los axones hasta la terminal central.

Hipótesis

Los canales de calcio de bajo (LVA) y alto umbral (HVA) de activación se sobreexpresan en la membrana de los axones de las neuronas sensoriales durante el dolor neuropático, modificando su excitabilidad, así como la amplitud y duración del potencial de acción compuesto (PAC).

Objetivo General

Mediante el registro extracelular del potencial de acción compuesto del nervio espinal L5 en ratas control y neuropáticas, se determinará la participación de los canales de Ca^{2+} de bajo y alto umbral de activación, en los diferentes tipos de neuronas sensoriales.

Objetivos particulares

1. Se registrarán los potenciales de acción compuesto en las raíces dorsales del nervio espinal L5 de ratas control y neuropáticas de los diferentes tipos de fibras aferentes evocados por la estimulación del cabo distal del nervio espinal L5.
2. Mediante el empleo de bloqueadores de los canales de Ca^{2+} LVA y HVA, mibefradil y ω -conotoxinaGVIA, respectivamente, se determinará su participación en la regulación de la excitabilidad y la generación del potencial de acción compuesto, de las fibras rápidas ($A\alpha/\beta$) y lentas $A\delta$ y C en el nervio espinal L5 de ratas control y neuropáticas.

Método

Animales de experimentación

Se utilizarán ratas hembra de la cepa Wistar con un peso de 150 a 200 g. Se mantendrán bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12 h) a una temperatura de 22°C y con libre acceso a agua y alimento. El cuidado y manejo de los animales será de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y todos los experimentos se realizarán la guía de aspectos éticos para la evaluación del dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983).

Inducción de dolor neuropático mediante la ligadura de los nervios espinales

Se utiliza el modelo de ligadura de nervios espinales L5 y L6, propuesto por Kim y colaboradores (1992) (Fig. 3A). Las ratas serán anestesiadas con una mezcla de ketamina (50 mg/Kg) y xilacina (10 mg/Kg) vía i.p. y se colocarán en posición prona para ser afeitadas de la espalda baja. Posteriormente, se realizará una incisión larga de 2 cm a nivel de la cresta ilíaca para acceder a los nervios espinales lumbares izquierdos L5 y L6, que serán ligados fuertemente con sutura de seda 6-0. En las ratas sham los nervios sólo se expondrán pero no se ligarán. Esta ligadura produce axotomía y degeneración distal e inflamación de los axones no ligados que corren junto con los lesionados (Hogan, 2007). Una ventaja de este modelo es permitir la evaluación funcional de los elementos lesionados y no lesionados.

Prueba de umbral táctil

Después de 14 días de la cirugía, las ratas serán colocadas en cajas de plástico con fondo de malla metálica durante 30 minutos para ambientarse. Para evaluar alodinia táctil se empleará el método de up-down, que consiste en estimular la pata de la rata con filamentos de von Frey en un rango de 2.36 a 6.65 g (Fig. 3B). Las ratas que retiren la pata con ante estímulos menores a 4 g de presión, en el umbral de respuesta se considerarán con desarrollo de alodinia (Chaplan y cols., 1994).

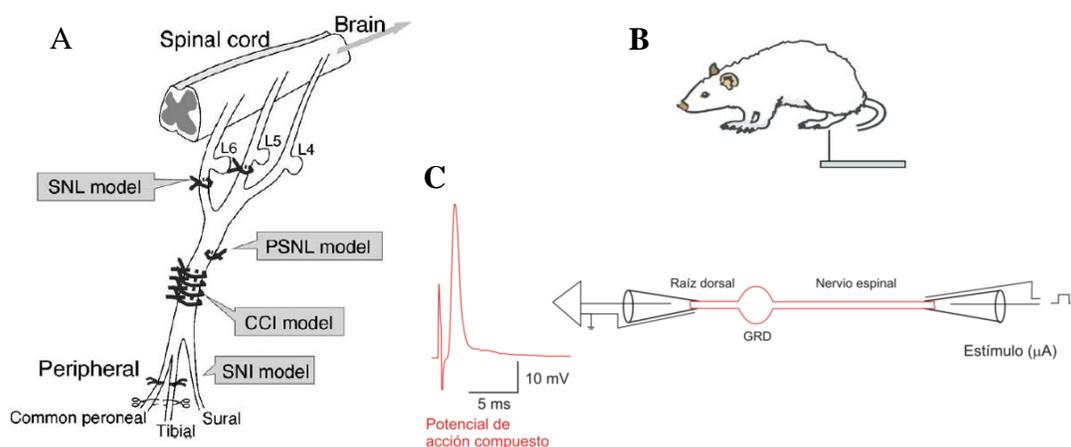


Figura 3. Método utilizado para inducir dolor neuropático en ratas y registro electrofisiológico extracelular. En A, se observan diferentes modelos para producir dolor neuropático que involucran la ligadura del nervio espinal total o parcial (modelo CCI o PSNL), ligadura de nervios difusos (peroneo común y tibial), y finalmente el modelo desarrollado por Kim y Chung (1992), que se utiliza en este trabajo, basado en la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 (SNL). En B se ejemplifica la evaluación de comportamiento utilizando filamentos de Von Fray. C, esquema del arreglo experimental empleado para estimular el extremo distal del nervio espinal y registrar el potencial de acción compuesto en el extremo cefálico de la raíz dorsal L5, mostrado en el trazo de la izquierda. (Imágenes A y B obtenidas de Ueda, 2006).

Registro electrofisiológico de los PAC del nervio in vitro

El ganglio L5 en continuidad con el nervio espinal y la raíz dorsal del lado ipsilateral y contralateral a la lesión se obtendrán de ratas control y neuropáticas. Las ratas serán anestesiadas con una mezcla de ketamina (50 mg/Kg) y xilacina (10 mg/Kg) vía i.p., se colocarán en posición prona para realizar una laminectomía que permitirá disecar y extraer

el tejido de interés (Fig. 3C). Los tejidos se colectarán en un vaso de precipitado con solución Harman para rata (en mM: 117 NaCl, 3.6 KCl, 2.5 NaHCO₂, 1.2 MgCl₂, 25 C₆H₁₂O₆, 1 CaCl₂ burbujeada con gas de O₂ (95%) y CO₂ (5%). El registro de los PAC, se obtendrá colocando el nervio en una cámara de registro llena con solución a temperatura ambiente (22-24°C). El extremo libre del nervio espinal se succionará con un electrodo de vidrio conectado a un estimulador eléctrico de pulsos rectangulares, mientras que el extremo libre de la raíz dorsal se succionará con un electrodo de vidrio (Fig. 3C) conectado a un amplificador de AC (WPI). Los PAC se evocarán por estimulación del extremo distal del nervio espinal L5 con pulsos rectangulares de corriente de 300µs de duración y serán registrados en el extremo central con una amplificación de x100 con filtros DC-3KHz. Los trazos de 100 ms serán digitalizados con una tarjeta DIGIDATA (Molecular Devices) a 50 KHz y serán almacenados en el disco duro de una computadora para posterior análisis.

Se determinará el umbral (U) de los PAC partiendo de una corriente de 0 µA hasta que aparezca un potencial de acción que presente una ocurrencia de 50 %. Al estabilizarse el registro del PAC evocado por la estimulación a 30xU por 5 minutos, se procederá a estimular a intensidades de 1, 3 y 50xU, para obtener el PAC de las diferentes fibras aferentes primarias, con la mayor sincronización posible que permita hacer un análisis de la amplitud y del área bajo la curva.

Análisis de los PAC

Se registrarán 30 trazos a una frecuencia de 0.2 Hz para cada intensidad de estimulación. Se aplicarán bloqueadores selectivos, mibefradil y ω-conotoxina, de los canales de Ca²⁺ tipo T y N, respectivamente. Se medirá el área bajo la curva de los 30 PAC, evocados en medio

control y en presencia de los fármacos. Se obtendrá un trazo promedio de los 30 registros para cada intensidad (Fig. 3C).

Resultados

Las 19 ratas a las que se les realizó la ligadura de los nervios espinales (LNE) L5 y L6 mostraron alodinia táctil en un 100%. Al ser evaluadas con filamentos de Von Fray presentaron respuesta de retirada de la pata ipsilateral a la ligadura con una fuerza menor a 4g, en tres intentos consecutivos. En cambio, a las ratas sometidas a la exposición de los nervios, denominadas sham, mostraron respuesta a la prueba con filamentos de Von Fray mayor a 6 g.

a) Umbral de activación y área del PAC en fibras sensoriales A β y C durante el dolor neuropático

Una vez que se montaron los nervios para el registro electrofisiológico extracelular, además de la diferencia en la respuesta conductual, se encontró una caracterización distintiva en el umbral de activación de las fibras y tamaño del PAC.

Los registros de los PAC evocados a 1.1xU, 3xU y 50xU se realizaron en el nervio espinal L5 de ratas sham y neuropáticas ipsilateral al sitio de lesión.

Lo primero que se evaluó fue el umbral de activación del PAC, encontrándose que tanto en las fibras rápidas A α/β como en las lentas del tipo C, la corriente umbral se incrementó en más de 300% y 150%, respectivamente en el nervio espinal L5 de las ratas neuropáticas con respecto a las sham (Fig. 4).

Al evaluar el PAC de las fibras rápidas en L5 evocado con una estimulación 3xU se encontró que el área del PAC de las ratas neuropáticas disminuyó en 21.4 ± 0.09 % con respecto a las sham. Por el contrario, el componente C evocado con una estimulación 50xU

se incrementó en 40.5%. Es importante mencionar que la intensidad de 50xU, se encuentra cercano a producir la máxima respuesta de las fibras tipo C, por lo tanto el incremento en el área del PAC no se debe a un mayor número de fibras reclutadas.

