



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

Caracterización electrofisiológica de las fibras aferentes primarias del nervio tibial y de la actividad antidrómica en las raíces dorsales de ratas neuropáticas

TESIS

Que Presenta:

Biol. Exp. Dámaris Segura Bello

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias

en la especialidad de:

Neurobiología Celular y Molecular

Director de Tesis

Dr. José Rodolfo Delgado Lezama

Ciudad de México

Agosto, 2016

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CONACyT, por haberme otorgado la beca de maestría
del 1 de septiembre de 2014 al 31 de agosto de 2016

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Definición y clasificación del dolor	5
1.2 Neuronas sensoriales	5
1.3 Proyección de las neuronas sensoriales en las láminas de la médula espinal	7
1.4 Sensibilización en dolor crónico inflamatorio y neuropático	8
1.4.1 Sensibilización periférica	8
1.4.2 Sensibilización central	9
1.5 Teoría de la compuerta del dolor de Melzack y Wall	10
1.6 Inhibición presináptica	11
1.7 Reflejos de la raíz dorsal y dolor	12
1.8 Actividad de las fibras aferentes primarias en ratas neuropáticas	14
1.9 Modelo de dolor neuropático	15
1.10 Inervación de la planta de la extremidad posterior de la rata	16
1.10.1 Estudios electrofisiológicos	16
1.10.2 Estudios inmunohistoquímicos	16
2. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	18
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo general	19
4.2. Objetivos particulares	19
5. MATERIAL Y MÉTODOS	20
5.1 Preparación animal	20
5.1.1 Inducción de dolor neuropático	20
5.1.2 Prueba de umbral táctil	20
5.1.3 Laminectomía y disección del nervio tibial	20

5.2 Estimulación eléctrica del nervio tibial y registro de los potenciales de acción compuestos evocados en las raíces dorsales L3, L4, L5 y L6	20
5.3 Potenciales de acción antidrómicos en las fibras aferentes primarias	21
5.3.1 Reflejos de la raíz dorsal en la raíz dorsal L3	21
5.3.2 Reflejos de la raíz dorsal en un filamento de las raíces dorsales L3 y L4	21
5.3.3 Reflejos de la raíz dorsal en las raíces dorsal L5 y L6	21
5.3.4 Reflejos de la raíz dorsal evocados por estimulación de la raíz dorsal L5 en las raíces dorsales L3 y L6.	22
5.4 Análisis de resultados	22
6. RESULTADOS	23
6.1 Inducción de dolor neuropático	23
6.2 Estimulación eléctrica del nervio tibial y registro de los potenciales de acción compuestos evocados en las raíces dorsales L3, L4, L5 y L6	23
6.3 Potenciales de acción antidrómicos en las fibras aferentes primarias	29
6.3.1 Reflejos de la raíz dorsal en la raíz dorsal L3	29
6.3.2 Reflejos de la raíz dorsal en un filamento de las raíces dorsales L3 y L4	30
6.3.3 Reflejos de la raíz dorsal en las raíces dorsales L5 y L6	32
6.3.4 Reflejos de la raíz dorsal en las raíces dorsales L3 y L6 evocados por estimulación de la raíz dorsal L5 lesionada.	33
7. DISCUSIÓN	34
7.1 Estimulación eléctrica del nervio tibial y registro de los potenciales de acción compuestos evocados en las raíces dorsales L3, L4, L5 y L6	34
7.2 Potenciales de acción antidrómicos en las fibras aferentes primarias	36
8. CONCLUSIÓN	39
9. PERSPECTIVAS	39
10. REFERENCIAS	40

RESUMEN

El dolor neuropático resulta de una lesión en el sistema nervioso central o periférico y se caracteriza por la presencia de hiperalgesia y alodinia. Las neuronas sensoriales nociceptivas liberan mediadores inflamatorios en la terminal periférica ante el arribo de potenciales de acción antidrómicos (reflejos de la raíz dorsal; RRD) durante el dolor crónico por inflamación. No obstante, en el dolor neuropático no se ha demostrado la presencia de RRD. La alodinia mecánica y térmica se determina aplicando estímulos en la planta de la pata de la extremidad posterior en ratas con neuropatía. Por lo tanto, es importante conocer el patrón de inervación sensorial de esta región. Se acepta que la planta de la pata de la rata está inervada por el nervio safeno y las ramas tibial y sural del nervio ciático. Además, está ampliamente aceptado que los axones que forman el nervio ciático provienen de los nervios espinales L4-L6. Sin embargo, estudios anatómicos indican la contribución del nervio espinal L3. Un estudio reciente mostró que el nervio principal que inerva la planta de la pata es el tibial. El objetivo de este trabajo fue determinar las raíces dorsales (RD) por donde entran las fibras aferentes primarias (rápidas $A\alpha/\beta$ y lentas $A\delta$ y C) que constituyen el nervio tibial, así como la posible presencia de RRD en ratas neuropáticas. Para esto, se registró la actividad eléctrica de las raíces dorsales lumbares 3, 4, 5 y 6 (RDL3-6) evocada por la estimulación del nervio tibial. Se encontró que el 100% de las ratas intactas presenta actividad eléctrica en las RDL4 y RDL5, mientras que el 66.6% y 50% presentó salva aferente en las RDL6 y RDL3, respectivamente. Además, la RDL3 presenta principalmente axones de velocidad de conducción lenta $A\delta$ y en menor cantidad fibras aferentes $A\beta$ y C. Las raíces dorsales L4, L5 y L6 presentan axones de todos los tipos ($A\alpha$, $A\beta$, $A\delta$ y C). Estos resultados sugieren que el nervio tibial contiene fibras aferentes que corren por las RDL4 y RDL5. También pueden presentarse en algunos animales en las RDL3 y RDL6. Respecto a los RRD, se encontraron en las ratas naive y neuropáticas, aunque en mayor número en estas últimas, lo que podría explicar la alodinia e hiperalgesia en el dolor neuropático.

ABSTRACT

Neuropathic pain produced by the central and peripheral nervous system lesion is characterized by the presence of hyperalgesia and allodynia. Nociceptive sensory neurons release inflammatory mediators in the peripheral terminal evoked by antidromic action potentials (dorsal root reflexes; DRR) in inflammatory chronic pain. However, presence of DRR has not been demonstrated in neuropathic pain. In rats with neuropathy, the mechanical and thermal allodynia is detected by applying the respective stimuli on the hind paw. Therefore, it is important to know the sensory innervation pattern of this region. It is accepted that the hind paw of the rat is innervated by the saphenous and the tibial and sural branches of the sciatic nerve. It is well accepted that sciatic nerve afferents enter the spinal cord along dorsal roots L4, L5 and L6, though anatomical studies indicate a L3 dorsal root contribution. A recent study showed that tibial nerve innervates the whole hind paw. The aim of this work was to determine the dorsal roots where the primary afferents of the tibial nerve enter the spinal cord and its type (fast $A\alpha/\beta$ and slow $A\delta$ and C), as well as the possible presence of DRR in neuropathic rats. Recording the electrical activity in the dorsal roots L3, L4, L5 and L6 evoked by the tibial stimulation 100% of the naive rats presented afferent activity in DRL4 and DRL5, while 66.6 and 50% showed afferent volley in DRL6 and DRL3, respectively. In addition, DRL3 presented mainly axons of slow conduction velocity $A\delta$ type, in less amount $A\beta$ and C afferent types. DRL4, L5 and L6 presented all types of axons ($A\alpha$, $A\beta$, $A\delta$ y C). All these results suggest that the tibial nerve contain afferents that enter the spinal cord along the DRL4 and L5. In addition, primary afferents might enter through DRL3 and L6 in some animals. Regarding the RRD, they were found in naive and neuropathic rats, but in greater numbers in the latter, which could explain allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición y clasificación del dolor

El dolor fisiológico es un mecanismo de defensa cuya función es salvaguardar la integridad del organismo de factores que pudieran dañarlo. Sin embargo, el dolor se vuelve patológico (crónico y debilitante) cuando se pierde la homeostasis de los procesos que lo integran y regulan. Por su duración y características fisiopatológicas el dolor se clasifica en: nociceptivo, inflamatorio (agudo) y patológico (crónico y/o neuropático) (Loeser y Melzack, 1999; Wolf, 2010). El dolor nociceptivo nos permite detectar y retirarnos de estímulos nocivos por activación de los nociceptores, dura pocos segundos y no requiere de tratamiento médico. El dolor inflamatorio (agudo) también se produce por activación de los nociceptores, se considera de adaptación y protección. En el dolor patológico, el efecto autoprotector desaparece debido al funcionamiento anormal del sistema nervioso, el tratamiento médico es necesario pero a menudo inefectivo, se puede presentar en condiciones en las que no existe daño o inflamación (dolor disfuncional) o por un daño al tejido nervioso (neuropático) (Woolf y Ma, 2007; Woolf, 2010). En el dolor neuropático la función de las neuronas nociceptivas y no nociceptivas se encuentra alterada, pudiendo incluso estas últimas participar en percepción del dolor. Las alteraciones se producen tanto a nivel periférico como central (Campbell y Meyer, 2006; Djouhri et al., 2012). Además, se llevan a cabo cambios en el asta dorsal de la médula espinal, donde se procesa la información de dolor así como en centros supraespinales que lo integran. En el dolor neuropático se presentan dos características: incremento en la respuesta a estímulos dolorosos (hiperalgesia) y dolor en respuesta a estímulos inocuos (alodinia). La hiperalgesia se puede localizar en el sitio de la lesión (hiperalgesia primaria) o en lugares adyacentes o lejanos (hiperalgesia secundaria) (Cohen y Mao, 2014; Djouhri et al., 2012). Los nociceptores son neuronas sensoriales que responden a los estímulos de intensidad mayor a la que responden los demás receptores.

1.2 Neuronas sensoriales

Las neuronas sensoriales son células bipolares cuyo soma está ubicado en el ganglio de la raíz dorsal (GRD), con un axón que proyecta una rama a la periferia y otra a la médula espinal (Fig. 1). Su función es transmitir los estímulos detectados en la periferia al SNC, codificados en un patrón de potenciales de acción. Las neuronas sensoriales transmiten diferentes modalidades sensoriales,

dependiendo de los sitios que inervan. Estas células son heterogéneas y pueden clasificarse en base a diferentes criterios: nociceptivas o no nociceptivas, por el diámetro del axón, mielinización, velocidad de conducción y por el sitio que inervan (cutáneas, musculares y viscerales) (Kandel et al., 2013). La velocidad de conducción y los diámetros de las fibras varían entre las especies, en humanos los valores son los más altos (tabla 1), mientras que en la rata las velocidades de conducción son: A α (30-55 m/s); A β (14-30 m/s); A δ (2.2-8 m/s) y C (< 1.4 m/s) (Djoughri y Lawson, 2004; Fang et al., 2005; Bourinet et al., 2014). Las fibras más rápidas (A α y A β) son principalmente musculares y cutáneas, mientras que las más lentas son nociceptivas (A δ y C).

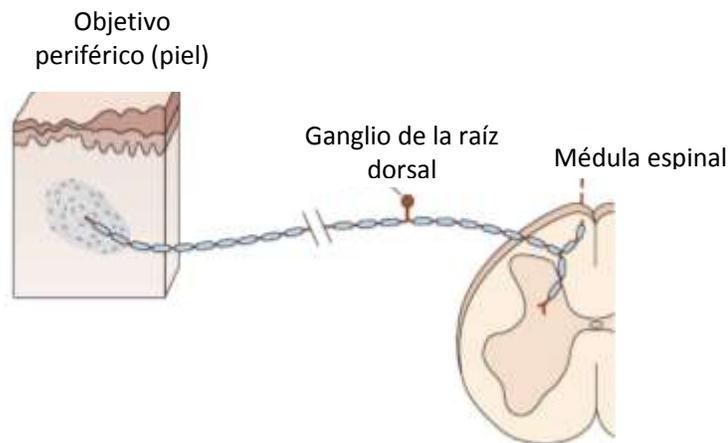


Figura 1. Neurona sensorial. El soma se encuentra en el ganglio de la raíz dorsal, su axón proyecta hacia la periferia y la médula espinal (Imagen modificada de Kandel et. al., 2013).

Tabla 1. Clasificación de las fibras sensoriales en humanos.

	Nervios Muscular	Nervio cutáneo	Diámetro de la fibra (μm)	Velocidad de conducción (m/s)
Mielinizadas	I (A α)	--	12-20	72-120
	II	A β	6-12	36-72
Poco mielinizadas	III	A δ *	1-6	4-36
No mielinizada	IV	C*	0.2-1.5	0.4-2.0

Las fibras nociceptivas están marcadas con un asterisco (Kandel et al., 2013)

1.3 Proyección de las neuronas sensoriales en las láminas de la médula espinal

La terminal central de las neuronas sensoriales inerva una región determinada de la médula espinal. Ésta se encuentra dividida en 10 láminas que son numeradas del I al X, las láminas I-VI corresponden al asta dorsal: la lámina I contiene 5% de neuronas de proyección, la lámina II está compuesta por interneuronas, donde cerca de un tercio son GABAérgicas y un subgrupo de éstas co-expresa glicina, y el resto son excitadoras. La lámina I y II recibe entradas de fibras A δ y C (nociceptivas); en las láminas III y IV terminan fibras de mecanorreceptores cutáneos A β . Las neuronas de la lámina V responden a diversas modalidades sensoriales, por lo que se les denomina neuronas de rango dinámico amplio (Fig. 2) (Prescott y Ratté, 2012; Kandel et. al., 2013).

