

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**Papel de los canales iónicos de calcio
dependientes de voltaje en la modulación de las
señales nociceptivas en la médula espinal.**

Memoria de Tesis Doctoral

Jesús Martínez Gómez

2010

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Fisiología



Papel de los canales iónicos de calcio dependientes de voltaje en la modulación de las señales nociceptivas en la médula espinal.

Memoria de Tesis Doctoral presentada por Jesús Martínez Gómez para optar al grado de Doctor por la Universidad de Alcalá.

Marzo 2010

PUBLICACIONES

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

ARTÍCULOS.

1.- Rivera-Arconada I., **Martínez-Gómez J.** & López-García J.A. M-current modulators alter rat spinal nociceptive transmission: an electrophysiological study *in vitro*. *Neuropharmacology*, 46 (2004), 598-606.

2.- **Martínez-Gómez J.** & López-García J.A. Electrophysiological and pharmacological characterisation of ascending anterolateral axons in the *in vitro* mouse spinal cord. *Journal of Neuroscience Methods*, 146 (2005), 84-90.

3.- **Martínez-Gómez J.** & López-García J.A. Simultaneous assessment of the effects of L-type current modulators on sensory and motor pathways of the mouse spinal cord *in vitro*. *Neuropharmacology*, 53 (2007), 464-471.

COMUNICACIONES A CONGRESOS.

1.- Rivera-Arconada I., **Martínez-Gómez J.** & López-García J.A. Modulation of spinal reflexes by M-current modulators an electrophysiological study *in vitro*. *J. Physiol.* 549, 119 (2003).

2.- **Martínez-Gómez J.** & López-García J.A. Recordings from anterolateral sensory fibers in a mouse spinal cord *in vitro* preparation. *J. Physiol. Biochem.*, 61(1), 240 (2005).

3.- **Martínez-Gómez J.** & López-García J.A. Effects of verapamil on motor reflexes and putative spinothalamic ascending fibers. Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, (2005). Online. Program No. 982.7.

Publicaciones.

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

- Comunidad de Madrid, Contrato Programa (2000-2003).
- Papel de canales iónicos de potasio y de calcio en la modulación de señales nociceptivas en la médula espinal. Ministerio de Educación y Ciencia (2004-2006).
- Mecanismos iónicos de excitabilidad neuronal relacionados con procesos hiperalgésicos. Ministerio de Educación y Ciencia (2006-2009).

El autor de esta Tesis fue **Becario Predoctoral** del programa de Formación de Personal Investigador del Vicerrectorado de Investigación de la **Universidad de Alcalá** (convocatoria de 19 de septiembre de 2002).

RESUMEN

La finalidad de esta Tesis era obtener nuevos procedimientos de estudio de la transmisión de información nociceptiva a nivel de la médula espinal, usando un modelo de médula espinal de ratón *in vitro*. Así mismo nos propusimos usar esta nueva metodología para estudiar el papel de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) en la transmisión nociceptiva medular.

En base a modelos previos de médula espinal hemiseccionada de rata, se estableció una preparación viable de médula entera de ratón *in vitro*. Este modelo permitió estimular eléctricamente una raíz dorsal de la región lumbar, y registrar de forma simultánea información motora en la raíz ventral correspondiente e información sensorial a nivel de un axón ascendente, ambas generadas como respuesta al estímulo aplicado. Se registró con éxito la información sensorial ascendente en el cuadrante anterolateral (contralateral a la raíz de estimulación), área preferente de proyección del tracto espinotalámico. En los primeros estudios se realizó una clasificación de los axones anterolaterales registrados, en base a sus respuestas a la estimulación de la raíz dorsal. También se realizaron registros en las columnas dorsales (ipsilateral), demostrando que este modelo presentaba una gran versatilidad para el estudio de la médula espinal.

Para verificar que estas dos vías de información registradas (motora y sensorial) eran independientes, se estudió su modulación por un gas anestésico (sevoflurano) y por una amina biógena (noradrenalina). Los resultados obtenidos mostraron que el sevoflurano deprime la transmisión por ambas vías mientras que la noradrenalina deprime la vía sensorial pero potencia la vía motora. De esta forma se demostró que realmente se registraba de forma paralela y diferencial información motora y sensorial, y que éstas vías tenían mecanismos de modulación diferentes.

Una vez desarrollado el modelo, se realizaron estudios para conocer cómo afectaba la aplicación de antagonistas y agonistas de los CCDV a las respuestas motora y sensorial. Los antagonistas empleados fueron verapamil, diltiazem y nimodipina, cada uno de ellos pertenecía a una de las tres grandes familias de antagonistas de CCDV de tipo L. La aplicación de estos antagonistas dificultó la capacidad de las vías motoras espinales para producir descargas sostenidas en respuesta a la activación sináptica repetitiva, sin embargo tuvo efectos mucho más

Resumen.

modestos en las vías sensoriales. Nimodipina tuvo un efecto más específico que los otros dos antagonistas, los cuales podrían ejercer su actividad sobre otras dianas diferentes a los CCDV de tipo L cuando son aplicados a altas concentraciones.

Por último, la aplicación del agonista de los CCDV de tipo L Bay K8644 aumentó considerablemente la actividad de los circuitos motores medulares en respuesta a la estimulación de la raíz dorsal. Esta potenciación fue duradera, característica que se debió a una interacción prolongada entre el agonista y el canal, pero no al establecimiento de una potenciación a largo plazo iniciada por la entrada de calcio, ya que se anuló completamente mediante la posterior aplicación del antagonista diltiazem. Este agonista no afectó aparentemente a la información ascendente excepto en su actividad espontánea, la cual se vio potenciada.

En resumen, hemos establecido un modelo de médula de ratón *in vitro* para el registro simultáneo de la actividad en vías motoras y sensoriales, y el uso de esta preparación nos ha permitido concluir que los CCDV de tipo L pueden estar implicados en la codificación inmediata de señales nociceptivas persistentes, aunque parece poco probable que la entrada de calcio a través de estos canales contribuya al desarrollo de procesos de sensibilización en las condiciones empleadas. Se ha confirmado también que estos canales no juegan un papel esencial en la transmisión sensorial ascendente de señales nociceptivas.

ABSTRACT

The principal aims of the present Thesis were (1) to develop new procedures to study the transmission of nociceptive information across spinal circuits using a mouse model of the spinal cord *in vitro*, and (2) to use this new technology to study the role of voltage dependent calcium channels (VDCC) on spinal nociceptive transmission.

On the basis of existing models of the hemisected rat spinal cord *in vitro*, we have established a viable preparation of the entire mouse spinal cord *in vitro*. This model allowed for the simultaneous recording of activity in motor and sensory transmission pathways in response to the electrical stimulation of a lumbar dorsal root. We have recorded ascending sensory information from single axons in the anterolateral quadrant of the cord (contralateral to the site of stimulation) which is the main projection area for spinothalamic pathways. In the first experiments we were able to characterize and classify ascending axons in terms of their responses to dorsal root stimulation. We also obtained recordings from the ipsilateral dorsal columns, showing the potential of the model used.

In order to test whether or not motor and sensory pathways could be independently modulated, we studied the effects of a halogenated anaesthetic agent (sevoflurane) and an amine (noradrenalin) in simultaneous recording experiments. Results showed that sevoflurane depressed transmission across both pathways, whereas noradrenalin depressed sensory transmission but potentiated motor transmission. This demonstrated that both pathways can be modulated by different mechanisms.

Once established the reliability of the technique, we proceeded to study the effects of agonists and antagonists of VDCC on motor and sensory responses to afferent stimulation. We used verapamil, diltiazem and nimodipine, each representing one of the three main families of VDCC antagonists of the L-type currents. These antagonists tended to show marked depressant effects on motor pathway but little effects on sensory pathways. Nimodipine appeared to be the most selective antagonist, whereas verapamil and diltiazem could activate different targets from the L-type VDCC when applied at high concentrations.

Abstract.

Finally, we studied the action of the agonist of the L-type VDCC Bay K8644 on spinal transmission. This agonist produced a long-lasting increase of the responses in motor pathways. The long duration of the effect appeared to be due to a strong interaction of the agonist with the channel, excluding an established process of increased responses started by calcium entry, since perfusion of diltiazem abolished the effects produced by Bay K8644. This agonist did not show any effect on the responses to afferent stimulation in the sensory pathway but increased spontaneous activity.

In summary, we have established a new model of the *in vitro* mice spinal cord that allowed for simultaneous recordings in sensory and motor pathways. The use of this new model has allowed us to conclude that L-type calcium currents are involved in the immediate codification of persistent nociceptive signals across somato-motor pathways without intervening in the initiation of a process of spinal sensitization. We also confirmed that L-type currents do not play a fundamental role in modulating nociceptive sensory transmission in the present study conditions.

ÍNDICE

| | |
|------------------------------|-----|
| Agradecimientos | I |
| Publicaciones | III |
| Resumen | V |
| Abstract | VII |
| Índice | IX |

INTRODUCCIÓN.

| | |
|--|----|
| Aspectos Generales..... | 3 |
| Parte Primera: Procesamiento Espinal de Información Somato-Sensorial | 3 |
| 1.- Aferentes Primarias | 4 |
| 1.1.- Tipos de fibras aferentes..... | 4 |
| 1.2.- Tipos de receptores periféricos..... | 5 |
| 2.- Médula Espinal | 5 |
| 2.1.- Estructura macroscópica longitudinal..... | 6 |
| 2.2.- Estructura macroscópica transversal..... | 7 |
| 2.3.- Estructura laminar..... | 8 |
| 2.4.- Vías motoras..... | 10 |
| 2.5.- Vías sensoriales ascendentes..... | 11 |
| 2.5.a.- Columnas dorsales o posteriores..... | 11 |
| 2.5.b.- Funículo posterolateral..... | 12 |
| 2.5.c.- Cuadrante anterolateral..... | 13 |
| 2.5.d.- Tracto espinalámico..... | 15 |
| Parte Segunda: Canales de Calcio Dependientes de Voltaje | 18 |
| 3.- Canales Iónicos | 18 |
| 4.- Canales Iónicos Dependientes de Voltaje | 19 |
| 5.- Canales de Calcio Dependientes de Voltaje (CCDV) | 19 |
| 5.1.- Nomenclatura de los CCDV..... | 20 |
| 5.2.- Estructura de los CCDV..... | 21 |
| 5.2.a.- Subunidades α_1 | 21 |
| 5.2.b.- Subunidades β | 22 |
| 5.2.c.- Subunidades $\alpha_2\delta$ | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2.d.- Subunidades γ | 23 |
| 5.3.- Clasificación de los CCDV..... | 23 |
| 6.- Canales de Calcio Dependientes de Voltaje de Tipo L..... | 24 |
| 6.1.- Bloqueantes y activadores de los CCDV de tipo L..... | 26 |
| 6.2.- Implicación de los CCDV de tipo L en procesos de nocicepción..... | 27 |
| OBJETIVOS..... | 33 |

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.

| | |
|--|-----------|
| 1.- Animales Utilizados..... | 37 |
| 2.- Anestesia..... | 37 |
| 3.- Extracción de la Médula Espinal..... | 38 |
| 4.- Mantenimiento de la médula espinal..... | 39 |
| 5.- Disposición Experimental de la Médula Espinal..... | 41 |
| 6.- Preparación y Aplicación de los Fármacos..... | 42 |
| 7.- Extracción y Registro del Nervio Safeno..... | 43 |
| 8.- Electrodo de Registro y Estimulación..... | 43 |
| 9.- Estimulación Eléctrica y Protocolos de Estimulación..... | 45 |
| 10.- Tratamiento de las Señales Bioeléctricas..... | 47 |
| 10.1.- Registro de reflejos espinales..... | 47 |
| 10.2.- Registro de axones ascendentes..... | 49 |
| 10.3.- Disposición de los registros..... | 50 |
| 11.- Características de las Respuestas, Definición de las Variables | |
| Estudiadas y Análisis Estadísticos de los Datos..... | 51 |
| 11.1.- Respuesta registrada en la raíz ventral..... | 51 |
| 11.2.- Respuesta de los axones ascendentes..... | 55 |
| 11.3.- Análisis estadísticos y presentación de los resultados..... | 56 |

RESULTADOS.

CAPÍTULO I: Puesta a punto de un modelo de registro simultáneo de la actividad en vías motoras y sensoriales en la médula aislada de ratón.

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 1.- Introducción..... | 59 |
| 2.- Materiales y Métodos..... | 61 |

| | |
|--|-----------|
| 2.1.- Registro del nervio safeno..... | 61 |
| 2.2.- Registro de reflejos espinales..... | 62 |
| 2.3.- Registro de axones ascendentes..... | 63 |
| 2.4.- Parámetros y cálculos utilizados..... | 64 |
| 3.- Resultados..... | 65 |
| 3.1.- Nervio safeno..... | 65 |
| 3.2.- Reflejos espinales..... | 66 |
| 3.2.a.- Reflejos espinales tras estimulación unitaria..... | 66 |
| 3.2.b.- Reflejos espinales tras estimulación repetitiva..... | 68 |
| 3.2.c.- Estabilidad de la respuesta ventral a estimulación repetitiva..... | 70 |
| 3.2.d.- Actividad espontánea en la raíz ventral..... | 72 |
| 3.3.- Registro de axones ascendentes..... | 73 |
| 3.4.- Actividad espontánea de los axones ascendentes..... | 77 |
| 3.5.- Registros de axones ascendentes en la región de las columnas dorsales..... | 78 |
| 4.- Discusión..... | 79 |

CAPÍTULO II: Efectos de la noradrenalina y el sevoflurano sobre la actividad en vías motoras y sensoriales de la médula espinal de ratón *in vitro*.

| | |
|--|------------|
| 1.- Introducción..... | 87 |
| 2- Materiales y métodos..... | 89 |
| 3.- Resultados..... | 90 |
| 3.1.- Efectos de la noradrenalina..... | 91 |
| 3.1.a.- Reflejo monosináptico..... | 91 |
| 3.1.b.- Potenciales de acción disparados por las motoneuronas..... | 92 |
| 3.1.c.- Área en registros DC..... | 92 |
| 3.1.d.- Potenciales de acción disparados por los axones ascendentes..... | 93 |
| 3.2.- Efectos del sevoflurano..... | 94 |
| 3.2.a.- Reflejo monosináptico..... | 94 |
| 3.2.b.- Potenciales de acción disparados por las motoneuronas..... | 95 |
| 3.2.c.- Área en registros DC..... | 96 |
| 3.2.d.- Potenciales de acción disparados por los axones ascendentes..... | 96 |
| 3.3.- Aplicación secuencial del Sevoflurano y la Noradrenalina..... | 98 |
| 3.3.a.- Respuestas registradas en la raíz ventral..... | 98 |
| 3.3.b.- Respuesta de los axones ascendentes..... | 100 |
| 4.- Discusión..... | 101 |

CAPÍTULO III: Efectos de los antagonistas de la corriente de calcio tipo L en la transmisión por vías sensoriales y motoras de la médula espinal de ratón.

| | |
|--|-----|
| 1.- Introducción..... | 107 |
| 2.- Materiales y métodos..... | 109 |
| 2.1.- Protocolo experimental..... | 109 |
| 2.2.- Tratamiento de los datos..... | 110 |
| 3.- Resultados..... | 110 |
| 3.1.- Efectos de los antagonistas sobre respuestas registradas en los axones anterolaterales..... | 111 |
| 3.1.a.- Estímulos unitarios..... | 111 |
| 3.1.b.- Estímulos repetitivos..... | 113 |
| 3.2.- Efectos de los antagonistas sobre las respuestas de la raíz ventral..... | 115 |
| 3.2.a.- Estimulación unitaria. Reflejo monosináptico..... | 115 |
| 3.2.b.- Estimulación unitaria. Potenciales de acción..... | 116 |
| 3.2.c.- Estimulación unitaria. Área de la respuesta..... | 117 |
| 3.2.d.- Estimulación repetitiva. Potenciales de acción..... | 118 |
| 3.2.e.- Estimulación repetitiva. Área acumulada..... | 120 |
| 3.3.- Comparación de los efectos de los antagonistas de la corriente L sobre la respuesta a estimulación repetitiva..... | 123 |
| 3.4.- Comparación de los efectos de los antagonistas de la corriente L sobre la vía sensorial y la vía motora..... | 124 |
| 4.- Discusión..... | 126 |

CAPÍTULO IV: Estudio del efecto del agonista de la corriente de calcio de tipo L Bay K8644 sobre la actividad en vías sensoriales y motoras de la médula espinal de ratón.

| | |
|---|-----|
| 1.- Introducción..... | 133 |
| 2.- Materiales y métodos..... | 134 |
| 2.1.- Protocolo experimental..... | 134 |
| 2.2.- Tratamiento de los datos..... | 136 |
| 3.- Resultados..... | 137 |
| 3.1.- Efectos de Bay K8644 en las respuestas de los axones ascendentes..... | 137 |
| 3.1.a.- Estimulación unitaria..... | 137 |
| 3.1.b.- Estimulación repetitiva..... | 137 |
| 3.1.c.- Actividad espontánea..... | 140 |

| | |
|--|---------|
| 3.2.- Efectos de Bay K8644 en las respuestas registradas en la raíz ventral... | 140 |
| 3.2.a.- Estimulación unitaria. Reflejo monosináptico..... | 140 |
| 3.2.b.- Estimulación unitaria. Disparo de potenciales de acción..... | 140 |
| 3.2.c.- Estimulación unitaria. Área de despolarización de la respuesta... | 141 |
| 3.2.d.- Estimulación repetitiva. Disparo de potenciales de acción..... | 141 |
| 3.2.e.- Estimulación repetitiva. Área acumulada..... | 142 |
| 3.3.-Efectos de Bay K8644 en las respuestas a estimulación repetitiva de diferente intensidad..... | 144 |
| 3.3.a.- Aplicación de estímulos repetitivos de baja intensidad..... | 146 |
| 3.3.b.- Aplicación de estímulos de 60 μ A de intensidad..... | 148 |
| 3.4.- Efectos de la aplicación de Diltiazem tras la perfusión de Bay K8644 sobre la respuesta motora..... | 149 |
| 3.4.a.- Estimulación repetitiva de alta intensidad..... | 150 |
| 3.4.b.- Estimulación repetitiva de baja intensidad..... | 153 |
| 4.- Discusión..... | 154 |
| CONCLUSIONES GENERALES | 161 |
| BIBLIOGRAFÍA | 165 |

INTRODUCCIÓN

Aspectos Generales.

En esta Tesis Doctoral hemos buscado analizar el mensaje sensorial ascendente que genera la médula espinal como respuesta de la activación de las aferentes primarias. Nos ha interesado particularmente la señalización a través de vías nociceptivas y también el papel que los canales de calcio dependientes de voltaje puedan desempeñar en el procesamiento de estas señales.

Por esto, la presente introducción se centra en la estructura funcional de la médula espinal y la caracterización de los canales de calcio dependientes de voltaje, poniendo énfasis en la corriente de tipo L y en la evidencia que la relaciona con el procesamiento nociceptivo.

PARTE PRIMERA: PROCESAMIENTO ESPINAL DE INFORMACIÓN SOMATO- SENSORIAL.

La información sensorial originada por la activación de los receptores situados en la periferia del organismo se transmite por las aferentes primarias, que se agrupan en los nervios espinales para entrar en la médula espinal a través de las raíces dorsales (figura 1). Una vez en la médula espinal, esta información sensorial se transmite a otros centros superiores a través de las vías ascendentes espinales, y paralelamente genera información motora en los circuitos propioespinales, que se transmite a los músculos a través de las fibras eferentes que salen de la médula espinal a través de las raíces ventrales (figura 1).

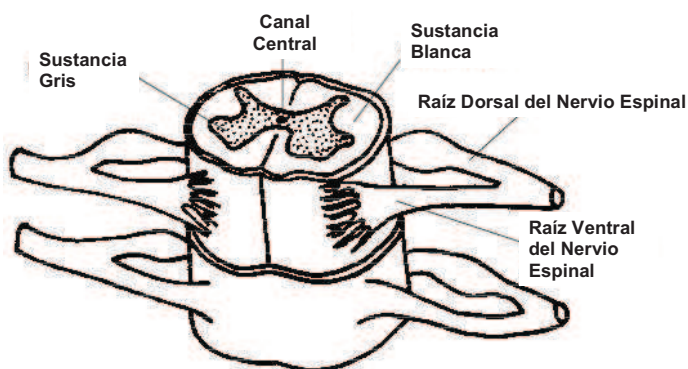


Figura 1.- La figura muestra una sección de la médula espinal en la que se puede observar la entrada de las fibras aferentes a través de la raíz dorsal, y la salida de las fibras eferentes a través de la raíz ventral. Ambas raíces se unen en un mismo nervio espinal. La médula espinal presenta una estructura simétrica y segmental.

Introducción.

La transmisión segmental se refiere al paso de información desde los receptores sensoriales y las aferentes primarias hasta las motoneuronas, que comandan la respuesta muscular, a través de una región espacialmente limitada de la médula espinal. Dada la organización somatotópica del sistema nervioso, a cada segmento medular llega información de partes específicas de la periferia. Los segmentos lumbares son de gran interés ya que en ellos se integra información procedente de las patas traseras del animal y se generan reflejos nociceptivos ampliamente estudiados y documentados. Los componentes de esta transmisión segmental son los receptores en los que se origina la señal, las fibras por las que se transmite y la médula espinal, donde se procesa y dirige hacia las motoneuronas.

Por otro lado la médula espinal elabora un “mensaje sensorial” en base a la información recibida de las aferentes, que se proyecta a núcleos clave del encéfalo para generar sensaciones y percepciones somáticas. Este mensaje se transmite por las vías ascendentes de la sustancia blanca de la médula espinal.

A continuación se describen brevemente los elementos principales de este sistema.

1.- AFERENTES PRIMARIAS.

1.1.- Tipos de Fibras Aferentes.

Las fibras aferentes primarias son axones de neuronas sensoriales que forman parte de los nervios periféricos, cuya función es llevar información sensorial desde la periferia (receptores) hasta la médula espinal. Estos axones varían en su calibre y pueden ser mielínicos o amielínicos. El soma de estas neuronas sensoriales se encuentra en los ganglios raquídeos.

Entre las fibras de mayor calibre y más mielinizadas están las denominadas A α (10-20 μ m) y A β (5-15 μ m) (Erlangen y Gasser, 1937), las cuales pueden transmitir potenciales de acción a velocidades de 30-100 m/s (Boivie y Perl, 1975). Las fibras que están algo menos mielinizadas y tienen un calibre menor son denominadas A δ (2-5 μ m) y transmiten a velocidades de 4-30 m/s (Boivie y Perl, 1975). Las fibras aferentes constituidas por axones amielínicos, de menor calibre, son denominadas fibras C (0.5-2 μ m), y transmiten a velocidades de entre 0.5 y 2.5 m/s (Gasser, 1950).

Una terminología paralela se usa para denominar a las fibras procedentes de músculos y articulaciones, pasándose a denominar tipos I (120-72 m/s), II (71-24 m/s), III (23-6 m/s) (Rexed y Therman, 1948; Lloyd y Chang, 1948; Hunt, 1954) y IV (<2.5 m/s) (Stacy, 1969).

1.2.- Tipos de Receptores Periféricos.