Los resultados muestran que los cambios en el comportamiento van acompañados de cambios en la transmisión de la información en el nervio espinal lesionado que podrían ser muy importantes para entender la fisiopatología del dolor neuropático.

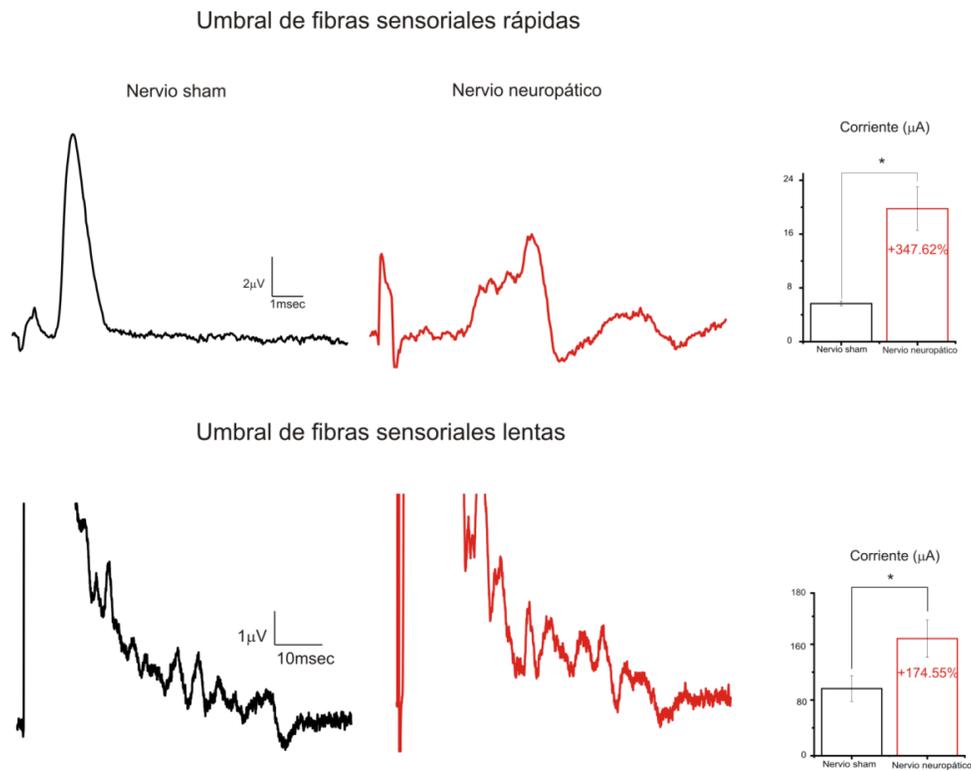


Figura 4. Trazos representativos de PAC de las fibras rápidas y lentas tipo C del nervio espinal L5. En la parte superior se observa el PAC evocado por estimulación 1.1xU en rata sham (trazo negro) y en neuropática. Obsérvese que el PAC de la rata neuropática tiene menor amplitud y para activarlo se requirió incrementar la corriente hasta un 347% más con respecto al control. En los trazos inferiores, se muestra el componente lento C, del nervio espinal de una rata sham (negro) y neuropática (rojo). De la misma manera, el umbral de activación es mayor, aunque sólo en un 150%, con respecto al nervio sham. Las gráficas muestran los promedios de los umbrales para las fibras rápidas y lentas. * indica diferencia estadísticamente significativa bajo la prueba de de Krustal Wallis, $p < 0.05$.

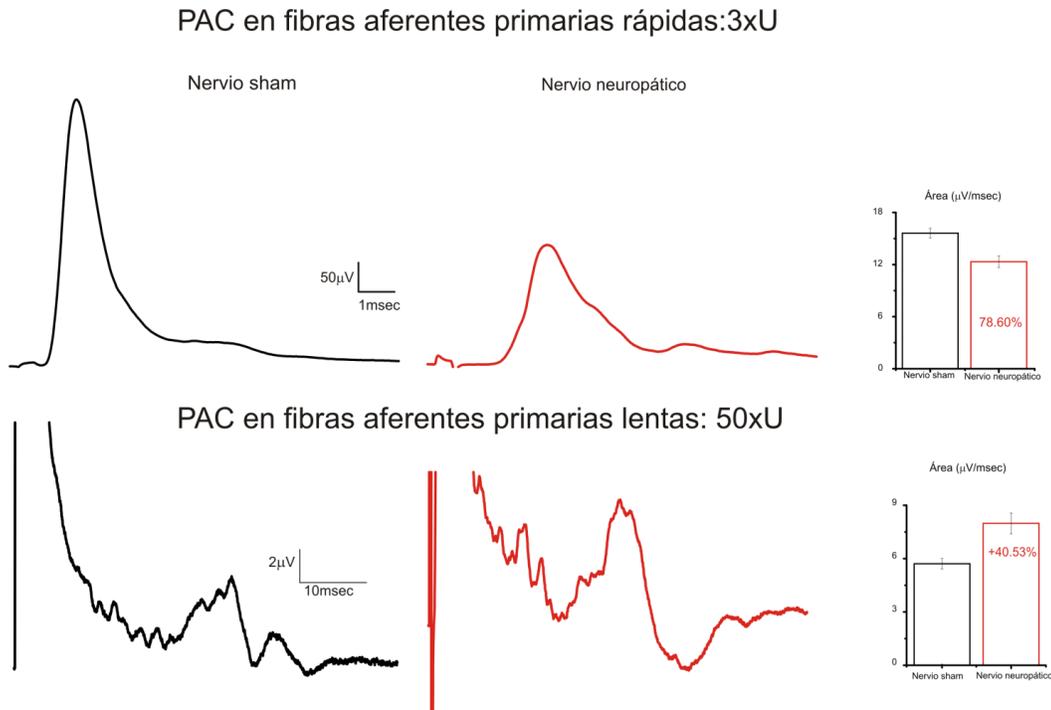


Figura 5. Trazos representativos de PAC de las fibras rápidas y lentas del tipo C del nervio espinal L5 evocados a 3xU. Se observa el PAC de fibras rápidas del nervio espinal L5 de una rata sham (trazo negro) y con dolor neuropático (trazo rojo), en este trazo representativo el PAC del nervio neuropático tiene un tamaño de la mitad al que corresponde el nervio sham. En los trazos inferiores se muestra el componente lento C, del mismo nervio de una rata sham (trazo negro) y de una neuropática (trazo rojo). Contrario a lo que ocurrió con las fibras rápidas el PAC promedio en el nervio neuropático es mayor, alrededor de tres veces, que el del nervio de la rata sham. Las gráficas de barras muestran el área bajo la curva para las fibras rápidas y lentas, * indica diferencia estadísticamente significativa bajo la prueba de Kruskal Wallis, $p < 0.05$.

b) Efecto de los bloqueadores para de los canales de calcio tipo T y N en el PAC de fibras sensoriales rápidas

En la Fig. 6 se muestran los trazos representativos del PAC de las fibras rápidas evocados por estimulación de 3xU en ratas sham y neuropáticas. La aplicación de mibefradil (500 nM), bloqueador de los canales de Ca^{2+} del tipo T, produjo una disminución en el área del PAC de las ratas sham y neuropáticas de 54% y 83% ($n = 7$; $n=6$), respectivamente (gráficas de barras). Además, la latencia del PAC, medida como el intervalo de tiempo que

transcurre entre el artefacto del estímulo y el inicio del potencial, aumentó 14 % en las ratas sham y 19% en las neuropáticas. Estos resultados indican que los canales de calcio tipo T se expresan en las fibras rápidas regulando su excitabilidad, ya que con el mismo estímulo se reclutaron menos axones sobre expresándose en estas fibras durante el dolor neuropático. La adición ω -conotoxina (ω -CTX-GVIA), bloqueador de los canales tipo N, produjo una disminución adicional en el PAC de las ratas sham y neuropáticas de 34% y 5%, respectivamente. La latencia se incrementó hasta un 26% en el nervio sham y 50% en el neuropático. Al igual que ocurre con los canales tipo T, los N también regulan la excitabilidad de los axones, aunque podría ser con menor intensidad, indicando la importancia que tiene el Ca^{2+} en la generación de los potenciales de acción.

Si las fibras aferentes primarias rápidas están participando ahora en la conducción de estímulos dolorosos no nociceptivos, la combinación de estos dos bloqueadores permite controlar su actividad y probablemente los efectos que produzcan en la señalización de dolor a nivel central, en la médula espinal.