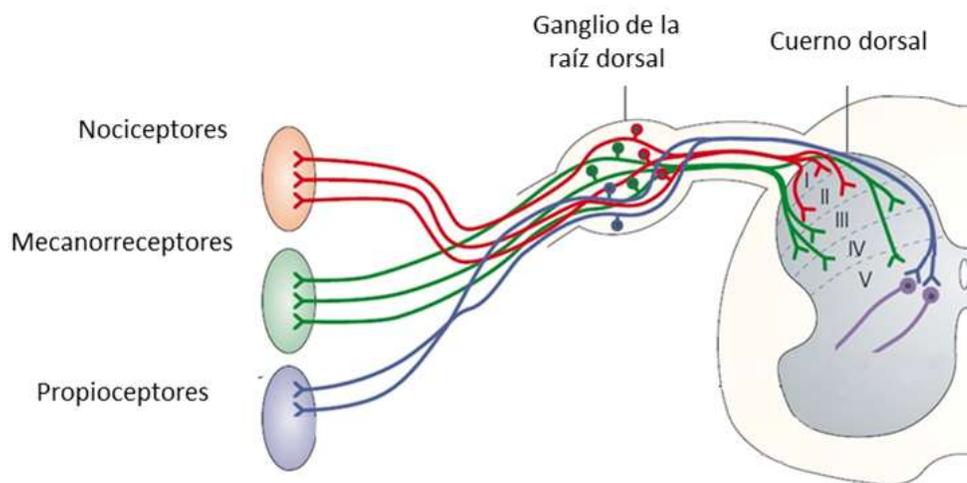


Figura 2. Inervación de las neuronas sensoriales en las láminas del asta dorsal de la médula espinal. Las neuronas nociceptivas (A δ y C, rojo) proyectan principalmente en las láminas I y II. Los mecanorreceptores (A β , verde) proyectan en las láminas III-V. La propiocepción (A α , azul) está mediada por neuronas sensoriales que proyectan al núcleo intermedio (láminas V a VII) y a las motoneuronas ubicadas en el asta ventral (Imagen modificada de Caspary y Anderson, 2003).

1.4 Sensibilización en el dolor crónico inflamatorio y neuropático

La sensibilización es un proceso que conlleva a un aumento en la intensidad con que se perciben los estímulos, puede ser a nivel periférico y central. La primera, se origina por la presencia de sustancias proinflamatorias liberadas por las células del sistema inmune o por la liberación de sustancias pronociceptivas de la terminal periférica de los nociceptores (Constigan y Woolf, 2000; Xie et al., 2003). La segunda, puede ocurrir por la actividad persistente de las fibras nociceptivas y no nociceptivas que producen un incremento en la excitabilidad de las neuronas de segundo orden.

1.4.1 Sensibilización periférica

La sensibilización periférica es una forma de plasticidad funcional de las terminales periféricas que conlleva a la reducción de su umbral de activación (Basbaum et al., 2009). Existen varios factores que contribuyen a la sensibilización periférica, por ejemplo, ante una lesión tisular se activan células del sistema inmune que liberan mediadores inflamatorios como bradicinina, prostanoïdes, citocinas y otros que se unen a su receptor en las fibras nociceptivas. En este caso, la bradicinina provoca la entrada de calcio en las neuronas sensoriales contribuyendo de este modo al incremento de su excitabilidad (Linhart et al., 2003). Además, los mediadores inflamatorios como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la sustancia P se liberan de las terminales nociceptivas, provocando extravasación del plasma y con ello la liberación de prostaglandinas, bradicinina, factores de crecimiento y citocinas, manteniendo la sopa inflamatoria y la hiperexcitabilidad. Cuando la inflamación persiste, de las terminales periféricas se envían señales al soma, en el ganglio de la raíz dorsal, que provocan el incremento de la transcripción y traducción de neuropéptidos, entre los que se encuentran el factor derivado del cerebro (BDNF), canales iónicos de sodio, calcio y receptores de potencial transitorio (TRPV), que posteriormente se presentan tanto en los somas como en las terminales periféricas y centrales, manteniendo a las neuronas en un estado más excitable (Costigan y Woolf, 2000; Scholz y Woolf, 2002; Woolf y Ma, 2007). En el dolor neuropático no se ha observado un proceso inflamatorio periférico evidente, aunque se ha reportado que las aferentes primarias A δ y C presentan actividad espontánea que podría favorecer la liberación de sustancias pronociceptivas en las terminales periféricas y con ello evocar el proceso de sensibilización periférica.

1.4.2 Sensibilización central

La sensibilización central se refiere a la hiperexcitabilidad que presentan las neuronas del SNC ante la entrada continua de potenciales de acción de las fibras aferentes sensibilizadas (Basbaum et al., 2009) o la entrada de descargas ectópicas por lesión nerviosa (Liu et al., 2000). Existen varias propuestas para explicar la sensibilización central, entre las que se encuentran las siguientes: Las fibras aferentes primarias sensibilizadas liberan sustancias neuromoduladoras como el glutamato, sustancia P, BDNF y ATP. Estas sustancias activan receptores post-sinápticos y desencadenan múltiples cascadas de señalización (Costigan y Woolf, 2000; Scholz y Woolf, 2002; Basbaum et al., 2009). El glutamato activa a los receptores AMPA que despolarizan a las neuronas post-sinápticas. Esta despolarización remueve el ion Mg^{2+} que bloquea a los canales NMDA, permitiendo que el glutamato los active y como consecuencia aumente el Ca^{2+} intracelular. Además, las fibras lesionadas y en menor medida las no lesionadas presentan cambios transcripcionales, que provocan incluso que neuronas no-nociceptivas comiencen a sintetizar y liberar sustancias pronociceptivas (Campbell y Meyer, 2006). Otra propuesta, se refiere al efecto del BDNF en la expresión del co-transportador potasio-cloruro (KCC2) en el asta dorsal. En estados no patológicos, las neuronas maduras del SNC expresan al KCC2 en altos niveles, este transportador permite la salida de dos iones de cloruro utilizando el gradiente del ion potasio, así el potencial de equilibrio del Cl^{-} se mantiene más negativo que el potencial de reposo de la membrana. En esta condición la activación de los receptores $GABA_A$ y glicinérgicos produce la entrada del ion Cl^{-} a la neurona, hiperpolarizándola, por lo tanto, dando lugar a la inhibición post-sináptica. En el dolor neuropático, la lesión de un nervio periférico conlleva a que la terminal central de las neuronas sensoriales libere proteína quimio-atrayente de monocitos 1 (MCP-1 o CCL2) y ATP. El CCL2 es un quimioatrayente que activa a la microglía y el ATP activa sus receptores P2X4 que disparan la liberación de BDNF (Tsuda et al., 2003; Thacker et al., 2008). El BDNF se une a los receptores TrkB en las neuronas de proyección del asta dorsal, lo cual disminuye la expresión de KCC2 y por lo tanto permite la acumulación de Cl^{-} intracelular, lo cual trae como consecuencia la pérdida de la inhibición post-sináptica o incluso su cambio a excitación (Coull et al., 2005).

1.5 Teoría de la compuerta del dolor de Melzack y Wall

La teoría de la compuerta sugiere que la información nociceptiva que se transmite al cerebro normalmente se encuentra sometida a un intenso control inhibitorio a niveles pre y post-sináptico en la médula espinal. Esta teoría predice que bajo condiciones patológicas una alteración en la eficacia inhibitoria espinal puede contribuir al desarrollo del dolor crónico. Tanto la inhibición pre-sináptica como la post-sináptica están controladas por interneuronas inhibitorias y fibras descendentes, también inhibitorias. Aunque Melzack y Wall presentaron únicamente evidencia para la inhibición pre-sináptica (Fig. 3), también mencionan la posibilidad de un mecanismo de control post-sináptico (Melzack y Wall, 1965). Lo anterior pone de manifiesto que, bajo condiciones fisiológicas, la entrada aferente de neuronas no-nociceptivas, vía las interneuronas inhibitorias espinales, controla la entrada (compuerta) de la información nociceptiva por inhibición pre-sináptica, ocasionando que el tacto (sobarse) elimine o reduzca el dolor. Bajo condiciones patológicas, el estado de esta compuerta puede cambiar al disminuir la inhibición pre-sináptica (Chen et al., 2014). Aunque esta teoría ha sido ampliamente aceptada, actualmente se sabe que las fibras de diámetro pequeño no liberan neurotransmisores inhibitorios como sugirieron Melzack y Wall (Fig. 3).

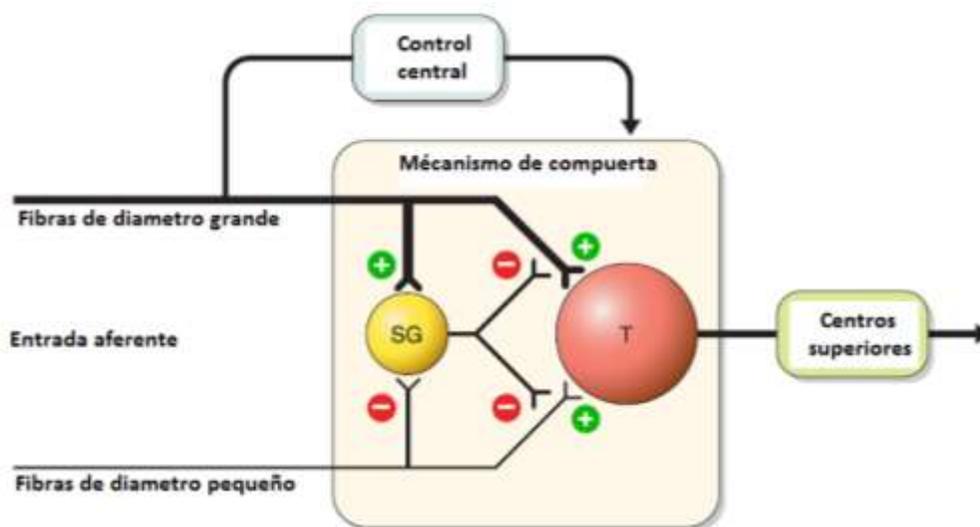


Figura 3. Teoría de la compuerta. El efecto inhibitorio ejercido por SG en la terminal de las fibras aferentes se incrementa por la actividad de las fibras de diámetro grande y disminuye por la actividad de fibras de diámetro pequeño. SG= Interneurona inhibitoria de la sustancia gelatinosa, T= Neurona de proyección (Imagen modificada de Zeilhofer et al., 2008).

1.6 Inhibición presináptica

La inhibición pre-sináptica ocurre en sinapsis axoaxónicas simples o por arreglos sinápticos más complejos, denominados sinapsis glomerulares. Las sinapsis glomerulares están formadas por la terminal central de la fibra aferente primaria que está rodeada por la terminal axónica de una interneurona inhibidora GABAérgica y por dendritas de neuronas post-sinápticas (Zeilhofer et al., 2012b; Rudomín y Shmith, 1999). Las fibras aferentes primarias expresan receptores GABA_A y el cotransportador NKCC1 que introduce en la neurona un ion de sodio, uno de potasio y dos de cloruro. El NKCC1 mantiene altas concentraciones de $[Cl^-]_i$, provocando que la activación de los receptores GABA_A en las terminales de las aferentes primarias produzca una despolarización (PAD, por sus siglas en inglés) en lugar de una hiperpolarización como ocurre en las células maduras del SNC. Paradójicamente, esta despolarización está asociada a la inhibición pre-sináptica (Rudomín y Shmith, 1999) y no a excitación. Diferentes mecanismos se han propuesto para explicar cómo la PAD mediada por GABA produce inhibición: 1) La PAD mantiene en estado inactivado a los canales de sodio dependientes de voltaje (NaV) en las terminales aferentes primarias y así interrumpe la propagación ortodrómica; 2) La PAD puede atenuar la amplitud de los potenciales de acción a través de un aumento en la conductancia de membrana, al abrir canales de cloro se produce un cortocircuito; 3) La PAD puede inactivar los canales de calcio dependientes de voltaje, reduciendo la entrada de calcio a la pre-sinápsis lo que deprime la liberación del neurotransmisor (Guo y Hu, 2014).

El daño tisular y nervioso aumenta la actividad o expresión del NKCC1 y por lo tanto produce una mayor acumulación de Cl⁻ intracelular (Price et al., 2009), incrementando la despolarización de las aferentes primarias a un nivel que la PAD podría activar los canales de sodio que median el potencial de acción, que se propagaría ortodrómicamente hacia las terminales centrales y antidrómicamente hacia las terminales periféricas. Estos potenciales antidrómicos son los reflejos de la raíz dorsal (RRD) (Willis, 1999). Esto implicaría la activación de neuronas centrales, perdiéndose la acción inhibidora de la PAD. La pérdida de la inhibición pre-sináptica abriría la compuerta nociceptiva y permitiría la excitación cruzada entre las aferentes primarias de bajo y alto umbral (Chen et al., 2014).