Los receptores sensoriales son estructuras especializadas en las que se origina la señal que será transmitida por las aferentes primarias. Se clasifican por su localización según se encuentren en la piel, los músculos, las articulaciones o las vísceras (Willis y Coggeshall, 1991; Cerveró, 1994). En la tabla 1 se muestra su clasificación y el tipo de fibra nerviosa que transmite la información.

| Localización | Tipo de Receptor | Fibra | Localización |
|--------------|-------------------------------|--------------------|--|
| Cutáneos | Mecanorreceptores | A _β | Piel |
| | Nociceptores Cutáneos | A _δ y C | Piel |
| | Termorreceptores | A _δ y C | Piel |
| Musculares | Husos Musculares | Ia y II | Interior músculo |
| | Órganos Tendinosos | Ib | Tejido conectivo tendones |
| | Receptores de Dolor y Presión | II, III y IV | Fascias y adventicia de los vasos de los músculos |
| Articulares | Mecanorreceptores | I y II | Articulaciones |
| | Nociceptores | III y IV | Cápsula articular |
| Viscerales | Mecanorreceptores | A _β | Mesenterio y tejido conectivo |
| | Nociceptores | A _δ y C | Órganos como corazón, tracto digestivo y órganos reproductores |

Tabla 1.- Clasificación de los receptores periféricos en función de su localización. La tercera columna muestra las fibras aferentes que transmiten la información.

2.- MÉDULA ESPINAL.

La médula espinal de los vertebrados está localizada en el canal medular de la columna vertebral. Está especializada en la recepción de información sensorial desde la periferia (fibras aferentes) y la transmisión de ésta a los centros superiores. También recibe información desde los centros superiores con fines fundamentalmente motores y reguladores, además presenta una gran capacidad integradora y de modulación (revisión en Willis y Coggeshall, 1991).

Introducción.

En los procesos sensoriales que transcurren en la médula espinal están involucradas las terminales centrales de las fibras aferentes primarias que portan información desde los receptores sensoriales, interneuronas, tractos ascendentes que transportan mensajes sensoriales al cerebro, y tractos descendentes que modulan la actividad de los circuitos de la médula espinal.

La mayor parte de las neuronas de la médula espinal, al igual que en el encéfalo, son interneuronas que modulan y transforman la información sensorial originada en los receptores periféricos.

2.1.- Estructura Macroscópica Longitudinal.

La médula espinal se divide longitudinalmente en cuatro regiones: cervical, torácica, lumbar y sacra (figura 2). Los axones que abandonan la médula espinal para inervar estructuras del cuerpo que se desarrollan al mismo nivel segmentario, se reúnen en el espacio intervertebral con los axones de las aferentes primarias que penetran en la médula espinal, para formar en conjunto los nervios raquídeos. Los nervios raquídeos cervicales participan en la percepción sensorial y la función motora de la parte posterior de la cabeza, el cuello y los brazos. Los nervios torácicos inervan la parte superior del tronco, mientras que los nervios raquídeos lumbares y sacros inervan la parte inferior del tronco, la espalda y las piernas.

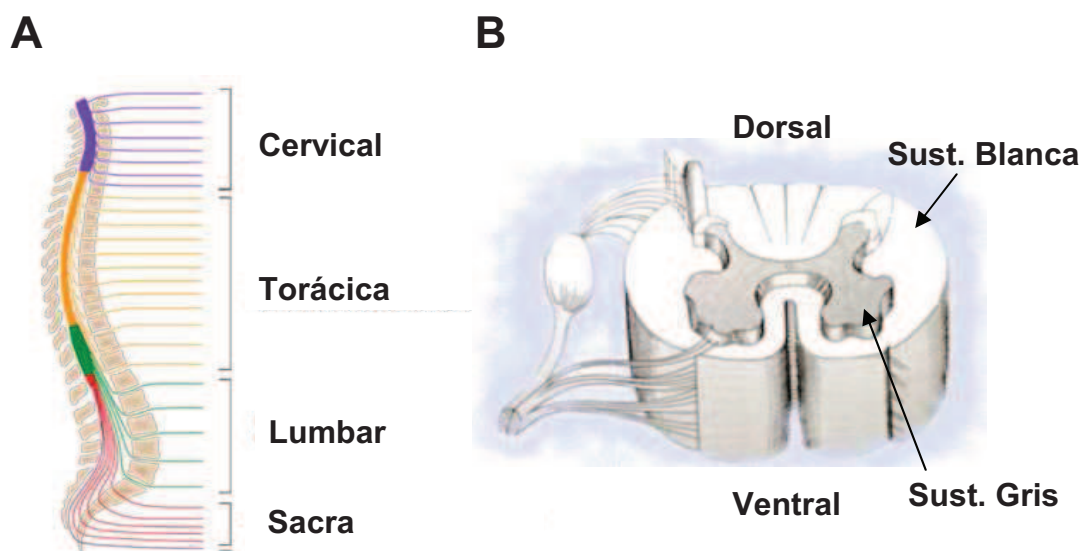


Figura 2.- La figura **A** muestra una vista longitudinal de la médula espinal, en la cual se pueden diferenciar sus cuatro divisiones. La figura **B** muestra una sección transversal de la médula espinal en la que se observa la sustancia gris (somatos neuronales) y la sustancia blanca (proyecciones neuronales).

Cada una de las cuatro regiones de la médula espinal se divide en varios segmentos dependiendo del número de las raíces dorsales y ventrales que penetran o salen de la médula. Existen 8 segmentos cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares y 5 sacros. La médula espinal madura varía de tamaño y forma a lo largo de su eje rostrocaudal por dos características de su organización. Primero, a nivel sacro penetran pocos axones sensoriales, mientras que en regiones más altas (lumbar, torácica y cervical) aumentan progresivamente el número de axones sensoriales que ascienden en la médula. Por el contrario, la mayoría de los axones que descienden del encéfalo terminan en niveles cervicales, y el número de los que descienden a niveles más bajos de la médula espinal disminuye progresivamente. Por ello, el número de fibras de la sustancia blanca es máximo en los niveles cervicales y mínimo en la región sacra. La segunda diferencia es la variación del tamaño de las astas ventrales y dorsales. El asta ventral es mayor allí donde los nervios motores que inervan los brazos y las piernas abandonan la médula, debido al mayor número de motoneuronas necesario para inervar y regular los movimientos del gran número de músculos de las extremidades comparados con los del tronco. De forma similar el asta dorsal es mayor donde los nervios sensoriales de las extremidades penetran en la médula espinal, debido a que las extremidades tienen una densidad superior de receptores sensoriales y por tanto envían más fibras nerviosas a la médula espinal.

2.2.- Estructura Macroscópica Transversal.

La médula espinal está compuesta de una región central de sustancia gris rodeada de sustancia blanca. La sustancia gris tiene forma de H y cada lado está subdividido en un asta posterior o dorsal y un asta anterior o ventral. La sustancia gris del asta dorsal contiene grupos de neuronas sensoriales que reciben información de las aferencias procedentes de la periferia corporal. El asta ventral contiene grupos de neuronas motoras denominadas motoneuronas, cuyos axones salen de la médula espinal e inervan los músculos esqueléticos. Las motoneuronas están dispuestas en columnas que discurren a lo largo de la longitud de la médula espinal. Diferentes tipos de interneuronas de la sustancia gris medular regulan la información que fluye desde las neuronas sensoriales hacia el encéfalo, así como las órdenes procedentes de centros superiores a las motoneuronas y la información intercambiada entre grupos de motoneuronas.

La sustancia blanca que rodea a la sustancia gris se divide en las columnas dorsales o posteriores, el funículo posterolateral y el cuadrante anterolateral. Cada una

Introducción.

de estas divisiones contiene diversos haces de axones ascendentes y en muchos casos también axones descendentes. Las columnas dorsales situadas entre las dos astas dorsales de la sustancia gris contienen mayoritariamente axones ascendentes que transmiten información somática sensorial al tronco encefálico. El funículo posterolateral incluye tanto axones ascendentes como axones descendentes procedentes del tronco encefálico y de la neocorteza, que inervan interneuronas y neuronas motoras de la médula espinal. El cuadrante anterolateral también contiene axones descendentes y ascendentes, estos últimos son de gran importancia en la transmisión de información nociceptiva, los cuales se detallan en el apartado 2.5.c (página 13).

2.3.- Estructura Laminar.

La médula espinal presenta una estructura laminar organizada, distinguiéndose diez láminas en dirección dorsoventral (Rexed, 1952 y 1954). El asta dorsal está constituida por las láminas I-V, el asta ventral por las láminas VII-IX, mientras que las láminas VI y X se pueden considerar de transición entre ambas astas (figura 3). Los axones o fibras aferentes terminan en láminas medulares determinadas en función del tipo de información que portan.

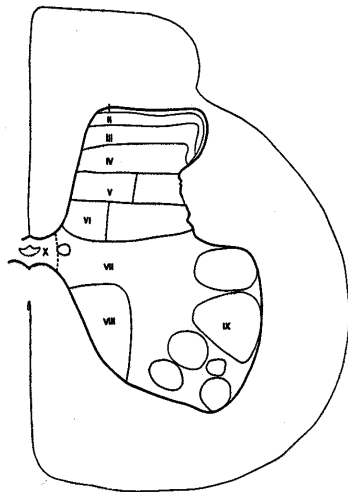


Figura 3. Esquema de una sección transversal de la médula espinal de gato (tomado de Rexed, 1952). En la figura se indican las distintas láminas descritas por Rexed y su numeración. En la imagen, la parte dorsal se sitúa hacia arriba y la ventral hacia abajo. La parte medial se observa en la parte izquierda. Nótese el menor espesor de las láminas superficiales.

A la **lámina I** llegan mayoritariamente axones de tipo A δ desde los nociceptores y termorreceptores, aunque también se encuentran terminaciones de fibras de tipo C y A β desde las vísceras, y de fibras III y IV desde los músculos y las articulaciones. Sus neuronas proyectan principalmente al tálamo, al tronco del encéfalo y posiblemente al cerebelo. Las sinapsis predominantes en esta lámina son las axodendríticas.

A la **lámina II** o **sustancia gelatinosa** llegan principalmente fibras C desde la piel y las vísceras, aunque se ha demostrado la presencia de terminaciones A δ y A β . Llevan información desde nociceptores, termorreceptores y mecanorreceptores. Esta lámina se caracteriza por tener un gran número de células de pequeño tamaño y numerosas terminaciones amielínicas. Los tipos celulares son variados y su neuropilo se caracteriza por formar complejas estructuras sinápticas denominadas glomérulos. Estas estructuras relacionan terminales de las aferentes con dendritas y axones espinales. Estas neuronas proyectan mayoritariamente sus axones hacia otros segmentos de la médula y hacia otras láminas.

A la **lámina III** también llegan fibras A δ , pero desde los folículos pilosos. Las neuronas de esta lámina son similares a las de la lámina II, pero con árboles dendríticos más extensos, que pueden llegar a la lámina I. Algunas ramificaciones pueden formar parte de los glomérulos. Sus axones proyectan principalmente a los núcleos cervicales laterales y a los núcleos de las columnas dorsales.

A la **lámina IV** llega información desde los mecanorreceptores vía fibras A β , aunque algunas también terminan en la lámina III. Esta lámina posee una importante variabilidad neuronal, con muchas similitudes con la lámina III, posee neuronas espinotalámicas y espinocervicales, y se caracteriza por la existencia de árboles dendríticos que llegan a las láminas I y II, y que se denominan “neuronas antena”. Los axones que parten de esta lámina proyectan al tálamo, al núcleo cervical lateral, a los núcleos de las columnas dorsales y también a otras partes de la médula. Las terminaciones dendríticas de esta lámina están poco asociadas con glomérulos.

A la **lámina V** llegan fibras A δ provenientes de nociceptores mecánicos y mecanorreceptores, además también llegan fibras del tipo III y IV procedentes de músculos, articulaciones y vísceras. Las neuronas de esta lámina son como las de la lámina IV, y sus terminaciones axónicas van a los mismos núcleos. Las neuronas de esta lámina quizás reciban aferencias en la lámina I ya que tienen procesos dendríticos que se prolongan hasta estas regiones, como los de la lámina IV.

Aunque la **lámina VI** es una lámina de transición entre el asta dorsal y el ventral, aún hay fibras aferentes propioceptivas del tipo Ia, que proyectan a esta lámina y al asta ventral. En mamíferos se da básicamente en el engrosamiento cervical y el lumbosacral. A diferencia del resto de láminas, las fibras aferentes

primarias no son predominantes. Esta lámina presenta numerosos sistemas de terminaciones de fibras descendentes. Sus proyecciones se dirigen al tálamo o al núcleo cervical lateral, aunque probablemente la mayoría son propioespinales.

También hay nociceptores mecánicos que a través de fibras A δ y fibras aferentes viscerales amielínicas proyectan a la **lámina X**. Se han observado en esta lámina neuronas de bajo y alto umbral, así como de rango dinámico amplio. Muchas de sus neuronas son de proyección.

El asta ventral es fundamentalmente motora, en ella se encuentran las láminas más ventrales (**VII, VIII y IX**) en las que se encuentran las interneuronas involucradas básicamente en la modulación de la función de las motoneuronas, así como las propias motoneuronas. Las únicas vías aferentes primarias que llegan de forma directa son las Ia, procedentes de los husos musculares, formando conexiones sinápticas con las motoneuronas α que controlan el movimiento a través de los músculos. También se encuentran las motoneuronas γ , que son las que activan las fibras intrafusales. Los axones de ambas neuronas motoras discurren por la raíz ventral para salir de la médula espinal (Kandel y col., 1991).

Las motoneuronas están sometidas a un estrecho control ya que su excitación se transforma en movimiento. Además de estar controladas por centros superiores, también puede ser activadas por sistemas neuronales más simples que se encuentran en la propia médula espinal para producir los denominados reflejos espinales. Estos reflejos se desencadenan por estímulos sensoriales específicos, sin la activación previa de centros superiores, y provocan una respuesta muscular rápida y estereotipada. Es decir, los reflejos medulares están mediados por circuitos neuronales integrados en la médula espinal, los cuales están modulados por centros superiores a través de vías descendentes, pero que pueden actuar de forma autónoma (Kandel y col., 1991).

2.4.- Vías Motoras.

Las motoneuronas canalizan la información procedente tanto de centros superiores (corteza motora) como de vías aferentes y de interneuronas espinales (reflejos espinales), para producir movimiento mediante la estimulación directa de los músculos a través de las placas motoras colinérgicas.

Las raíces ventrales están compuestas por haces de axones de motoneuronas α y γ , que se proyectan fuera del sistema nervioso central para inervar los músculos. Las motoneuronas constituyen la “vía final común” en la que todos los niveles superiores del encéfalo que participan en la actividad motora tienen que actuar para controlar el movimiento muscular. En ciertos niveles de la médula espinal las raíces ventrales también comprenden axones simpáticos y parasimpáticos.

2.5.- Vías Sensoriales Ascendentes.

Las fibras de la sustancia blanca de la médula espinal se agrupan en fascículos con características funcionales y anatómicas propias. No obstante, ni siquiera en mamíferos es posible individualizar netamente cada uno de ellos y no es infrecuente que se entremezclen a lo largo de su trayectoria. La sustancia blanca de cada hemimédula espinal por la que asciende la información sensorial a centros superiores se puede dividir en tres zonas: (1) las columnas dorsales o posteriores, (2) el funículo posterolateral y (3) el cuadrante anterolateral (revisión en Willis y Coggeshall, 1991).

2.5.a.- Columnas Dorsales o Posteriores.

Las columnas dorsales están compuestas por ramas de fibras aferentes primarias y axones de neuronas postsinápticas de las columnas dorsales. Estas fibras aferentes primarias que penetran por una raíz dorsal cursan en la región medial de las columnas dorsales, donde se bifurcan en ramas que se distribuyen tanto rostral como caudalmente. Estas fibras aferentes constituyen dos componentes de las columnas dorsales denominados fascículos grácil y cuneiforme. El **fascículo grácil** contiene las ramas ascendentes de las fibras aferentes primarias desde la región sacra hasta la región torácica media, mientras que el **fascículo cuneiforme** contiene las ramas de las fibras aferentes primarias desde esta región torácica media hasta la región cervical. Estos fascículos terminan en el núcleo grácil y el núcleo cuneiforme respectivamente, situados en el bulbo raquídeo caudal, y denominados en conjunto como núcleos de las columnas dorsales. Las neuronas de estos núcleos originan axones que cruzan al otro lado del encéfalo y ascienden hacia el tálamo contralateral, entre otros puntos, en un largo haz de fibras llamado lemnisco interno.

Los núcleos de las columnas dorsales también reciben información sináptica a través de neuronas de segundo orden cuyos somas se sitúan en las láminas III, IV, V y VI del asta dorsal. Estos somas y sus axones ligeramente mielinizados constituyen la

Introducción.

vía postsináptica de las columnas dorsales. Las neuronas postsinápticas de las columnas dorsales situadas en la región lumbosacra proyectan al núcleo grácil, mientras que las neuronas postsinápticas situadas en el engrosamiento cervical terminan en el núcleo cuneiforme. Cabe destacar que también hay una proyección postsináptica que finaliza en los núcleos de las columnas dorsales que transcurre por el funículo posterolateral.

Las columnas dorsales poseen una ordenación somatotópica precisa, y a diferencia de otras vías ventrolaterales siguen un trayecto exclusivamente ipsilateral en la médula espinal, decusando a nivel del bulbo raquídeo. Por las columnas dorsales también discurren ramas descendentes de fibras aferentes primarias, axones propioespinales y otras vías descendentes desde el encéfalo como el tracto corticoespinal.

Estudios de comportamiento realizados en animales indican que las columnas dorsales son especialmente importantes para el análisis espaciotemporal de estímulos mecánicos, aunque también puede transmitir información nociceptiva de origen visceral (Willis y col., 1999; Willis y Westlund, 2001; Palecek, 2004). Evidencias clínicas indican que las columnas posteriores son responsables de la transmisión al encéfalo de información relacionada con el tacto discriminativo, la sensibilidad vibratoria y el sentido de la posición. La pérdida de la función de las columnas posteriores puede derivar no sólo en la pérdida de estas sensaciones, sino también en una baja habilidad para detectar estímulos repetitivos, una capacidad reducida para reconocer graduaciones de presión, alucinaciones posicionales y táctiles, así como un aumento de la sensación térmica, dolorosa y otros tipos de sensibilidad mediados por el cuadrante anterolateral.

2.5.b.- Funículo Posterolateral.

Dos vías sensoriales que ascienden completamente en el funículo posterolateral son el tracto espinocervicotalámico y el tracto espinobulbar. Además esta zona también contiene componentes de la vía postsináptica de las columnas dorsales, del tracto espinotalámico y del tracto espinomesencefálico.

El **tracto espinocervicotalámico** se origina en neuronas del asta dorsal (mayoritariamente láminas III y IV), cuyos axones proyectan en la parte dorsal del funículo lateral ipsilateral para realizar sinapsis con células del núcleo cervical lateral,

constituido por neuronas especializadas situadas en la sustancia blanca externa de los segmentos cervicales C1 a C3. La mayoría de estas neuronas especializadas proyectan al tálamo contralateral, algunas al mesencéfalo, y sólo una pequeña parte lo hacen a la médula espinal. El tracto espinocervicotalámico constituye un sistema de conducción rápida para la transmisión de información desde la piel hasta la corteza cerebral (Catalano y Lamarche, 1957). Sus neuronas responden tanto a estímulos táctiles como nocivos.

El **tracto espinobulbar** transmite información propioceptiva desde las extremidades posteriores hasta la corteza sensoriomotora contralateral, proyectando a través del núcleo z del bulbo raquídeo caudal. El núcleo z proyecta a través del lemnisco medial a los núcleos ventrolateral y ventroposterolateral, así como al mesencéfalo.

Estudios en animales indican que esta región contiene vías que transmiten información similar a la de las columnas dorsales y el cuadrante anterolateral. Los estudios clínicos no han evidenciado ninguna función sensorial especial para el funículo posterolateral en humanos. Es probable que el sentido de la posición dependa del funículo posterolateral junto a las columnas dorsales, al igual que otras funciones mecanorreceptivas. También es posible que los axones de esta parte de la sustancia blanca tengan una contribución en la sensación del dolor.

2.5.c.- Cuadrante Anterolateral.

El cuadrante anterolateral contiene el tracto espinotalámico, espinorreticular, espinomesencefálico, espinoparabraquial, espinohipotálamico y numerosas vías espinolímbicas directas (figura 4). Algunos componentes de estos tractos ascienden más dorsalmente en el funículo posterolateral.

La cordotomía de esta zona de la médula espinal ha demostrado que entre sus funciones se encuentran la transmisión de la sensación dolorosa y térmica, participando también en la sensación táctil. Contiene vías cruciales para la información nociceptiva, las cuales cruzan la línea media cerca del segmento de entrada, encontrándose organizadas de forma somatotópica (los segmentos inferiores se representan dorsolateralmente y los segmentos superiores ventromedialmente).

Introducción.

La estimulación del cuadrante anterolateral en humanos puede resultar en la generación de sensaciones dolorosas, siempre que se apliquen estímulos de suficiente intensidad y frecuencia. Esta sensación parece estar transmitida por axones mielinizados. Estímulos más débiles pueden generar sensaciones térmicas.

El **tracto espinotalámico** se detalla más profundamente en el apartado 2.5.d de esta introducción (página 15).

Se denomina **tracto espinoreticular** al conjunto de proyecciones de neuronas medulares dirigidas al tronco del encéfalo que acaban en la formación reticular del mesencéfalo. Este tracto se puede dividir en tres componentes, una parte que realiza sinapsis en la formación reticular romboencefálica medial que probablemente participe en el procesamiento sensorial, algo improbable para el segundo componente que proyecta al núcleo reticular lateral, que es un núcleo precerebelar. El tercer componente proyecta al núcleo reticular dorsal, proporcionando aparentemente información nociceptiva.

La mayoría de estos axones ascienden por la sustancia blanca ventrolateral, siendo la mayor parte de ellos mielinizados. Por debajo de los segmentos cervicales superiores gran parte de sus células se presentan en posición contralateral respecto a sus dianas, cruzando la línea media cerca del soma, con una localización mayoritaria en las láminas V, VII, VIII y X, siendo la mayoría de ellas multipolares. Algunos de sus axones no cruzan la línea media.

El **tracto espinomesencefálico** es un conjunto de vías que ascienden desde la médula espinal a diferentes dianas del mesencéfalo, de esta forma se pueden considerar componentes de este sistema los tractos espinotectal, espinoanular y espinoparabraquial. Por debajo de los segmentos cervicales superiores gran parte de sus neuronas se presentan en posición contralateral. Presentan una velocidad de conducción muy variable. Igualmente el tamaño y forma del soma neuronal también son muy variables, situándose en diferentes láminas en función de la especie. Se piensa que puede contribuir a la transmisión nociceptiva y al componente afectivo del dolor (Dougherty col., 1999). Algunas de sus neuronas también proyectan al tálamo.

El **tracto espinohipotálamico** accede directamente al sistema límbico y se origina principalmente en neuronas de láminas profundas del asta dorsal y de la región intermedia, aunque algunas se sitúan en láminas superficiales. La mayoría de sus

neuronas son nociceptivas, presentando respuestas de alto umbral o de rango dinámico amplio, así como alguna de bajo umbral. Las vías espinolímbicas parecen tener una función en la contribución de aspectos afectivos y emocionales en las respuestas a estímulos dolorosos.

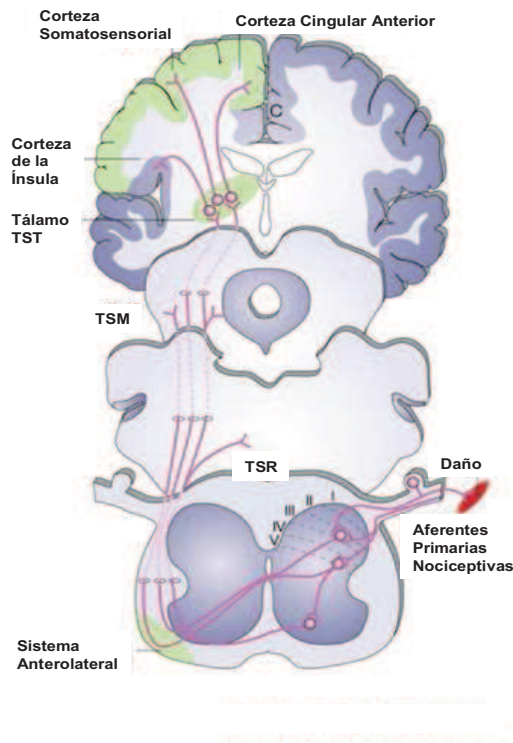


Figura 4. Esquema de la transmisión de la información nociceptiva a través del cuadrante anterolateral de la médula espinal de gato (tomado de Fields, 2004). En la figura se indican tres de las principales vías del cuadrante anterolateral: tracto espinotalámico (TST), tracto espinomesencefálico (TSM) y el tracto espinoreticular (TSR). Nótese cómo estas vías cruzan la línea media para ascender en el lado contralateral.