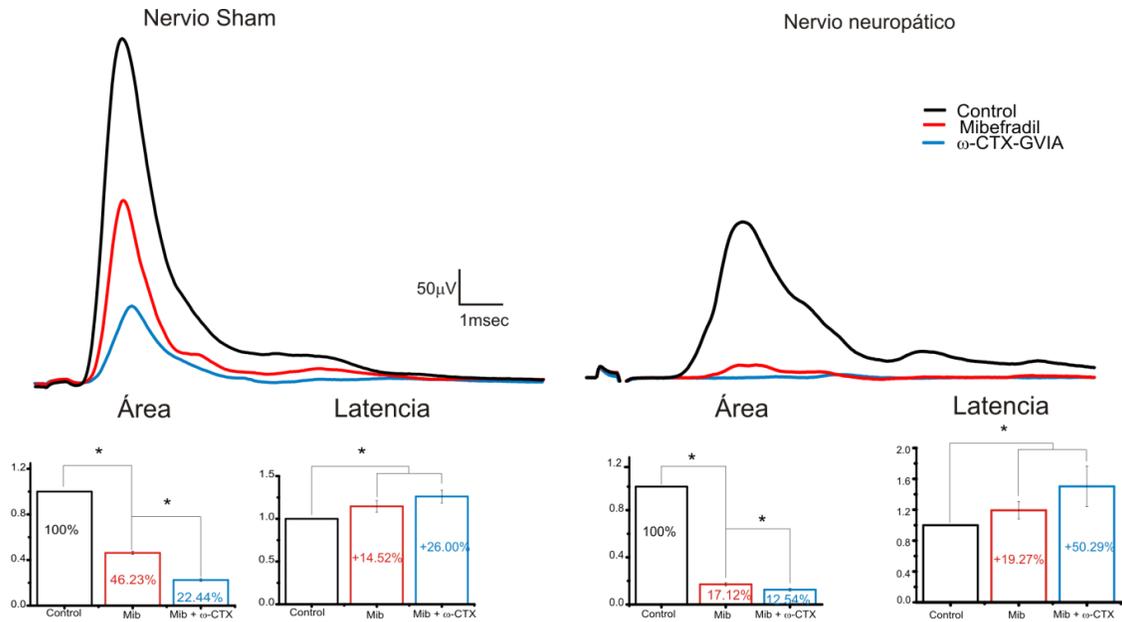


Figura 6. Los bloqueadores mibefradil y ω -CTX-GVIA anulan el PAC en el nervio neuropático. Se presenta el PAC rápido evocado a 3xU de rata sham (panel de la izquierda) y neuropática (panel de la derecha) en medio control (negro y en presencia de mibefradil (trazo rojo) y ω -CTX-GVIA (trazo azul). En las ratas neuropáticas el PAC se deprimió prácticamente por completo ante el uso combinado de ambos boqueadores, disminuyendo el área bajo la curva y aumentando la latencia. Sin embargo, en la rata sham (panel de la izquierda) el PAC se mantiene, aunque disminuye, ante la presencia de los bloqueadores. La latencia también disminuye de menor medida en este nervio. Las gráficas de barras muestran la diferencia de tamaño en cada caso. * indica diferencia estadísticamente significativa bajo la prueba de Krustal Wallis, $p < 0.05$.

La activación de las fibras C se evaluó aplicando un estímulo 50xU en el nervio espinal que junto con la raíz dorsal midió entre 10 y 15 mm. Esta longitud permitió registrar un PAC de mayor amplitud debido a sincronización de las fibras lentas que tuvo un latencia de 15-30 ms después de aplicado el estímulo (Fig. 5).

Los bloqueadores de canales de calcio utilizados, tienen un efecto diferente en el PAC de las fibras lentas con respecto al de las fibras sensoriales rápidas. En este caso, a pesar de tener un tamaño mayor el PAC del nervio neuropático que el sham, los bloqueadores afectan de la misma forma en ambos nervios. De esta forma, el mibefradil reduce a un 74%

el PAC del nervio sham y a un 70%, únicamente 4% menos de PAC para el nervio neuropático. La ω -CTX-GVIA, reduce el PAC de forma similar dejando en ambos casos poco más del 50%. Asimismo, la latencia aumenta en un 20% en ambos casos ante el uso combinado de los fármacos.

Aun así, si el PAC es mayor en el nervio neuropático en condiciones control puede decirse que a pesar de perder el mismo porcentaje en área del PAC que el nervio sham, el tamaño del PAC queda de un tamaño y forma similar al del nervio neuropático ante el uso combinado de estos dos bloqueadores, lo cual puede justificar las propiedades analgésicas que su tratamiento ha presentado (Bourinet et al., 2014).

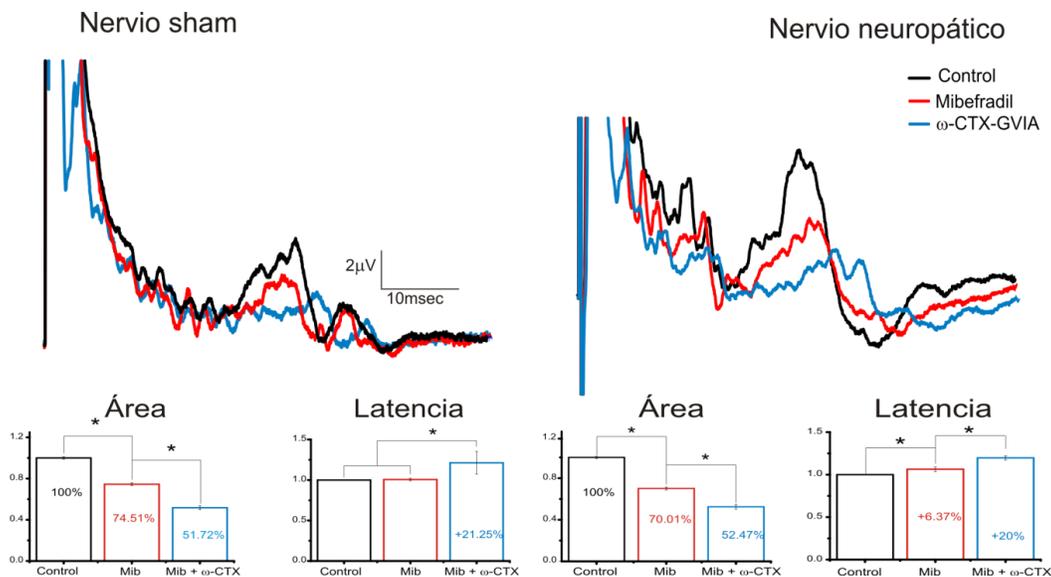


Figura 7. Acción de mibefradil y ω -CTX-GVIA en área y duración del PAC de fibras sensoriales lentas C. El PAC de fibras lentas registradas de un nervio espinal de rata neuropática y sham en medio fisiológico (negro), en presencia de mibefradil (rojo) y en presencia de ω -CTX-GVIA, presenta cambios similares en porcentaje de disminución de área del PAC y aumento de latencia. Las gráficas de barras muestran la diferencia de tamaño en cada caso. * indica diferencia estadísticamente significativa bajo la prueba de Krustal Wallis, $p < 0.05$.

c) Efecto de los bloqueadores, mibefradil y ω -CTX-GVIA en el PAC de fibras sensoriales rápidas y lentas en el nervio neuropático contralateral al sitio de la lesión

El dolor neuropático, como se ha mencionado, es un proceso complejo que se extiende de forma regional e incluso sistemática. Como ejemplo, la sensibilización central forma parte de los fenómenos presentes en el dolor neuropático, alodinia e hiperalgesia. Si tales cambios llegan a producir modificaciones en la dinámica neuronal del asta dorsal en la médula espinal es posible que también se produzcan cambios en la sensibilidad de otros nervios, adyacentes y contralaterales a la lesión. Es por eso que en este trabajo se decidió la actividad electrofisiológicas del nervio neuropático contralateral a la lesión bajo las mismas condiciones en las que se trabajó con el nervio neuropático ipsilateral. Y los resultados encontrados fueron interesantes e inesperados.

En primer lugar, como se observa en la figura 8, se identificó que el tamaño del área bajo la curva del PAC en el nervio contralateral neuropático es menor, no sólo con respecto al nervio sham, sino también con el nervio neuropático ipsilateral. Pareciendo encontrar una mayor degeneración en la conducción de las fibras en estos nervios. Sin embargo, en cuanto al efecto de los bloqueadores, el resultado es diferente. Al utilizar el mibefradil, bloqueador de canales de calcio tipo T, se obtiene que el PAC se reduce en un 33%, lo cual implica que tiene un efecto mayor al obtenido en el nervio sham (46%) pero menor al del nervio neuropático ipsilateral (17%), es posible que el dolor neuropático afecte la expresión de canales de calcio tipo T en la membrana axonal de estos nervios, o al menos sus propiedades biofísicas. Por otro lado, el bloqueador de canales tipo N, produjo efectos similares en el nervio contralateral neuropático y el ipsilateral. El PAC prácticamente se perdió al evocarlos con una intensidad de 3xU. La combinación de estos dos bloqueadores

muestra que estos canales podrían estar causando sensibilización contralateral, y por lo tanto, podrían participar un aumento en la percepción de dolor neuropático a nivel regional. El efecto en la latencia, ante los dos bloqueadores es similar a lo que ocurre en el nervio sham, aumenta hasta un 25%. Lo cual podría indicar que el aumento de la expresión o actividad de canales de calcio en estos nervios no participa directamente en su excitabilidad sino en el volumen de entrada de calcio intracelular.