1.7 Reflejos de la raíz dorsal y dolor

La sensibilización periférica de las fibras aferentes primarias puede producir una entrada constante sobre las neuronas de segundo orden que a su vez activen más interneuronas GABAérgicas, incrementando la concentración de GABA a nivel sináptico y extrasináptico. Esto incrementaría el número de receptores GABA_A extrasinápticos activados tónicamente produciendo una mayor despolarización sostenida de las fibras aferentes primarias. Esto aunado al incremento en la actividad del NKCC1 después de una lesión (aumenta el Cl⁻ intracelular en las fibras aferentes primarias) llevaría a un incremento de la PAD que podría activar RRD (Cervero y Laird, 1996; Willis, 1999). Los RRD se propagan de forma anterógrada y ortodrómica. La propagación anterógrada induce la liberación de neuropéptidos como la sustancia P y CGRP en la terminal periférica, favoreciendo la inflamación y contribuyendo al desarrollo de la alodinia e hiperalgesia. La propagación ortodrómica causa sobreexcitación de las neuronas de segundo orden, reforzando la sensibilización central que mantiene el dolor (Willis, 1999). La PAD se propaga pasivamente pudiéndose registrar en las raíces dorsales, como un potencial de la raíz dorsal (DRP) junto con los RRD (Willis, 1999; Loeza-Alcocer et al., 2013). Durante el dolor neuropático se presentan los fenómenos de alodinia e hiperalgesia (primaria y secundaria). La hiperalgesia primera se ha explicado a través de la sensibilización de los nociceptores periféricos. Sin embargo, los mecanismos de la hiperalgesia y alodinia secundarias no están claros. Cervero y Laird (Cervero y Laird, 1996) propusieron un mecanismo basado en interacciones pre-sinápticas que ocurren en el asta dorsal de la médula espinal entre los mecanorreceptores y nociceptores que permite explicar la fisiopatología del dolor crónico a través de la activación de RRD (Fig.4). En la figura 4A se muestra la PAD en un estado no patológico, aquí los nociceptores A δ y C contactan con neuronas de proyección que envían la información de dolor a centros supraespinales. La activación de mecanorreceptores estimula a interneuronas GABAérgicas que inhiben pre-sinápticamente a los nociceptores. En la figura 4B se muestra lo que ocurre en un estado patológico. En primer lugar los nociceptores sensibilizados activan persistentemente a las neuronas de proyección dando lugar a la hiperalgesia primaria, por otra parte sensibilizan a interneuronas GABAérgicas, así cuando se estimulan los mecanorreceptores la PAD que se genera es mayor y podría alcanzar el umbral de activación de los canales de sodio dando lugar a los RRD. Los RRD se desencadenarían no sólo en las fibras aferentes primarias que inervan el sitio de la lesión, lo que daría lugar a la hiperalgesia secundaria. Debido a que los mecanorreceptores inducen una PAD en los nociceptores

que al estar facilitada activaría RRD, produciendo dolor, esto explicaría el fenómeno de alodinia (Cervero et al., 2003). En el dolor por inflamación se ha observado que la PAD es tan intensa que permite la formación de RRD, cambiando su estado inhibitor en excitación (Willis., 1999). Por lo anterior la estimulación de fibras no nociceptivas podría evocar a través de las interneuronas GABAérgicas potenciales de acción que se propaguen de forma antidrómica y ortodrómica en aferentes nociceptivos y así inducir alodinia e inflamación neurogénica (Cervero et al., 2003; Price et al., 2009). De acuerdo con esto, los agonistas del receptor GABA_A han mostrado un efecto analgésico (Munro et al., 2011). Sin embargo, en el dolor neuropático Chen y colaboradores (2014) encontraron que las neuronas disociadas del ganglio de la raíz dorsal presentan una disminución de la conductancia GABAérgica y por imagenología de calcio observaron que al despolarizar las terminales de las neuronas sensoriales la fluorescencia de calcio era menor en los ratones neuropáticos que en ratones control, estos resultados llevaron a los autores a proponer que la inhibición pre-sináptica disminuye por la caída en la conductancia GABAérgica. Por lo tanto, no se produce un incremento de la PAD, lo que significa que no hay un aumento en la excitabilidad que podría favorecer los RRD (Chen et al., 2014), a diferencia de las neuronas de proyección donde la inhibición GABAérgica disminuye llegando convertirse en excitación (Coull et al., 2005).

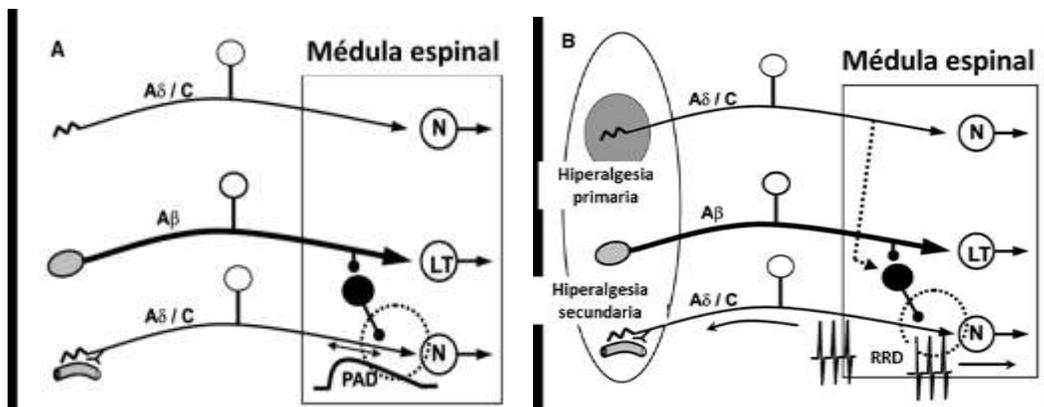


Figura 4. Modelo de interacciones pre-sinápticas entre mecanorreceptores de bajo umbral ($A\beta$) y nociceptores ($A\delta$ y C). (A) Despolarización aferente primaria (PAD) evocada en un estado no patológico en fibras nociceptivas ($A\delta$ y C) por activación de mecanorreceptores de bajo umbral ($A\beta$). (B) Una lesión activa y sensibiliza a los nociceptores, dando lugar a la hiperalgesia primaria. Los potenciales de acción llegan a la médula espinal y sensibilizan a interneuronas que median la inhibición pre-sináptica (línea punteada). Esto propicia que ante la activación de los mecanorreceptores, la PAD de los nociceptores sea tal que pueda evocar RRD, dando lugar a la hiperalgesia secundaria. N=Neurona del asta dorsal nociceptiva, LT= Neurona del asta dorsal de bajo umbral. (Imagen modificada de Cervero et al., 2003).

1.8 Actividad de las fibras aferentes primarias en ratas neuropáticas

Cuando ocurre la lesión de un nervio periférico, las fibras aferentes primarias comienzan a presentar descargas ectópicas (Liu et al., 2000). Varios autores apoyan la hipótesis de que esta actividad de las fibras aferentes lesionadas produce la sensibilización central, mientras que otros apoyan la hipótesis de que son las fibras aferentes no lesionadas las que inducen la sensibilización central (Shim et al., 2005). Liu y colaboradores (2000) observaron en ratas que después de la sección del nervio espinal L5, las neuronas del ganglio ipsilateral a la lesión presentaron descarga ectópica que se fue incrementando con el tiempo. Esto se observó únicamente en las fibras aferentes de conducción rápida tipo A y sorprendentemente no en las fibras tipo C. De modo interesante, la descarga ectópica apareció al mismo tiempo que la alodinia táctil, lo que llevó a los autores a sugerir que las fibras tipo A lesionadas pueden inducir la sensibilización central (Liu et al., 2000). Otros autores también observaron la presencia de descargas ectópicas, no sólo en fibras de tipo A lesionadas, también en las no lesionadas e igualmente no observan actividad ectópica en fibras de tipo C (Campbell y Meye, 2006). Sin embargo, Shim y colaboradores (2005) encontraron que la actividad de las neuronas sensoriales de los axones no lesionados A δ y C presentó actividad espontánea y disminución del umbral mecánico en ratas con neuropatía inducida por ligadura de los nervios espinales L5 y L6 (Kim y Chung, 1992). Los autores concluyen que las fibras aferentes nociceptivas no lesionadas contribuyen al establecimiento del dolor neuropático (Shim et al., 2005)

1.9 Modelo de dolor neuropático

Un avance importante en el campo del estudio del dolor neuropático se dio por Wall y colaboradores en 1970, quienes descubrieron que el daño a un nervio periférico puede generar mecanismos fisiopatológicos, muy diferentes a los que se producen por un estímulo nocivo agudo (Decosterd y Woolf, 2000). En particular, un modelo de dolor que reproduce la fisiopatología del dolor neuropático en humanos fue desarrollado por Kim y Chung en 1992, éste consiste en ligar fuertemente los nervios espinales (SNL, por su sigla en inglés) lumbares 5 y 6 (L5 y L6), aproximadamente 5 mm antes del ganglio de la raíz dorsal (Fig. 3). Este modelo produce alteraciones como alodinia mecánica, alodinia al frío, hiperalgesia térmica y dolor espontáneo, que se manifiestan conductualmente con flexión de la extremidad posterior ipsilateral a la ligadura, apareciendo entre 24 y 48 h después de realizadas las ligaduras y persisten aproximadamente entre 10 y 16 semanas (Kim y Chung, 1992; Jaggi et al., 2011). La ligadura de los nervios espinales L5 y L6 produce degeneración de los axones que corren por el nervio ciático, de tal modo que su activación periférica no llega a la médula espinal (Fig. 5). Debido a que el nervio espinal L4 contiene una gran abundancia de fibras motoras no es conveniente ligarlo, ya que se produce un déficit motor severo que interfiere con las pruebas de valoración del dolor (Jaggi et al., 2011).

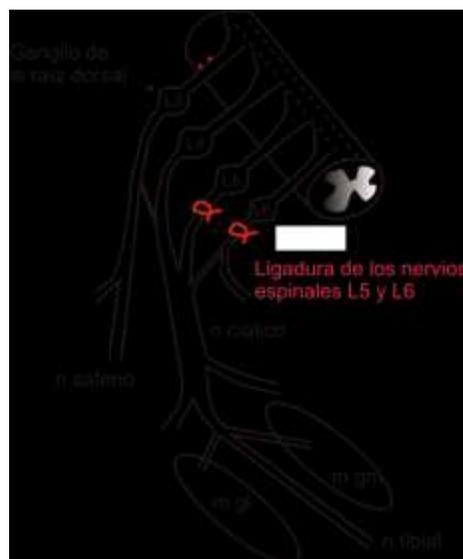


Figura 5. Modelo de Kim y Chung. Se ligan fuertemente los nervios espinales L5 y L6 (en rojo), dejando intactos los nervios espinales L3 y L4. n= nervio, m gl= músculo gastrocnemio lateral, m gm= músculo gastrocnemio medial. (Imagen editada de Decosterd y Woolf, 2000)

1.10 Inervación de la planta de la extremidad posterior de la rata

La aparición de alodinia e hiperalgesia en la rata después de la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 se detecta aplicando estímulos mecánicos o térmicos en la planta de la pata de la extremidad posterior ipsilateral al sitio de la lesión. Por lo tanto, conocer el patrón de inervación sensorial de esta región es muy importante para determinar los cambios estructurales y funcionales, que ocurren durante el desarrollo y establecimiento del dolor neuropático, tanto a nivel central como periférico.

Está ampliamente aceptado que la pata posterior de la rata está inervada por el nervio safeno y las ramificaciones del nervio ciático que dan lugar a los nervios peroneo, tibial y sural (Fig. 5) y que los axones que forman el nervio ciático provienen de los nervios espinales L4-L6 (Brunner et al., 1980; Swett et al., 1986; Kaizawa y Takahashi, 1970). Sin embargo, Sanguinetti y colaboradores reportaron que el nervio ciático se deriva principalmente de los nervios espinales L4-L6 y parcialmente de los nervios espinales L3 y S1 (Sanguinetti et al., 1986).

1.10.1 Estudios electrofisiológicos

Sweet y Woolf (1985), registrando potenciales de acción en los nervios que proyectan hacia la pata posterior de la rata evocados por la estimulación mecánica de la planta de la pata, encontraron tres campos receptivos: medial (incluye el dígito 1 y parte del 2) inervado por el nervio safeno; central (incluye parte de los dígitos 2 y 4, y el dígito 3) inervado por el nervio tibial; lateral (incluye el dígito 5 y parte del 4) inervado por el nervio sural (Fig. 6 A). En este estudio no se determinó en que raíces se localizan las aferentes que conforman los nervios estudiados (Swett y Woolf, 1985). En otro estudio, se reportó que la estimulación eléctrica del nervio tibial evocó potenciales de acción únicamente en las raíces dorsales L4-L6, sin haberse observado salvos aferentes en L3 (Vejsada y Hník, 1980).

Estudios inmunohistoquímicos

Marcando los nervios espinales lumbares con azul de Evans, se mostró que la planta de la pata de la rata presenta dermatomas de los nervios espinales L3-L5 que se traslapan ligeramente (Fig. 6B) (Takahashi et al., 1994; Takahashi y Nakajima, 1996). En otro estudio donde se empleó el marcador anterógrado de peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés), se demostró que los somas de los axones del nervio sural se localizan en los ganglios de las raíces dorsales L4 y L5, y ocasionalmente en L6 (Peyronnard y Charron., 1982).

Sweet y colaboradores (1991), usando HRP con germen de trigo (WGA-HRP), encontraron que aproximadamente 98 a 99% de todas las neuronas del nervio ciático de la rata presentan su soma en los ganglios L4 y L5, mientras que ~0.4% se ubican en el ganglio L6 y ~1.2% en el ganglio L3 (Sweet et al., 1991). Un trabajo reciente donde emplean el colorante azul de Evans confirmó parcialmente la descripción realizada por Sweet y Woolf (1985), aunque Kambiz et al. encontraron que el nervio tibial inerva toda la planta de la pata posterior de la rata, superponiéndose con la inervación del nervio sural y safeno (Kambiz et al., 2014). Esto se contrapone con los resultados electrofisiológicos reportados por Sweet y Woolf (1985) (Fig. 7).

De acuerdo a los campos receptivos de los nervios tibial, sural y safeno y de los nervios espinales L3-L5, se puede inferir que los axones del nervio tibial corren por los nervios espinales L3-L6; los del nervio sural por los nervios espinales L4 y L5; y los del nervio safeno por el nervio espinal L3. En contra de estos hallazgos, un estudio electrofisiológico mostró que el nervio tibial está constituido por axones que provienen únicamente de las raíces dorsales L4-L6, sin que se haya registrado alguna actividad aferente en la L3. De todos los nervios que inervan la extremidad posterior de la rata el nervio safeno es el menos estudiado. De estos trabajos se puede concluir que la planta de la pata posterior de la rata está inervada principalmente por el nervio tibial y parcialmente por los nervios sural y safeno. Sin embargo, queda por resolver electrofisiológicamente si los nervios tibial y ciático contienen axones de la raíz L3.

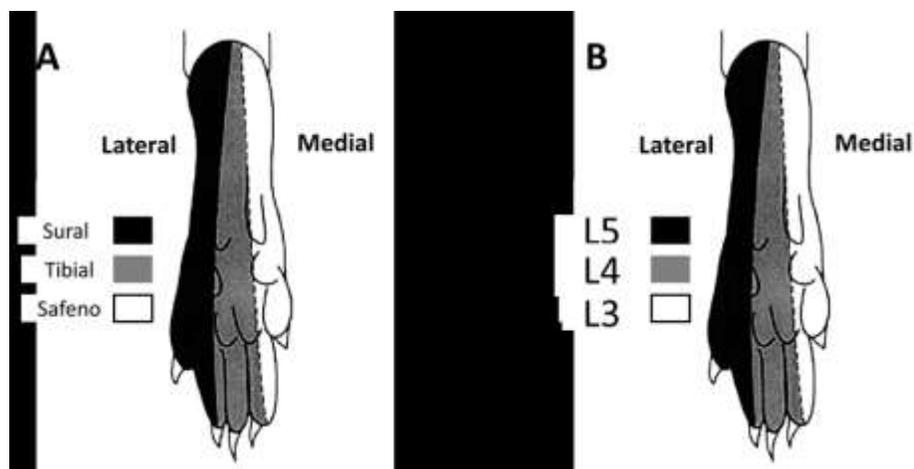


Figura 6. Campos receptivos y dermatomas de la planta de la pata posterior de la rata. A. Campos receptivos de los nervios sural (negro), tibial (gris) y safeno (blanco) (Imagen editada de Decosterd & Woolf., 2000). B. Dermatomas de los nervios espinales L5 (negro), L4 (gris) y L3 (blanco) (Imagen editada de Li et al., 2000).