2.5.d- Tracto Espinotalámico.

El tracto espinotalámico en primates se origina principalmente en neuronas del asta dorsal de la médula espinal, aunque algunas células de este tracto se sitúan en la zona intermedia y el asta ventral. Sus neuronas presentan una morfología variada, incluyendo somas de tamaños pequeños, medianos y grandes, así como formas fusiformes y poligonales. Reciben numerosas sinapsis de diferentes tipos, conteniendo en sus terminales sinápticas sustancias como encefalina, sustancia P, CGRP, serotonina, dopamina- β -hidroxilasa o diversos tipos peptídicos. Sus axones cruzan la línea media a un nivel cercano al soma celular y ascienden a través de la sustancia blanca anterolateral hasta el tálamo.

Asociado al tracto espinotalámico hay otras vías que hacen sinapsis en neuronas que a su vez proyectan al tálamo. De forma colectiva, todas estas vías que ascienden por el cuadrante ventral se considera que forman un sistema de

Introducción.

proyecciones directas e indirectas al tálamo. Estas vías indirectas incluyen el tracto espinoreticular y el tracto espinomesencefálico.

Se han descrito varias subdivisiones del tracto espinotalámico. Uno de sus componentes se origina principalmente en la lámina I, aunque algunas neuronas de las láminas II y III también contribuyen. Muchas de estas células tienen axones que se encuentran entre los más dorsalmente posicionados en el funículo lateral contralateral, incluyendo entre sus destinos los núcleos talámicos ventroposterior lateral caudal y ventral, posterior inferior y central lateral, así como el núcleo posterior y supragenículado. Un segundo componente del tracto espinotalámico se origina en células de las láminas IV-VI, cuyos axones proyectan al tálamo a través del cuadrante contralateral ventral. Estos axones finalizan en los núcleos ventroposterior lateral caudal, ventral posterior inferior, complejo posterior y central lateral. Un tercer componente del tracto espinotalámico se origina en neuronas de las láminas VII-X, cuyos axones proyectan al núcleo central lateral a través del cuadrante contralateral ventral. Otra subdivisión incluye una población de neuronas situadas en los segmentos cervicales superiores, las cuales proyectan al tálamo ipsilateral y contralateral.

Los axones de las células espinotalámicas presentan un amplio rango de diámetros, incluyendo axones mielinizados y no mielinizados. La velocidad de conducción media de axones de células espinotalámicas de monos es de 33.4 m/s, presentando las células de lámina I una velocidad media de 20.3 m/s, la cual es considerablemente menor que la velocidad de las células de lámina V (45.5 m/s) (Trevino y col., 1973). La velocidad de conducción varía en función de la especie, ya que la velocidad máxima observada en gatos es de 17 m/s (Craig y Kniffki, 1985).

La mayoría de las células del tracto espinotalámico descargan potenciales de acción en ausencia de aplicación de estímulos, sin embargo los rangos de disparo varían entre las diferentes poblaciones celulares y la especie animal, aunque también hay que tener en cuenta otros factores como la inhibición descendente, el nivel de anestesia y el daño tisular debido a la cirugía o estimulación nociva. Como ejemplo, el 84% de las células espinotalámicas de gato originadas en las láminas VII y VIII descargan espontáneamente a frecuencias de entre 1-67 Hz (Meyers y Snow, 1982).

La respuesta de las neuronas espinotalámicas de primate evocadas por estimulación eléctrica de las fibras nerviosas periféricas se caracteriza por descargas en grupos separados, los cuales se corresponderían con la activación de las fibras de

tipo A β , A δ y C, aunque hay neuronas que no responden a la activación de fibras A β . La mayoría de las neuronas responden a estímulos que activan las fibras nerviosas de tipo C, aunque el tamaño de las respuestas varía considerablemente (Chung y col, 1979).

Las células del tracto espinotalámico que se originan en la lámina I suelen tener campos receptivos pequeños, lo que sugiere que proporcionan información utilizada para la localización de los estímulos. Muchas de las neuronas de lámina I presentan un alto umbral de activación, pudiendo señalar la presencia de estímulos potencialmente dañinos. Una pequeña subpoblación de estas células es termorreceptiva.

Las células del tracto espinotalámico situadas en las láminas IV-VI presentan campos receptivos restringidos a una porción de la extremidad contralateral a su proyección talámica. El tamaño de estos campos es muy variable. La mayoría de estas neuronas son de rango dinámico amplio, pero también existen de umbral alto e incluso algunas son de bajo umbral. Estas neuronas de rango dinámico amplio pueden proporcionar información sobre la presencia de un daño inminente y discriminar entre rangos de estímulos nocivos.

Las células del tracto espinotalámico pueden ser excitadas o inhibidas por numerosas moléculas conocidas como neurotransmisores. Las sustancias excitadoras incluyen glutamato y otros agonistas de receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato del grupo I, así como la sustancia P. Las sustancias inhibitorias incluyen los aminoácidos inhibitorios, GABA y glicina, varias aminas biógenas, opioides, así como otros péptidos.

Las respuestas de las neuronas del tracto espinotalámico pueden presentar cambios plásticos en respuesta a lesiones o procesos inflamatorios, reflejando así el proceso que fundamenta el desarrollo de alodinia secundaria (dolor debido a estímulos que previamente no eran dolorosos) e hiperalgesia (incremento del dolor debido a un estímulo que previamente era menos doloroso).

PARTE SEGUNDA: CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE.

3.- CANALES IÓNICOS.

La comunicación neuronal depende de cambios rápidos en el potencial eléctrico a través de la membrana. Durante un potencial de acción, el potencial de membrana cambia súbitamente. El mantenimiento de potenciales de reposo así como sus cambios rápidos son posibles gracias a los canales iónicos, una clase de proteínas integrales insertadas en la membrana celular que se encuentran en todas las células del organismo. Estos canales iónicos pueden conducir iones a tasas muy elevadas, hasta 100.000 iones por segundo pueden pasar a través de un solo canal. El flujo de iones a través de los canales es pasivo, y no requiere gasto de energía. La dirección se determina por las fuerzas eléctricas y de gradiente químico a través de la membrana (Kandel y col., 1991).

Las propiedades eléctricas intrínsecas de las neuronas están gobernadas por la acción de canales iónicos. La localización determinada de poblaciones de canales iónicos específicos con diferentes propiedades funcionales en lugares discretos de las neuronas, así como su cantidad, determinan su excitabilidad y transmisión sináptica (Lai y Jan, 2006; Vacher y col., 2008).

De forma general los canales iónicos se pueden clasificar en aquellos que se abren y cierran en respuesta a estímulos específicos o canales regulados, y otros canales no regulados que están normalmente abiertos con la neurona en reposo, a pesar de lo cual contribuyen significativamente al potencial de reposo de la membrana plasmática.

Los canales regulados responden a estímulos específicos, de forma que se pueden clasificar como sigue:

- 1.- Canales dependientes de voltaje, responden a variaciones de voltaje.
- 2.- Canales regulados por ligando, responden a la unión de un transmisor químico.
- 3.- Canales regulados por estímulos mecánicos o térmicos, responden a la presión o al estiramiento, y a las variaciones de temperatura respectivamente.

4.- CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE.

Los canales iónicos dependientes de voltaje participan en la generación de señales eléctricas en las membranas celulares. En el sistema nervioso de mamíferos se expresa un gran repertorio de canales iónicos dependientes de voltaje, que forman poros altamente selectivos para el paso de iones específicos a través de la membrana plasmática, constituyendo la base de las propiedades eléctricas de las neuronas (Trimmer y Rhodes, 2004).

Sus subunidades principales son miembros de una familia génica y algunas de ellas pueden funcionar como canales iónicos dependientes de voltaje por sí mismos. Se expresan en asociación a una o más subunidades auxiliares que modifican la expresión y las propiedades funcionales de las subunidades principales (Catterall, 1995).

Los canales iónicos dependientes de voltaje selectivos para los iones de sodio, calcio y potasio son los mayores determinantes de las propiedades eléctricas de las neuronas y otras células excitables (Catterall, 1995). Estas propiedades no sólo dependen de la expresión de determinados canales, también es crítica su localización discreta en la membrana plasmática. Teniendo en cuenta la compartimentalización de la membrana neuronal y la localización discreta de eventos específicos en la misma críticos para la recepción de información, la transducción de señales y su propagación, la localización no uniforme de los canales iónicos impacta de forma decisiva en la función neuronal (Trimmer y Rhodes, 2004).

Los canales iónicos dependientes de voltaje pueden presentarse en tres estados funcionalmente distintos, los cuales son reposo, activo e inactivado. En los estados de reposo e inactivación no hay conducción de iones. Los canales que han sido inactivados por despolarizaciones prolongadas son refractarios, a no ser que la célula se repolarice para permitirles que retornen al estado de reposo (Catterall, 1995).

5.- CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE.

El calcio (Ca^{2+}) es la molécula de señalización más ubicua y constituye una señal intracelular muy versátil que puede regular una gran cantidad de funciones celulares en un curso temporal que va desde microsegundos (p. ej. exocitosis) hasta horas (p. ej. transcripción génica o proliferación celular). Esta versatilidad está

determinada por una gran cantidad de herramientas intracelulares que regulan los flujos y concentraciones de calcio, como son receptores, transductores, canales, enzimas, bombas e intercambiadores. Por norma general las variaciones de concentración altas y rápidas regulan respuestas transitorias, mientras que las respuestas lentas están mediadas por ondas intracelulares de calcio o tránsitos repetitivos. El calcio es capaz de controlar por sí mismo la expresión de sus propios sistemas de señalización (Berridge y col., 2003).

Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) son miembros de una superfamilia génica de canales iónicos transmembrana que incluyen los canales de potasio y sodio dependientes de voltaje (Catterall y col., 2005). Los CCDV se abren como consecuencia de la despolarización de la membrana plasmática, permitiendo así el flujo de iones de calcio al interior celular, provocando tránsitos localizados. De esta forma estos canales actúan como transformadores de señales eléctricas en señales bioquímicas, jugando un papel central en procesos fisiológicos de gran importancia como la contracción, secreción, neurotransmisión y la expresión génica en diferentes tipos celulares (Hofmann y col., 1999; Catterall, 2000; Catterall y col., 2005). Estos canales fueron identificados por primera vez por Paul Fatt y Bernard Katz en músculo de crustáceo, cuando al eliminar el sodio del medio observaron que el músculo continuaba siendo capaz de generar potenciales de acción (Fatt y Katz, 1953).

Los CCDV juegan un papel fundamental en el funcionamiento normal así como en procesos patológicos que ocurren en neuronas (Dolphin, 2006).

5.1.- Nomenclatura de los Canales de Calcio Dependientes de Voltaje.

En 1994 se adoptó una nomenclatura unificada pero arbitraria en la que las subunidades α_1 se referían como α_{1S} para la isoforma original de músculo esquelético (ver apartado 5.2, página 21), y de α_{1A} a α_{1E} para las isoformas descubiertas con posterioridad (Birnbaumer y col., 1994). En el año 2000 se adoptó una nomenclatura más razonable (Ertel y col., 2000) basada en la nomenclatura de los canales de potasio (Chandy y Gutman, 1993). Los canales de calcio se denominaron utilizando el símbolo químico del principal ión permeable (Ca), con el principal regulador fisiológico (voltaje) indicado como subíndice (Ca_v). La identificación numérica corresponde con la subfamilia génica de la subunidad α_1 correspondiente (de 1 a 3), y el orden de

descubrimiento de la subunidad α_1 dentro de la subfamilia (de 1 a n) (Catterall y col., 2005).

5.2.- Estructura de los Canales de Calcio Dependientes de Voltaje.

Estudios bioquímicos han revelado que los CCDV son proteínas heteroméricas grandes compuestas por cuatro o cinco subunidades distintas denominadas α_1 , α_2 , δ , β y γ , las cuales están codificadas por múltiples genes (Catterall, 2000). Los primeros estudios se realizaron a partir de los túbulos T de músculo esquelético debido a su alta riqueza en estos canales (Dolphin, 1995). Las propiedades específicas de estos canales están determinadas por la identidad de su subunidad α_1 , que constituye el poro del canal, aunque se ven modificadas por las subunidades asociadas α_2 , δ , β y γ (Dunlap y col., 1995; Westenbroek y col., 1998; Muth y col., 2001). La interacción entre las diferentes subunidades es fuerte pero no están unidas de forma covalente.

5.2.a.- Subunidades α_1 .

La subunidad α_1 es la de mayor tamaño, consiste aproximadamente en 2000 aminoácidos (190-250 kDa), y constituye el poro de paso para los iones de calcio y determina las propiedades fundamentales del canal, ya que incorpora el sensor de voltaje y el aparato de apertura, además de ser la subunidad que contiene el mayor número de sitios de regulación por parte de vías de señalización intracelular, fármacos y toxinas (Hofmann y col., 1999; Muth y col., 2001; Catterall y col., 2005; Dolphin, 2006). Hasta ahora se han encontrado diez genes que codifican para la subunidad α_1 , los cuales se han clasificado en tres familias (ver apartado 5.3, página 23).

Al igual que la subunidad α de los canales de sodio, esta subunidad α_1 está organizada en cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de los cuales presenta seis segmentos transmembrana (S1-S6) con los terminales C y N en el interior celular (figura 5). El segmento S4 contiene el sensor de voltaje, mientras que el lazo situado entre los segmentos S5 y S6 de cada dominio determina la conductancia iónica y la selectividad, de forma que cambios de sólo tres aminoácidos en los lazos de los dominios I, III y IV pueden convertir un canal de sodio en un canal selectivo de calcio (Catterall y col., 2005). Las diez subunidades α_1 han sido clonadas y todas poseen unas funciones y distribución especializada, siendo todas homólogas con las subunidades α del canal de sodio dependiente de voltaje.

Introducción.

La localización de la región que regula la apertura y cierre del poro se desconoce en la actualidad. De igual forma la base de la inactivación en estos canales todavía no está clara (Dolphin, 2006).

El resto de subunidades modulan la función de la subunidad α_1 actuando sobre la inactivación dependiente de voltaje de la corriente. Sin embargo la diversidad farmacológica y electrofisiológica proviene principalmente de la existencia de diferentes subunidades α_1 (Hofmann y col., 1994).

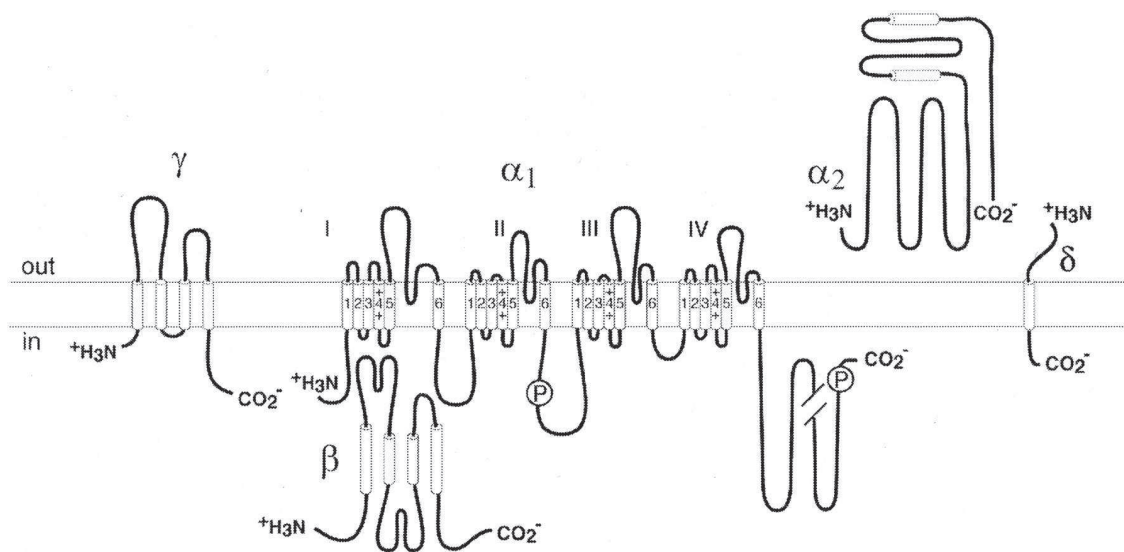


Figura 5. .- Estructura y composición de las diferentes subunidades de los canales Ca_v1 (figura tomada de Catterall y col., 2005). Los cilindros representan estructuras en α -hélice, la longitud de las líneas se corresponde de forma aproximada con la longitud de los segmentos polipeptídicos representados.

5.2.b.- Subunidades β .

La subunidad β se localiza en el interior celular y hasta el momento se han conseguido clonar cuatro subunidades diferentes (β 1-4). Estas subunidades intracelulares determinan propiedades de las subunidades α_1 de las familias Ca_v1 y Ca_v2 , incluyendo el transporte de complejos de canales de calcio a la membrana plasmática, la modificación de propiedades cinéticas y la expresión funcional de las subunidades α_1 , siendo ésta una de sus principales funciones (Gregg y col., 1996; Murakami y col., 2002).

5.2.c.- Subunidades $\alpha_2\delta$.

Las subunidades α_2 y δ son proteínas auxiliares. Han sido clonados cuatro genes que codifican para subunidades $\alpha_2\delta$. No está demostrado que todas las subunidades α_1 funcionales de canales de calcio activados por alto voltaje que se encuentran en la membrana plasmática estén asociadas con subunidades $\alpha_2\delta$ (Dolphin, 2006).

5.2.d.- Subunidades γ .

Los canales de calcio de músculo esquelético purifican junto con una subunidad γ , mientras que subunidades relacionadas se expresan en corazón y cerebro (Catterall y col., 2005). Hasta el momento han sido clonadas 7 posibles subunidades γ (γ_2 - γ_8).

5.3.- Clasificación de los Canales de Calcio Dependientes de Voltaje.

Los CCDV se clasifican en base a sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas en canales con umbral de activación por bajo voltaje o tipo T, y canales activados por alto voltaje entre los que se incluyen los tipos L, N, P/Q y R (Schaible y col., 2000), los cuales se activan a potenciales cercanos a -20 y -10 mV (Tsien y col., 1995).

Hasta ahora se han encontrado diez genes que codifican para la subunidad α_1 (figura 6), los cuales se han clasificado dentro de tres grandes familias en función de la similitud de sus secuencias, estas familias son Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 (Ertel y col., 2000).

Los cuatro miembros de la familia Ca_v1 dan lugar a canales de tipo L. Los canales $Ca_v1.1$ representan la isoforma presente en músculo esquelético, los canales $Ca_v1.2$ son especialmente prevalentes en músculo cardíaco y neuronas, mientras que los canales $Ca_v1.3$ y $Ca_v1.4$ presentan un umbral de voltaje menor a los anteriores y tienen una distribución más restringida. Sólo los canales $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ se expresan en el sistema nervioso central.

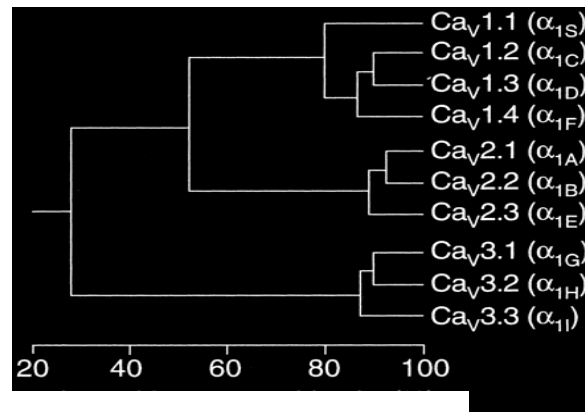
Los canales $Ca_v2.1$ (inicialmente denominados α_1A) determinan las corrientes de tipo P/Q, los canales $Ca_v2.2$ (α_1B) son la base molecular de las corrientes de tipo N,

Introducción.

los canales $Ca_v2.3$ (α_{1E}) fueron clasificados inicialmente como canales de bajo umbral y realmente presentan una inactivación mayor que el resto de canales de calcio activados por alto voltaje, actualmente se piensa que estos canales pueden determinar la corriente residual de tipo R (Dolphin, 2006).

El grupo de canales Ca_v3 determinan las corrientes de tipo T, fueron los últimos en ser clonados y se caracterizan por ser activados por bajo voltaje. Los estudios de homología realizados indican que estos canales son claramente divergentes en términos estructurales de los canales de calcio activados por alto voltaje (revisión en Perez-Reyes, 2003).

Figura 6.- Homología de las secuencias génicas de las subunidades α_1 (figura tomada de Catterall y col., 2005). La homología dentro de cada una de las familias es próxima al 80%, mientras que entre familias es del 52%.



6.- CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE DE TIPO L.

Los canales de tipo L son probablemente los mejor caracterizados dentro de los CCDV. Los primeros estudios realizados sobre estos canales los reconocieron como la parte esencial para el acoplamiento entre la excitación y la contracción de músculo esquelético, cardíaco y liso. En neuronas participan en la regulación de muchos procesos como secreción de neurohormonas y transmisores, expresión génica, eficacia sináptica y modulando la actividad de otros canales iónicos (Lipscombe y col., 2004).

En el sistema nervioso central sólo se encuentran los canales de tipo L de la clase $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ (Chin y col., 1992; Hell y col., 1993), los cuales son la base de la transmisión sináptica en algunas terminaciones nerviosas especializadas, como por ejemplo aquellas que se encargan de la liberación de neurotransmisores de forma

continúa con lentas despolarizaciones en la retina y en las células auditivas. En general se localizan predominantemente en el soma y dendritas proximales de las neuronas en todo el cerebro y en todas las láminas de la médula espinal, no variando su distribución en los diferentes segmentos de la misma (Dunlap y col., 1995; Westenbroek y col., 1998; Schiabe y col., 2000). También se ha observado la presencia de canales de tipo L en las neuronas sensoriales de menor tamaño de los ganglios dorsales, que se corresponderían con neuronas de tipo C y A_δ (Murakami y col., 2004).

Parece que estos canales se presentan preferentemente en las membranas postsinápticas, siendo más importantes para la regulación de eventos intracelulares dependientes de calcio que en la rápida transmisión sináptica (Heinke y col., 2004), teniendo una contribución menor en la liberación de neurotransmisores desde las terminaciones nerviosas (Stanley y Atrakchi, 1990; Kim y col., 2001).

Los CCDV de tipo L median una corriente de entrada que se activa lentamente como consecuencia de la despolarización de la membrana, mostrando una pequeña o nula inactivación. Sus lentas cinéticas de activación y desactivación dan unas propiedades sensibles a voltaje en un rango de tiempo de cientos de milisegundos a decenas de segundos, conduciendo a procesos de *wind up* en neuronas motoras y sensoriales. Los canales de tipo L responden a despolarizaciones repetitivas o sostenidas más que a despolarizaciones breves, ya que necesitan más de 7 ms para alcanzar un 90% de su valor de activación máxima (Mermelstein y col., 2000), haciéndoles buenos candidatos para una corriente de entrada persistente (Perrier y col., 2002).

Los canales Ca_v1.2 se caracterizan por activarse por despolarizaciones fuertes, ser muy sensibles a agonistas y antagonistas de la familia de las dihidropiridinas, presentan inactivación dependiente de calcio con baja inactivación dependiente de voltaje y tienen una alta conductancia (Lipscombe y col., 2004). Este canal se abre cuando la despolarización de membrana supera los -30 mV. Se piensa que en las neuronas acoplan la despolarización de membrana con la regulación de la expresión génica (Dolmetsch y col., 2001; Weick y col., 2003).