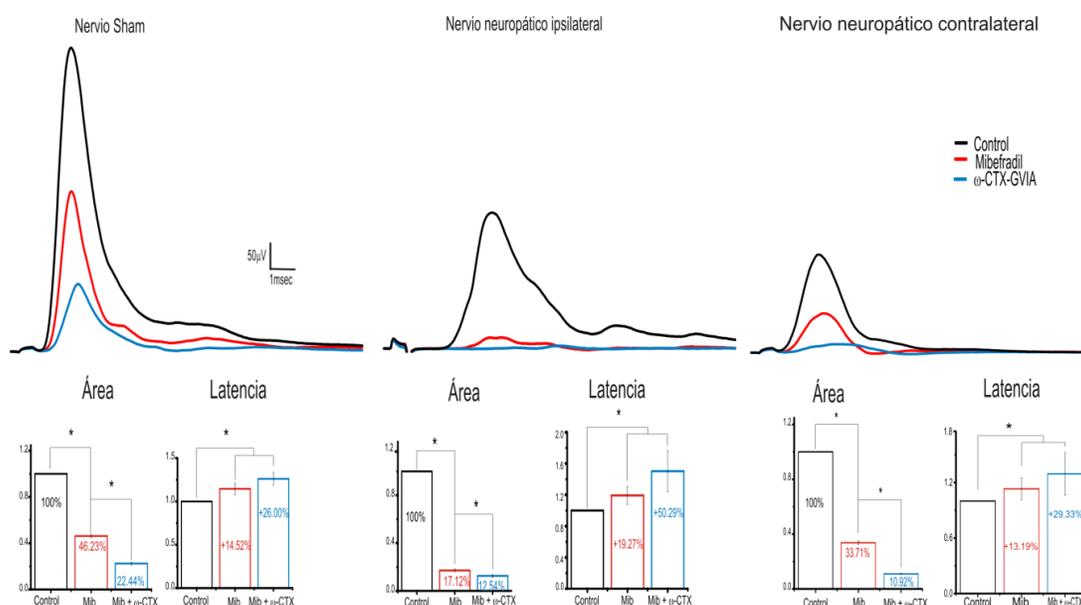


Figura 8. Características del PAC en el nervio neuropático contralateral. Se identificaron las propiedades del PAC en el nervio neuropático contralateral bajo las mismas condiciones en las que se evaluó al nervio neuropático ipsilateral y sham. Se encontró que el área del PAC es menor con respecto al nervio neuropático ipsilateral, imagen al extremo izquierdo. El mibefradil no tiene un alcance tan amplio de afección en el PAC, disminuye a un 33% mientras que en el ipsilateral se reduce hasta un 17%. Sin embargo Al utilizar ω-CTX-GVIA el PAC prácticamente desaparece como en el nervio ipsilateral, indicado que el dolor neuropático tiene un alcance más allá de la lesión local. La latencia se modifica de forma similar al PAC del nervio sham, aumentando hasta en un 25%. Las gráficas de barras muestran la diferencia de tamaño en cada caso. * indica diferencia estadísticamente significativa bajo la prueba de Kruskal Wallis, $p < 0.05$.

El PAC de las fibras C también se evaluó para el nervio contralateral neuropático. En este caso, el área no aumenta como en el nervio neuropático ipsilateral, sino que es similar al nervio sham. El efecto del mibefradil es similar a un 74% de área. Sin embargo, la ω -CTX-GVIA reduce el potencial 15% más que en los otros nervios, llegando a quedar en un 34%, lo cual implica un mayor efecto de este bloqueador en el nervio contralateral a la lesión que podría relacionarse con una mayor expresión o actividad. En cuanto a la latencia, presenta un aumento similar al nervio sham, sin cambios significativos. Probablemente este nervio no tenga mayor excitabilidad pero sí una entrada de calcio mayor y una posible mayor liberación de neurotransmisor en la terminal del asta dorsal en la médula espinal.

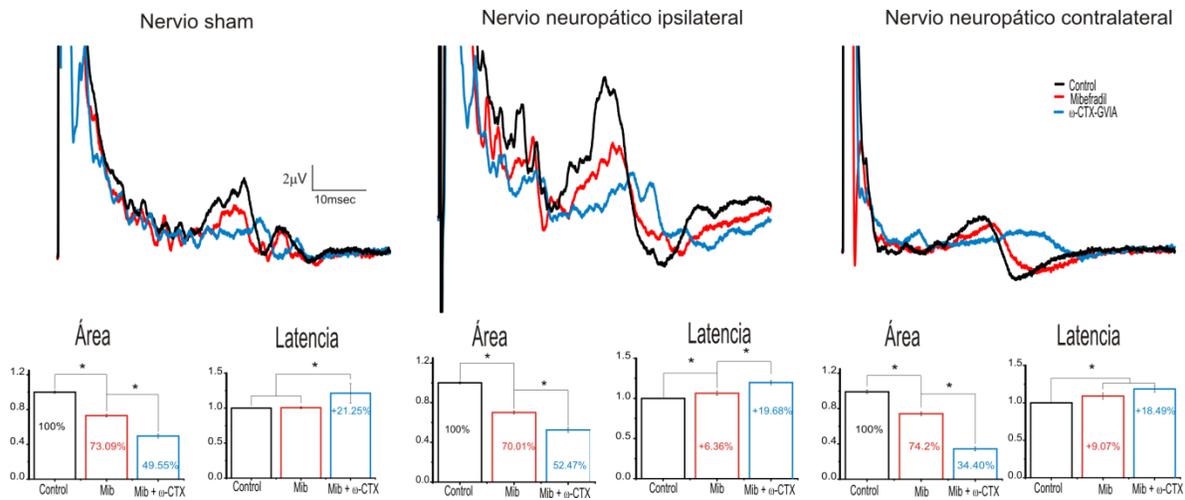


Figura 9. PAC de fibras C en el nervio neuropático contralateral. En el extremo izquierdo se encuentra el PAC del nervio neuropático contralateral. Bajo condiciones control no cuenta con un tamaño aumentado, el efecto del mibefradil es muy similar a lo que ocurre en los otros dos nervios, dejando un 74% del original. Sin embargo, la ω -CTX-GVIA tiene un mayor efecto en este nervio dejando un área final de 34%, mientras que en los otros dos casos es ligeramente mayor al 50%. La latencia se modifica de forma similar en los tres nervios. Las gráficas de barras muestran la diferencia de tamaño en cada caso. * indica diferencia estadísticamente significativa bajo la prueba de Kruskal Wallis, $p < 0.05$.

Discusión

El dolor neuropático producido por la ligadura de los nervios espinales va acompañado por cambios periféricos y centrales. En este trabajo se evaluó la participación de los canales de Ca^{2+} tipo T y N, de bajo y alto umbral de activación, respectivamente, en la activación y propagación del PAC en las fibras rápidas del tipo $A\beta$ y lentas del tipo C. Los efectos de los bloqueadores de estos canales se evaluaron midiendo el cambio en el área del PAC registrados en las ratas neuropáticas con respecto de las ratas sham con intensidades de estimulación umbral (U), 3xU y 50xU.

a) Umbral de activación de las fibras $A\alpha/\beta$ y C

El umbral de activación de las fibras rápidas y lentas presentó un incremento de 347% y 172%, respectivamente (Fig. 4). Considerando que el estímulo se aplica a unos 5 mm del sitio donde se produjo el neuroma por la ligadura, la disminución en la excitabilidad de ambos tipos de fibras podría estar ocurriendo por el proceso inflamatorio, lo que podría explicar que no se produzca actividad ectópica en esta región, como ocurre en el soma (Liu et al., 2000). Impidiendo así el flujo de corriente y produciendo la necesidad de aumentar la cantidad de corriente en el estímulo para alcanzar los niveles de activación del PAC que se observan en el nervio sham.

La inflamación que produce el neuroma puede disparar cambios en la excitabilidad de las neuronas, que llegan a mantenerse aún después de la recuperación de la herida, acompañados de la llegada de neutrófilos y macrófagos y producción de citocinas proinflamatorias, que pueden incrementar la expresión de canales como los de Na^+ resistentes a TTX en los somas del GRD (Abdulla et al., 2003). Sumado al proceso de

inflamación, la degeneración valeriana de los nervios puede provocar la pérdida de fibras sensoriales, particularmente las rápidas, que como se observa en la figura 5, muestran un PAC disminuido con respecto al del nervio sham, a pesar de estimular a la intensidad con la que se produce el máximo de respuesta para estas fibras. Por otro lado, aunque el umbral de activación de las fibras lentas también se encuentra incrementado en las fibras lentas se puede observar un PAC mayor que el del nervio sham mostrado a la misma intensidad de corriente correspondiente, 50xU, indicando que los efectos producidos por el modelo de ligadura en estas fibras es diferente al que ocurre en las fibras sensoriales rápidas.

En el modelo de axotomía del nervio ciático Abdulla y Smith (2001) reportan cambios en donde disminuye la excitabilidad solo de las células pequeñas y medianas, correspondientes a las neuronas nociceptivas, sin que se afecte la de las rápidas no nociceptivas. Sin embargo, cuando la axotomía produce autotomía, proceso en el que el individuo tratado se come la pata lesionada, ocurren cambios en excitabilidad de las células grandes, pero no en las células pequeñas nociceptivas. La respuesta de las células medianas es, por lo general intermedia. En conclusión, estos autores adjudican que los cambios observados en las propiedades eléctricas de las neuronas del GRD dependen del tipo de modelo de dolor neuropático.

b) Área del PAC en ratas sham y neuropáticas.

El área del PAC de las fibras rápidas de las ratas neuropáticas fue menor que el de las sham, de acuerdo a lo reportado por Wall y Devor. (1981), quienes encontraron que después de producir la lesión, el área del PAC de las fibras rápidas del nervio espinal lesionado empieza a decrecer. Por el contrario, el área del PAC de las fibras lentas de ratas neuropáticas se incrementó. Los potenciales de acción se evocaron en el extremo caudal a

aproximadamente 5 mm del neuroma, producido por la ligadura, con una intensidad supramáxima que reclutó la mayor parte de los axones del tipo C, por lo tanto el incremento en el área del PAC no se produjo por un mayor reclutamiento de fibras, sino por posible incremento en el área del potencial de acción en cada fibra. Registros del somas en GRD en vivo o aislados, han mostrado incrementos en la fase de repolarización del potencial de acción en las neuronas correspondientes a fibra nociceptivas, que se han atribuido a un decremento en la expresión de canales de K^+ , lo que facilitaría la activación de más canales de Ca^{2+} y por lo tanto una prolongación de la fase de repolarización del potencial de acción (Hogan, 2007).

c) Los canales de calcio dependientes de voltaje tipo T modulan la excitabilidad de las fibras sensoriales rápidas $A\beta$

En presencia de mibefradil, bloqueador de los canales de calcio tipo T, se produjo una depresión significativa del PAC de las fibras de más rápidas (3xU), indicando la expresión de estos canales de Ca^{2+} en la membrana axonal. Este efecto fue más intenso en las ratas neuropáticas que en las sham, donde el PAC se redujo un poco menos del 50% (Fig. 6). Lo cual sugiere que estos canales participan en la regulación de la excitabilidad y podrían estar sobre-regulados en las ratas neuropáticas, como sugieren Todorovic y Jevtovic-Todorovic, (2013).