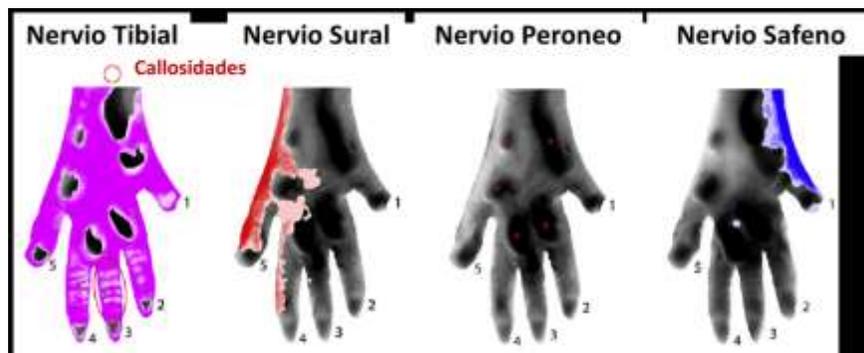


Figura 7. Campos receptivos de las ramas del nervio ciático (nervios tibial, sural y peroneo) y del safeno, determinados empleando el colorante azul de Evans. El nervio tibial inerva toda la planta de la pata, el nervio sural el área lateral, el nervio peroneo no inerva la planta y el nervio safeno inerva el área medial. Los dígitos de la rata están numerados desde el área medial hacia el área lateral. Las callosidades no presentan inervación y se muestran con un círculo rojo (Imagen editada de Kambiz et al., 2014).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el dolor crónico por inflamación, las terminales periféricas de las neuronas sensoriales se encuentran activadas permanentemente por mediadores inflamatorios que se liberan de las células del sistema inmune. En el dolor neuropático no se ha observado un proceso inflamatorio periférico evidente, aunque se ha reportado que las aferentes primarias A δ y C presentan actividad espontánea que podría favorecer la liberación de sustancias pronociceptivas en las terminales periféricas. Sin embargo, hasta el momento en el dolor neuropático no se ha demostrado si parte de esta actividad espontánea pudiera estar compuesta de RRD. En la rata con dolor neuropático inducido por ligadura de los nervios espinales L5 y L6, la alodinia mecánica se detecta aplicando estímulos mecánicos en la planta de la pata de la extremidad posterior ipsilateral a la lesión. Por lo tanto, es muy importante conocer el patrón de inervación sensorial de esta región. Está ampliamente aceptado que la extremidad posterior de la rata está inervada por el nervio safeno y las ramas del nervio ciático que forman los nervios peroneo, tibial y sural. También se reconoce que el nervio ciático de la rata se compone de los axones de las raíces dorsales L4-L6. Sin embargo, queda en duda si contiene axones del nervio espinal L3. Debido a que la planta de la pata está preferentemente inervada por el nervio tibial es importante determinar qué tipos de aferentes lo constituyen y por qué raíces dorsales entran a la médula espinal. Esto será muy importante para determinar los cambios en la actividad de las aferentes primarias producidos por la degeneración de las aferentes primarias ligadas.

3. HIPÓTESIS

La estimulación eléctrica del nervio tibial evoca potenciales de acción compuestos en las RDL4 a L6 y eventualmente en la RDL3 que corresponden a fibras aferentes rápidas ($A\alpha$ y $A\beta$) y lentas ($A\delta$ y C). Además, en ratas neuropáticas la estimulación del nervio tibial evoca potenciales antidrómicos (RRD) en las RDL3 y L4, así como en las RDL5 y L6 lesionadas. También, la estimulación de la RDL5 lesionada evoca RRD en la RDL6 lesionada y en las RDL3 y L4 no lesionada.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las raíces dorsales por donde entran las fibras aferentes primarias del nervio tibial a la médula espinal y por su velocidad de conducción los tipos de fibras (rápidas $A\alpha/\beta$ y lentas $A\delta$ y C) que las conforman, así como la presencia de RRD en ratas neuropáticas.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar en qué raíces dorsales desde L3 a L6 se evocan potenciales de acción ortodrómicos por estimulación del nervio tibial.
2. Determinar el tipo de fibras aferentes primarias del nervio tibial (rápidas $A\alpha/\beta$ y/o lentas $A\delta$ y C) que corren en cada raíz dorsal.
3. Determinar la presencia de RRD tanto en las raíces lesionadas como en las no lesionadas evocados por estimulación eléctrica del nervio tibial y de la RDL5 (lesionada) en ratas neuropáticas.

5. MÉTODO

5.1 Preparación animal

5.1.1 Inducción de dolor neuropático

El dolor neuropático se indujo mediante el método de Kim y Chung (1992). Se utilizaron ratas hembra y macho de la cepa Wistar con un peso de 180 a 230 g. Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (50 mg/Kg) y xilacina (10 mg/Kg) vía intraperitoneal (i.p.) y se colocaron en posición prona para ser afeitadas en la espalda baja. Posteriormente, se realizó una incisión de 2 cm a nivel de la cresta ilíaca para acceder a los nervios espinales lumbares izquierdos L5 y L6, que fueron ligados fuertemente con sutura de seda 6-0.

5.1.2 Prueba de umbral táctil

Después de 14 días de la cirugía, se evaluó la alodinia táctil empleando el método de up-down, que consiste en estimular la planta de la pata de la rata con filamentos de von Frey en un rango de 2.36 a 6.65 g. Las ratas que presentaron una respuesta de flexión de la extremidad ipsilateral a la lesión con valores < 4g en el umbral se consideraron con desarrollo de alodinia (Chaplan y cols., 1994). A estos animales se les denominó neuropáticos.

5.1.3 Laminectomía y disección del nervio tibial

Las ratas control y neuropáticas de 14 días después de la ligadura, fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (50 mg/Kg) y xilacina (10 mg/Kg) vía i.p. Se realizó una laminectomía desde las vértebras L1 a S1 para disecar las RDL3-RDL6 en continuidad con los nervios espinales respectivos. En la parte posterior de la pata izquierda se realizó una incisión desde el muslo hasta un centímetro distal a la región poplíteica para exponer el nervio ciático y el nervio tibial.

5.2 Estimulación eléctrica del nervio tibial y registro de los potenciales de acción compuestos evocados en las raíces dorsales L3, L4, L5 y L6

Se montó el nervio tibial en un par de electrodos de alambre de plata conectados a un estimulador de corriente para aplicar pulsos rectangulares con duración de 50 μ s. Cada raíz dorsal (L3-L6) se montó en un par de electrodos de plata conectados a un amplificador diferencial para registrar los potenciales de acción compuestos. Las señales se amplificaron x1000, se filtraron con un ancho de

banda de 0.1Hz a 3 KHz y se digitalizaron a 50 KHz. La tierra se fijó en la cola de la rata. Primero se grabó la actividad basal presente en cada raíz dorsal. A continuación se determinó el umbral (U) de activación de las fibras más rápidas. Con el fin de reclutar gradualmente los diferentes tipos de fibras se estimuló a las siguientes intensidades: 2xU, 5xU, 10xU y 50xU. A cada intensidad se grabaron 10 barridos. Se midió la latencia de los potenciales de acción registrados y la distancia desde la médula al sitio de registro para calcular la velocidad de conducción y determinar el tipo de fibras aferentes primarias en cada raíz dorsal.

5.3 Potenciales de acción antidrómicos en las fibras aferentes primarias

5.3.1 Reflejos de la raíz dorsal en la raíz dorsal L3

Para determinar si los potenciales de acción registrados en la RDL3 son RRD o información aferente, se registró el cabo central o periférico de la raíz dorsal seccionada cerca del ganglio de la raíz dorsal o cerca de la médula espinal, respectivamente. La primera maniobra es la más efectiva, porque descarta la entrada aferente ortodrómica. A cada intensidad se grabaron 10 barridos. Las condiciones de registro, digitalización e intensidades de estimulación se mantuvieron como se describió previamente para la caracterización de las fibras aferentes primarias de las raíces dorsales L3-L6.

5.3.2 Reflejos de la raíz dorsal en un filamento de las raíces dorsales L3 y L4

Se disecó un filamento de las RDL3 y RDL4 y se cortó periféricamente. La digitalización e intensidades de estimulación fueron iguales a las descritas arriba. En las condiciones de registro se mantuvo la misma amplificación y filtros, pero esta vez se aplicó un tren de tres pulsos rectangulares de corriente a 330 Hz con duración de 50 μ s cada uno (Eccles et al., 1963). A cada intensidad se grabaron 10 barridos. Posteriormente se contó barrido por barrido el número de RRD generados y el promedio de todas las ratas se graficó para cada intensidad de estimulación.

5.3.3 Reflejos de la raíz dorsal en las raíces dorsales L5 y L6

Las RDL5 y RDL6 se seccionaron periféricamente. Las condiciones de registro, digitalización, intensidades de estimulación se mantuvieron como se describió para los filamentos de las RDL3 y

RDL4. A cada intensidad se grabaron 10 barridos. Posteriormente se contó barrido por barrido el número de RRD generados y el promedio de todas las ratas se graficó.

5.3.4 Reflejos de la raíz dorsal evocados por estimulación de la raíz dorsal L5 en las raíces dorsales L3 y L6

Las RDL3 y RDL6 se seccionaron periféricamente en una rata neuropática. Se montó la RDL5 con un par de electrodos de alambre de plata conectados a un estimulador de corriente para aplicar el mismo tren de estimulación. La amplificación, filtraje, digitalización e intensidades de estimulación se mantuvieron como en los registros anteriores. A cada intensidad se grabaron 10 barridos.

5.4 Análisis de resultados

El análisis de los registros se realizó empleando el software pCLAMP 10.2. La velocidad de conducción se calculó midiendo la distancia de conducción entre los electrodos de registro y estimulación, dividida entre el tiempo de conducción medido entre el artefacto del estímulo y el pico del potencial de acción compuesto (PAC). Además, se determinaron los intervalos de tiempo dónde se reclutan las fibras aferentes $A\alpha$, $A\beta$, $A\delta$ y C y se calculó el área bajo la curva que posteriormente se comparó con el área bajo la curva basal. Para determinar el número de RRD evocados por estimulación del nervio tibial en los filamentos seccionados periféricamente de las RDL3 y RDL4, así como en las RDL5 y RDL6 lesionadas, también seccionadas periféricamente se realizó un contero de los potenciales de acción generados en cada uno de los 10 barridos. El número de potenciales promedio estimulando a 50xU en los grupos control y neuropático se graficaron empleando el software OriginPro 8 y se hicieron las figuras mostrando 10 trazos de cada registro de las diferentes raíces dorsales a una estimulación de 50xU.

Se empleó la estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si las áreas control y de prueba eran diferentes. Estas áreas también se compararon para las RDL3 y RDL4 entre el grupo control y neuropático, empleando la misma estadística. El procedimiento anterior también se aplicó para identificar posibles RRD presentes después de la sección de la RDL3 cerca de la médula, comparando las áreas bajo la curva de los potenciales de acción antes y después del corte.

6.0 RESULTADOS

6.1 Inducción de dolor neuropático

Las ratas en las que se realizó la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 mostraron alodinia táctil. Las ratas neuropáticas respondieron con una presión menor a 4 g. En contraste el grupo control tuvo una respuesta de retirada con filamentos mayores a 6 g.

6.2 Estimulación eléctrica del nervio tibial y registro de los potenciales de acción compuestos evocados en las raíces dorsales L3, L4, L5 y L6

La caracterización electrofisiológica de las fibras aferentes primarias se llevó a cabo en seis ratas control y seis ratas neuropáticas. Las RDL3 y RDL4 se estudiaron en ambos grupos, sin embargo debido a la ligadura de los nervios espinales lumbares izquierdos L5 y L6 en las ratas neuropáticas, que produce la degeneración del sitio de la lesión hasta la terminal periférica, la actividad aferente en estas raíces se estudió sólo en las ratas control. Con el fin de cuantificar la actividad aferente evocada en cada raíz dorsal se evaluó el área bajo la curva del PAC, registrado en los intervalos de tiempo donde se reclutaron los diferentes tipos de fibras de acuerdo a su velocidad de conducción: $A\alpha$ (30-55 m/s), $A\beta$ (14-30 m/s), $A\delta$ (2.2-8 m/s) y C (< 1.4 m/s). El área se calculó para cada grupo cuando se estimuló a 50xU, debido a que a esta intensidad se reclutaron todas las aferentes primarias.

Con respecto a la RDL3, en el grupo control (naive) únicamente 3 de 6 ratas presentaron actividad aferente. Sólo en una rata se reclutaron fibras rápidas del tipo $A\alpha$ (Fig. 8) presentando un área de 1.71 mV*ms. En dos ratas se reclutaron fibras rápidas $A\beta$ (1.73 mV*ms), en todos los animales se registraron fibras lentas $A\delta$ (1.52 mV*ms). Únicamente en dos ratas se logró identificar fibras de velocidad de conducción lenta tipo C (1.25 mV*ms). En contraste, en el grupo de ratas neuropáticas 4 de 6 animales mostraron actividad en la RDL3 y en ninguno se reclutaron fibras de alta velocidad de conducción $A\alpha$, en todos se logró identificar fibras del tipo $A\beta$ (1.45 mV*ms) y $A\delta$ (1.27 mV*ms) y sólo en 2 ratas se reclutaron fibras C (1.1 mV*ms) (Fig.9). En la figura 10 se muestra para la RDL3 del grupo control y neuropático, el área bajo la curva de los potenciales de acción de los diferentes tipos de fibras aferentes primarias y sobre cada barra la desviación estándar. Utilizando la estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

La RDL4 presentó una entrada aferente importante en ambos grupos de animales, 6 de 6 ratas mostraron actividad y en ambos grupos se reclutaron fibras rápidas del tipo $A\alpha$ y $A\beta$ y lentas ($A\delta$ y C), sólo en una rata neuropática no se reclutaron fibras C (Figs. 11, 12 y 13). El PAC $A\alpha$ - $A\beta$ presentó un área bajo la curva de 16.27 mV*ms en el grupo control y 7.85 mV*ms en el grupo neuropático. El área de las fibras $A\delta$ fue de 2.29 mV*ms en el grupo control y 2.04 mV*ms en el grupo neuropático. Para las fibras C el área fue de 1.31mV*ms en las ratas control y 1.29 mV*ms en las neuropáticas. En ningún caso se identificaron diferencias entre los grupos utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Aunque aparentemente el componente $A\alpha$ - $A\beta$ parecía ser mayor en las ratas control, la desviación estándar fue de 9.72 para el grupo naive y 5.42 para el neuropático (Fig. 13).