Los canales Ca_v1.3 presentan un umbral de activación menor y son diez veces menos sensibles a los antagonistas de tipo dihidropiridina en comparación a los

canales $Ca_v1.2$ (Koschak y col., 2001). Comienzan a activarse a un potencial de -55 mV, presentando cinéticas de activación más rápidas (Xu y Lipscombe, 2001).

En la médula espinal, las motoneuronas y subgrupos específicos de interneuronas expresan canales de calcio de tipo L (Perrier y col., 2002). En el asta dorsal las subunidades $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ se expresan ampliamente en toda su extensión, aunque parece que la presencia de $Ca_v1.3$ es menos intensa (Murakami y col., 2004).

Su sensibilidad al voltaje es regulada en parte por algunos receptores metabotrópicos, de forma que se facilita por receptores de glutamato (grupo I), acetilcolina, noradrenalina y serotonina en motoneuronas, mientras que los receptores de glutamato y sustancia P lo hacen en interneuronas dorsales. En ambos tipos celulares esta facilitación se contrarresta por la activación de receptores de GABA (Russo y col., 1998).

Estudios realizados en ratones transgénicos demuestran que los animales knockout homocigóticos para $Ca_v1.2$ son inviábiles, mientras que el heterocigótico es idéntico al tipo silvestre. Los animales knockout homocigóticos para $Ca_v1.3$ son sordos debido a que estos canales median la liberación de neurotransmisores en células auditivas, por lo que la sordera es consecuencia de la falta de entrada de calcio necesaria para la liberación de neurotransmisores (Muth y col., 2001)

6.1.- Bloqueantes y Activadores de los CCDV de Tipo L.

Los canales de calcio de tipo L son la diana molecular de bloqueantes orgánicos utilizados ampliamente en la terapia de enfermedades cardiovasculares, los cuales engloban las fenilalquilaminas, las dihidropiridias y las benzotiazepinas. Se piensa que cada tipo de antagonista actúa en sitios distintos del receptor, pero acoplados alostéricamente (Glossmann y Striessing, 1990; O'Neill y col., 1994).

Las fenilalquilaminas son bloqueantes intracelulares del poro, y se piensa que penetran por el mismo desde el citoplasma para bloquearlo. Su punto de actuación se encuentra en residuos de aminoácidos del segmento S6 de los dominios III y IV. Las dihidropiridinas pueden ser activadoras o inhibidoras del canal y por lo tanto se piensa que actúan alostéricamente para cambiar el canal entre los estados abierto o cerrado, más que ocluyendo el poro. Su lugar de actuación se sitúa en residuos de

aminoácidos en el segmento S6 de los dominios III y IV, y del segmento S5 del dominio III. El lugar de actuación de las dihidropiridinas está tan próximo al de fenilalquilaminas que incluso comparten algunos residuos de aminoácidos. Se piensa que las benzotiazepinas se unen a un tercer lugar del receptor, pero los residuos de aminoácidos que son requeridos para la unión solapan extensamente con aquellos requeridos por las fenilalquilaminas (Catterall y col., 2005).

Las dihidropiridinas son un grupo de fármacos sintéticos con gran importancia clínica en el tratamiento de la hipertensión. Estos canales son altamente selectivos para dihidropiridinas, pero su sensibilidad es relativamente baja, siendo $Ca_v1.2$ más sensible que $Ca_v1.3$ (Perrier y col., 2002). Verapamil fue la primera molécula orgánica descrita como “antagonista de calcio” en la década de 1960 por Albrecht Fleckenstein, el cual acuñó este término para nombrar cualquier sustancia capaz de bloquear el acoplamiento excitación-contracción, en la misma forma que la eliminación de iones de calcio externos. Este mismo científico identificó con posterioridad nifedipina como antagonista de calcio, la primera molécula de importancia terapéutica de la clase 1,4-dihidropiridina (Dolphin, 2006). Nifedipina y nimodipina han sido las dihidropiridinas más utilizadas para la identificación farmacológica de estos compuestos (Schaible y col., 2000). La inhibición por dihidropiridinas es dependiente de estado, de forma que aumenta con potenciales de membrana despolarizados que abren el canal, y se reduce con potenciales de membrana hiperpolarizados (Bean, 1984; Berjukow y col., 2000).

El compuesto Bay K8644 es un agonista de tipo dihidropiridina que se utilizó como sustancia para identificar de forma inequívoca los CCDV de tipo L, debido a su enorme capacidad de aumentar el tiempo de apertura del canal sin variar la conductancia unitaria del mismo (Bean y col., 1984; Nowycky y col., 1985).

6.2.- Implicación de los CCDV de Tipo L en Procesos de Nocicepción.

Los efectos de diferentes moduladores de los CCDV de tipo L se han estudiado en diversos modelos de dolor utilizando gran variedad de condiciones experimentales. En todos ellos se debe tener en cuenta que en una neurona, e incluso en una sinapsis determinada, pueden concurrir diferentes tipos de CCDV, por lo que un solo antagonista bloqueará una fracción de los CCDV presentes, pudiendo tener efectos aditivos la aplicación de diferentes bloqueantes de forma conjunta (Vanegas y Schaible, 2000; Schaible y col., 2000).

Introducción.

Neugebauer y colaboradores (1996) observaron en registros de neuronas nociceptivas del asta dorsal que la aplicación de nimodipina deprime alrededor de un 30% la respuesta neuronal tanto a estímulos inocuos como nocivos.

En estudios de comportamiento la aplicación de diferentes antagonistas por vía intratecal o a través de microfilamentos directamente a la médula espinal, producen efectos contradictorios. Hara y colaboradores (1998) observaron que diltiazem o verapamil aumentan la latencia de retirada de la cola por aplicación de calor y el umbral de distensión colorrectal, pero hay que tener en cuenta que en este caso las mayores dosis aplicadas provocaron parálisis temporal en los animales estudiados. Por el contrario Malmberg y Yaksh (1994) no observaron ningún efecto en el comportamiento motor tras aplicar verapamil en un modelo de aplicación de calor por placa en ratas, al igual que Sluka (1997 y 1998) que no observó ningún efecto al aplicar nifedipina sobre los reflejos de retirada a estímulos inocuos o nocivos. Sin embargo, Todorovic y colaboradores (2004) observaron que la aplicación intraperitoneal de verapamil produjo una reducción de los umbrales de retirada por estímulos mecánicos y térmicos en ratas adultas.

Sluka (1997) observó que la administración de nifedipina en el asta dorsal a través de un microfilamento, previno de forma concentración dependiente el desarrollo de procesos de alodinia e hiperalgesia en la parte distal de la pata de ratas, inducidos por la aplicación de capsaicina en la zona proximal de la misma.

En un modelo de inyección subcutánea de formalina, Coderre y Melzack (1992) observaron que la aplicación intratecal previa de nifedipina o verapamil redujo en un 30% el comportamiento nociceptivo de la segunda fase de este modelo, no observándose ninguna variación en la fase temprana del mismo. Idénticos resultados obtuvieron Malmberg y Yaksh (1994), los cuales también observaron una reducción del 20-30% en el comportamiento nociceptivo de la segunda fase tras la previa aplicación de verapamil o diltiazem. Sin embargo en otros estudios de comportamiento con este mismo modelo, Murakami y colaboradores (2004) no observaron ningún efecto tras la aplicación intratecal de nicardipina. En este mismo modelo Díaz y Dickenson (1997) no observaron ningún efecto de la aplicación previa de verapamil sobre el disparo de neuronas de rango dinámico amplio del asta dorsal.

En procesos inflamatorios desarrollados por la aplicación de inyecciones de kaolina y carragenina, Neugebauer y colaboradores (1996) observaron que la

administración espinal de diltiazem o nimodipina reducen alrededor de un 30% las respuestas potenciadas de neuronas nociceptivas espinales tras estimulación nociva e inocua de la zona inflamada (hiperalgesia primaria y alodinia), reduciendo en un 18% las respuestas tras la estimulación de zonas no inflamadas (hiperalgesia secundaria). Sin embargo Sluka (1998) estudió el efecto de nifedipina en el desarrollo de la hiperalgesia secundaria, no observando ningún efecto.

En modelos de dolor neuropático, Chaplan y colaboradores (1994) no observaron ningún efecto tras la aplicación intratecal de verapamil, diltiazem o nimodipina a altas concentraciones.

En un modelo de dolor visceral, la administración intratecal de verapamil o Bay K8644 no afectaron a la transmisión de estímulos nocivos desde el mesenterio (Hováth y col., 2001).

Respecto al agonista de los CCDV de tipo L Bay K8644, Coderre y Melzack (1992) observaron que su aplicación intratecal aumentó el comportamiento nociceptivo de la segunda fase del modelo de formalina.

Los CCDV de tipo L parecen estar implicados en procesos nociceptivos patofisiológicos así como en la somestesia normal, aunque debido a la diversidad de resultados obtenidos en los diferentes estudios su papel no está completamente claro. El desarrollo de herramientas farmacológicas más específicas y potentes sería necesario para obtener resultados más concluyentes. Además hay que tener en cuenta que la presencia de estos canales no es exclusiva de la médula espinal, por lo que los efectos de su aplicación también afectan a la fisiología de otros tejidos y órganos corporales.

OBJETIVOS

Los principales objetivos de la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1.- Desarrollar una nueva metodología que permita registrar de forma simultánea reflejos motores e información ascendente a nivel de la médula espinal.
- 2.- Demostrar que esta nueva metodología realmente aporta información de vías diferentes.
- 3.- Caracterizar el posible efecto de los antagonistas de los CCDV de tipo L verapamil, diltiazem y nimodipina sobre la actividad medular, así como determinar particularidades de sus posibles efectos.
- 4.- Caracterizar el posible efecto del agonista de los CCDV de tipo L Bay K8644 sobre la actividad medular.

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

1.- ANIMALES UTILIZADOS.

Durante la realización de la fase experimental de esta tesis se han empleado ratones CD-1 de ambos sexos, con un rango de edad comprendido entre los 6 y 17 días, y con un peso que oscila entre 3.5 y 9.5 gramos. La razón para utilizar animales neonatales se basa en que los tejidos extraídos de animales jóvenes son más resistentes a la hipoxia, de tal forma que las médulas espinales extraídas de ratones con un peso superior a 9.5 gramos, o con una edad superior a 17 días han resultado inviables durante la realización de esta tesis. Esta afirmación concuerda con los resultados obtenidos utilizando la preparación de médula hemiseccionada de rata, la cual es también inviable en animales adultos.

Los animales utilizados en la experimentación fueron criados en el animalario de la Universidad de Alcalá, en condiciones controladas de luz (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) y temperatura (22 °C), además de tener acceso libre a comida y agua. Todos los animales empleados fueron separados de su madre y resto de crías instantes antes de proceder a la preparación experimental.

Todos los procedimientos experimentales empleados son acordes a las regulaciones de la Unión Europea y el Gobierno Español respecto al trabajo con animales de laboratorio. Además estos procedimientos han sido aprobados por el Comité de Cuidado Animal de la Universidad de Alcalá. A continuación se describen las técnicas generales utilizadas, algunos aspectos particulares se detallan en capítulos sucesivos.

2.- ANESTESIA.

Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de uretano disuelto en suero salino a una concentración de 2 g/kg. La aplicación de la anestesia se realizó con un jeringa de 1 ml y una aguja de 0.3 mm en una sola dosis. Para asegurar que la anestesia fue inducida se presionó la cola del animal con unas pinzas para evaluar el reflejo de retirada. En los casos excepcionales en los que la inyección no surtió el efecto esperado, el animal fue sometido a una segunda inyección de aproximadamente $\frac{1}{4}$ del volumen inicial, dependiendo del grado de efecto del primer volumen aplicado. Tras la anestesia, el animal se situó en posición de decúbito supino en hielo picado con el fin de enfriar su región dorsal, ralentizar su metabolismo y por tanto sus necesidades de oxígeno, además de aumentar la

anestesia en la zona que sufre el daño más importante durante la extracción de la médula espinal.

3.- EXTRACCIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL.

Después de mantener al animal anestesiado entre 2 y 5 minutos sobre el hielo, la respiración del mismo se vuelve lenta y regular, lo que permite situarlo sobre la superficie de operación. Ésta consistió en una lámina gruesa de corcho que se podía mover libremente para permitir la máxima flexibilidad de movimientos durante la extracción. El animal se fijó a esta lámina en posición de decúbito prono con las extremidades extendidas y pegadas con dos tiras de cinta adhesiva. En esta situación se procedió a eliminar la piel de la región dorsal y posteriormente a levantar la grasa interescapular, para así exponer la mayor parte de la región cérvico-toraco-dorsal del animal.

Tras estos preliminares, con instrumental de microcirugía y bajo una lupa estereoscópica, se procedió a realizar una laminectomía dorsal. Primero se realizó un corte con tijera en la región interescapular, con el fin de seccionar el arco vertebral de una vértebra antero-torácica y exponer la médula espinal. Tras esta maniobra y con las tijeras paralelas a la columna vertebral en todo momento, se procedió a seccionar ambas bases de los arcos vertebrales lo más proximal posible, continuando con este proceso a lo largo de la columna vertebral en dirección caudal. El fin es exponer la médula espinal hasta las regiones más sacras. Una vez expuesta la médula, se procedió a la extracción de ésta, con la ayuda de unas pinzas de punta fina y curva. Primero la médula se seccionó transversalmente a la altura de la región C-2 o C-3, con las pinzas se sujetó la médula a través de las membranas meníngeas expuestas en la zona seccionada. Después, situando las tijeras paralelas a la médula, se fue desligando ésta de sus conexiones al tejido circundante, hasta llegar a la región caudal, donde se volvió a seccionar la médula transversalmente para su total extracción.

Durante la laminectomía y la extracción de la médula espinal, ésta se irrigó constantemente con una pipeta Pasteur que contiene líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) oxigenado a una temperatura de 4°C aproximadamente, lo que permitió mantener la zona a baja temperatura, limpiar los líquidos corporales que obstaculizan la visión de las zonas a cortar durante la extracción, y mantener viva de forma artificial la médula espinal del animal una vez cortado el riego sanguíneo.

Una vez extraída la médula se colocó en un baño frío (4-8 °C) de LCRA oxigenado constantemente. Este último proceso se realizó en una placa Petri con un fondo de Sylgard colocada sobre una base de hielo. Primero se fijó la médula espinal con alfileres (0.1 mm de diámetro) al fondo de Sylgard a través de las membranas meníngeas, las cuales fueron eliminadas con gran cuidado de no dañar el tejido mediante el uso de alfileres, pinzas y tijeras, material que posteriormente se utilizó para separar las raíces dorsales y ventrales, lo cual permitirá introducirlas en sus correspondientes electrodos. Las membranas meníngeas no se eliminaron por completo, se dejaron pequeños restos en los extremos de la médula para permitir su fijación sin dañar el tejido nervioso. En este punto también se realizó un corte transversal de 45 grados aproximadamente en el plano anterolateral a nivel del extremo rostral de la médula espinal, de esta forma se permitió diferenciar mejor la sustancia blanca de la sustancia gris para aproximar los microelectrodos de succión a las zonas de registro durante el experimento.

Tras estos pasos, la médula espinal se trasladó en LCRA a la cámara de registro, donde se mantiene en condiciones *in vitro* en un baño de LCRA oxigenado que se detalla a continuación.

4.- MANTENIMIENTO DE LA MÉDULA ESPINAL.

La composición del LCRA fue (en mM): NaCl (128), KCl (1.9), KH_2PO_4 (1.2), MgSO_4 (1.3), CaCl_2 (2.4), NaHCO_3 (26) y glucosa (10) con un pH de 7.4. Estos componentes se pesaron previamente y antes de comenzar el experimento se disolvieron en agua ultrapura, producida por un aparato marca MiliQ. La temperatura del líquido se mantuvo a 23 ± 1 °C. El LCRA se gaseó constantemente con carbógeno (95% O_2 – 5% CO_2) para asegurar una oxigenación homogénea y mantener el pH en condiciones fisiológicas.

La médula espinal se situó en una cámara de registro que medía 2 cm de largo, 1 cm de ancho y 0.5 cm de fondo. El fondo de la cámara era de Sylgard, lo que permitió fijarla y mantenerla estable físicamente mediante alfileres que atraviesan pequeños restos de membranas meníngeas. La parte rostral de la médula se situó sobre una pequeña cuña de Sylgard con una inclinación de aproximadamente 45°, de esta forma se pudo observar mejor la zona en la que se van a situar los microelectrodos. A continuación de la cámara de registro se situó una segunda cámara de evacuación de LCRA, esta segunda cámara era más pequeña que la anterior.

Ambas cámaras estaban separadas por un tabique para evitar turbulencias del LCRA en la cámara de registro, el flujo de LCRA se permitió comunicando ambas cámaras por la parte superior del tabique de separación a través de un puente de papel de filtro (figura 7).

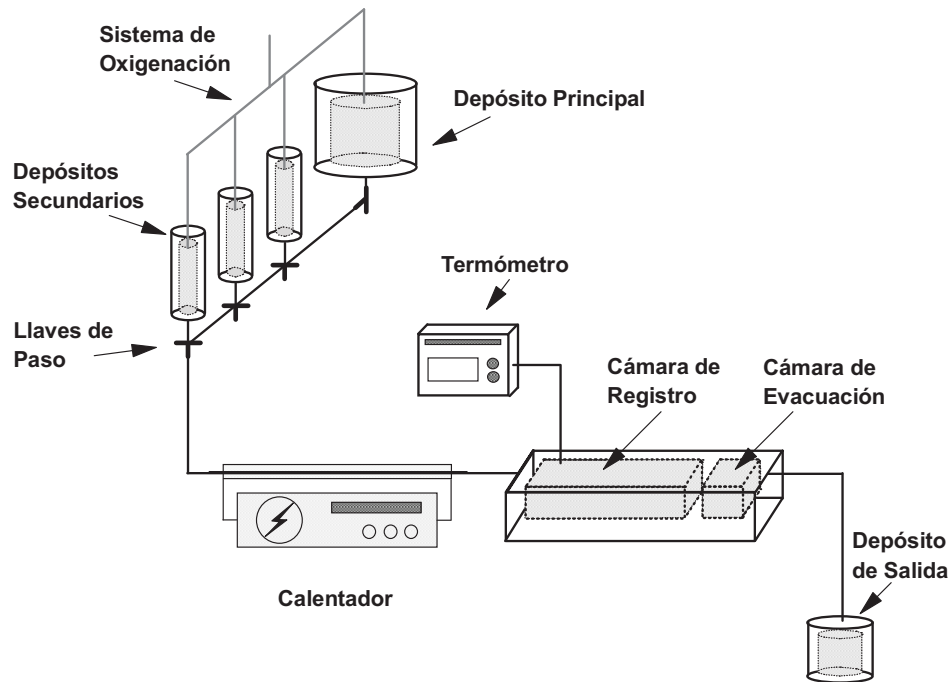


Figura 7.- Sistema de perfusión utilizado para mantener la médula espinal en condiciones *in vitro*. El LCRA está permanentemente burbujeado con carbógeno. Los depósitos secundarios sirven para regular la entrada de fármacos en el sistema de perfusión. El calentador mantiene la temperatura constante por recirculación de agua.

La cámara de registro estaba conectada con un sistema de perfusión constante con un flujo medio de 8 ± 2 ml/min de LCRA, que funcionaba por gravedad y constaba de varios depósitos que permiten la aplicación de distintas sustancias (figura 7). El depósito principal fue de 750 ml y estaba situado a 40 cm sobre el baño en el que se situó la médula espinal. El LCRA bajó por gravedad del depósito al baño a través de un tubo de silicona (5 mm de diámetro). Este tubo, en su parte final, discurrió por el interior de otro tubo de mayor diámetro, por el que se pudo pasar agua a diferentes temperaturas con el fin de mantener la temperatura del LCRA constante o variarla en caso de necesidad. La temperatura del líquido se midió con una sonda. Interpuestos en este sistema se encontraban tres recipientes calibrados, cuyo contenido se pudo verter al sistema de perfusión a través de un sistema de llaves de tres vías. Estos

recipientes se emplearon para la perfusión de fármacos. La evacuación de la cámara de registro se realizó también por gravedad mediante un tubo de silicona (1 mm diámetro) situado en la cámara de evacuación, y cuyo extremo inferior se situó 50 cm por debajo del extremo superior (figura 7). El LCRA utilizado fue eliminado para evitar contaminaciones.

Todo el sistema de estimulación y registro, la cámara de registro y parte del sistema de perfusión se montaron sobre una mesa antivibratoria, lo cual permitió tener unas condiciones óptimas de estabilidad mecánica durante la realización de los experimentos. Estos sistemas se situaron en el interior de una caja de Faraday para minimizar la aparición de ruidos eléctricos que alteraran las señales registradas.

5.- DISPOSICIÓN EXPERIMENTAL DE LA MÉDULA ESPINAL.

La médula espinal recibe información a través de las aferentes primarias que discurren por las raíces dorsales, esta información llega a núcleos superiores a través de vías ascendentes situadas en la sustancia blanca medular, y a la vez genera información refleja eferente que se transmite por los axones de las motoneuronas que transcurren por las raíces ventrales. Por ello se situaron electrodos de succión en la raíz dorsal y en la ventral de un mismo segmento lumbar (L4 o L5) con el fin de estimular eléctricamente toda la raíz dorsal y registrar la respuesta que viaja por la raíz ventral tras la integración producida en la médula espinal. De igual forma se situó un microelectrodo de registro a nivel de la sustancia blanca anterolateral localizada en el extremo rostral de la médula espinal, en el lado contralateral respecto de la raíz dorsal estimulada, lo que permitió registrar la información dirigida a núcleos superiores a través de vías ascendentes (figura 8). De esta forma con un mismo estímulo en la raíz dorsal se registró de forma paralela información motora (electrodo de registro ventral) e información sensorial ascendente (microelectrodo de registro ascendente).

El empleo de los segmentos lumbares es debido a que a esta región llegan la mayoría de las aferencias que provienen de los miembros posteriores, y a que éstas se agrupan en pocas raíces y muy gruesas. Otra de las ventajas de registrar a nivel de este segmento es que permitió intercalar una distancia de 10 mm aproximadamente desde el lugar de estimulación hasta el de registro ascendente. Además numerosos trabajos de comportamiento utilizan las patas traseras para diversos estudios como procesos de inflamación o neuropatía.

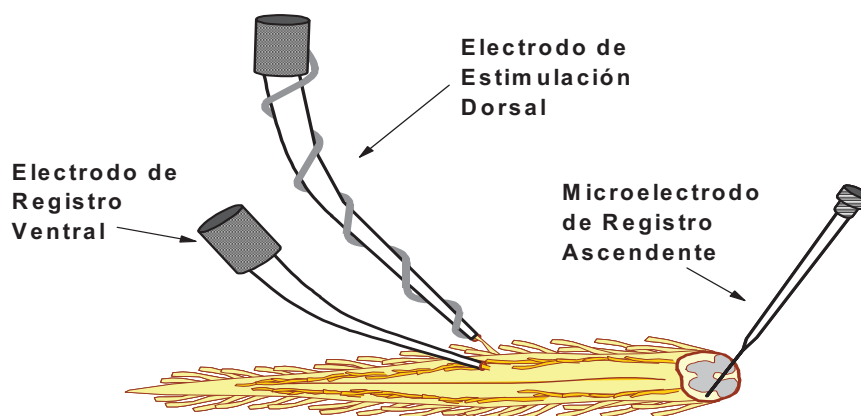


Figura 8.- Disposición de los electrodos en la médula espinal. Una raíz dorsal (L4 o L5) se introdujo en el electrodo de estimulación, a través del cual se aplicaron los estímulos eléctricos. La correspondiente raíz ventral se introdujo en el electrodo de registro, el cual permitió detectar los reflejos motores. Un microelectrodo de succión se situó en el extremo rostral de la médula espinal a nivel de la sustancia blanca contralateral a la raíz estimulada, permitiendo registrar la actividad de axones ascendentes. Los electrodos dorsal y ventral estimularon y registraron todas las fibras contenidas en sus respectivas raíces, mientras que el microelectrodo de registro ascendente sólo registró uno o unos pocos axones aislados.