La participación de los canales de calcio, particularmente tipo T y N, ha sido controversial, unos grupos proponen que su expresión disminuye, mientras que otros que aumenta, estas discrepancias podrían deberse al tipo de modelo de dolor neuropático que se empleó y al sitio donde se evaluó su expresión, por ejemplo, médula espinal o somas del GRD.

Aun así los resultados de este trabajo apoyan la propuesta de un incremento en la expresión o activación de los canales tipo T en las fibras sensoriales rápidas. Esta conclusión está de acuerdo con las evidencias obtenidas en estudios conductuales, que han mostrado que la aplicación intratecal de mibefradil reduce la alodinia e hiperalgesia mecánica (Chen et al., 2015). Además, Chen y cols. empleando inmunofluorescencia demostraron la presencia de la variante Cav3.2 en el GRD del nervio espinal L5, colocalizados con parvalbúmina, IB4⁺ y CGRP, moléculas expresadas en neuronas de nocicepción térmica y mecánica (Chen et al., 2015). Asimismo, en el modelo de compresión crónica de los nervios espinales L4 y L5, los canales Cav3.2 están sobreexpresados en la lámina I, donde se localizan las neuronas inervadas por las fibras nociceptivas, esto fue demostrado por extracción del mRNA del GRD de los nervios espinales L4 y L5 provenientes de las ratas lesionadas. La aplicación de mibefradil revirtió la hipersensibilidad táctil (Wen, 2010). Debido a que esta prueba se realizó 5 días después de la lesión, es posible que estos canales estén participando no solo en el mantenimiento del dolor neuropático sino también en su desarrollo. Por lo tanto, puede concluirse que el efecto antinociceptivo del mibefradil podría ser central o periférico. La expresión diferenciada de los canales de calcio se produce en el GRD, un problema de radical importancia es saber si estos canales llegan a la terminal, en donde su expresión no sólo produce el aumento de la excitabilidad del nervio lesionado, sino también, un incremento en la liberación de transmisores excitadores sobre las neuronas de segundo orden de la vía de transmisión del dolor. La evaluación directa de la expresión de los canales de Ca²⁺ en las terminales centrales representa un problema de alta nivel de dificultad para realizarlo, por esta razón en este trabajo se decidió evaluar su expresión en los axones de la raíz dorsal, donde probablemente su expresión sea semejante la que tiene en la terminal. Jacus y colaboradores (2012), abordaron este problema estudiando el papel

de los canales de Ca^{2+} registrando los potenciales miniatura en las neuronas de segundo orden inervadas por las fibra nociceptivas. Aplicando TTA-P2, un bloqueador selectivo de los canales tipo T, observaron una disminución de presencia de potenciales miniatura sin que se redujera la amplitud, lo que indicó la expresión de los canales T en las terminales presinápticas de las fibras nociceptivas, sin que se hayan observado cambios semejantes en las neuronas de láminas más profundas. Estos autores no observaron ningún efecto del TTA-P2 en animales knock-out del gen que codifica la subunidad α_{1H} del canal tipo T. Además, la participación de los canales tipo T fue apoyada por el marcaje inmunohistoquímico que mostró localización del canal en fibras no peptidérgicas (IB4^+) y peptidérgicas (CGRP).

Dada su localización, los canales de calcio tipo T pueden estar participando en la regulación de la eficacia sináptica por potenciación a largo plazo, dependiente de actividad que se genera en neuronas aferentes y neuronas de la lámina I. La expresión del canal de calcio tipo T Cav3.2 a nivel periférico y central indica que podría tener una participación muy relevante en la sensibilización a lo largo de la vía de señalización del dolor.

Contrario a las evidencias discutidas anteriormente hay reportes que indican lo contrario, esto es, una disminución en la expresión de los canales tipo T durante el dolor neuropático. Por ejemplo, realizando registros intracelular o en modalidad de célula completa de somas de neuronas del GRD, Hogan (2007), Murali et al., (2014) y Abdula y Smith (2013) observaron un decremento o ausencia de corrientes tipo T en animales neuropáticos. Algo relevante de mencionar, es referente a la síntesis de los canales, aunque ésta se realiza en el soma su inserción en la membrana podría ser diferencial entre el soma, el axón y las terminales, por ejemplo, Bauer y cols (2009) encontraron que durante el dolor neuropático la subunidad $\alpha_{2\delta}$ se sobreexpresa en el soma y es transportada a lo largo del axón hasta la

terminal central, donde podría estar participando en la inserción de los canales de calcio tipo N, sin que se observe su posible inserción en la membrana plasmática de los axones.

Como se ha mencionado, el dolor neuropático es un proceso complejo y dinámico que produce cambios en la expresión de canales en las neuronas nociceptivas, y no nociceptivas, que participan en la sensibilización central y periférica. Por lo tanto, en el proceso de desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático la participación de las fibras rápidas no nociceptivas es tan relevante como las nociceptivas, pudiendo ser más relevantes las primeras, como lo demuestra el experimento donde se eliminan o desensibilizan periféricamente las fibras nociceptivas con capsaicina o resiniferartoxina sin que se afecte la alodinia táctil (Shir y Seltzer, 1990; Takami et al., 2009). En otro trabajo, se demostró que el desarrollo del dolor neuropático, inducido por lesión del nervio ciático, la alodinia táctil se acompañó de actividad ectópica en las fibras sensoriales rápidas A δ , que presentaron una disminución en la corriente necesaria para activar potenciales de acción únicos o en ráfagas. Estas fibras liberan sustancia P, glutamato y otras sustancias que podrían participar en la sensibilización central (Liu et al., 2000). Al mismo tiempo, proponen que la actividad ectópica se origina principalmente en el soma neuronal dentro del GRD y no en el sitio de la lesión, por lo tanto los somas parecen ser el origen electrogénico de la actividad espontánea, aunque la aparición de la actividad ectópica depende del tipo de lesión, ya que los cambios cinéticos y metabólicos que se producen por la lesión nerviosa dependen de la distancia entre el ganglio y la interrupción del axón, entre más cerca se encuentre la lesión del ganglio la actividad ectópica se origina más temprano. Esta actividad puede producirse por un aumento en la conductancia de Na⁺, ya sea por sobre expresión o cambio en la cinética de los canales, cabe recordar que los canales de

calcio tipo T se activan a niveles de potencial de membrana cercanos al reposo y si estos se encontraran sobre expresados podrían estar participando en la actividad ectópica espontánea que se produce al poco tiempo de realizar la lesión.

Por otro lado, la participación de las fibras aferentes primarias A β no se descarta en el dolor neuropático, ya que puede ocurrir una reorganización de la médula espinal o ramificación de estas fibras hacia láminas relacionadas con la transducción del dolor, aunque estos procesos pueden ser establecidos a largo plazo. Además, las fibras A β pueden modificarse después de la lesión produciendo cambios rápidos en la expresión de BDNF y SP dentro del GRD, el cual también participa en la sensibilización central (Campbell y Meyer, 2006).

d) Participación de los canales de Ca²⁺ tipo N en los PAC evocados en fibras sensoriales rápidas A β

Los canales de calcio tipo N participan en la corrientes de calcio en las terminales excitadoras de las neuronas sensoriales en el asta dorsal de la médula espinal, y también pueden participar en la regulación de canales de K⁺ dependientes de calcio que regulan la excitabilidad neurona (McCallum et al., 2011). En general se ha observado que el uso de bloqueadores para los canales tipo N tiene efecto analgésico en el dolor neuropático, lo que se refuerza con la reducción de inflamación y de síntomas relacionados al dolor en animales con delección genética de estos canales (Saegusa et al., 2001).

En este trabajo, el uso del bloqueador de canales de calcio tipo N, ω -CTX-GVIA, produjo una disminución del área PAC remanente, después de aplicar mibefradil, en las fibras sensoriales rápidas, al grado de prácticamente anularlo por completo, dejando solamente el 12% del área, mientras que en la rata sham se conservó hasta un 22%. Aparentemente, la participación de los canales tipo N es menor que la de los canales tipo T, en el dolor

neuropático inducido por LNE. Pero dada su participación en la liberación de neurotransmisor en la terminal central, su intervención podría jugar un papel importante en la transducción del dolor.