La RDL5 mostró ser otra entrada aferente importante en los animales control, 6 de 6 ratas también mostraron actividad reclutándose fibras rápidas ($A\alpha$ y $A\beta$) y lentas ($A\delta$ y C). Solo en una rata no se logró identificar fibras de tipo C (Fig. 14). El PAC $A\alpha$ - $A\beta$ presentó un área bajo la curva de 14.45 mV*ms, el área de las fibras $A\delta$ correspondió a 2.55mV*ms y el de las C a 1.54 mV*ms.

La RDL6 en los animales control presentó actividad aferente menor que la observada en las RDL4 y L5. 4 de 6 ratas presentaron actividad aferente, en todas se reclutaron fibras de velocidad de conducción rápida ($A\alpha$ y $A\beta$) y lenta del tipo $A\delta$ y C. Sólo en una rata no se lograron identificar fibras del tipo C (Fig. 15). El área del PAC $A\alpha$ - $A\beta$ fue de 7.25 mV*ms, el área de las fibras $A\delta$ 2.68 mV*ms y el de las fibras C 1.1 mV*ms.

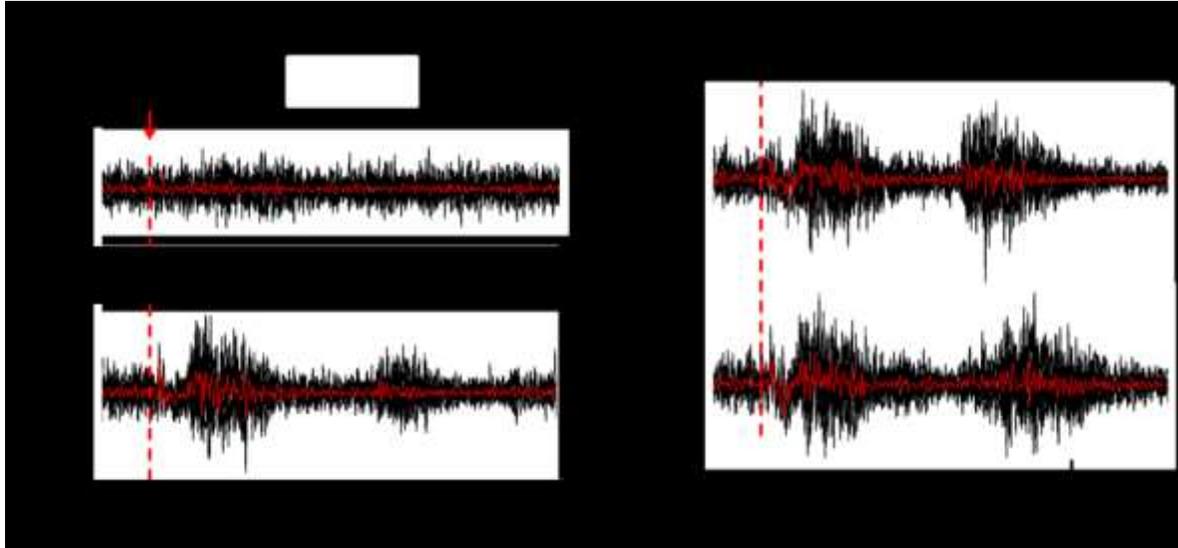


Figura 8. Potenciales de acción compuestos registrados en la RDL3 por estimulación del nervio tibial en una rata naive. Se muestran 10 registros superpuestos (negro) y el trazo promedio (rojo). Las aferentes primarias se reclutaron estimulando a intensidades de 2xU, 5xU, 10xU y 50xU.

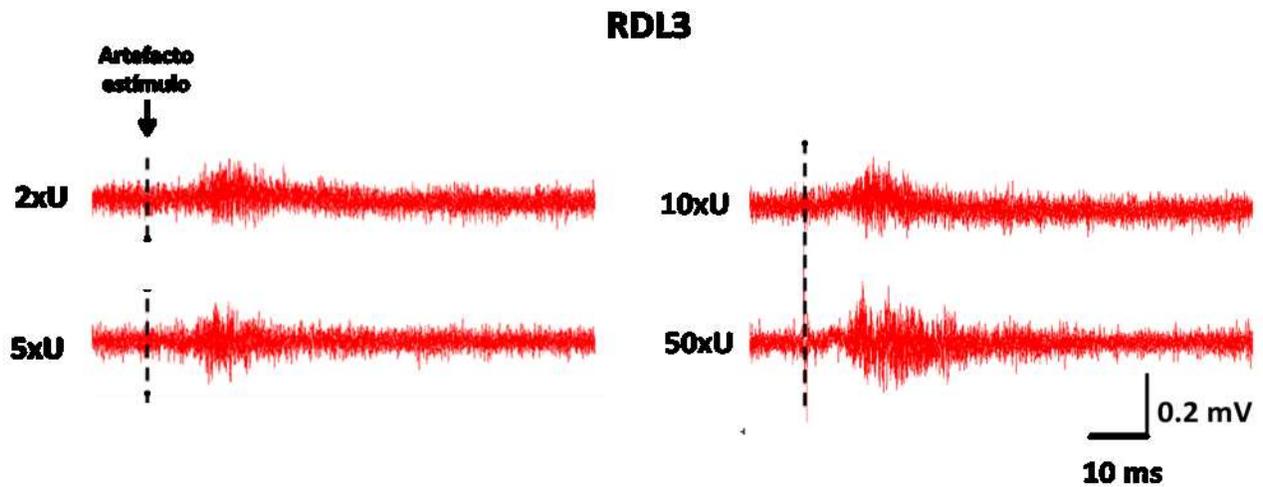


Figura 9. Potenciales de acción compuestos registrados en la RDL3 por estimulación del nervio tibial en una rata neuropática. Se muestran 10 registros superpuestos. Las aferentes primarias se reclutaron estimulando a intensidades de 2xU, 5xU, 10xU y 50xU.

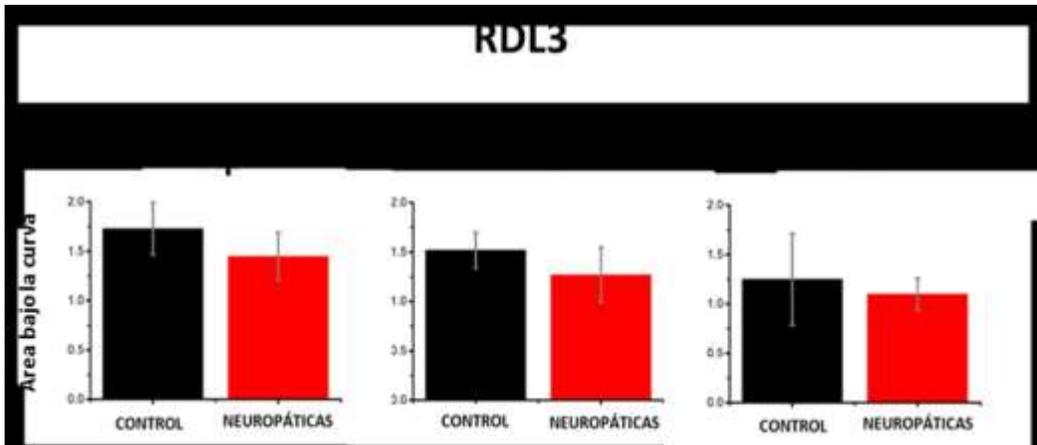


Figura 10. Área bajo la curva de los potenciales de acción de los diferentes tipos de fibras aferentes primarias de la RDL3, estimulando a 50xU. En negro se muestra el grupo control y en rojo el neuropático, para cada área se muestra la desviación estándar.

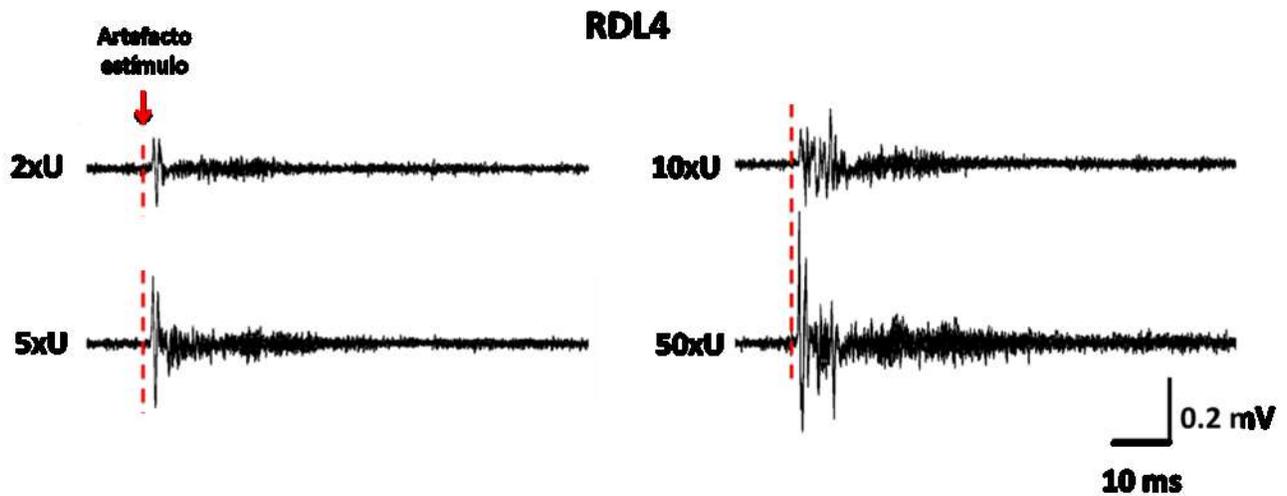


Figura 11. Potenciales de acción compuestos registrados en la RDL4 por estimulación del nervio tibial en una rata naive. Se muestran 10 registros superpuestos. Las aferentes primarias se reclutaron estimulando a intensidades de 2xU, 5xU, 10xU y 50xU.

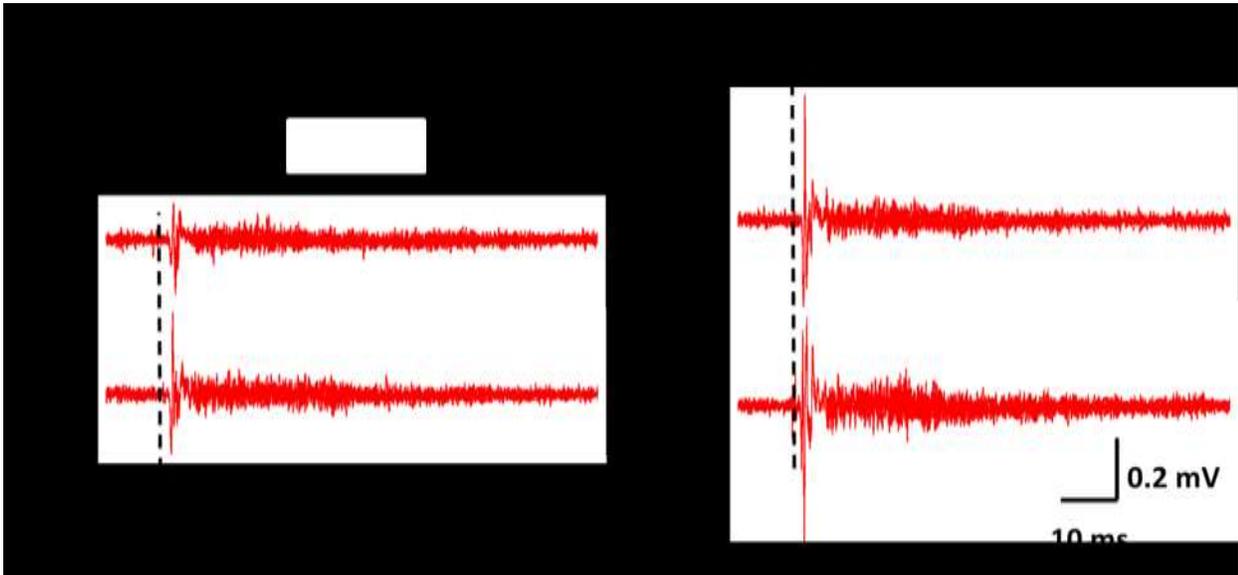


Figura 12. Potenciales de acción compuestos registrados en la RDL4 por estimulación del nervio tibial en una rata neuropática. Se muestran 10 registros superpuestos. Las aferentes primarias se reclutaron estimulando a intensidades de 2xU, 5Xu, 10xU y 50xU.