6.- PREPARACIÓN Y APLICACIÓN DE LOS FÁRMACOS.

La mayoría de los compuestos exógenos que se perfundieron sobre la preparación fueron disueltos previamente a alta concentración (10-50 mM) en sus respectivos disolventes (agua ultrapura o DMSO) y posteriormente conservadas en alícuotas a -20°C hasta su posterior utilización. Todas las sustancias fueron diluidas a su concentración final en LCRA oxigenado instantes antes de ser perfundidas en la preparación.

En el caso del anestésico sevoflurano (Abbott Laboratories, Kent, UK) no se siguió el método general de perfusión al tratarse de un compuesto gaseoso. Por ello el sevoflurano tuvo que ser vaporizado en carbógeno en un porcentaje de volumen determinado a través de un vaporizador específico (Quick FilTM Dräger Vapor 19.n). Esta mezcla gaseosa se burbujeó en LCRA en un depósito secundario hasta ser perfundido a la médula espinal.

Las peculiaridades de las sustancias utilizadas, los tiempos de aplicación de las mismas, así como la forma de aplicación, se detallan en los capítulos sucesivos en los que se utilizaron.

7.- EXTRACCIÓN Y REGISTRO DEL NERVIIO SAFENO.

El nervio safeno es un nervio fundamentalmente sensorial que se utilizó para realizar estudios de umbrales de activación de fibras nerviosas, que posteriormente fueron de gran utilidad para estimular de forma adecuada la raíz dorsal de la médula espinal. El nervio safeno se extrajo de ratones de 30 días de edad anestesiados con uretano (2 g/Kg, i.p.) siguiendo el protocolo detallado en Rivera y col. (2000). Extracciones realizadas en animales de menor edad fueron infructuosas, por lo que los datos obtenidos con los ratones jóvenes se tomaron como referencia para los parámetros de estimulación. Una vez anestesiado el animal se retiró la piel y el tejido muscular que circunda el nervio con tijeras y pinzas de microcirugía bajo una lupa estereoscópica. Después de la eliminación de las ligaduras periféricas del nervio se procedió a cortar sus extremos distal y proximal, para posteriormente ser transferido a la cámara de registro, donde se mantuvo en condiciones *in vitro* mediante la perfusión constante de fluido intersticial sintético (FIS), a una temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y oxigenado mediante la aplicación de carbógeno (95% O₂-5% CO₂). Tanto la cámara de registro como el sistema de perfusión y oxigenación fue el mismo que el utilizado para la médula espinal. La composición del FIS fue (en mM): NaCl (108); KCl (3.48); KH₂PO₄ (1.7); MgSO₄ (0.7); CaCl₂ (1.53); NaHCO₃ (26); glucosa (5.5); gluconato sódico (9.6) y sacarosa (7.6) (Cervero y Sann, 1989).

Los extremos distal y proximal del nervio se introdujeron en electrodos de succión para su estimulación y registro respectivamente, utilizando el mismo sistema empleado para el registro de reflejos espinales que se detalla a continuación.

8.- ELECTRODOS DE REGISTRO Y ESTIMULACIÓN.

Los electrodos de succión se fabricaron a partir de capilares de boro-silicato (Clark Electromedical Instruments, GC120-10) modificados a la llama para que se ajustaran lo mejor posible al grosor de la raíz espinal. Todos los electrodos de succión se situaron sobre micromanipuladores mecánicos para el ajuste fino de su posición. Los electrodos de estimulación dorsal y registro ventral utilizados en cada experimento se eligieron individualmente para obtener el mejor ajuste posible.

Estos electrodos se denominan de succión al estar conectados a una jeringa cuya fuerza de succión se empleó para rellenarlos con el propio LCRA, y al mismo tiempo introducir la raíz en el electrodo. Las raíces se introdujeron en su mayor parte

en el electrodo, pero éste no tocó nunca la médula para evitar la estimulación o el registro de fibras de paso. El tamaño del electrodo utilizado tanto para la estimulación como para el registro de las raíces fue aquél que se ajustara al grosor de la raíz sin llegar a presionar la misma, de tal forma que no se perdiera información por el bloqueo mecánico de las fibras.

Para la estimulación de la raíz dorsal se empleó un electrodo lleno de LCRA al que se acopla una espiral de hilo de plata alrededor del mismo hasta su extremo distal, y otro hilo de plata en el interior en contacto con el LCRA. Entre ambos filamentos se generan los pulsos de corriente eléctrica que estimulan las fibras aferentes de la raíz dorsal. El electrodo de registro de la raíz ventral fue idéntico al dorsal, pero careció de los hilos de plata.

Para obtener registros de axones ascendentes se utilizaron microelectrodos de succión producidos a partir de capilares de boro-silicato sin filamento interno (Harvard Apparatus, UK), que fueron preparados en un aparato para estirar electrodos (Sutter Instrument Co., model P-97). Los electrodos estirados presentaron el extremo de registro ciego, por lo que éste era cortado con posterioridad con unas pinzas bajo una lupa estereoscópica a un diámetro externo aproximado de $10 \pm 3 \mu\text{m}$. El interior del microelectrodo se llenó con el propio LCRA a través de una jeringa con una aguja micrométrica.

Para realizar los registros de los axones ascendentes el microelectrodo se acopló a una jeringa de succión, y se situó sobre un micromanipulador mecánico al igual que los electrodos de registro de las raíces espinales. Una vez situado junto a la zona de sustancia blanca de interés se aplicó una ligera succión a través de la jeringa, lo que provocó la entrada de axones en la punta del microelectrodo, permitiendo el registro de su actividad eléctrica. La distancia entre el electrodo de estimulación y el microelectrodo de registro varió entre los 6 y 11 mm, dependiendo de la raíz dorsal estimulada y la longitud de la médula espinal extraída.

La estimulación eléctrica de la raíz dorsal generó una respuesta motora que se registró por el electrodo situado en la raíz ventral, y paralelamente inició el ascenso de información sensorial a núcleos superiores a través de vías ascendentes, cuyos axones fueron registrados a través del microelectrodo situado en la sustancia blanca.

El polo de referencia de todos los electrodos de registro fue un electrodo de plata que se encontraba en la cámara de registro.

9.- ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA Y PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN.

La intensidad (μA) de los pulsos eléctricos aplicados a la raíz dorsal se controló de forma manual a través de un estimulador Iso-Flex (figura 11), mientras que su duración (μs) y número de estímulos fueron controlados por el sistema electrónico Master-8. Los protocolos de estimulación se controlaron con aplicaciones informáticas realizadas específicamente con el lenguaje de programación de CED para Spike2 (figura 11).

Los parámetros básicos (intensidad y duración) de estos pulsos se determinaron en experimentos en los que se extrajo el nervio safeno y se sometió a una batería de estímulos de intensidad y duración variable (figura 9, ver capítulo 1 página 65).

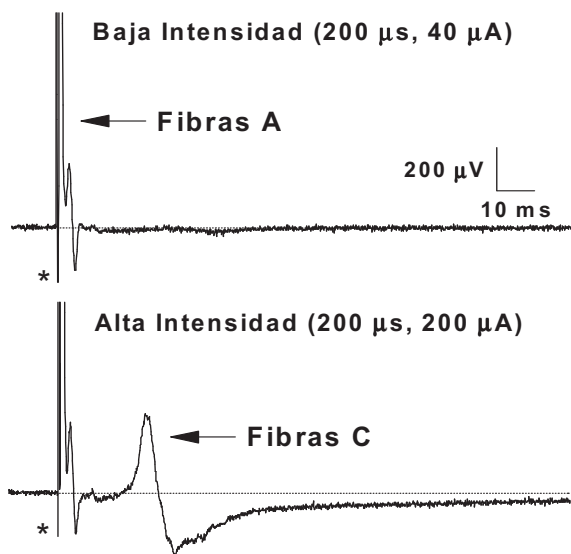


Figura 9.- En la figura se muestran los potenciales de acción compuestos registrados del nervio safeno en respuesta a estímulos de baja y alta intensidad (registro superior e inferior respectivamente). La respuesta de las fibras A prácticamente solapó con el artefacto del estímulo (marcado con un asterisco) debido a su alta velocidad de conducción. En el registro inferior se puede apreciar la presencia de una segunda onda debida a la activación de las fibras C, las cuales presentaron una velocidad de conducción menor que las fibras A.

Esta región del nervio safeno se dispuso en la cámara de registro electrofisiológico, se estimuló por el extremo distal y se registró por el extremo proximal de la vía nerviosa, utilizando el mismo sistema que el empleado para registrar la respuesta motora a través de la raíz ventral de la médula espinal (ver apartado 10.1,

página 47). Con este sistema se pudo determinar qué pulsos activaban únicamente fibras A, y a partir de qué intensidad empezaba a aparecer también la activación de las fibras C.

Los protocolos de estimulación de la raíz dorsal se especifican en la sección de materiales y métodos específica de cada capítulo de resultados, los cuales van a variar dependiendo del tipo de estudio que se realice. En general se puede decir que los estímulos, tanto de baja como de alta intensidad, se aplican aislados (estímulo unitario) o en trenes de estímulos (20 estímulos, 1 Hz; figura 10).

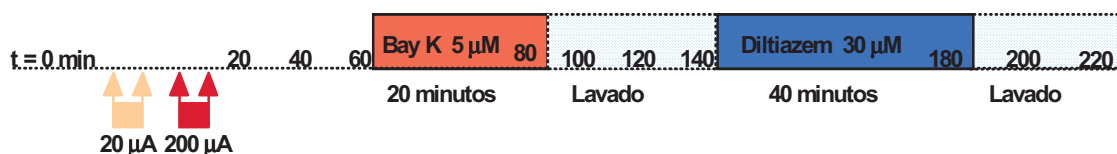


Figura 10.- En la figura se muestra un protocolo de estudio que consta de varias partes:

1.- La batería de estímulos aplicada a la raíz dorsal en cada punto temporal del estudio se indica con símbolos (ver figuras bajo este párrafo) en la parte inferior izquierda de la línea discontinua de la figura. En el caso de esta figura 10, la batería constaría de un tren de estímulos de 20μA seguido de otro de 200μA, aplicándose esta estimulación en cada punto temporal indicado (20, 40, 60... minutos).



2.- Los puntos temporales se indican sobre la línea discontinua. El periodo entre t=0 y 20 minutos se corresponde con el registro de actividad espontánea de la médula espinal, por lo que no se aplican estímulos durante este periodo, comenzando la estimulación en el minuto 20. Bajo este periodo de tiempo se indica la batería de estímulos aplicados.

3.- Por encima de la línea discontinua, e intercalados entre los puntos temporales, se indica la perfusión de las sustancias exógenas y su concentración, así como los periodos de lavado. Debajo de cada sustancia aplicada se indica el tiempo de perfusión.

4.- La información complementaria a la figura se detalla en el texto de cada capítulo.

Todas las médulas espinales estudiadas permanecieron en un periodo de estabilización durante un tiempo de 60-90 minutos tras la colocación del electrodo de registro ventral y del electrodo de estimulación dorsal, a través del cual se aplicó un estímulo de baja intensidad cada 5 minutos durante todo este periodo. La finalidad de

este periodo fue acomodar a la médula espinal a su nuevo entorno, dar un tiempo de estabilización tras el trauma sufrido durante la extracción y lavar el efecto de la anestesia.

En los estudios farmacológicos la estimulación eléctrica se realizó antes, durante y después de la aplicación de las distintas sustancias a estudiar. Las estimulaciones se realizaron a tiempos predeterminados y nunca con un intervalo menor a 15 minutos por grupo de estímulos con el fin de no degradar la respuesta. El tiempo de reposo mínimo de la médula espinal entre dos estímulos unitarios de baja intensidad era de 30 s, para el caso de dos estímulos unitarios de alta intensidad el reposo era de 60 s. El tiempo de reposo en el caso de los trenes de estímulos de baja intensidad era de 5 minutos, siendo de 15 a 30 minutos para trenes de estímulos de alta intensidad.

10.- TRATAMIENTO DE LAS SEÑALES BIOELÉCTRICAS.

10.1.- Registro de Reflejos Espinales.

La respuesta sináptica en la raíz ventral se registró y amplificó mediante un preamplificador DC (AxoClamp AI 402 x 50, Axon Instruments Inc.; CA, USA) al cual se acopló directamente el electrodo de registro, y posteriormente a través de un amplificador AC-DC (Cyber Amp 380, England, x 50) en modo DC. Esta señal, sin filtrado posterior, constituyó la base fundamental de los registros ventrales, y da una idea de la despolarización lenta por la activación sináptica de las motoneuronas tras la estimulación de la raíz dorsal (figura 11).

Derivada de esta primera señal se obtuvo otra destinada a detectar la despolarización rápida de las motoneuronas producida por el disparo de potenciales de acción. Para ello la señal DC se amplificó nuevamente en modo AC (x50) y posteriormente se filtró para eliminar las frecuencias menores de 300 Hz y mayores de 2600 Hz por medio de un filtrado analógico (figura 12), todo ello se realizó por medio del mismo amplificador AC-DC Cyber Amp 380 utilizando un canal diferente (figuras 11 y 12).

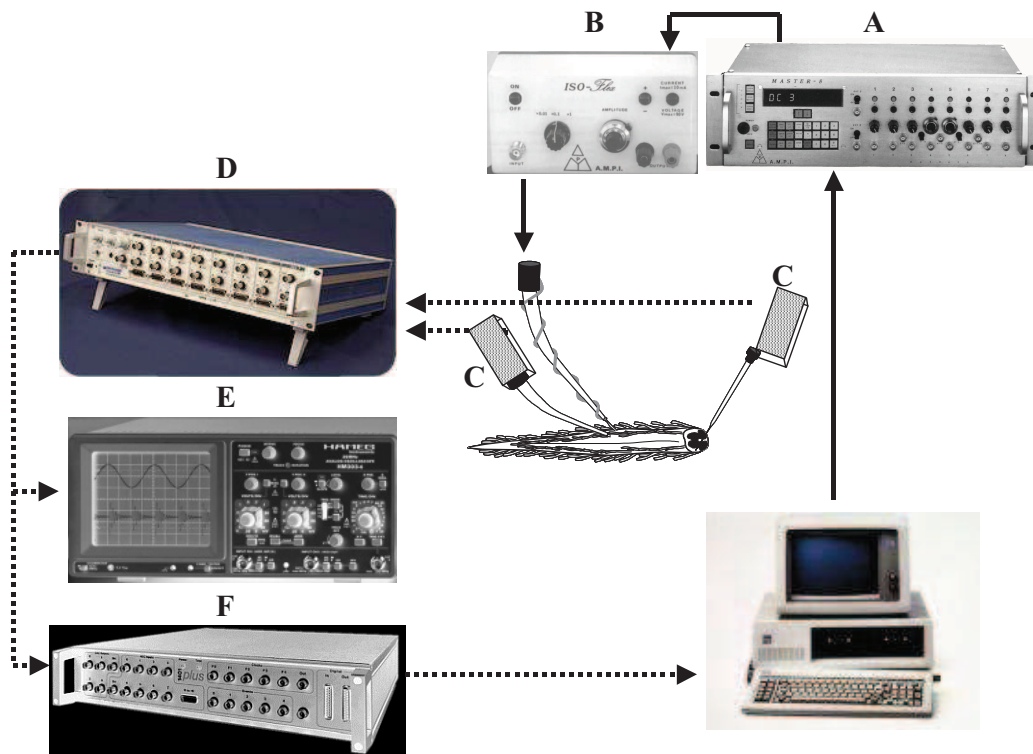


Figura 11.- En la figura se muestra la disposición del equipo utilizado para el registro y la estimulación de la preparación de médula espinal. Para la estimulación se utilizó el sistema Master-8 (A), acoplado a un estimulador Iso-Flex (B) (trazo continuo). La estimulación era controlada en todo momento por el ordenador a través del software del sistema Master-8. La señal registrada en la raíz ventral y en los axones ascendentes (trazos punteados) pasa por diferentes componentes del equipo antes de ser transferida al ordenador. Estos componentes son: Preamplificador AI 402 (C), Amplificador y filtros Cyber Amp 380 (D), osciloscopio Gould 6100 (E) y un convertor analógico-digital (CED) (F) que también actúa como interfaz, permitiendo el registro de respuestas en el ordenador, a la vez que cierto control sobre los estímulos aplicados.

Las señales bioeléctricas se monitorizaban en un osciloscopio Gould 6100 (200 MHz) y simultáneamente eran enviadas por medio de un convertidor analógico-digital (CED 1401 plus, Cambridge Electronics Design Ltd, UK) a un ordenador, en el cual las señales se podían visualizar utilizando un programa de adquisición de señales bioeléctricas (Spike 2, versión 3.14 Cambridge Electronics Design Ltd, UK). Las respuestas AC y DC se digitalizaban y almacenaban a una frecuencia de 3.3 a 5 KHz para su posterior análisis con aplicaciones informáticas desarrolladas en nuestro laboratorio.

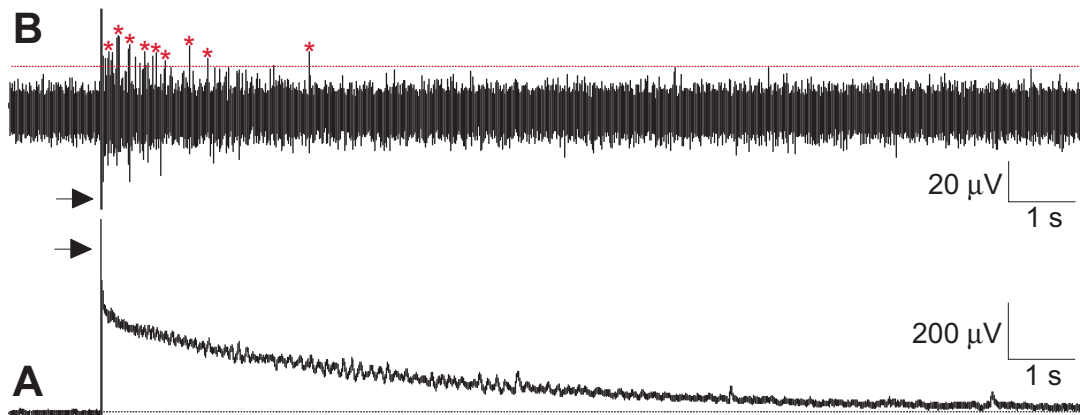


Figura 12.- Registro original de una respuesta de la raíz ventral a la aplicación de un estímulo unitario de alta intensidad en la raíz dorsal. En ambas figuras el artefacto del estímulo aplicado se marca con una flecha, debido a la escala utilizada este artefacto solapa con el reflejo monosináptico (ver figura 15). **A** Registro DC que muestra la despolarización lenta que puede durar hasta 17 segundos antes de volver a la línea base (línea discontinua). **B** Registro AC derivado del anterior destinado a la detección del disparo de potenciales de acción compuestos (despolarizaciones rápidas que duran algunos ms). La medida de estos potenciales se lleva a cabo contabilizando el número de despolarizaciones que superan un umbral determinado (umbral marcado como línea discontinua roja; ejemplos de potenciales de acción marcados con asteriscos).

10.2.- Registro de Axones Ascendentes.

La respuesta de los axones ascendentes registrada a través de los microelectrodos se amplificó y filtró (entre 300-2600 Hz), y finalmente se digitalizó y almacenó utilizando el mismo equipo de registro descrito para el registro de reflejos ventrales (registro de potenciales de acción). En el caso de los axones ascendentes sólo se registraron cambios rápidos de potencial de membrana debidos al disparo de potenciales de acción, por lo que la señal AC se mostró en dos canales, el primero se registró de forma continua a baja frecuencia (3 KHz) conteniendo tanto los potenciales de acción como la línea base (figura 13); y el segundo canal se utilizó únicamente para registrar potenciales de acción que superaban un umbral establecido en cada estudio, con una frecuencia de registro superior al primer canal (20 KHz), ya que su finalidad fue el análisis a través de aplicaciones informáticas de la forma y número de los potenciales de acción registrados tras la estimulación de la raíz dorsal (Spike 2 y CED 1401 plus) (figura 13).

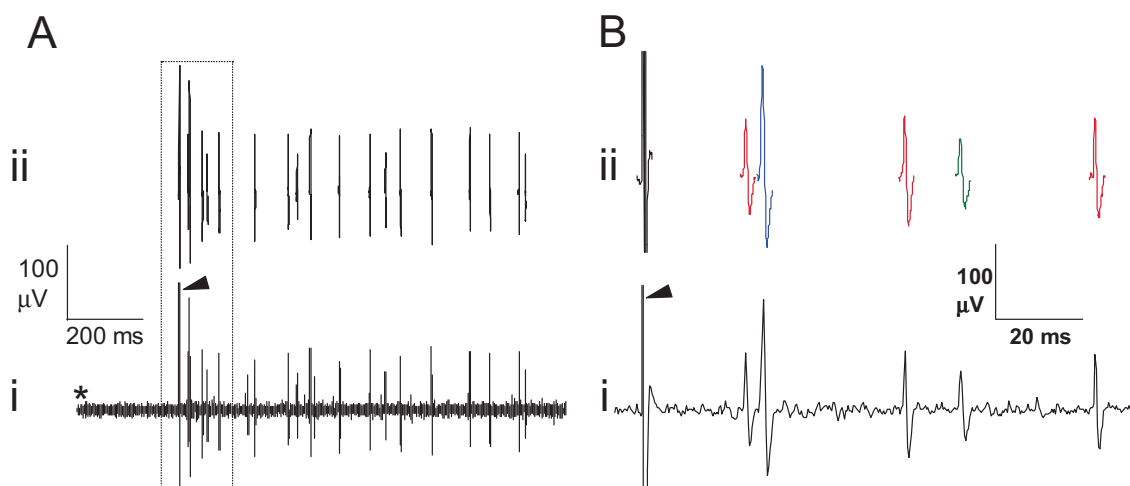


Figura 13.- Registros originales de potenciales de acción disparados por axones ascendentes. En la figura **Ai** se observa un registro original que contiene la línea base (marcada con un asterisco), artefacto del estímulo (punta de flecha) y varios potenciales de acción (líneas transversales a la línea base). La figura **Aii** corresponde con la parte de la señal anterior que se registra a mayor frecuencia y que constituye la base para los estudios posteriores. En la figura **B** se observa ampliada la zona punteada en la figura A, el canal inferior muestra toda la respuesta ascendente y la línea base, mientras que el canal superior muestra únicamente los potenciales de acción y el artefacto del estímulo que superan un umbral de detección. En este canal se muestra la respuesta con una mayor frecuencia de registro y con los potenciales de acción ya clasificados en función de su forma y amplitud.

10.3.- Disposición de los Registros.

De forma general se puede decir que para la realización de esta tesis se han realizado cuatro tipos de registros: registro del nervio safeno, registro de reflejos espinales, registro de axones ascendentes y registro simultáneo de reflejos espinales y axones ascendentes. Los más complejos fueron los registros simultáneos de reflejos espinales y axones ascendentes que constan de cuatro canales paralelos (figura 14). En esta configuración el registro situado en la parte inferior de la imagen se corresponde con la respuesta registrada en la raíz ventral en modo DC (cambios lentos del potencial), por encima del cual se sitúa el segundo registro de la respuesta ventral pero en modo AC (potenciales de acción). El tercer registro situado por encima de los dos anteriores, se corresponde con el registro de la actividad de los axones ascendentes (modo AC, disparo de potenciales de acción), el cual contiene tanto la línea base como el artefacto del estímulo y los potenciales de acción. Por último, el cuarto registro situado por encima de todos los anteriores es una réplica del tercer registro pero con una mayor frecuencia de muestreo, y únicamente presenta aquella parte de los registros que superan un umbral que se determina individualmente en

cada experimento, de forma que sólo vemos en este último registro los potenciales de acción y los artefactos del estímulo aplicado.