La misma controversia que hay sobre la expresión y función de los canales tipo T ocurre para los tipo N. Los trabajos publicados indican incremento en su regulación y otros aseguran una disminución de la expresión en los somas del GRD. En este trabajo se demostró la posibilidad de que estos canales estén sobre expresados en las neuronas sensoriales rápidas del nervio lesionado. En este trabajo se observa que es posible que se encuentren sobre-expresados o al menos más activos en las fibras sensoriales rápidas del nervio lesionado. Y aunque la atención sobre estos canales se ha enfocado en somas pequeños y medianos, nociceptivos a nivel fisiológico, y no sobre las neuronas grandes de donde provienen las fibras sensoriales rápidas. Aun así, en las fibras sensoriales de tamaño medio, que están dentro del rango de las rápidas estudiadas en este trabajo, se encuentra aumenta su regulación en el dolor neuropático, por lo que podrían tener un papel relevante en la transmisión del mensaje nociceptivo al asta dorsal de la médula espinal, facilitando procesos como potenciación a largo plazo, aumento de eficacia sináptica y sensibilización central, además que el incremento en la entrada de calcio mayor puede producir cambios en la expresión génica.

De la misma forma que se ha estudiado a las canales tipo T, los canales de calcio tipo N han sido evaluados con bloqueadores farmacológicos y manipulación genética. En el trabajo de Yang y Stephens (2009) por ejemplo se ha encontrado que estos canales junto con los tipo R participan en la transmisión nociceptiva y en los mecanismos espinales de hiperalgesia bajo el modelo de ligadura parcial del nervio ciático en el que se utilizó un Knock-out para estos canales y se registraron las corrientes de Ca^{2+} por medio de la técnica célula completa

en neuronas medianas y pequeñas, lo cual es coherente con nuestros resultados ya que un aumento de la respuesta sensorial al dolor puede estar acompañada por un PAC magnificado y por lo tanto de una mayor liberación de neurotransmisor en la terminal. Asimismo en el trabajo de Saegusa y colaboradores (2001) reiteran estos resultados mostrando un ratón deficiente en estos canales que cuenta con una respuesta menor ante estímulos dolorosos que inducen inflamación y reduce los síntomas de la neuropatía. A pesar de la eficiencia como analgésicos, el uso terapéutico de los ω -conopéptidos ha producido efectos secundarios severos como deficiencias motoras. Los efectos de estas toxinas no solamente son evidentes en neuronas del GRD, Matthews y Dickenson (2001) aplicaron espinalmente el mismo bloqueador para canales tipo N y observaron, bajo el registro electrofisiológico extracelular de la región superficial del asta dorsal en la médula espinal, que se produce una inhibición eléctrica en respuestas neuronales, en comparación con los organismos control. Y como se ha mencionado, un incremento en la actividad de aferentes primarias después de daño periférico puede producir una mayor liberación de neurotransmisores excitatorios como glutamato, SP y CGRP lo cual podría hiperexcitar a las neuronas en la médula espinal.

Aunque la entrada presináptica en esta área del asta dorsal se adjudica a neuronas sensoriales nociceptivas, pueden por ramificación, también estar participando las fibras sensoriales rápidas que han sido estimuladas por liberación de sustancias proinflamatorias en el neurona a producir neurotransmisores excitatorios. (Liu et al. 2000).

e) Los canales de calcio dependientes de voltaje tipo T y N no afectan de manera particular el PAC de las fibras sensoriales lentas.

Al aplicar los bloqueadores de canales de calcio tipo T y N no se observaron cambios importantes en el PAC de las fibras sensoriales lentas de los nervios sometidos a la lesión, en comparación con los nervios de las ratas sham. Mibefradil redujo un 70% el PAC y ω -CTX-GVIA lo deja en un 50% aproximadamente, para ambos casos.

De hecho, la mayor parte de los trabajos realizados ya sea en favor del aumento de la expresión de canales o disminución de los mismos, no muestran características particulares a los PA producidos por las fibras lentas, al menos, una vez que el dolor neuropático se ha establecido. McCallum y colaboradores (2011) registrando las corrientes excitadoras en células medianas disociadas del GRD en ratas con dolor neuropático inducido por LNE L5, encontraron que las corrientes de calcio entrante producidas por canales de alto umbral, tipo N, estaba disminuida y además determinaron que la densidad de corriente de estos canales es menor en neuronas de ratas neuropáticas, no por una menor expresión de los mismo sino por menor probabilidad de apertura provocado por cambios en la fosforilación del canal. Cabe mencionar que además de ligar el nervio L5 también lo seccionan, lo cual puede producir diferentes efectos comparando con sólo producir la ligadura, ya que al seccionar el nervio por completo puede perder la estimulación de factores neurotróficos como NGF o BDNF que promueven la expresión de canales de calcio, este último factor se expresa en neuronas pequeñas y medianas en el GRD, asociadas a la nocicepción. De hecho Miki y otros (2000) encontraron que la aplicación sistémica de BDNF en el modelo de dolor inducido por LNE, prolonga los efectos del dolor neuropático a altas dosis, particularmente la hiperalgesia mecánica. La unión de este factor con el receptor TrkB,

expresado por células medianas se asocia con una mayor expresión de canales de calcio tipo N, entre otros procesos de sensibilización.

A pesar de estos resultados, consideramos que es poco probable que disminuya la expresión de canales de calcio tipo N en el axón y la terminal, ya que la subunidad auxiliar $\alpha_2\delta$, que participa en la inserción de canales de calcio de alto umbral en la membrana, se ha demostrado que está sobre expresada. Como lo muestra el trabajo de Luo y colaboradores (2001), quienes encontraron que los niveles de mRNA de $\alpha_2\delta$ en los GRDs de L5 y L6 de ratas neuropáticas, se incrementa en función del tiempo después de la ligadura de los nervios espinales L5 y L6, además observan que se encuentra disminuye su expresión en organismos a los que se les trata de recuperar de la alodinia táctil. Los mismos resultados son encontrados por el grupo de Bauer (2009), quienes localizan con inmunohistoquímica la presencia de la subunidad $\alpha_2\delta$ en neuronas presinápticas de la región superficial del asta dorsal de la médula espinal, en el parte ipsilateral a la lesión y en la raíz dorsal que proyecta del GRD a la médula espinal, es decir a lo largo de todo el axón, independientemente del tamaño de las célula, indicando que podría estar ampliamente distribuida en todos los tipos de fibras sensoriales, y también en el neuroma. Dentro de este mismo trabajo se muestra que la aplicación de pregabalina alivia el dolor neuropático por una reducción del tráfico anterógrado de la subunidad $\alpha_2\delta$ en las terminales nerviosas que llegan a la médula espinal, además de impedir la inserción en la membrana sin afectar otros procesos celulares. Siguiendo esta misma línea, en el trabajo reciente de Zoidis y colaboradores (2014) plantean el uso de un análogo a la gabapentina, 2-aminoadamantane-1-ácido carboxílico (GZ4), que cuenta con un mecanismo de acción rápido, en pocas horas, sugiriendo una inhibición directa de las corrientes de calcio tipo N, en células HEK-293, por medio de una interacción de este fármaco con la subunidad $\alpha_2\delta$. Ya que al utilizar el recombinante de la

subunidad $\alpha_{1\beta}/\beta_3$, es decir sin la presencia de la subunidad $\alpha_2\delta$, encontraron que las corrientes de calcio tipo N estaban disminuidas y no obtuvieron efectos al aplicar GZ4, mostrando que se necesita de la presencia de esta subunidad para el control de la expresión de los canales tipo N en la membrana.

Entre los procesos en los que podría ser relevante la sobre expresión de los canales de calcio sería en la activación repetitiva de entradas sinápticas que produce potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) dependiente de actividad que intensifica y aumenta la eficacia sináptica de las fibras C. Ohnami y colaboradores (2010) investigaron el papel de canales de calcio tipo N registrando los potenciales de campo evocados por estimulación de fibras C bajo dolor crónico, en el modelo LNE, encontraron que ω -CTX-GVIA disminuye el potencial de campo tipo C, incrementado al producir el dolor crónico en comparación con organismos sham, de forma dosis dependiente. También se observó la contribución de las corrientes producidas por estos canales para el mantenimiento de LTP en el asta dorsal de la médula espinal. Es posible que la conotoxina deprima la liberación de glutamato y SP, por lo tanto disminuya la activación de receptores NMDA, que son clave para la inducción de LTP espinal.

En resumen, si bien no encontramos una sobre activación de los canales de calcio tipo N en las fibras sensoriales lentas durante el dolor neuropático, el incremento en el tamaño del PAC podría indicar una mayor entrada excitadora en la terminal sobre las neuronas de segundo orden del asta dorsal de la médula espinal. Aunque todavía hay una gran controversia sobre si estos canales se encuentran sobre expresados o no, al menos se tiene certeza que la subunidad $\alpha_2\delta$ se sobre-expresa y modula la inserción del canal en la membrana durante el dolor neuropático (Liu et al, 2001; Bauer y cols, 2009). Así que, a pesar de tener la misma proporción de bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo N con

conotoxina en las ratas sham y neuropáticas, la densidad de corrientes en estas últimas podría estar incrementada y participar en el fenómeno de hiperalgesia, contribuyendo a la sensibilización central asociada a desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático.

f) Sensibilización central y la posible participación del nervio contralateral en el dolor neuropático

Como se ha mencionado, durante el dolor neuropático no solo se sensibilizan las fibras aferentes primarias que llegan a la médula espinal, también se puede alterar la organización, expresión molecular y función de las neuronas presentes en el asta dorsal. Como describen Latremoliere y Woolf (2009), la sensibilización central puede desarrollarse por una estimulación repetida e intensa en donde participan fibras sensoriales nociceptivas y no nociceptivas, los cambios centrales son tales que se puede producir dolor ante un estímulo que antes era inocuo. La hipótesis general es que la entrada de fibras nociceptivas exacerbada sensibiliza el sistema nociceptivo, produciendo cambios en las propiedades funcionales de las neuronas del asta dorsal dependientes de la actividad, principalmente mediados por receptores NMDA, que puede ir desde fosforilación dependiente de la actividad hasta transcripción independiente de los canales y receptores que participan en la transducción del mensaje nociceptivo. En esta segunda etapa, la transcripción y síntesis de proteínas cambia la dinámica central y presenta larga duración de la sensibilización. Además, fibras no nociceptivas pueden reclutarse en la superficie del asta dorsal bajo procesos todavía no esclarecidos pero que apuntan hacia una migración de ramificaciones colaterales de las fibras aferentes primarias no nociceptivas hacia las láminas I y II donde se encuentran las neuronas de segundo orden nociceptivas. El incremento del Ca^{2+} intracelular puede ser la clave para la sensibilización central, que entra precisamente por los

receptores NMDA, y que además puede liberarse de reservorios intracelulares, llevando a la activación de cinasas que actúan sobre los receptores, aumentando la eficacia de los mismos receptores NMDA así como de canales iónicos presentes en la membrana, y también produciendo transcripción génica.