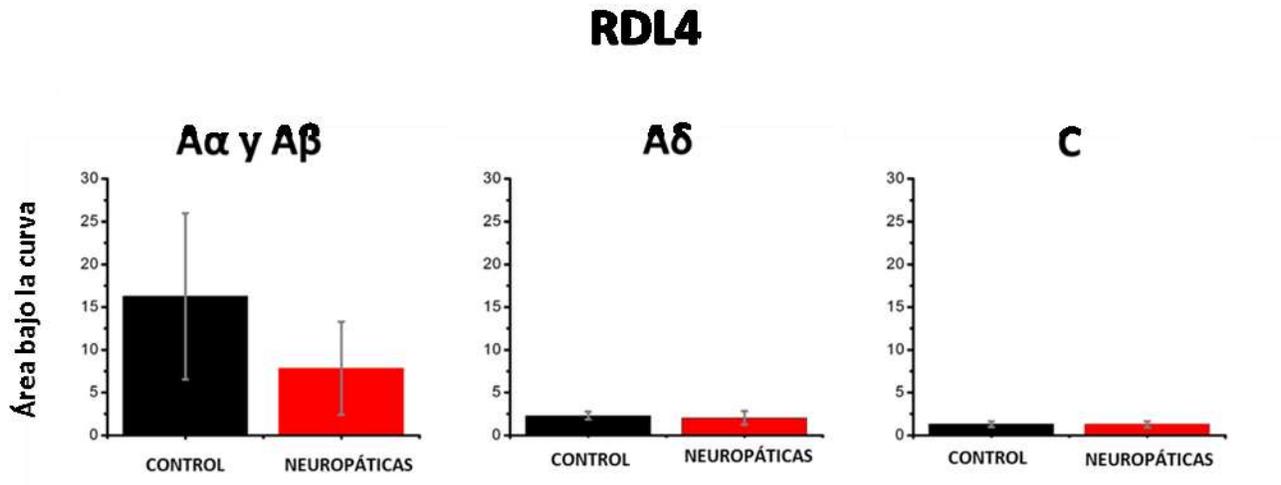


Figura 13. Área bajo la curva de los potenciales de acción de los diferentes tipos de fibras aferentes primarias de la RDL4, estimulando a 50xU. En negro se muestra el grupo control y en rojo el neuropático, para cada área se muestra la desviación estándar.

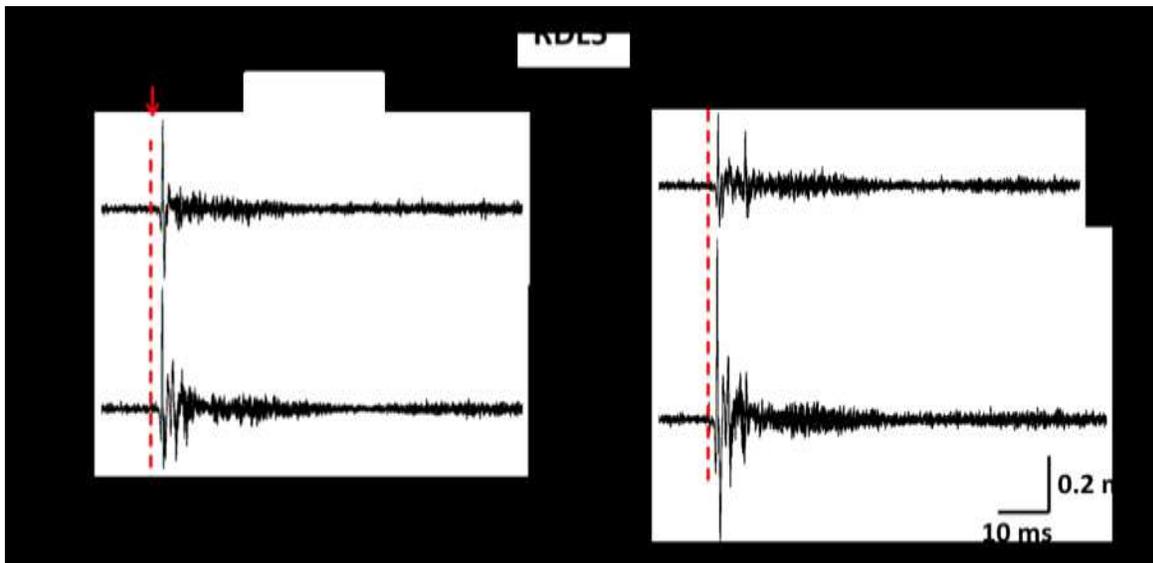


Figura 14. Potenciales de acción compuestos registrados en la RDL5 por estimulación del nervio tibial en una rata naive. Se muestran 10 registros superpuestos. Las aferentes primarias se reclutaron estimulando a intensidades de 2xU, 5xU, 10xU y 50xU.

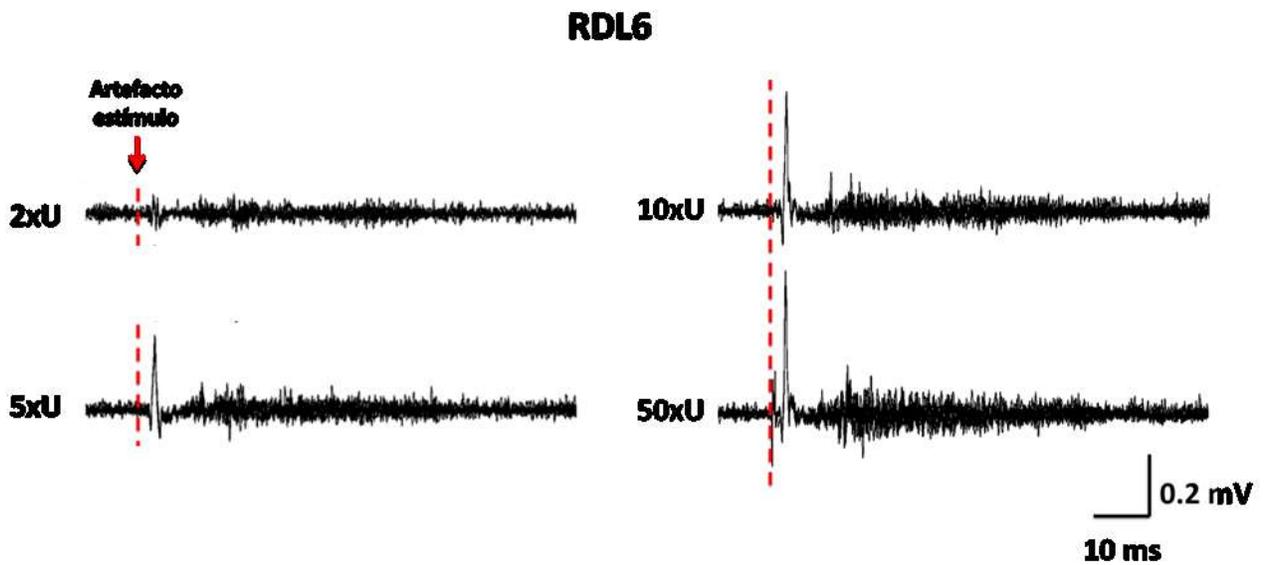


Figura 15. Potenciales de acción compuestos registrados en la RDL6 por estimulación del nervio tibial en una rata naive. Se muestran 10 registros superpuestos. Las aferentes primarias se reclutaron estimulando a intensidades de 2xU, 5xU, 10xU y 50xU.

6.3 Potenciales de acción antidrómicos en las fibras aferentes primarias

6.3.1 Reflejos de la raíz dorsal en la raíz dorsal L3.

Para estudiar si los RRD se presentan en ratas con dolor neuropático, se analizó la actividad de la RDL3 antes y después de su sección cerca de la médula espinal para eliminar la información proveniente del SNC o periféricamente para eliminar la información aferente ortodrómica.

En el grupo control 2 de las 3 ratas que presentaron actividad en la RDL3 se seccionaron cerca de la médula espinal y la tercera se seccionó periféricamente. En una de las ratas con sección central la actividad disminuyó significativamente (Fig. 16) y en la otra se eliminó completamente el componente C. Esto indica que en el primer caso la actividad presentaba dos componentes uno central posiblemente RRD y otro aferente, mientras que en el segundo la información de las fibras tipo C muy probablemente eran RRD. En la rata con sección periférica de la RDL3 la actividad se eliminó totalmente, indicando que la información era totalmente aferente. En el grupo de ratas neuropáticas 3 de las 4 ratas que presentaron actividad en la RDL3 se seccionaron cerca de la médula y la cuarta periféricamente. El corte cerca de la médula no produjo un cambio evidente en una de las ratas, en otra eliminó el componente de fibras A β y en la última eliminó totalmente la actividad (Fig. 17). Esto indica que el componente A β y en su totalidad la actividad de la última rata eran RRD. En la rata con sección periférica se eliminó toda la actividad indicando que se trataba de información aferente.

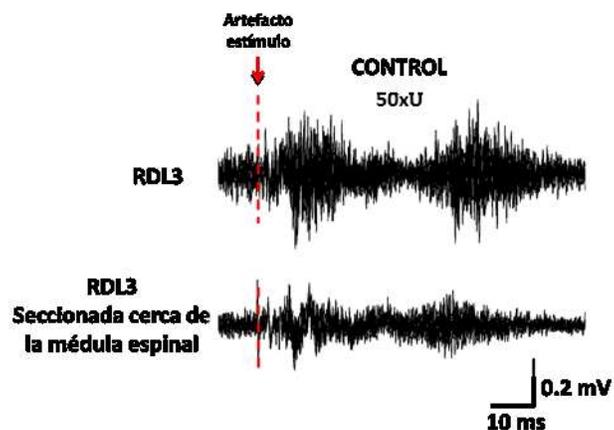


Figura 16. Potenciales de acción compuestos registrados en la RDL3 por estimulación del nervio tibial a 50xU en una rata control. Se muestran 10 registros superpuestos. En el trazo superior se muestra la raíz intacta y en el trazo inferior después de seccionar la raíz cerca de la médula. Se observa que después de la sección parte de la actividad desaparece.

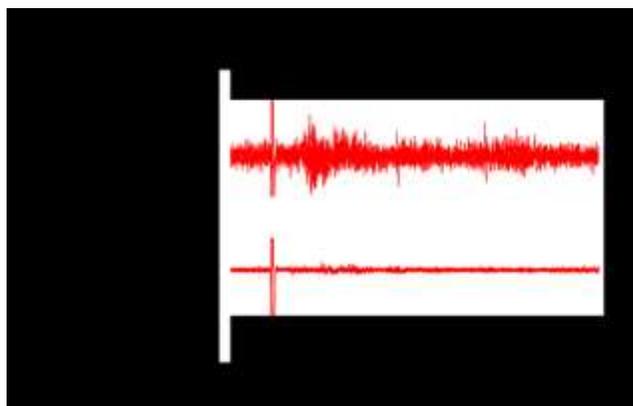


Figura 17. Potenciales de acción compuestos registrados en la RDL3 por estimulación del nervio tibial a 50xU en una rata neuropática. Se muestran 10 registros superpuestos. En el trazo superior se muestra la raíz intacta y en el trazo inferior después de seccionar la raíz a la entrada de la médula. Se observa que después de la sección la actividad desaparece.

6.3.2 Reflejos de la raíz dorsal en un filamento de las raíces dorsales L3 y L4

En el grupo control 2 de 3 ratas presentaron RRD en el filamento de la RDL3. El promedio de los potenciales de acción generados ante diferentes intensidades de estimulación se muestra en la figura 18A. En el grupo de ratas neuropáticas sólo en 1 de 5 ratas se logró registrar RRD. Sin embargo, el número de potenciales de acción evocados fue significativamente mayor que en las ratas control (Figs. 18A y 18B).

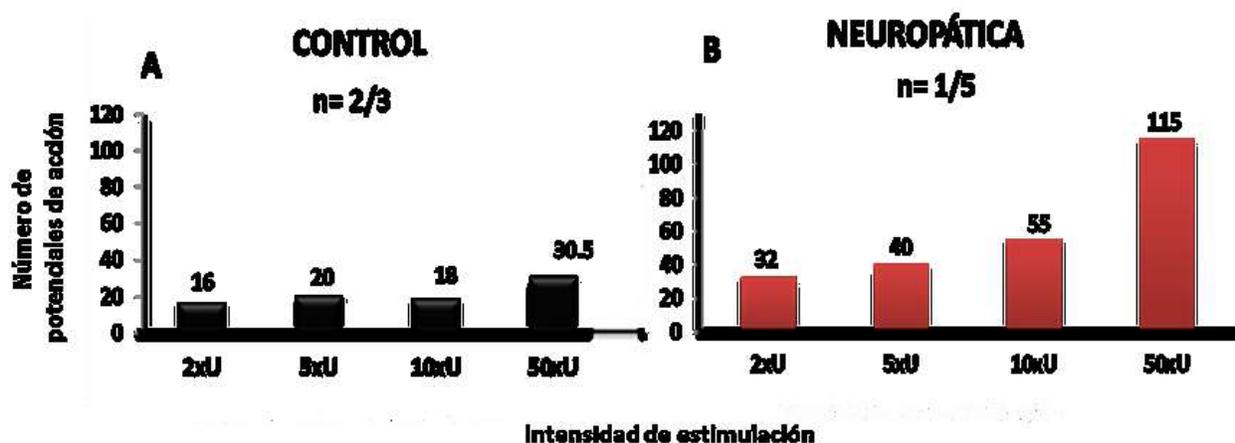


Figura 18. Reflejos de la raíz dorsal evocados por estimulación del nervio tibial a 50xU en un filamento de la RDL3. Se muestra el número de potenciales de acción promedio generados en diferentes intensidades de estimulación (2xU, 5xU, 10xU y 50xU) en el grupo control (A) y neuropático (B).

El filamento de la RDL4 mostró RRD en 3 de 4 ratas control y en 2 de 5 ratas neuropáticas, nuevamente la incidencia fue mayor en las ratas control pero se evocaron más potenciales de acción en las ratas neuropáticas. En la figura 19 se muestra en la parte superior 10 trazos superpuestos de una rata control (negro) y una neuropática (rojo), en la parte inferior se muestra el promedio de los potenciales de acción generados en las diferentes intensidades de estimulación.