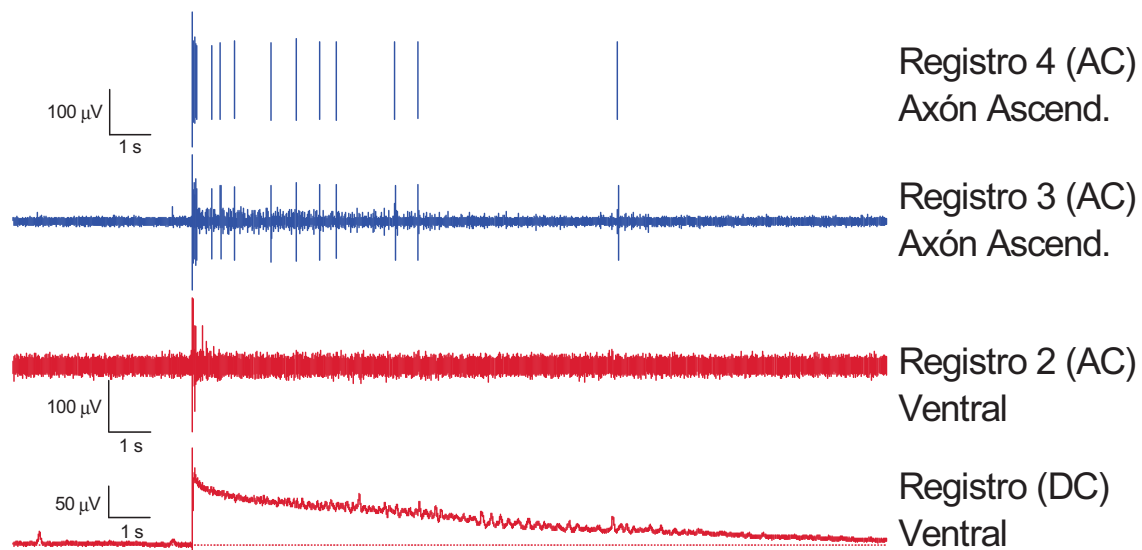


Figura 14.- Disposición de los cuatro canales utilizados en el registro simultáneo de axones ascendentes (en color azul) y reflejos espinales (en color rojo). El registro 1 es el único en modo DC, se utiliza para registrar cambios lentos de potencial. Los registros 2, 3 y 4 se registran en modo AC y muestran variaciones rápidas de potencial. El registro 4 emplea una resolución de registro superior al resto de canales, ya que se utiliza para estudiar la forma y amplitud de los potenciales de acción.

En los estudios de reflejos espinales sólo se utilizaron los registros 1 y 2, mientras que para los estudios de actividad del nervio safeno únicamente se empleó el registro 1. De igual forma para el estudio de la respuesta de axones ascendentes únicamente se utilizaron los registros 3 y 4. No todas las figuras presentes en esta tesis muestran todos los registros utilizados en el estudio debido a que pueden mostrar información recurrente, o simplemente se centran en detalles presentes sólo en uno de los registros.

11.- CARACTERÍSTICAS DE LAS RESPUESTAS, DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS.

11.1.- Respuesta registrada en la raíz ventral.

Las señales registradas en la raíz ventral evocadas por la estimulación unitaria de la raíz dorsal tenían un perfil característico en el canal DC, el cual constaba de dos componentes esenciales generados por la activación de poblaciones de fibras

aferentes. El primer componente dependió de la estimulación de fibras gruesas no mielinizadas Ia, y consistió en un primer pico rápido de gran amplitud causado por la activación monosináptica de las motoneuronas α (reflejo monosináptico, RMS; figura 15-A). El segundo componente dependió de la estimulación de fibras A δ y C, lo que provocó la aparición de una onda lenta de baja amplitud que representa potenciales postsinápticos excitatorios de las motoneuronas junto a descargas asincrónicas de origen polisináptico (figura 15-B). El aumento de la intensidad del estímulo hizo variar la duración y potencia del componente más tardío (figura 16). Las variables analizadas en las respuestas de las motoneuronas a estímulos unitarios fueron: **(1)** la amplitud del RMS, medida desde la línea base en un intervalo entre 4 y 9 ms tras el artefacto del estímulo, **(2)** el área de la onda lenta hasta 4 s tras el artefacto del estímulo. La finalidad de poner un tiempo límite a las medidas del área fue reducir la variabilidad debida a la deriva de los registros DC y estandarizar resultados con otros estudios.

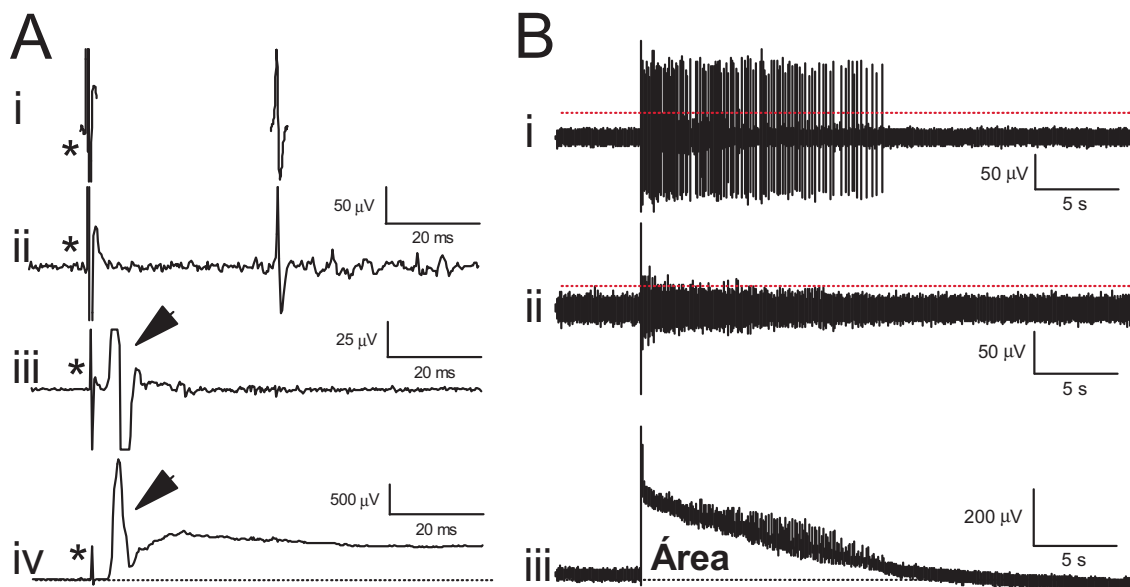


Figura 15.- En A se observa un registro original de una respuesta en una base de tiempo muy abierta a un estímulo de alta intensidad (registros simultáneos). Los artefactos del estímulo están marcados en los cuatro registros con un asterisco. El RMS está marcado con una punta de flecha en los dos registros inferiores, como puede observarse en los dos registros superiores no aparece el RMS ya que estos registros no tienen origen motor. En B se muestra un registro original de una respuesta a un estímulo de alta intensidad en una base de tiempo más extendida. En el registro inferior se puede observar el área de despolarización (onda lenta); en los registros intermedio (registro AC ventral) y superior (registro AC ascendente) se mide el número de potenciales de acción que sobrepasan un umbral superior al ruido base que es predeterminado en cada experimento (línea discontinua de color rojo).

Esta misma estimulación unitaria provocaba una respuesta en el canal AC consistente en un pico de corta latencia correspondiente al RMS, seguido de algunas variaciones sobre la línea base, pudiendo aparecer espigas (≤ 2 ms) generadas por potenciales de acción, especialmente tras la aplicación de estímulos de alta intensidad (figura 15-A y B). Estas espigas presentan una amplitud y duración variables dependiendo de la simultaneidad del disparo de las motoneuronas que la generan. Las medidas realizadas en esta respuesta consistían en contar el número de eventos que superaban un umbral hasta 4 segundos tras el artefacto del estímulo, el cual se situaba manualmente por encima del nivel medio del ruido. Esta contabilización de potenciales de acción compuestos (espigas) se denomina en adelante como potenciales de acción disparados por las motoneuronas.

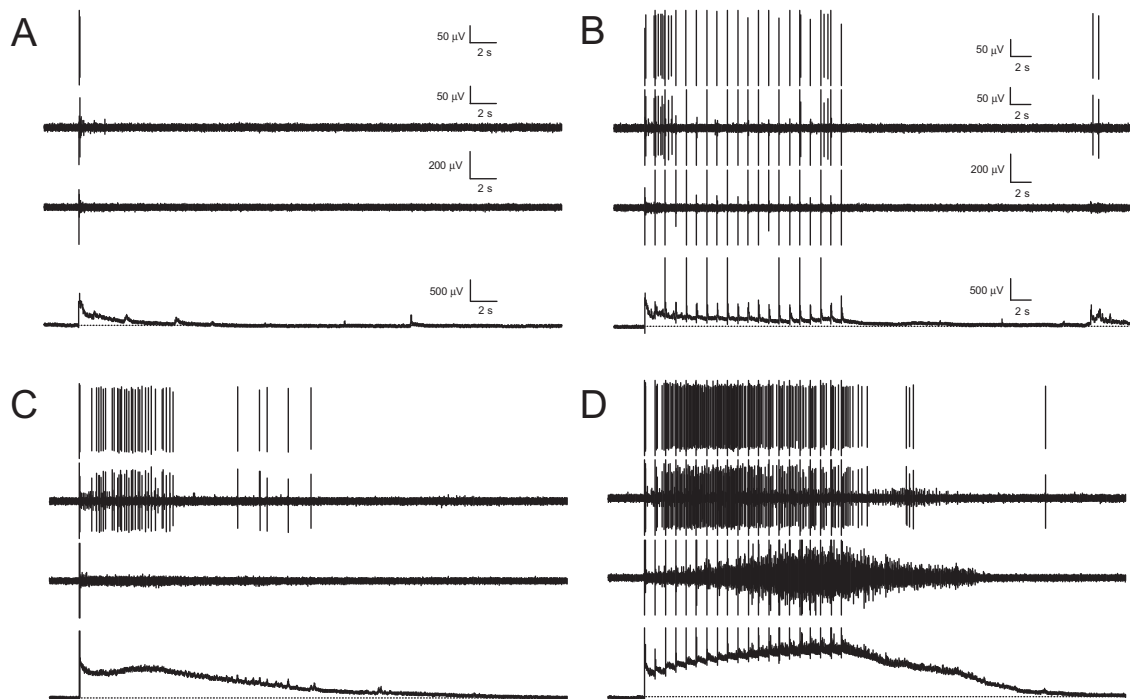


Figura 16.- Diferencias entre las respuestas a estímulos de baja intensidad (**A** unitario, **B** tren) y alta intensidad (**C** unitario, **D** tren). En cada figura los registros se corresponden con la configuración de registros simultáneos detallada en el apartado 10.3 "Disposición de los Registros" de este capítulo (página 50). Los estímulos unitarios de baja intensidad (A) producen unos pocos potenciales de acción en axones ascendentes y motoneuronas, y una pequeña área de despolarización en los registros DC. Los estímulos repetitivos de baja intensidad (B) producen una respuesta inicial baja en potenciales y área, que va decayendo según se aplican los estímulos sucesivos. Los estímulos unitarios de alta intensidad (C) provocan un gran número de potenciales de acción así como un área de despolarización acumulada grande. Es importante destacar los efectos acumulativos que se dan por parte de las motoneuronas en la respuesta a trenes de estímulos de alta intensidad (D), tanto en la producción de potenciales de acción, como en el área acumulada; es el efecto *wind up*.

En el caso de la estimulación repetitiva de la raíz dorsal, la respuesta registrada en la raíz ventral va a depender de la intensidad y duración del estímulo aplicado. Los componentes de esta respuesta fueron los mismos que los observados en los estímulos unitarios. Los estímulos repetitivos de baja intensidad provocaron una caída progresiva tanto del área como del número de potenciales de acción (figura 16-B), por el contrario, cuando se aplicaron estímulos repetitivos de alta intensidad el número de potenciales y el área acumulada solían ir en incremento progresivo ante la repetición del estímulo, proceso denominado *wind-up* (Herrero y col., 2000; figura 16-D).

Con la intención de cuantificar mejor las respuestas ventrales a estimulación repetitiva se tomaron varios tipos de medidas (figura 17). En el registro DC se midió **(1)** el área acumulada de la respuesta desde el artefacto del primer estímulo hasta 24 s del inicio de la estimulación, y **(2)** el coeficiente de incremento de la respuesta. Para calcular el coeficiente de incremento, se sustrajo la mínima amplitud de la máxima amplitud y el resultado se dividió por el intervalo de tiempo en segundos transcurrido entre ambas medidas.

En el canal AC de las motoneuronas se midió **(1)** el número de potenciales de acción desde el artefacto del primer estímulo hasta 24 s del inicio de la estimulación y **(2)** el coeficiente de incremento de la respuesta, que se calculó de la misma forma que se ha explicado en el párrafo anterior para el área acumulada, pero teniendo en cuenta el máximo y mínimo del número de potenciales de acción disparados (figura 16).

Con el fin de excluir actividad debida a la estimulación de las fibras A, sólo se midieron los potenciales que aparecían en una ventana de entre 100-990 ms desde el artefacto del estímulo. En la estimulación repetitiva los potenciales de acción fueron calculados para cada estímulo y posteriormente sumados para tener un total de potenciales de acción por tren de estímulos.

Durante la estimulación repetitiva de la raíz dorsal con estímulos de alta intensidad, en el canal AC los potenciales de acción solían ir en aumento hacia el final de la respuesta produciendo el efecto *wind up*, que se define como un incremento progresivo de la respuesta ante la estimulación repetida con estímulos constantes de alta intensidad que activen fibras aferentes de tipo C (figura 17-C). También se puede interpretar que existe este efecto cuando aparece despolarización acumulada, aunque la aplicación adecuada del término sería cuando hay un incremento de potenciales de acción.

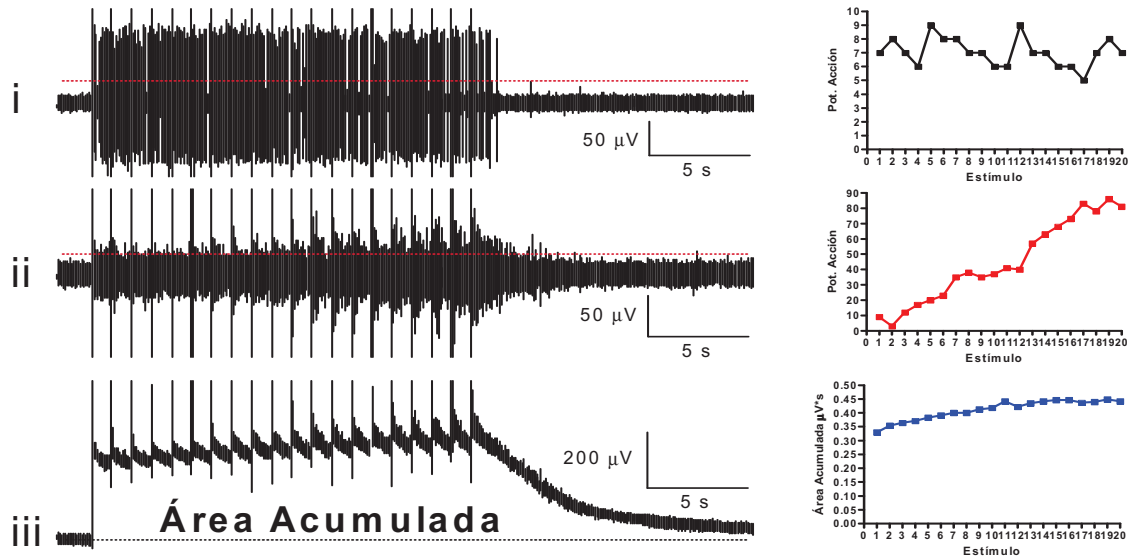


Figura 17.- La figura muestra la forma en que se cuantificaron las respuestas a estímulos repetitivos. A la izquierda se presentan registros originales de axones anterolaterales (i), y respuestas AC (ii) y DC (iii) de la raíz ventral; a la derecha de cada registro, su correspondiente cuantificación. Los registros en (i) y (ii) se cuantificaron como potenciales de acción evocados con los estímulos sucesivos. El registro en (iii) se cuantificó como la amplitud (en mV) al final de la respuesta individual a cada estímulo y el área total acumulada bajo la curva.

Los registros en modo DC solían presentar actividad espontánea en forma de potenciales de baja amplitud y de una duración variable, que por estas características no se vieron reflejados en el registro AC. La aparición de actividad espontánea en registros AC fue poco frecuente. La forma y tipos de actividad espontánea observada en la médula de ratón se exponen más extensamente en la sección 3.2.d de resultados del capítulo 1 (página 72).

11.2.- Respuesta de los axones ascendentes.

Los registros de axones ascendentes obtenidos a través de los microelectrodos de succión podían presentar uno o varios potenciales de acción fácilmente distinguibles en base a criterios de forma y amplitud. Únicamente se estudiaron aquellos registros en los cuales la forma y la amplitud de los potenciales de acción estaban bien definidas, excluyendo aquellos registros en los que no se podían determinar claramente el número y tipo de los potenciales de acción. En algunos casos la amplitud del potencial varió ligeramente tras ser registrados prolongadamente

(>40 min), pero en la mayoría de los registros se mantuvo estable (ver figura 29, página 73).

Al igual que los potenciales de acción de las motoneuronas, las medidas realizadas en la respuesta a estimulación unitaria consistían en contar el número de potenciales de acción disparados por cada axón, contabilizados en el registro AC de alta frecuencia de muestreo. En el caso de estimulación repetitiva se midió **(1)** el número de potenciales de acción desde el artefacto del primer estímulo hasta 24 s del inicio de la estimulación y **(2)** el coeficiente de incremento de la respuesta, que se calculó de la misma forma que en la respuesta de las motoneuronas (figura 17). En el caso de los estímulos unitarios el número de potenciales disparados se contaban justo después del artefacto del estímulo hasta un número determinado de segundos que depende del tipo de respuesta del axón. Tras la estimulación repetitiva se contaron los potenciales de acción disparados en cada segundo de la estimulación, sumándolos posteriormente para tener el total por tren de estímulos (en un total de 24 s desde el primer estímulo).

11.3.- Análisis estadísticos y presentación de los resultados.

Los análisis estadísticos se realizaron con aplicaciones informáticas específicas (Microsoft Excel, GraphPad Prism), con las que se extrajo la *t* de Student, se estudió el análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías, y se efectuaron test posteriores de Bonferroni (post-test) para conocer los puntos significativos respecto al control. Los valores de CI50 (concentración inhibitoria del 50 %) fueron calculados con la aplicación Graph Pad Prism.

En las figuras en las que se indican resultados de test ANOVA y tests posteriores de Bonferroni, el valor de la significación estadística global del test ANOVA se indica junto al título de la figura, mientras que el valor de los tests posteriores se indican en el interior de la figura, junto al punto que muestra significación estadística respecto al control.

RESULTADOS. CAPÍTULO I:

Puesta a punto de un modelo de registro simultáneo de la actividad en vías motoras y sensoriales en la médula aislada de ratón.

1.- INTRODUCCIÓN.

Este modelo de registro simultáneo de vías motoras y vías sensoriales ascendentes en médula espinal de ratón está basado en el modelo de registro de reflejos espinales en médula hemiseccionada (hemimédula) de rata, el cual es el modelo de referencia en el laboratorio donde se ha realizado esta tesis doctoral.

El modelo de registro en hemimédula de rata es muy similar al modelo de registro en médula completa de ratón ya explicado en la sección de materiales y métodos, ya que también se utilizan animales neonatos de 6 a 17 días de edad, pero con un peso superior, que oscila entre 15 y 29 gramos, debido a que la rata es un animal de mayor tamaño. La diferencia entre ambos modelos se basa en que en el modelo de hemimédula se secciona la médula espinal a lo largo de su línea media. Al tener la médula espinal una morfología simétrica, una hemimédula es una estructura funcional que permite el estudio de reflejos espinales, ya que posee circuitos completos de entrada, salida y procesamiento de información. Por el contrario, la hemimédula no permite registrar aquellas vías que cruzan la línea media para ascender por el lado contralateral, como es el caso del sistema anterolateral.

El hecho de que las ratas sean de mayor tamaño determina que la médula espinal tenga que ser hemiseccionada, lo cual permite que durante su mantenimiento en condiciones *in vitro* llegue oxígeno y nutrientes a las regiones internas. El modelo de hemimédula es inviable en animales adultos, al igual que el modelo de registro de médula completa en ratas neonatales, ya que en ambos casos la médula espinal presenta un grosor excesivo para permitir el mantenimiento funcional de todos sus circuitos en condiciones *in vitro*. Otras técnicas que permiten el registro de neuronas medulares de animales adultos emplean secciones transversales o longitudinales finas de la médula espinal (unas pocas μm de grosor), o la disgregación del tejido para la posterior fijación o cultivo de células aisladas. Estas técnicas permiten el estudio de neuronas maduras, pero pierden parcial o completamente la estructura de la médula espinal (Floeter y Lev-Tov, 1993; Wang y Randic, 1996; Phelan y Newton, 2000; Dahlhaus y col., 2005).

Con el modelo de hemimédula de rata se registran reflejos espinales cualitativamente iguales a los registrados en la médula completa de ratón (figura 18), pero no permite registrar axones ascendentes que discurren por el lado contralateral respecto a la raíz dorsal estimulada (ver apartado 2.2 introducción, página 7). Esta

región contralateral es de gran importancia porque por ella ascienden vías relevantes para la nocicepción, cuyas neuronas de origen tienen sus somas en el asta dorsal, y se caracterizan porque sus axones se proyectan al lado contralateral de la médula espinal, ascendiendo por la sustancia blanca anterolateral para terminar mayoritariamente en diferentes núcleos del tálamo (Delcomyn, 1997). De esta forma al hemiseccionar la médula espinal se corta los axones de estas vías ascendentes, impidiendo su registro.