La sensibilización central es hasta ahora, el proceso que involucra la mayor parte de los cambios producidos durante el dolor neuropático en espacio y escala temporal. Como reiteran Latremoliere y Woolf (2009), las fibras C pueden iniciar y mantener la sensibilización central dependiente de actividad en el asta dorsal de la médula espinal, pero los cambios químicos y estructurales que ocurren en las fibras A pueden llevar al reforzamiento de la sensibilización, estas neuronas exhiben cambios masivos en transcripción que alteran sus propiedades de membrana, así como el crecimiento y función de la transmisión sináptica que involucra canales iónicos, transmisores y la maquinaria para la regeneración axonal. Okamoto y colaboradores (2001), observaron una reorganización funcional de las rutas sensoriales producida por la sección del el nervio ciático, evidenciada por la estimulación de la raíz dorsal y registrando en modalidad célula completa de neuronas en láminas superficiales del asta dorsal. Propusieron que las fibras sensoriales A β establecen contacto sináptico con interneuronas en la sustancia gelatinosa de láminas superficiales del asta dorsal, dando lugar a la percepción anormal del dolor ante estímulos no nociceptivos, suficientes para activar a las fibras A β que produjeron corrientes excitadoras(EPSCs) en las neuronas de la sustancia gelatinosa, así como un aumento de los eventos polisinápticos indicando la posible ramificación de estas aferentes hacia las interneuronas de la lámina I, igualmente aunque en menor medida aumentaron los eventos monosinápticos a tiempos prolongados de desarrollo de dolor neuropático, es decir, es

posible que se establezca una conexión sináptica entre las neuronas de segundo orden que trasducen el dolor y las fibras aferentes primarias A β .

Por supuesto, estos no son los únicos procesos que ocurren, se presenta cambios en los astrocitos, células T y microglia, que son estimuladas por la inflamación producida durante el desarrollo del dolor neuropático; también se ha documentado una posible pérdida de inhibición GABAérgica que aumentaría la actividad excitadora en el asta dorsal, pero estos eventos no pudieron ser abordados desde el enfoque de este trabajo, son observaciones muy controversiales.

Los cambios que produce la sensibilización central no se limitan al asta dorsal de la médula espinal, Sun y colaboradores (2001) observaron modulación supraespinal durante la manifestación de alodinia, después de seccionar la médula espinal, bloqueo de este fenómeno sin que se afectara la hiperalgesia térmica producida por el modelo LNE. Igualmente en las fibras aferentes A β , aumentó la entrada sináptica de las rutas supraespinales como la espinotalámica. Con el fin de reducir la alodinia táctil, estos autores realizaron una hemisección de la médula espinal contralateral a la lesión, por donde viajan la información que transmite el dolor a los núcleos supraespinales, sin que se produjera el resultado esperado, es decir, disminución de la entrada nociceptiva ascendente.

El punto de mencionar estos mecanismos donde el dolor neuropático se extiende más allá de los límites locales o regionales del dolor nociceptivo en cuanto a mecanismos de transducción del dolor, se debe a los efectos producidos por la evaluación del nervio contralateral a la lesión de tipo LNE realizado en este trabajo, en donde la contralateralización del dolor neuropático parece poder evaluarse en cambios dentro del PAC.

En primer lugar, el PAC de las fibras sensoriales rápidas está deprimido en el nervio neuropático contralateral con respecto al nervio sham de forma significativa, lo cual indicaría que los cambios producidos en el asta dorsal ipsilateral a la lesión podrían estar sensibilizando el asta contralateral y afectando las neuronas sensoriales. Esta sensibilización contralateral produce alodinia táctil después de 19 días de realizada la ligadura de los nervios espinales contralaterales (observación no publicada del Dr. Vinicio Granados y su grupo). Los resultados de este trabajo apoyan estos hallazgos, ya que mibefradil produjo un mayor decremento en el PAC en los nervios contralaterales a la lesión que en los de las ratas sham. Además, la latencia de los PAC presentó un incremento de 29% con respecto a las ratas sham, lo que sugiere una participación importante de los canales de calcio tipo T en la generación de los potenciales de acción.

Por otro lado, el PAC de las fibras sensoriales tipo C del nervio contralateral al seccionado en promedio fue semejante al registrado en las ratas sham. El bloqueador de canales de calcio tipo T redujo el PAC a los valores semejantes a los de los nervios neuropático ipsilateral a la lesión y sham, alrededor de un 74%, por lo que no se observan propiedades particulares. Sin embargo, al bloquear los canales tipo N con ω -CTX-GVIA se reduce el tamaño del PAC a un 34%, que corresponde a un 15% más de lo que ocurre en los otros dos nervios, sham y neuropático ipsilateral. Entonces, es posible que aunque el PAC aparentemente no tenga cambios a simple vista con respecto al nervio sham sí se encuentren sobre expresados o activos canales de calcio tipo N, coadyuvando a la sensibilización central por medio de un incremento en la liberación de neurotransmisor.

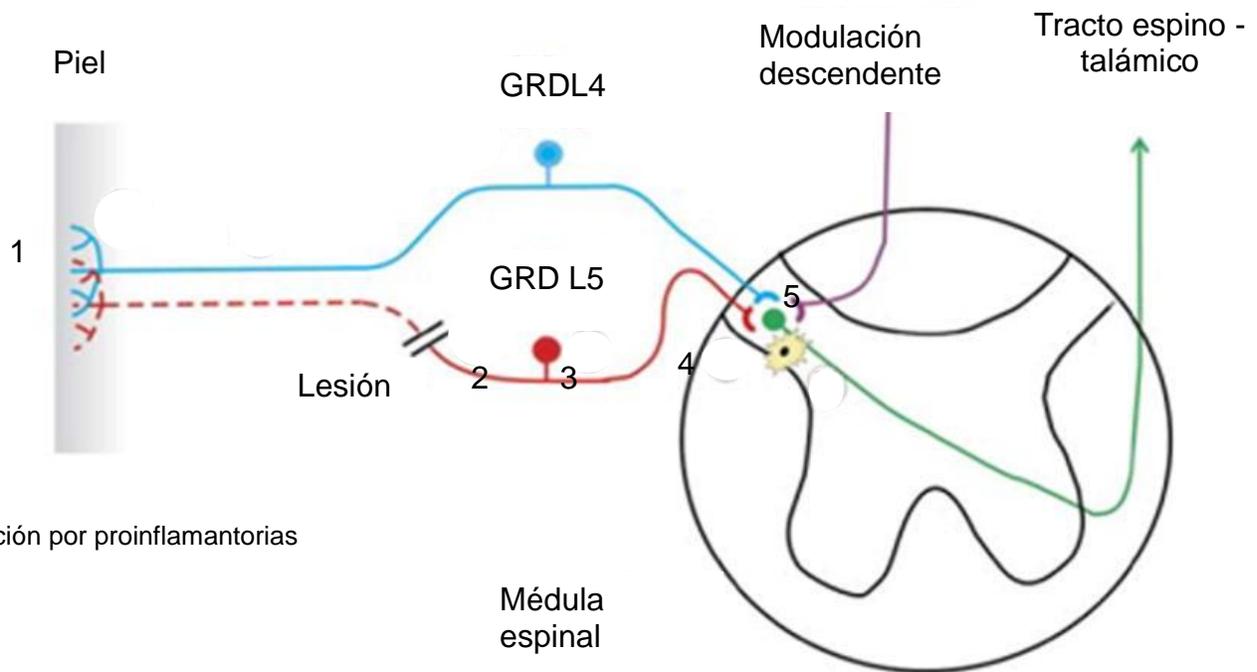
Los resultados de este trabajo corroboran lo complejo que son los cambios producidos a nivel del sistema nervioso central y periférico, durante el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático. La sensibilización del nervio contralateral que conlleva la aparición de

alodinia es un problema que complica todavía más la posibilidad de encontrar una terapia contra la neuropatía.

Conclusiones

Los canales de calcio tipo T y N participan en los cambios funcionales que se producen en las fibras aferentes primarias rápidas y lentas durante el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático. En las fibras sensoriales rápidas estos dos canales pueden estar actuando en el desarrollo de actividad ectópica, y de la sensibilización central al producir una mayor liberación de transmisor excitador sobre las neuronas de segundo orden involucradas en la transmisión del dolor, procesos que afectan en desarrollo de alodinia e hiperalgesia. En las fibras nociceptivas del tipo C, particularmente los canales tipo N pueden participar en el aumento de la liberación de neurotransmisor y el desarrollo de hiperalgesia y sensibilización central.