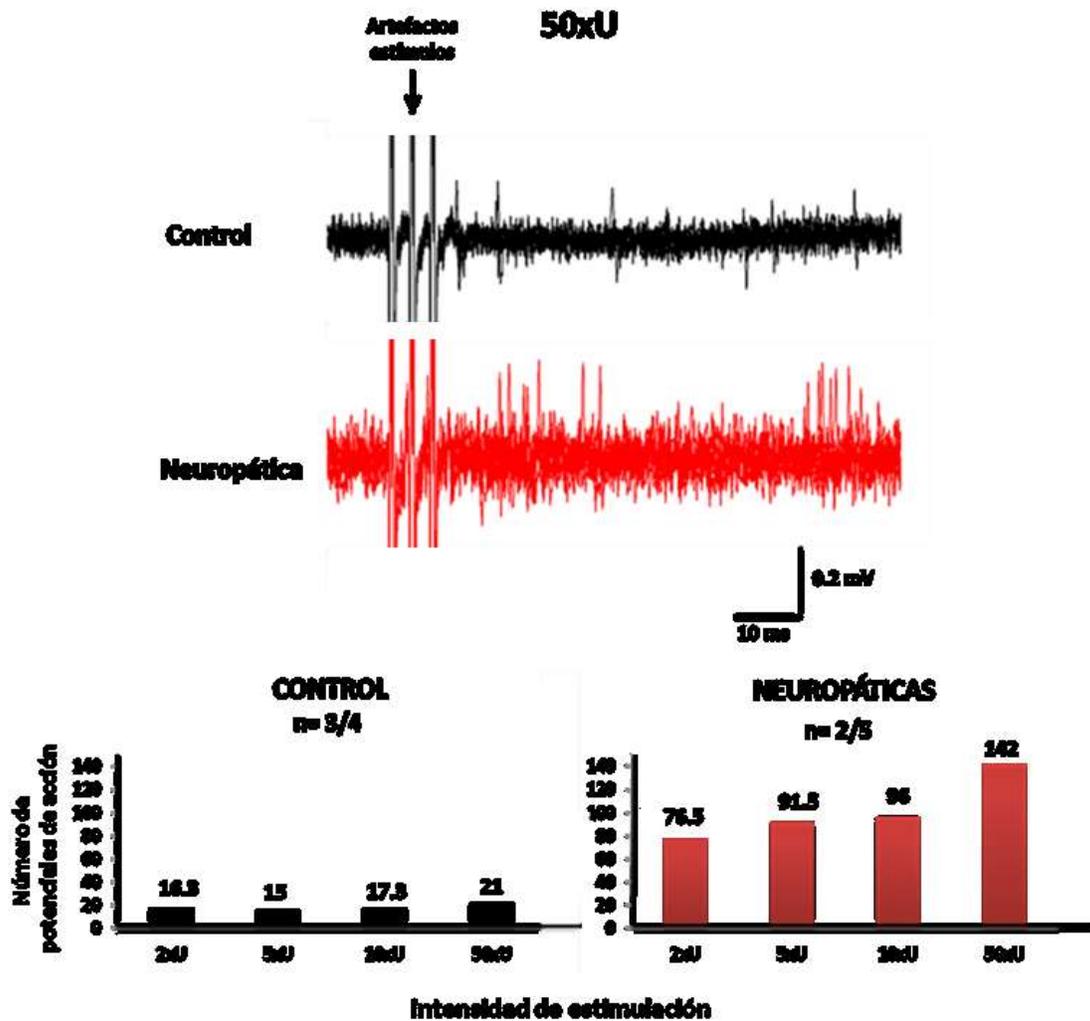


Figura 19. Reflejos de la raíz dorsal evocados por estimulación del nervio tibial a 50xU en un filamento de la RDL4. En la parte superior se muestran 10 registros superpuestos en una rata control y una rata neuropática, se observa que la rata neuropática presenta más RRD. En la parte inferior se observa el número de potenciales de acción promedio generados en el grupo de ratas control y neuropáticas.

6.3.3 Reflejos de la raíz dorsal en las raíces dorsales L5 y L6

Las raíces dorsales lesionadas también mostraron RRD. En la RDL5 se presentaron en 1 de 3 ratas (Fig.20) y en la RDL6 la incidencia aumento a 3 de 4 ratas (Fig. 21).



Figura 20. Promedio de los potenciales de acción generados en la RDL5 por estimulación del nervio tibial a diferentes intensidades (2xU, 5xU, 10xU y 50xU).

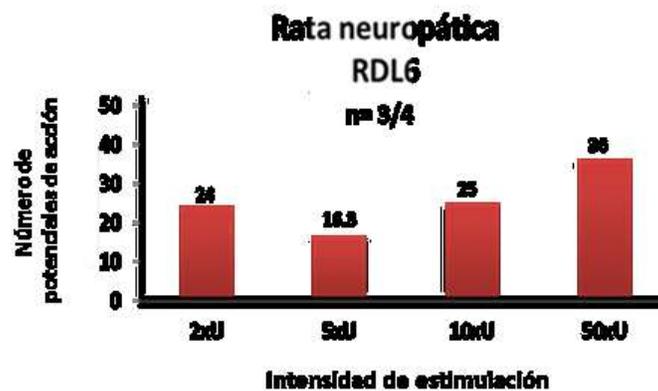


Figura 21. Promedio de los potenciales de acción generados en la RDL6 por estimulación del nervio tibial a diferentes intensidades (2xU, 5xU, 10xU y 50xU).

6.3.4 Reflejos de la raíz dorsal en las raíces dorsales L3 y L6 evocados por estimulación de la raíz dorsal L5 lesionada

La estimulación a 2xU de la RDL5 lesionada evocó en la RDL6 conformada por aferentes primarias lesionadas una fuerte descarga de potenciales de acción antidrómicos. Esta descarga también se presentó en la RDL3 conformada por aferentes primarias no lesionadas. Es importante resaltar que los RRD se pudieron evocar con intensidad de estimulación que sólo recluta las fibras de más bajo umbral de activación que comprende a los mecanoreceptores (Fig. 22).

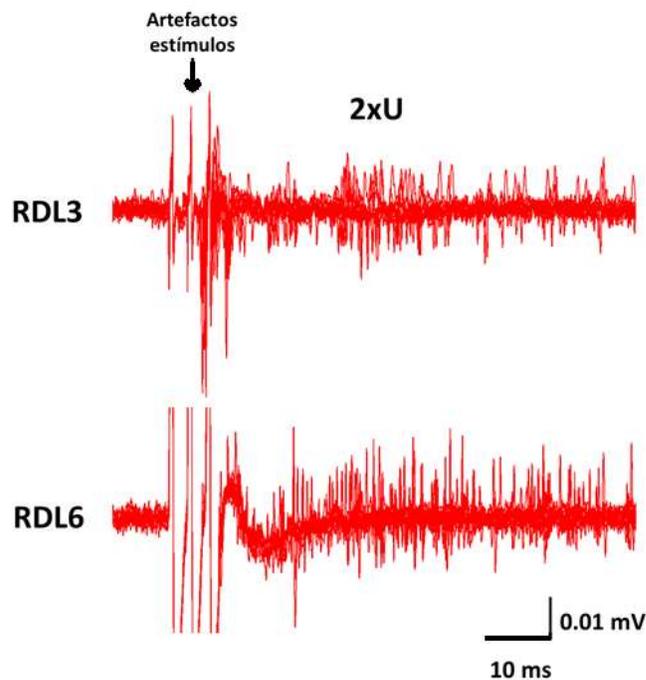


Figura 22. Reflejos de la raíz dorsal evocados por estimulación de la RDL5 a 2xU en ratas neuropáticas. Se muestran 10 registros superpuestos. En la parte superior se muestra la descarga registrada en la RDL3 y en la parte inferior el registro de la RDL6.

7.0 DISCUSIÓN

7.1 Estimulación eléctrica del nervio tibial y registro de los potenciales de acción compuestos evocados en las raíces dorsales L3, L4, L5 y L6

La ligadura de los nervios espinales L5 y L6 produjo hiperalgesia y alodinia en la planta de la pata de la extremidad posterior ipsilateral a la lesión. Aunque este modelo de dolor es muy utilizado por presentar una fisiopatología muy semejante a la observada en humanos, no existe una descripción clara de los plexos que componen los nervios que inervan la planta de la pata de la extremidad posterior. Lo que es muy relevante para determinar los cambios que se producen en las aferentes lesionadas y no lesionadas. Actualmente está ampliamente aceptado que la pata posterior de la rata está inervada por el nervio safeno y tres ramas que surgen del nervio ciático (peroneo, tibial y sural) y que los axones del nervio ciático provienen de los nervios espinales L4-L6 (Brunner et al., 1980; Swett et al., 1986). Sin embargo, otros autores reportan que también presenta axones de los nervios espinales L3 y S1 (Sanguinetti et al., 1986). Por ejemplo, Sweet y Woolf (1985) estimulando la planta de la pata y registrando potenciales de acción en los nervios que proyectan hacia esta región, encontraron tres campos receptivos (Fig. 6A): medial (incluye el dígito 1 y parte del 2) inervado por el nervio safeno; central (incluye parte de los dígitos 2 y 4, y el dígito 3) inervado por el nervio tibial; lateral (incluye el dígito 5 y parte del 4) inervado por el nervio sural (Fig. 4A) (Swett y Woolf, 1985). En otro estudio, el marcaje de los nervios espinales lumbares con azul de Evans mostró que la planta de la pata presenta dermatomas de los nervios espinales L3-L5 (Fig. 6B): medial inervado por el nervio espinal L3; central inervado por el nervio espinal L4; lateral inervado por el nervio espinal L5 (Kambiz et al., 2014). De este modo, Kambiz y colaboradores (2014) corroboraron que el nervio sural inerva el área lateral, el nervio safeno el área medial; sin embargo, contrario a descrito por Swett y Wolf (1986), estos autores encontraron que el nervio tibial inerva toda la planta de la pata (Kambiz et al., 2014) (Fig. 7). Con estos trabajos, se puede inferir que los axones del nervio tibial corren por los nervios espinales L3-L6. Sin embargo, el único estudio electrofisiológico donde se estimuló el nervio tibial y registro en las raíces dorsales mostró salvas aferente sólo en las RDL4-L6 sin haberse observado actividad en la RDL3 (Vejsada y Hník, 1980).

En esta investigación se estimuló el nervio tibial y se registraron las salvas aferentes en las raíces dorsales L3-L6. Encontramos que contrario a lo reportado por el estudio electrofisiológico, en 50% de las ratas control (naive) (3 de 6 ratas) se observó salva aferente en la RDL3, de las cuales sólo en una se reclutaron fibras rápidas del tipo $A\alpha$, además de fibras $A\beta$ y C, que se observaron en otras dos ratas. En todas se reclutaron fibras $A\delta$. Este tipo de información no ha sido reportada en los estudios histológicos (Swett & Woolf., 1985; Kambiz et al., 2014). En la RDL4 se encontró actividad en el 100% de los animales. Además, se reclutaron fibras rápidas ($A\alpha$ y $A\beta$) y lentas ($A\delta$ y C). Igualmente en la RDL5 se registraron salvas aferentes rápidas ($A\alpha$ y $A\beta$) y lentas ($A\delta$ y C). Sólo una rata no mostró actividad de fibras C. No obstante, la RDL6 presentó actividad sólo en el 66.6% de los animales, reclutándose aferentes rápidas ($A\alpha$ y $A\beta$) y lentas ($A\delta$ y C) en el 100% de los animales, sólo una rata no mostró actividad de fibras tipo C. Nuestros resultados demuestran que en ratas sanas los axones que constituyen el nervio tibial-plantarias entran a la médula espinal en el 100% de los animales por las RDL4 y L5, lo que está parcialmente de acuerdo con los reportes histológicos (Peyronnard y Charron, 1982; Swett et al., 1991;) y electrofisiológicos (Vejsada y Hník, 1980). En contraste, en los animales neuropáticos el 66.6 % presentó actividad en la RDL3, de los cuales en ninguno se reclutaron aferentes primarias $A\alpha$, aunque todos presentaron fibras $A\beta$ y $A\delta$, en el 50% se reclutaron fibras tipo C. El 100 % de las ratas neuropáticas mostraron salva aferente en la RDL4 de fibras rápidas ($A\alpha$ y $A\beta$) y lentas ($A\delta$ y C), sólo en una rata no se identificaron fibras tipo C. La ligadura de los nervios espinales L5 y L6 produce degeneración de los axones desde el sitio de la lesión hasta la terminal periférica, por lo que la entrada sensorial del nervio tibial queda restringida a la RDL4 (70.63 %), y el resto entra por la RDL3 (29.37%). El área bajo la curva para los diferentes tipos de fibras aferentes primarias no mostró diferencias entre los grupos, indicando que se a pesar del estado patológico de los animales neuropáticos, en las raíces dorsales no dañadas se siguen reclutando el mismo número de fibras.

En la ratas naive el área bajo la curva para las fibras aferentes rápidas en la RDL4 fue mayor que la medida en la RDL5. Esto indicaría que la RDL4 tendría un mayor número de estas aferentes provenientes del nervio tibial. Respecto a la RDL6 el área bajo la curva del PAC de las fibras rápidas es casi la mitad que el obtenido en las RDL4 y L5. Sin embargo, respecto a las lentas son muy semejantes, lo que indicaría que estas aferentes se mantienen en la misma proporción en las raíces dorsales que conforman el nervio tibial.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que en ratas sanas los axones que constituyen el nervio tibial-plantarias entran a la médula espinal por las raíces dorsales L4 y L5 en el 100% de los animales, lo que está de acuerdo con los reportes histológicos y electrofisiológicos. En contraste sólo se encontró salva aferente en la RDL6 y RDL3 en 66.6% y 50% de los animales sanos, respectivamente. Además, al caracterizar las aferentes primarias que constituyen cada una de estas raíces encontramos que la RDL3 presentó principalmente axones de velocidad de conducción lenta $A\delta$, aferentes $A\beta$ y C y con una probabilidad mucho menor las $A\alpha$. Las raíces dorsales L4, L5 y L6 presentaron axones de todos los tipos ($A\alpha$, $A\beta$, $A\delta$ y C). En las ratas naive donde no se identificaron fibras C en las raíces dorsales L5 y L6, probablemente se debe a que los potenciales de acción de estas fibras al no arribar al sitio de registro en sincronía, por su lenta velocidad de conducción y baja amplitud, hace más difícil su caracterización pudiendo confundirse con el ruido eléctrico. Algo importante fue que en los animales neuropáticos aumentó el porcentaje de ratas con actividad en la RDL3 de un 50% a un 66.6%, lo que podría deberse a la aparición de reflejos de la raíz dorsal por el proceso de sensibilización central. Es importante mencionar que éste es el primer reporte donde se describen los diferentes tipos de fibras aferentes que conforman el nervio tibial en las raíces dorsales por donde entran a la médula espinal.