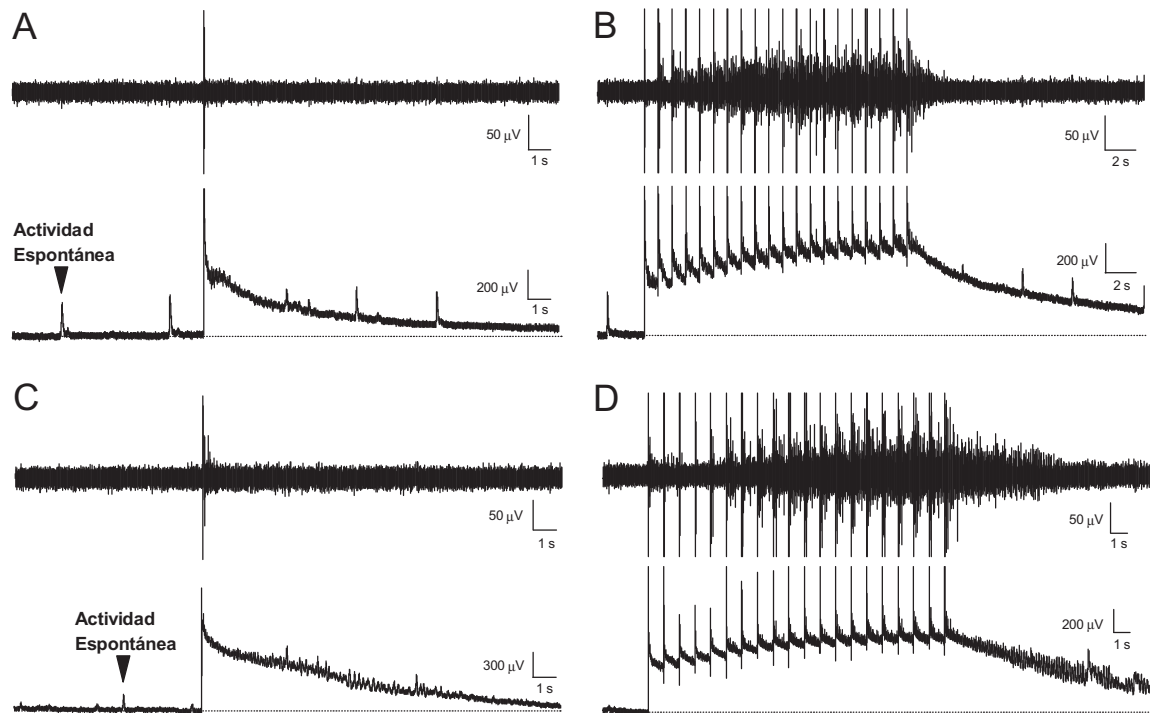


Figura 18.- Registros originales obtenidos en el modelo de hemimédula de rata (9 días de edad y 19 gramos de peso, **A** y **B**), y en el modelo de médula completa de ratón (9 días de edad y 6.3 gramos de peso, **C** y **D**). En ambos modelos se observa una respuesta a estimulación unitaria (**A** y **C**) y a estimulación repetitiva (**B** y **D**), ambas de alta intensidad (200 μ s y 200 μ A). En los registros A y B se muestra actividad espontánea a nivel del canal DC (panel inferior), esta actividad también se observa en la médula de ratón. En el registro D se observa una postdescarga mayor que la observada en B, estas variaciones dependen de la médula registrada, y no de la especie animal de origen. Como se puede observar las respuestas registradas en la hemimédula de rata son cualitativamente idénticas a las registradas en la médula completa de ratón, cuantitativamente son similares.

Una de las dificultades encontradas para el registro de la médula espinal de ratón se basa en que esta médula es más endeble que la de rata, lo cual exige una manipulación muy cuidadosa para evitar daños en el tejido que puedan modificar la respuesta medular. De igual forma, los ratones neonatales son de un tamaño muy

inferior a las ratas de su mismo rango de edad, lo que dificulta la extracción y manipulación de la médula espinal.

El desarrollo de este nuevo modelo de registro simultáneo de vías motoras y ascendentes busca una serie de ventajas:

- 1.- Permitir el estudio de forma simultánea de los efectos de fármacos en los circuitos motores y sensoriales de la médula espinal.
- 2.- Utilizar ratones en lugar de ratas, lo cual permitirá el análisis de animales transgénicos.
- 3.- No seccionar la médula espinal, lo que conlleva disminuir el trauma físico sufrido durante su manipulación, así como mantener circuitos completos, lo que permite aumentar el conocimiento sobre la fisiología de la médula espinal, en especial de sus vías ascendentes.

El objetivo principal de este capítulo es conseguir el registro de axones que ascienden a nivel de la sustancia blanca contralateral respecto a la raíz dorsal estimulada, utilizando una metodología sencilla de electrodos de succión, para obtener registros estables, duraderos y claros de forma paralela al registro de reflejos espinales.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

La extracción, disposición y mantenimiento en condiciones *in vitro* del nervio safeno y de la médula espinal en la cámara de registro, así como sus puntos de estimulación y registro, ya han sido explicados en la sección de materiales y métodos generales (apartados 5 y 7, páginas 41 y 43).

2.1.- Registro del Nervio Safeno.

Los nervios safenos (n=3) se extrajeron de ratones CD-1 de 30 días de edad y un peso de 28.4 a 30 gramos. La longitud de los nervios registrados fue de 8.4, 9.5 y 12 milímetros. La temperatura media del fluido intersticial sintético (FIS) durante el registro de la respuesta nerviosa fue de 23.7 ± 0.6 °C.

El primer estudio realizado en los nervios safenos se basó en un análisis de su respuesta a estimulación máxima ($500 \mu\text{s}$ y $500 \mu\text{A}$), de esta forma se activaban todas las fibras del nervio y pudieron distinguirse sus componentes principales. Esta estimulación se repitió 10 veces en intervalos de 1 minuto, posteriormente los registros se promediaron para obtener una respuesta final (figura 22-A).

Tras 15 minutos de reposo se llevó a cabo un estudio de la respuesta del nervio a diferentes intensidades de estimulación. Para ello se aplicaron estímulos eléctricos de una duración fija de $200 \mu\text{s}$ y de una intensidad creciente de 10, 50, 100, 150, 200 y $250 \mu\text{A}$. Cada estímulo se repitió tres veces con una separación mínima de 30 segundos para estímulos inferiores a $100 \mu\text{A}$, 45 segundos para estímulos entre 100 y $200 \mu\text{A}$, y 60 segundos para estímulos de $250 \mu\text{A}$ (figura 19). Tras el estudio se midió la longitud del nervio para determinar la velocidad de conducción de los diferentes tipos de fibras aferentes, basándose en las latencias de las respuestas registradas.



Figura 19.- Protocolo de estimulación del nervio safeno. Tras los diez estímulos máximos iniciales ($500 \mu\text{s}$ y $500 \mu\text{A}$), se aplicaron grupos de tres estímulos de intensidad creciente con una duración fija de $200 \mu\text{s}$.

2.2.- Registro de Reflejos Espinales.

Para estudiar la respuesta registrada en la raíz ventral de este nuevo modelo se aplicó una batería de estímulos unitarios y repetitivos de diferentes intensidades a la raíz dorsal. El primer parámetro estudiado fue la intensidad umbral, definida como la intensidad mínima de estimulación, en μA , que produce una respuesta visible en las motoneuronas utilizando una duración fija del estímulo de $200 \mu\text{s}$. A continuación se realizó un estudio de la respuesta ventral a estímulos unitarios de baja intensidad (50 ó $200 \mu\text{s}$ e intensidad umbral + $20 \mu\text{A}$) y de alta intensidad (normalmente $200 \mu\text{s}$ y $200 \mu\text{A}$), para determinar el tipo de respuesta y compararla con la obtenida a diferentes intensidades. Los estímulos unitarios se repitieron tres veces como regla general, con una separación temporal mínima de 30 segundos para estímulos con una intensidad inferior a $50 \mu\text{A}$, y una separación mínima de 60 segundos para estímulos que superen esta intensidad (figura 20-A).

Para determinar el tipo de respuesta ventral tras la estimulación repetitiva de la raíz dorsal, se aplicaron trenes de estímulos de diferente intensidad y duración (50 μs y 50 μA ; 100 μs y 100 μA ; 200 μs y 200 μA ; 300 μs y 300 μA) con una separación temporal mínima entre los mismos de 5 minutos para los estímulos de 50 y 100 μA , y de 15 minutos para los estímulos de 200 y 300 μA . Tras 30 minutos de descanso, se volvió a aplicar esta estimulación por segunda vez a la médula espinal. Todos los trenes de estimulación constaban de 20 estímulos con una frecuencia de 1 Hz.

Los estímulos que más podían alterar la respuesta de la médula espinal son los trenes de estímulos de alta intensidad. Para estudiar si estos estímulos pueden provocar variaciones en la respuesta con las repeticiones sucesivas, tanto provocando una potenciación como una inhibición de la misma a lo largo del tiempo, se realizó un estudio consistente en aplicar trenes de estímulos de 200 μs y 200 μA cada 15 minutos, un total de 12 veces. De esta forma se buscaba conocer si el número total de potenciales de acción disparados, así como el área acumulada, sufrieron variaciones significativas en un periodo temporal (3 horas) similar al que puede durar un experimento estándar (figura 20-B).

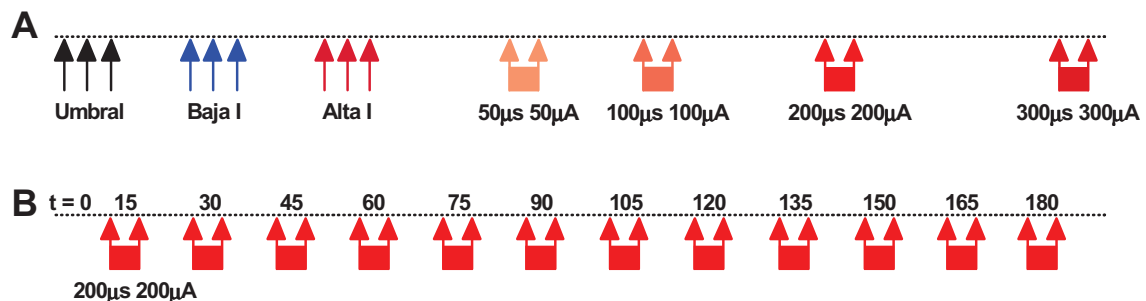


Figura 20.- A Protocolo para estudiar la respuesta ventral de una médula espinal de ratón. **B** Protocolo para estudiar la estabilidad de la respuesta ventral de una médula espinal de ratón durante la aplicación secuencial de estímulos repetitivos de alta intensidad.

2.3.- Registro de Axones Ascendentes.

En este apartado se emplearon un total de 26 médulas espinales extraídas a partir de ratones con una edad comprendida entre 6 y 17 días, y un peso de 3.7 a 9 gramos. Para el estudio y clasificación de los axones ascendentes se realizaron una serie de test tendentes a determinar el umbral de activación de los mismos, su

respuesta a estímulos de baja y alta intensidad, así como la evolución de la respuesta a estimulación repetitiva. En los estudios de intensidad umbral, se utilizó una duración de estimulación fija de 200 μ s, y se define como la intensidad mínima necesaria para provocar que el axón dispare como mínimo un potencial de acción. A continuación, se estudió la respuesta del axón mediante la aplicación de tres estímulos de baja intensidad (50 μ s y 50 μ A) con una separación de 30 segundos, y tres estímulos de alta intensidad (200 μ s y 200 μ A) con una separación de 60 segundos. De esta forma se obtuvieron las principales características de la respuesta del axón ascendente: número de potenciales de acción disparados tras estimulación de alta y baja intensidad, latencia (medida en estímulos de alta intensidad) y duración de la respuesta. Por último se estudió la respuesta de los axones a estimulación repetitiva de baja (50 μ s y 50 μ A) y alta intensidad (200 μ s y 200 μ A), para determinar si la respuesta obtenida era de tipo *wind up* (suma o aumento progresivo de potenciales de acción), o si mantenía o disminuía progresivamente la respuesta inicial (figura 21).



Figura 21.- A Protocolo para estudiar la respuesta de los axones ascendentes a través de la aplicación de estímulos de baja (50 μ s y 50 μ A) y alta intensidad (200 μ s y 200 μ A). Ver más detalles en el texto.

2.4.- Parámetros y Cálculos Utilizados.

Los principales parámetros utilizados para cuantificar los resultados de los experimentos de los registros de reflejos espinales son el número de potenciales de acción, el área (despolarización) y la amplitud del RMS. En el caso de los axones ascendentes, el parámetro utilizado para cuantificar su respuesta es el número de potenciales de acción disparados. El parámetro estudiado para cuantificar la respuesta en los nervios safenos es la amplitud de las ondas registradas. En todos estos parámetros también se estudia su umbral y latencia. Su cuantificación se realiza a través de programas semiautomáticos construidos en el contexto Spike-2. Los datos se muestran como la media \pm EEM, y las comparaciones estadísticas se han realizado mediante ANOVA de una vía y el test *t* de Student (*t-test*).

3.- RESULTADOS.

3.1.- Nervio Safeno.

La estimulación del nervio safeno con intensidades máximas (500 μ s y 500 μ A) provocaron una respuesta que se puede dividir en tres ondas principales, encontradas a diferentes latencias, y atribuidas a la activación de las fibras del nervio de tipo A_{β} , A_{δ} y C respectivamente (figura 22-A). El gráfico de la figura 22-B muestra la amplitud de la respuesta de las diferentes ondas tras estimulación con diferentes intensidades y una duración fija de 200 μ s, en el cual se puede observar cómo en todos los tipos de fibras se alcanzó prácticamente el máximo de su respuesta tras aplicar estímulos de una intensidad de 200 μ A. La primera onda que aparece en la respuesta máxima está prácticamente solapada con el artefacto del estímulo, y se corresponde con la activación de fibras A_{β} (ver características en la tabla 2). La segunda onda observada está prácticamente a continuación de la primera, presentó menos amplitud y se corresponde con la activación de las fibras de tipo A_{δ} . La tercera onda registrada se corresponde con la activación de las fibras de tipo C, las cuales presentaron el mayor umbral de activación con un valor medio de 42 ± 8 μ A. Esta última onda no llegó a alcanzar una amplitud cercana al máximo hasta que se aplicó un intensidad de 200 μ A.

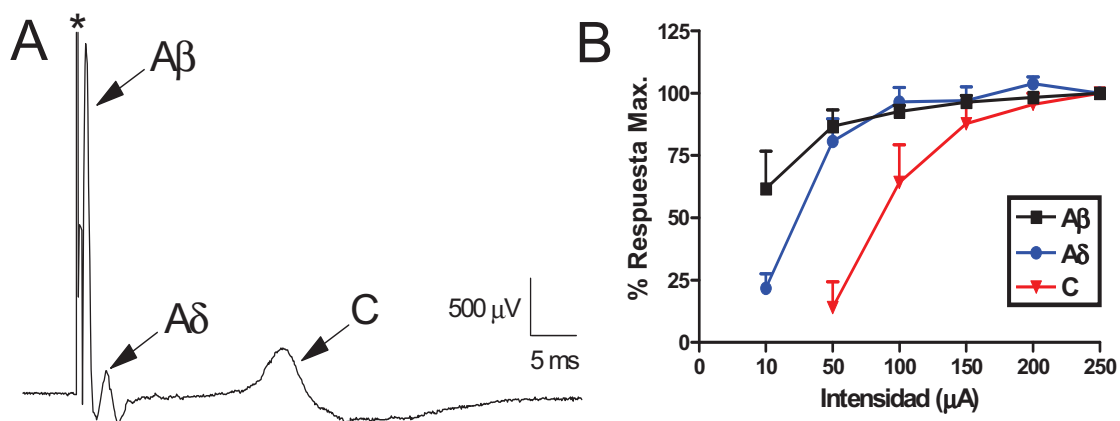


Figura 22.- En la figura A se observan las ondas correspondientes a la respuesta promedio de las fibras A_{β} , A_{δ} y C de un nervio safeno en respuesta a estímulos máximos (500 μ s y 500 μ A). El primer pico de la figura se corresponde con el artefacto del estímulo (marcado con un asterisco). El gráfico B representa la evolución de la amplitud de las respuestas de los tres tipos de fibras aferentes ante el incremento de la intensidad de estimulación con una duración fija en todos los casos de 200 μ s. Nótese como las fibras C no responden a estímulos de 10 μ A de intensidad.

| Tipo de Onda | velocidad (m/s) | latencia (ms) | amplitud (mV) |
|---------------------------------------|-----------------|---------------|---------------|
| 1ª Onda (act. fibras A _β) | 19.4 ± 2.3 | 0.51 ± 0.04 | 4 ± 0.6 |
| 2ª Onda (act. fibras A _δ) | 5.1 ± 0.7 | 2.0 ± 0.21 | 0.88 ± 0.31 |
| 3ª Onda (act. fibras C) | 0.49 ± 0.03 | 20.0 ± 1.1 | 0.69 ± 0.22 |

Tabla 2.- Valores promedio de las características de las tres ondas registradas en el nervio safeno. Los valores se obtuvieron de la respuesta de los nervios tras ser estimulados con una intensidad y duración de 200 μ A y 200 μ s respectivamente.

3.2.- Reflejos Espinales.

En estos experimentos únicamente se registraron respuestas de la raíz ventral tras la estimulación eléctrica unitaria o repetitiva de la correspondiente raíz dorsal. La finalidad de los mismos era estudiar y poner a punto el modelo de registro de reflejos espinales en la médula espinal completa de ratón, conocer los componentes de la respuesta, así como cuantificarlos, además de estudiar su mantenimiento a lo largo del tiempo. En estos experimentos se emplearon un total de 15 médulas espinales, obtenidas a partir de ratones de entre 8 y 13 días, cuyo peso osciló entre 4.8 y 8.3 gramos.

3.2.a.- Reflejos Espinales tras estimulación unitaria.

Las respuestas a estímulos unitarios registradas en el canal DC consistían en un reflejo monosináptico rápido, normalmente de gran amplitud, seguido de una onda lenta cuya duración dependía de la intensidad del estímulo aplicado (figura 23). Normalmente los estímulos de baja intensidad provocaron respuestas con una duración de la onda lenta de entre 1-5 s, por el contrario estímulos de alta intensidad podían provocar respuestas de hasta 17 s de duración. Las respuestas registradas en el canal AC consistieron en ráfagas de potenciales de acción, que se cuantificaron midiendo el número de eventos que las componen. Estímulos de baja intensidad provocaron la aparición de pocos potenciales de acción, mientras que estímulos de alta intensidad provocaron la aparición de más potenciales de acción, distribuidos a lo largo de un periodo mayor de tiempo. Como ya se ha indicado con anterioridad, las respuestas motoras a estímulos de baja o alta intensidad variaron cuantitativamente pero no cualitativamente. Para estudiar estas variaciones se aplicaron a diez médulas espinales estímulos de 50 μ s y 50 μ A, 100 μ s y 100 μ A, 200 μ s y 200 μ A y por último 300 μ s y 300 μ A (figura 24).

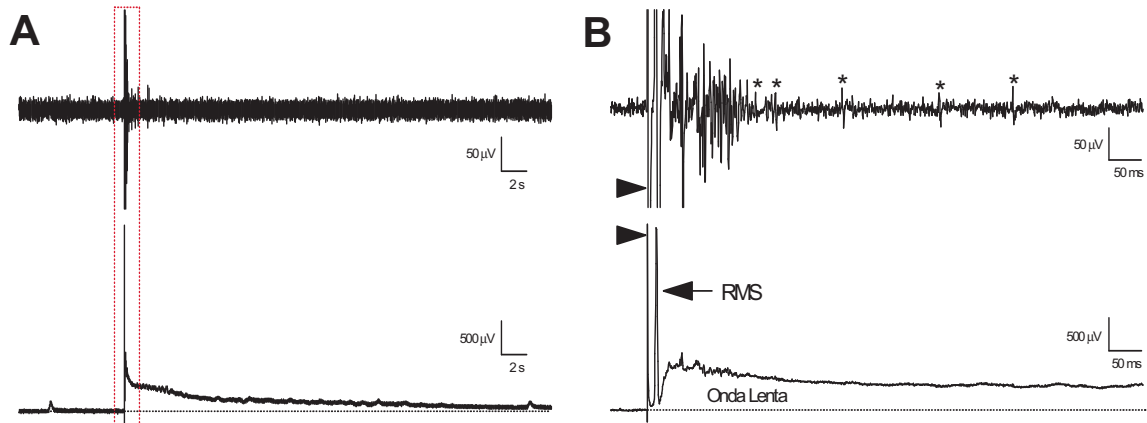


Figura 23.- En la figura **A** se observa un registro original de una respuesta ventral a estimulación unitaria de alta intensidad (200 μ s y 200 μ A). El registro mostrado en la figura **B** se corresponde con la zona punteada de la figura **A** ampliada a mayor escala, siendo así posible diferenciar entre el artefacto del estímulo (punta de flecha) y el reflejo monosináptico (RMS) en el registro DC. En el registro AC de la misma figura, se pueden diferenciar algunos potenciales de acción compuestos aislados (marcados con un asterisco). Nótese cómo la onda lenta que sigue al RMS presenta una larga duración.

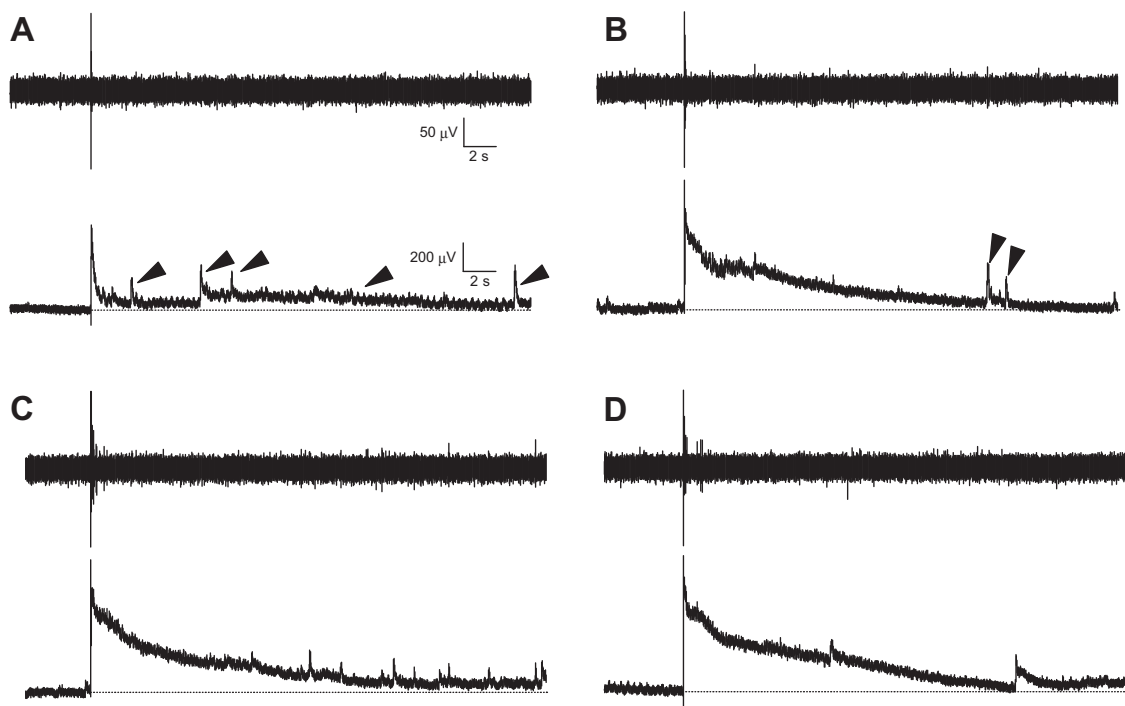


Figura 24.- Registros originales de respuestas ventrales tras estimulación unitaria de diferente duración e intensidad. En el panel **A** (50 μ s y 50 μ A) se puede observar que el área acumulada es muy baja y va acompañada de actividad espontánea en el registro DC (puntas de flecha). En el panel **B** (100 μ s y 100 μ A) se puede observar cómo el área bajo la curva aumenta considerablemente. En los paneles **C** (200 μ s y 200 μ A) y **D** (300 μ s y 300 μ A) se muestra cómo los estímulos de alta intensidad generan un área bajo la curva de larga duración en el registro DC, y algunos potenciales de acción compuestos en el registro AC.

La estimulación unitaria de 50 μA generó una pequeña respuesta ventral, la cual aumentó el valor de sus parámetros de forma paralela al aumento de la intensidad y duración de los estímulos (figuras 24 y 25, ver valores en tabla 3). La respuesta se estabilizó al aplicar estímulos de 200 μA , ya que sus valores eran prácticamente idénticos a los registrados con una intensidad de 300 μA , exceptuando los potenciales de acción disparados.

| Estímulo ($\mu\text{A} \times \mu\text{s}$) | 50 x 50 | 100 x 100 | 200 x 200 | 300 x 300 |
|---|-----------------|---------------|---------------|---------------|
| RMS (mV) | 1.8 ± 0.8 | 2.1 ± 0.6 | 2.7 ± 0.7 | 2.8 ± 0.8 |
| Área Acumulada ($\mu\text{V} \cdot \text{s}$) | 0.93 ± 0.18 | 1.8 ± 0.3 | 2.2 ± 0.4 | 2.2 ± 0.3 |
| Potenciales de Acción (n°) | 16 ± 7 | 54 ± 23 | 87 ± 32 | 104 ± 38 |

Tabla 3.- Valores promedio de los parámetros de la respuesta registrada en la raíz ventral en respuesta a estímulos unitarios de valor creciente. Los datos en la tabla se muestran como la media \pm EEM ($n=10$).