En la figura 10 se muestra un resumen de los posibles procesos moleculares, celulares y sistémicos que ocurren durante el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático. Se muestra que el dolor neuropático es un proceso sostenido, que transforma las propiedades de las fibras sensoriales primarias, los cambios ocurren de forma acumulativa, es decir, a partir de los primeros procesos se van estableciendo otros, que transforman un simple estímulo en toda una cascada compleja de interacción intra y extracelular que modulan la actividad del sistema nervioso central y periférico. Por lo tanto, no hay un protagonista o factor único que detone o sostenga al dolor neuropático, sino que como la mayoría de los procesos biológicos, se encuentra orquestado por tantos factores como participantes que desafían nuestro concepto de 'componentes principales'.



1) Activación por proinflamatorios

2) Actividad ectópica

3) Expresión de canales

4 y 5) Liberación de NT, eficacia sináptica

Figura 10. Cambios producidos en las neuronas sensoriales por una lesión del nervio espinal. De izquierda a derecha se enumeran los procesos secuenciales que inician desde el momento de la lesión como la liberación de sustancias proinflamatorias (1), actividad ectópica (2) producidas por el neuroma o GRD; continuando con cambios en la expresión molecular de canales y receptores en los somas y proyecciones axónicas de las fibras aferentes primarias (3); que llevan a un aumento de la liberación de transmisor a nivel de la terminal en el asta dorsal de la médula espinal (4), que aumenta la eficacia sináptica y a largo plazo produce sensibilización. Finalmente la información de dolor se transmite a los núcleos supraespinales que activa respuestas descendentes (5).

Bibliografía

1. Abdulla FA1 y Smith PA. (2001). Axotomy- and autotomy-induced changes in Ca^{2+} and K^{+} channel currents of rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 85(2):644-58.
2. Bauer, C. S., Nieto-Rostro, M., Rahman, W., Tran-Van-Minh, A., Ferron, L., Douglas, L. y Dolphin, A. C. (2009). The increased trafficking of the calcium channel subunit $\alpha 2\delta$ -1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the $\alpha 2\delta$ ligand pregabalin. *The journal of neuroscience*, 29(13), 4076-4088.
3. Bourinet, E., Altier, C., Hildebrand, M. E., Trang, T., Salter, M. W., y Zamponi, G. W. (2014). Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiological reviews*, 94(1), 81-140.
4. Campbell, J. N., y Meyer, R. A. (2006). Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*, 52(1), 77-92.
5. Chen, Y. L., Tsaur, M. L., Wang, S. W., Wang, T. Y., Hung, Y. C., Lin, C. S., ... & Cheng, J. K. (2015). Chronic intrathecal infusion of mibefradil, ethosuximide and nickel attenuates nerve ligation-induced pain in rats. *British journal of anaesthesia*, 115(1), 105-111.
6. Carbone E1, Calorio C, Vandael DH (2014). T-type channel-mediated neurotransmitter release. *Pflugers Arch*, 466(4):677-687.
7. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 57(4):411-25.
8. Djouhri, L. y Lawson, S. N. (2004). A β -fibernociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Research Reviews*, 46(2), 131-145.
9. Fang, X., McMullan, S., Lawson, S. N., y Djouhri, L. (2005). Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo. *The Journal of physiology*, 565(3), 927-943.
10. Harper, A. A. y Lawson, S. N. (1985). Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *The Journal of physiology*, 359(1), 31-46. (a)
11. Harper, A. A. y Lawson, S. N. (1985). Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities. *The Journal of Physiology*, 359(1), 47-63. (b)

12. Hogan, Q. H. (2007). Role of decreased sensory neuron membrane calcium currents in the genesis of neuropathic pain. *Croatian medical journal*, 48(1), 9-21.
13. Hounsgaard, J., & Kiehn, O. (1989). Serotonin - induced bistability of turtle motoneurons caused by a nifedipine - sensitive calcium plateau potential. *The Journal of physiology*, 414(1), 265-282.
14. Jacus, M. O., Uebele, V. N., Renger, J. J., & Todorovic, S. M. (2012). Presynaptic Cav3. 2 channels regulate excitatory neurotransmission in nociceptive dorsal horn neurons. *The Journal of Neuroscience*, 32(27), 9374-9382.
15. Julius, D., y Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203-210.
16. Kim, S. H., y Chung, J. M. (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 50(3), 355-363.
17. Latremoliere, A., & Woolf, C. J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The Journal of Pain*, 10(9), 895-926.
18. Liu, C. N., Michaelis, M., Amir, R., & Devor, M. (2000). Spinal nerve injury enhances subthreshold membrane potential oscillations in DRG neurons: relation to neuropathic pain. *Journal of neurophysiology*, 84(1), 205-215.
19. Luo, Z. D., Chaplan, S. R., Higuera, E. S., Sorkin, L. S., Stauderman, K. A., Williams, M. E., y Yaksh, T. L. (2001). Upregulation of dorsal root ganglion $\alpha 2\delta$ calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *The Journal of Neuroscience*, 21(6), 1868-1875.
20. Matsuda, Y., Yoshida, S., yYonezawa, T. (1976). A Ca-dependent regenerative response in rodent dorsal root ganglion cells cultured in vitro. *Brain research*, 115(2), 334-338.
21. McCallum, J. B., Wu, H. E., Tang, Q., Kwok, W. M., & Hogan, Q. H. (2011). Subtype-specific reduction of voltage-gated calcium current in medium-sized dorsal root ganglion neurons after painful peripheral nerve injury. *Neuroscience*, 179, 244-255.
22. Matthews, E. A., & Dickenson, A. H. (2001). Effects of spinally delivered N-and P-type voltage-dependent calcium channel antagonists on dorsal horn neuronal responses in a rat model of neuropathy. *Pain*, 92(1), 235-246.
23. Miki, K., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Kondo, E., Dai, Y., & Noguchi, K. (2000). Differential effect of brain-derived neurotrophic factor on high-threshold

- mechanosensitivity in a rat neuropathic pain model. *Neuroscience letters*, 278(1), 85-88.
24. Murali, S. S., Napier, I. A., Mohammadi, S. A., Alewood, P. F., Lewis, R. J., y Christie, M. J. (2014). High-voltage activated calcium current subtypes in mouse DRG neurons adapt in a subpopulation-specific manner following nerve injury. *Journal of neurophysiology*, jn-00608.
 25. Nickel, F. T., Seifert, F., Lanz, S., y Maihöfner, C. (2012). Mechanisms of neuropathic pain. *European Neuropsychopharmacology*, 22(2), 81-91.
 26. Ohnami, S., Tanabe, M., Shinohara, S., Takasu, K., Kato, A., & Ono, H. (2011). Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in spinal long-term potentiation of C-fiber-evoked field potentials. *PAIN®*, 152(3), 623-631.
 27. Okamoto, M., Baba, H., Goldstein, P. A., Higashi, H., Shimoji, K., & Yoshimura, M. (2001). Functional reorganization of sensory pathways in the rat spinal dorsal horn following peripheral nerve injury. *The Journal of physiology*, 532(1), 241-250.
 28. Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Kazuno, A. A., Matsuda, Y., Nonaka, T., ... & Tanabe, T. (2001). Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N - type Ca²⁺ channel. *The EMBO Journal*, 20(10), 2349-2356.
 29. Shir, Y., & Seltzer, Z. E. (1990). A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats. *Neuroscience letters*, 115(1), 62-67.
 30. Sun, H., Ren, K., Zhong, C. M., Ossipov, M. H., Malan, T. P., Lai, J., & Porreca, F. (2001). Nerve injury-induced tactile allodynia is mediated via ascending spinal dorsal column projections. *Pain*, 90(1), 105-111.
 31. Takami, K., Fujita - Hamabe, W., Harada, S., & Tokuyama, S. (2011). A β and A δ but not C - fibres are involved in stroke related pain and allodynia: an experimental study in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(3), 452-456.
 32. Todorovic, S. M., y Jevtovic-Todorovic, V. (2013). Neuropathic pain: role for presynaptic T-type channels in nociceptive signaling. *PflügersArchiv-European Journal of Physiology*, 465(7), 921-927.
 33. Ueda, H. (2006). Molecular mechanisms of neuropathic pain—phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacology y therapeutics*, 109(1), 57-77.

34. Wall, P. D., & Devor, M. (1981). The effect of peripheral nerve injury on dorsal root potentials and on transmission of afferent signals into the spinal cord. *Brain research*, 209(1), 95-111.
35. Waxman, S. G., y Zamponi, G. W. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nature neuroscience*, 17(2), 153-163.
36. Wen, X. J., Xu, S. Y., Chen, Z. X., Yang, C. X., Liang, H., & Li, H. (2010). The roles of T-type calcium channel in the development of neuropathic pain following chronic compression of rat dorsal root ganglia. *Pharmacology*, 85(5), 295-300.
37. Yang, L., & Stephens, G. J. (2009). Effects of neuropathy on high-voltage-activated Ca²⁺ current in sensory neurones. *Cell calcium*, 46(4), 248-256.
38. Yue, J., Liu, L., Liu, Z., Shu, B., y Zhang, Y. (2013). Upregulation of T-type Ca²⁺ channels in primary sensory neurons in spinal nerve injury. *Spine*, 38(6), 463-470.
39. Zoidis, G., Sandoval, A., Pineda-Farias, J. B., Granados-Soto, V., & Felix, R. (2014). Anti-allodynic effect of 2-(aminomethyl) adamantane-1-carboxylic acid in a rat model of neuropathic pain: A mechanism dependent on Ca^v2.2 channel inhibition. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 22(6), 1797-1803.