7.2 Potenciales de acción antidrómicos en las fibras aferentes primarias

Se sabe que las terminales periféricas de las neuronas sensoriales se encuentran sensibilizadas en el dolor crónico inflamatorio (Willis, 1999; Cervero y Laird, 1996; Price et al., 2009; Bausman et al., 2009). Esta sensibilización periférica reduce el umbral de activación de las neuronas sensoriales (Bausman et al., 2009), incrementándose la entrada sináptica excitadora sobre las neuronas de proyección y sobre las interneuronas GABAérgicas, aumentando la concentración de GABA a nivel sináptico y extrasináptico. Esto aumenta el número de receptores $GABA_A$ extrasinápticos activados tónicamente, produciendo una despolarización sostenida mayor de las aferentes primarias (PAD tónica). En estas condiciones la activación de la PAD sináptica se incrementa en amplitud pudiendo alcanzar el umbral de activación de los RRD, por lo que la PAD pasaría de una acción inhibitoria a una excitadora (Cervero y Laird, 1996). Los RRD se propagan de forma antidrómica y ortodrómica. La propagación anterógrada induce la liberación de neuropéptidos como la sustancia P y CGRP en la terminal periférica, favoreciendo la inflamación y contribuyendo al desarrollo de la alodinia e

hiperalgesia (Cervero y Laird, 1996). La propagación ortodrómica causa sobre-excitación de las neuronas de segundo orden, reforzando la sensibilización central que mantiene el dolor (Willis, 1999). En el dolor neuropático no se ha observado un proceso inflamatorio periférico evidente ni la presencia de RRD. En esta condición, Chen et al (2014) encontraron una reducción en la conductancia GABAérgica, que reduciría la PAD y por lo tanto la inhibición pre-sináptica, de tal modo que contrario a lo que ocurre en las neuronas de proyección, donde el GABA pasa de inhibir a excitar, en las neuronas sensoriales disminuye la excitabilidad al decrecer la PAD y por lo tanto la probabilidad de producirse RRD (Chen et al., 2014). Es importante mencionar que Chen et al (2014) evaluaron la actividad GABAérgica pre-sináptica midiendo la fluorescencia de calcio que se producía al aplicar GABA o despolarizar la terminal con alto potasio. Esta maniobra no discrimina la activación de los receptores sinápticos de los extrasinápticos. Loeza-Alcocer et al (2013) demostraron que los receptores GABA_A extrasinápticos activados por el GABA en el ambiente pueden producir una PAD tónica de tal modo que al activar la PAD sináptica se produjeron RRD. Estos autores encontraron que al bloquear los receptores α_5 GABA_A los RRD se deprimieron, lo que sugirió que los receptores extrasinápticos estarían despolarizando tónicamente las neuronas sensoriales (Loeza-Alcocer et al., 2013). Por lo tanto, sería muy importante evaluar la inhibición pre-sináptica en condiciones fisiológicas en presencia de dolor neuropático, para determinar si la PAD no es capaz de evocar RRD. Otra maniobra que puede desenmascarar la presencia de los RRD fue aplicada por Eccles y su grupo, ésta consistía en aplicar un tren de alta frecuencia a un nervio para facilitar el DRP (Eccles et al., 1962).

Cuando ocurre la lesión de un nervio periférico las fibras aferentes primarias (tipo A y C) lesionadas y no lesionadas (Campbell & Meye., 2006; Kim y Chung., 1992; Liu et al., 2000; Shim et al., 2005) comienzan a presentar descargas espontáneas, lo que sugiere la posibilidad de que parte de esta actividad se produzca por sensibilización periférica inducida por la presencia de RRD. En este trabajo, se encontró que el 66.6% de ratas neuropáticas presentan actividad aferente en la RDL3, que después de seccionarla en la entrada de la médula, en algunos casos desaparece (Fig. 17), indicando que se trata de RRD. En otro caso, en una rata control la sección cerca de la médula eliminó los potenciales de acción identificados como fibras tipo C y en una rata neuropática los identificados como fibras A β . Siendo escépticos se podría pensar que las fibras C no se observaron por algún cambio durante el registro que afectara la identificación de estos potenciales al ser de pequeña amplitud y encontrarse

dispersos. Sin embargo, en el caso de la rata neuropática los potenciales de las fibras A β están sincronizados y son de mayor amplitud, por lo que se identifican muy fácilmente, sugiriendo nuevamente la presencia de RRD. En otros experimentos, la estimulación de un filamento de las raíces dorsales L3 y L4 conectadas a la médula espinal mostró que en las ratas neuropáticas se evocan mayor número de potenciales de acción; sin embargo, la incidencia fue mayor en las ratas control que en las neuropáticas (filamento de la RDL3: 2 de 4 ratas; filamento L4: 1 de 5 ratas).

Un resultado muy relevante fue la producción de RRD en los cabos centrales de las raíces dorsales lesionadas L5 y L6 de ratas neuropáticas evocados por estimulación del nervio tibial a intensidades que activan sólo a los mecanorreceptores. Este resultado podría ser explicado por el modelo de Cervero et al. (2003), que sugiere que en un estado patológico los nociceptores sensibilizados excitan persistentemente a las interneuronas GABAérgicas, de tal modo que cuando se estimulan los mecanorreceptores la PAD que se genera es mayor y alcanza el umbral de activación de los canales de sodio dando lugar a los RRD (Fig. 4). Consistente con esta hipótesis, se encontró que al estimular en una rata neuropática la RDL5 desde una intensidad 2xU se evocaron RRD en la RDL3 no lesionada y en la RDL6 lesionada (Fig.22). Este resultado sugiere que la actividad ectópica registrada en las raíces dorsales lesionadas, a las que se le atribuye el desarrollo de la sensibilización central (Liu et al., 2000), estaría generando RRD en las mismas raíces lesionadas y no lesionadas, contribuyendo a la sensibilización central así como a la alodinia.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que en el dolor neuropático, se activan RRD, ya sea por activación de las fibras aferentes primarias no lesionadas pero sensibilizadas periféricamente o por la actividad ectópica de las aferentes de las raíces lesionadas. Estos RRD que podrían activar la liberación de sustancias pronociceptivas como la sustancia P y CGRP en la terminal periférica contribuyen al desarrollo de la alodinia e hiperalgesia como ocurre en el dolor crónico inflamatorio.

8 CONCLUSIONES

- En animales sanos los axones que constituyen el nervio tibial entran a la médula espinal en el 100% de los animales por las raíces dorsales L4 y L5, como una variación anatómica entre individuos también pueden enviar información a través de la RDL5 (66.6 % de la población) y sólo en un 50% por la RDL3.
- La RDL3 presenta principalmente fibras de velocidad de conducción lenta A δ y posteriormente A β y C. Las raíces dorsales L4, L5 y L6 presentan todos los tipos de fibras aferentes primarias (A α , A β , A δ y C).
- Durante el dolor neuropático se evocan RRD que podrían disparar la liberación de sustancias pronociceptivas como la sustancia P y CGRP en la terminal periférica.

9. PERSPECTIVAS

- Para cada experimento realizado aumentar la muestra a 6 ratas neuropáticas y 6 ratas naive.
- Investigar si los RRD se bloquean con L-655708 agonista inverso de los receptores α_5 GABA_A.
- Identificar las fibras aferentes primarias (A β , A δ y C) que presentan RRD.

10. REFERENCIAS

- Basbaum, A., Bautista, D., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139, 267-284.
- Bourinet, E., Altier, C., Hildebrand, M. E., Trang, T., Salter, M. W., & Zamponi, G. W. (2014). Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiological reviews*, 94(1), 81-140.
- Brunner, R., P. Zimmermann., & Klusmann, F. W. (1980). Localization and neurophysiological properties of motoneurons of the m. triceps surae of the rat after retrograde labelling with Evans blue. *Cell Tissue Res*, 212, 73–81.
- Campbell, J. N., & Meyer, R. A. (2006). Review Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*, 52, 77–92.
- Casparly, T., & Anderson, K. V. (2003). Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nat Rev Neurosci*, 4(4), 289–297.
- Cervero, F., & Laird, J.M. (1996). Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain*, 68, 13-23.
- Cervero, F., Laird, J., García-Nicas, E. (2003). Secondary hyperalgesia and presynaptic inhibition: an update. *Eur J Pain*, 7,345-351.
- Chen, J.T., Guo, D., Camanelli, D., Frattini, F., Mayer, F., Kuner, R., Heppenstall, P., Knipper, A., & Hu, J. (2014). Presynaptic GABAergic inhibition regulated by BDNF contributes to neuropathic pain induction. *Nature Commun*, 5, 5331.
- Cohen, S. P., & Mao, J. (2014). Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ*, 348, f7656.
- Costigan, M., & Woolf, C. (2000). Pain: molecular mechanisms. *J Pain*, 1, 35-44.
- Coull, JA., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, MW., & De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438,1017-1021.
- Decosterd, I., & Woolf, C. J. (2000). Spared nerve injury: An animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, 87(2), 149–158.
- Djoughri, L., Fang, X., Koutsikou, S., & Lawson, S. N. (2012). Partial nerve injury induces

electrophysiological changes in conducting (uninjured) nociceptive and nonnociceptive DRG neurons: Possible relationships to aspects of peripheral neuropathic pain and paresthesias. *Pain*, 153(9), 1824–1836.

Djoughri, L., & Lawson, S. N. (2004). A β -fibernociceptiveprimaryafferentneurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Research Reviews*, 46(2), 131-145.

Fang, X., McMullan, S., Lawson, S. N., & Djoughri, 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.

Guo, D., & Hu, J. (2014). Spinal presynaptic inhibition in pain control. *Neuroscience*, 283, 95–106.

Jaggi, A. S., Jain, V., & Singh, N. (2011). Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharm*, 25(1), 1–28.

Kambiz, S., Baas, M., Duraku, L. S., Kerver, A. L., Koning, A. H. J., Walbeehm, E. T., & Ruigrok, T. J. H. (2014). Innervation mapping of the hind paw of the rat using Evans Blue extravasation, Optical Surface Mapping and CASAM. *Journal of Neuroscience Methods*, 229, 15–27.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013). Principles of neural science. *Neurology (Vol. 3)*. 475-480.

Kim, SH., & Chung, JM. (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 50, 355-363.

Latremoliere, A., & Woolf, C.J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*, 10, 895-926.

Li, Y., Dorsi, M. J., Meyer, R. A., & Belzberg, A. J. (2000). Mechanical hyperalgesia after an L5 spinal nerve lesion in the rat is not dependent on input from injured nerve fibers. *Pain*, 85(3), 493–502.

Linhart, O., Obreja, O., & Kress, M. (2003). The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. *Neuroscience*, 118, 69-74.

Liu, C., Wall, P. D., Ben-dor, E., Michaelis, M., Amir, R., & Devor, M. (2000). Tactile allodynia in the absence of C- fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain*, 85 (3), 503–521.

- Loeser, J., & Melzack, R. (1999). Pain: An overview. *Lancet*, 353, 1607-1609.
- Melzack, R., & Wall, P.D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150:971-979.
- Munro, G., Erichsen, H.K., Rae M.G., Mirza, N.R. (2011). A question of balance - positive versus negative allosteric modulation of GABA_A receptor subtypes as a driver of analgesic efficacy in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Neuropharmacology*, 61, 121-132.
- Peyronnard, J.M., & Charron, L. (1982). Motor and sensory neurons of the rat sural nerve: a horseradish peroxidase study. *Muscle Nerve*, 5, 654-660.
- Prescott, S. A., & Ratté, S. (2012). Pain processing by spinal microcircuits: Afferent combinatorics. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(4), 631-639.
- Price, T., Cervero, F., Gold, M., Hammond, D., & Prescott, S.(2009).Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Res Rev*, 60, 149-170.
- Rudomin, P., & Schmidt, R.F. (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp Brain Res*, 129, 1-37.
- Sanguinetti, C., Tranquilli, L. P., & Grispigni, C. (1986). An experimental study of retrograde axonal plasmatic flow in the peripheral nerves of rats. *Italian journal of orthopaedics and traumatology*, 12(4), 479-484.
- Shim, B., Kim, D. W., Kim, B. H., Nam, T. S., Leem, J. W., & Chung, J. M. (2005). Mechanical and heat sensitization of cutaneous nociceptors in rats with experimental peripheral neuropathy. *Neuroscience*, 132(1), 193-201.
- Scholz, J., & Woolf, C. (2002). Can we conquer pain?. *Nat Neurosci*, 5, 1062-1067.
- Swett, J.E., Torigoe, Y., Elie, V.R., Bourassa, C.M., & Miller, P.G. (1991). Sensory neurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol*, 114, 82-103.
- Swett, J. E., Wikholm, R. P., Blanks, R. H., Swett , A. L., & Conley, L. C. (1986) .Motoneurons of the rat sciatic nerve. *Exp. Neurol.* 93, 227-252.
- Swett, J. E., & Woolf, C. J. (1985). The somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*, 231(1), 66-77.

- Takahashi, Y., & Nakajima, Y. (1996). Dermatomes in the rat limbs as determined by antidromic stimulation of sensory C-fibers in spinal nerves. *Pain*, 67, 197-202.
- Takahashi, Y., Nakajima, Y., & Sakamoto, T. (1994). Dermatome mapping in the rat hindlimb by electrical stimulation of the spinal nerves. *Neurosci Lett*, 168, 85-88.
- Thacker, M.A., Clark, A.K., Bishop, T., Grist, J., Yip, P.K., Moon, L.D., Thompson, S.W., Marchand, F., & McMahon, S.B. (2008). CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states. *Eur J Pain*, 13, 263-272.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., & Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*, 424, 778-783.
- Vejsada, R., & Hník, P. (1980). Radicular innervation of hindlimb muscles of the rat. *Physiol Bohemoslov*, 29 (5), 385-392.
- Willis, D. (1999). Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp Brain Res*, 124, 395-421.
- Woolf, C. J. (2010). What is this thing called pain? *The Journal of Clinical Investigation*. 120(11), 3742–3744.
- Woolf, C., & Ma, Q. (2007). Nociceptors-noxious stimulus detectors. *Neuron*, 55, 353-364.
- Xie, G., Wang, Y., Sharma, M., Gabriel, A., Mitchell, J., Xing, Y., Meuser, T., & Palmer, P. (2003). 5-Hydroxytryptamine-induced plasma extravasation in the rat knee joint is mediated by multiple prostaglandins. *Inflamm Res*, 52, 32-38.
- Zeilhofer, H.U., Wildner, H., Yévenes, G.E. (2012b). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev*, 92, 193-235.