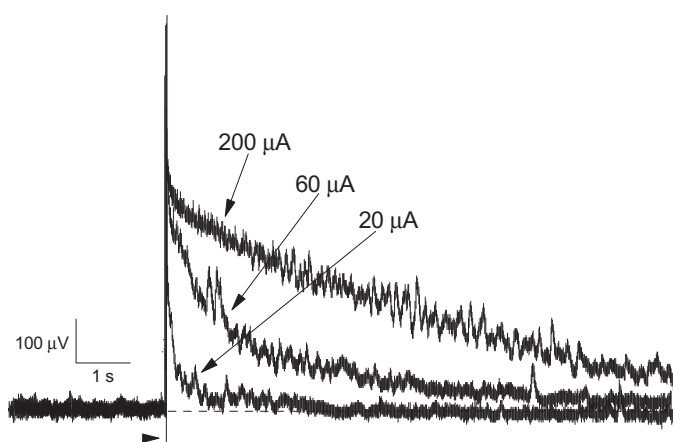


Figura 25.- Evolución de la respuesta ventral tras la aplicación de tres estímulos unitarios de la misma duración (200 μs) e intensidad creciente (20, 60 y 200 μA) a la correspondiente raíz dorsal. Véase cómo el área de despolarización aumenta paralelamente a la intensidad del estímulo aplicado. El RMS se solapa con el artefacto del estímulo (punta de flecha).

3.2.b.- Reflejos Espinales tras estimulación repetitiva.

Para estudiar la respuesta de la médula espinal de ratón tras ser estimulada de forma repetitiva, se aplicaron trenes de estímulos (20 estímulos, 1 Hz) con las mismas intensidades y duraciones aplicadas en el apartado anterior (50 μs y 50 μA , 100 μs y 100 μA , 200 μs y 200 μA y por último 300 μs y 300 μA). El objetivo de este estudio era conocer si la médula de ratón podía generar respuestas de tipo *wind up*, y qué tipo de estímulo repetitivo era el más adecuado para obtener de forma estable este tipo de respuesta. Este estudio se realizó sobre diez médulas espinales.

La estimulación repetitiva de menor intensidad y duración (50 μA y 50 μs) produjo respuestas en las que el área de despolarización acumulada, así como el número de potenciales de acción disparados, disminuyeron de forma progresiva desde los primeros estímulos aplicados, no obteniendo en ningún caso suma de la respuesta (figura 26-A, ver valores en tabla 4). Al aplicar estímulos de intensidad media (100 μA y 100 μs), el número de potenciales de acción disparados y el área acumulada por las motoneuronas tendieron a mantenerse o disminuir ligeramente a lo largo del periodo de estimulación (figura 26-B), no llegando a observarse suma de la respuesta en ningún caso.

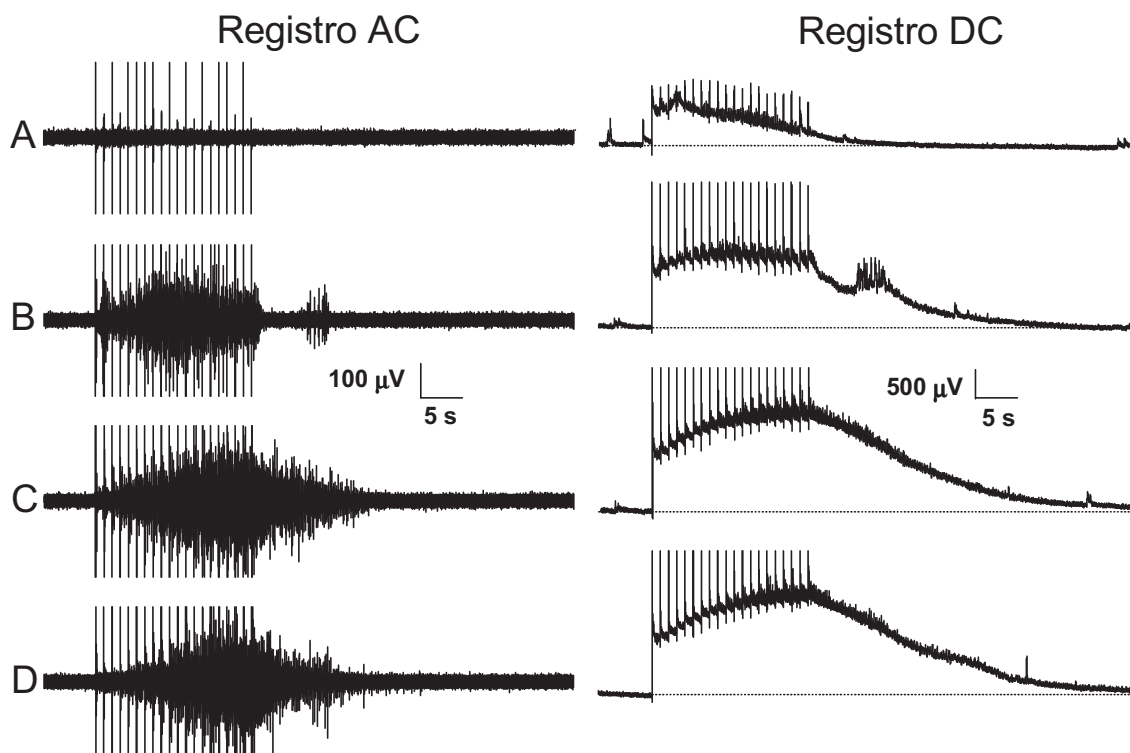


Figura 26.- Respuestas ventrales originales registradas tras aplicar a la raíz dorsal trenes de estímulos de intensidad y duración crecientes. El panel izquierdo y el derecho corresponden con los registros AC (potenciales de acción) y los registros DC (despolarización acumulada) respectivamente. La intensidad y duración de los estímulos para cada figura son: **A** (50 μA y 50 μs), **B** (100 μA y 100 μs), **C** (200 μA y 200 μs) y **D** (300 μA y 300 μs).

Al aplicar estimulación de alta intensidad (200 μA y 200 μs ; 300 μA y 300 μs) se obtuvieron respuestas típicas de suma o *wind up* en las que el número de potenciales de acción y el área acumulada fueron aumentando de forma progresiva durante la aplicación de los estímulos (figura 26-C y D, valores en tabla 4). Los valores obtenidos al aplicar estas dos estimulaciones de mayor intensidad fueron muy

similares, aunque tendieron a ser algo superiores al aplicar estímulos de 300 μA excepto en el número de potenciales de acción, cuyo valor descendió ligeramente.

| Estímulo ($\mu\text{A} \times \mu\text{s}$) | 50 x 50 | 100 x 100 | 200 x 200 | 300 x 300 |
|---|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Área Acumulada ($\mu\text{V}^*\text{s}$) | 6.5 ± 1.3 | 10.1 ± 1.5 | 16 ± 2.8 | 17.6 ± 3.3 |
| Potenciales de Acción (n°) | 63 ± 27 | 627 ± 106 | 2856 ± 412 | 2771 ± 403 |
| Coef. de Incremento (Pot.) | -0.047 ± 0.04 | 1.6 ± 0.9 | 12.4 ± 3.9 | 13.5 ± 3.9 |
| Coef. de Incremento (Área) | $-0.0028 \pm 2\text{e-}4$ | $0.0021 \pm 4\text{e-}4$ | $0.010 \pm 2 \text{e-}3$ | $0.011 \pm 3 \text{e-}3$ |

Tabla 4.- Valores promedio del número de potenciales de acción y área acumulada, así como sus respectivos coeficientes de incremento, registrados en la raíz ventral como respuesta a estímulos repetitivos de magnitud creciente aplicados en la raíz dorsal. Los datos en la tabla se muestran como la media \pm EEM (n=10).

3.2.c.- Estabilidad de la respuesta ventral a estimulación repetitiva.

La finalidad de este estudio era conocer si las respuestas de tipo *wind up* registradas en la raíz ventral tras estimulación repetitiva de alta intensidad de la raíz dorsal, se podían reproducir de forma estable en periodos largos de tiempo para utilizarlas como herramienta de estudio. Para ello se utilizaron cinco médulas espinales (no incluidas en el estudio anterior), sobre las que se aplicó un tren de estímulos de 200 μA y 200 μs (20 estímulos, 1 Hz) cada 15 minutos durante un periodo de tiempo de 3 horas, de forma que la estimulación se repitió 12 veces.

Las respuestas a estos trenes de estímulos fueron estables en todo el periodo estudiado, tanto para el número de potenciales de acción como para el área acumulada, no observándose variaciones significativas en ningún caso (ANOVA). El número medio de potenciales de acción registrados en el segundo tren de estímulos fue de 1349 ± 74 potenciales, mientras que en el séptimo tren fue de 1267 ± 80 potenciales, para finalizar con un registro en el duodécimo tren de 1162 ± 133 potenciales. Por otra parte el área acumulada presentó unos valores muy estables, partiendo de un registro medio de $8.3 \pm 2 \mu\text{V}^*\text{s}$ en el segundo tren, para pasar a un valor medio de $8.0 \pm 2.1 \mu\text{V}^*\text{s}$ en el séptimo tren, y finalizar con un registro en el duodécimo tren de $8.7 \pm 2.6 \mu\text{V}^*\text{s}$ (figura 27).

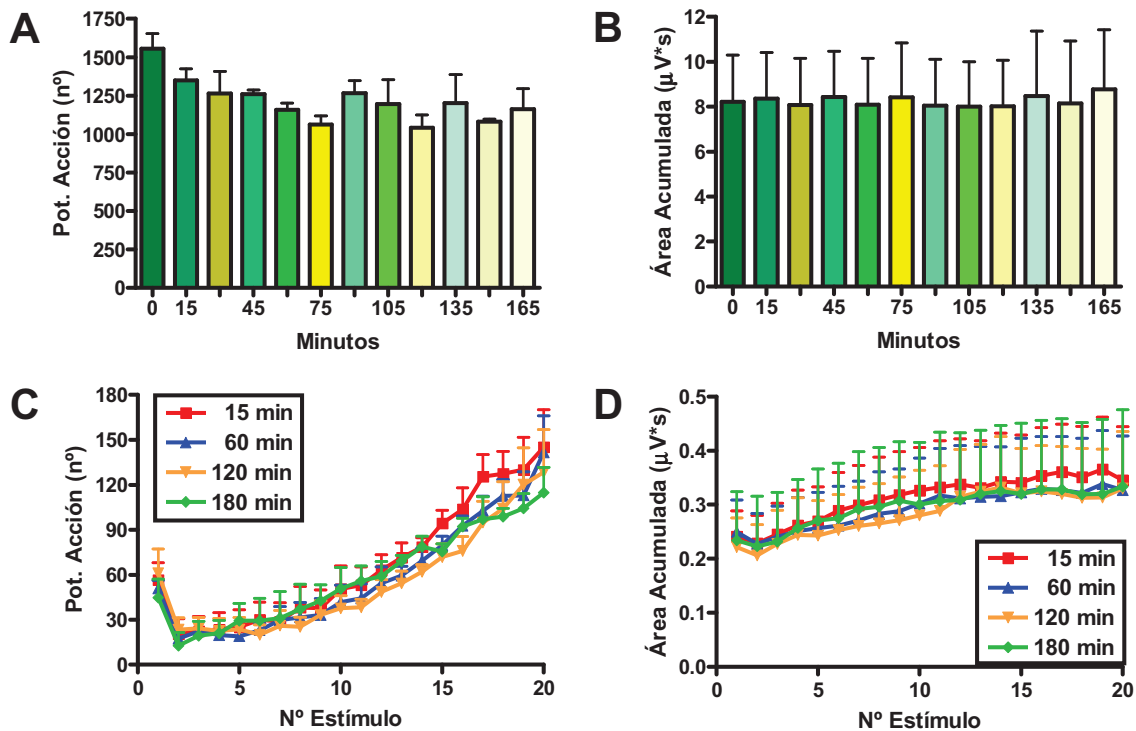


Figura 27.- Los gráficos **A** y **B** muestran el número medio de potenciales de acción y área acumulada por tren de estímulos de alta intensidad aplicado a la raíz dorsal cada 15 min. El gráfico **C** muestra el perfil promedio del número de potenciales de acción de cada uno de los estímulos repetitivos de alta intensidad aplicados en diferentes puntos temporales. El gráfico **D** muestra el perfil del promedio del área de cada uno de los estímulos de alta intensidad aplicados en diferentes puntos temporales.

| Tiempo (minutos) | 15 | 45 | 105 | 165 |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Coef. Incremento (Pot.) | 6.0 ± 0.6 | 5.7 ± 0.7 | 5.5 ± 0.8 | 5.4 ± 0.6 |
| Coef. Incremento (Área) | $0.007 \pm 2 \text{ e-}3$ | $0.006 \pm 1 \text{ e-}3$ | $0.006 \pm 1 \text{ e-}3$ | $0.005 \pm 1 \text{ e-}3$ |

Tabla 5.- Valores del coeficiente de incremento medio del número de potenciales de acción y área acumulada, registrados en la raíz ventral como respuesta a estímulos de $200 \mu\text{A}$ y $200 \mu\text{s}$ aplicados en la raíz dorsal en diferentes puntos temporales. Los datos en la tabla se muestran como la media \pm EEM ($n=10$).

Otra posible variación en la respuesta ventral que se podría producir a lo largo del tiempo son oscilaciones en el perfil de la respuesta durante la aplicación de los estímulos repetitivos. Este perfil se caracterizó por disminuir ligeramente tras la aplicación del primer estímulo, para mantenerse y posteriormente comenzar a crecer a partir del octavo estímulo aproximadamente (figura 27). En los registros obtenidos en estas cinco médulas el coeficiente de incremento medio del número de potenciales de

acción registrados y del área acumulada no sufrió variaciones significativas durante toda la duración del estudio (ANOVA), obteniéndose en ambas variables valores muy similares desde los trenes iniciales hasta los finales (tabla 5).

3.2.d.- Actividad espontánea en la raíz ventral.

Durante los registros de la médula espinal de ratón se observó actividad espontánea en el canal DC en dos formas. Una de ellas se caracterizó por ser una actividad irregular similar a la observada en rata, que presentó despolarizaciones de la línea base sin orden aparente, con diferentes formas y amplitudes. La otra actividad espontánea fue específica de médula espinal de ratón, y se caracterizó por presentar ondas sucesivas normalmente de una amplitud y frecuencia regular, la cual no se ha descrito con anterioridad en la médula espinal de rata (figura 28). En alguna ocasión, en los registros de médula espinal completa de ratón, se ha registrado actividad espontánea en el canal AC de forma paralela a la registrada en el canal DC, aunque estos casos son muy poco frecuentes, habiéndose observado también este tipo de registros en el modelo de hemimédula de rata.

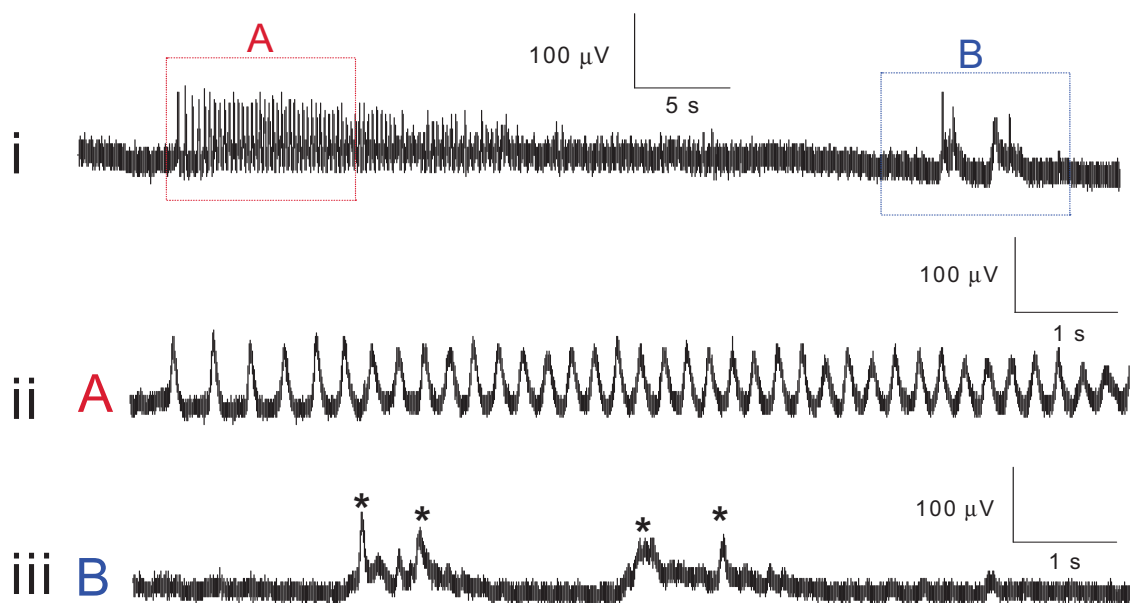


Figura 28.- i Registro original de actividad espontánea en el canal DC del modelo de médula completa de ratón, en el cual se puede observar actividad espontánea regular (A) e irregular (B). ii Ampliación del registro original punteado en rojo (A), en el cual se puede observar la actividad espontánea ordenada específica de ratón. iii Ampliación del registro original punteado en azul (B) en la que se puede observar la actividad espontánea no ordenada, muy similar a la observada en rata. Ver registros originales de médula de rata con actividad espontánea en la figura 18 (página 60).

3.3.- Registros de axones ascendentes.

El uso de microelectrodos de succión con una punta de aproximadamente 10 μm de diámetro permitió obtener registros en los que se pudo aislar uno o varios axones ascendentes, en base a criterios de amplitud y forma de los potenciales de acción registrados. Para la caracterización de los diferentes axones se estudiaron todos los registros en los que los potenciales de acción tenían una forma bien definida y fácilmente distinguible. Se descartaron registros en los que la identificación de potenciales de acción no era clara, debido a variaciones excesivas en su forma o por solapamiento de la respuesta de varios axones. En algunos casos la amplitud del potencial de acción varió ligeramente en registros de gran duración (superiores a 40 minutos), pero en la mayoría de los casos la amplitud fue estable (figura 29).

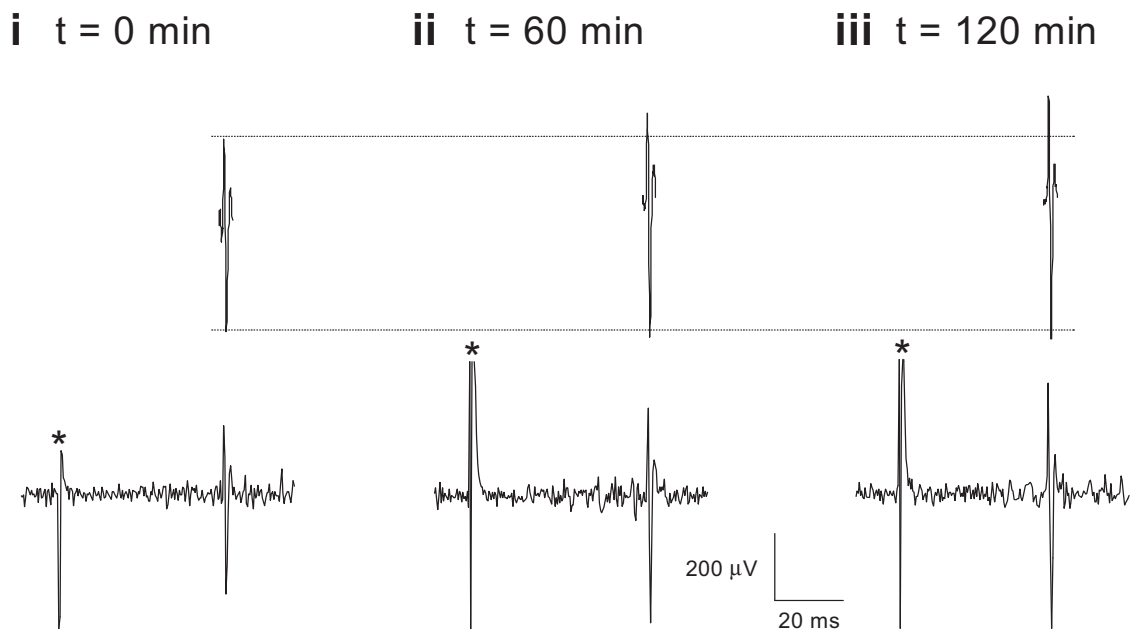


Figura 29.- Registro original en alta y baja resolución (paneles superior e inferior, respectivamente), en el que se observan las variaciones en amplitud de un potencial de acción al inicio de su registro, y tras 60 y 120 minutos de estudio. El potencial se genera como respuesta a un estímulo de alta intensidad cuyo artefacto se marca con un asterisco.

Se realizaron un total de 63 registros de axones ascendentes utilizando 26 preparaciones de médula espinal. La localización aproximada de los lugares de registro se muestra en la figura 30-A. Los axones registrados fueron clasificados en función de su respuesta a una batería de estímulos unitarios y repetitivos de diferente intensidad (ver registro de axones ascendentes en apartado 10.2, página 49).

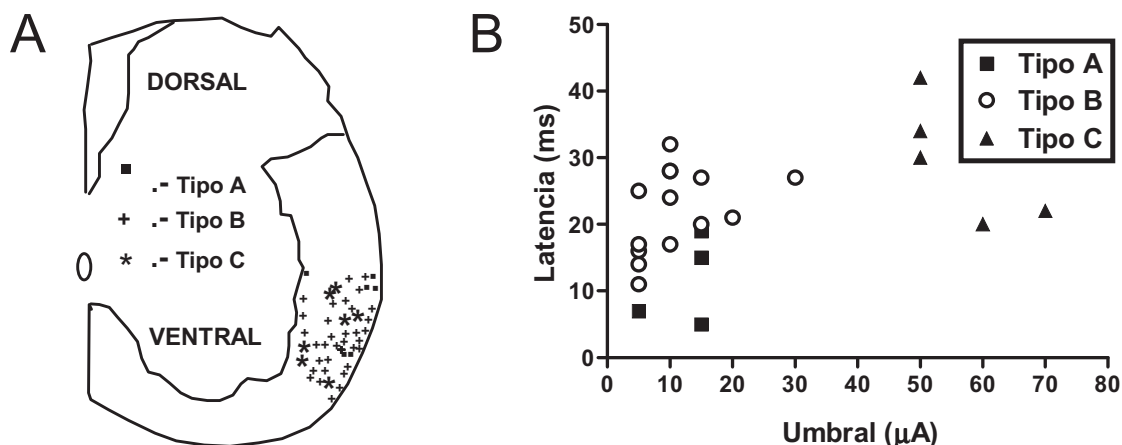


Figura 30.- La figura A muestra 50 lugares de registro en los que se ubicó el microelectrodo y se obtuvo respuesta de un axón ascendente, representados en una reconstrucción transversal de una médula espinal de ratón de 9 días de edad (sólo se muestra una mitad de la médula). El gráfico B muestra una representación de los valores umbral/latencia de 22 axones ascendentes registrados. Obsérvese la clara diferencias de umbral de los axones de tipo C respecto al resto de axones.

La mayoría de los axones registrados (52) presentaron umbrales de activación inferiores a una intensidad de 50 μA (figura 30). De todos ellos, 6 axones tuvieron una respuesta similar a estímulos de baja y alta intensidad, por lo que fueron clasificados como axones de tipo A. Los 46 axones restantes de este grupo fueron capaces de codificar intensidades de estimulación, presentando una respuesta mayor a estímulos de alta intensidad en relación a la respuesta a estímulos de baja intensidad, siendo clasificados como axones de tipo B (figura 31).

Otros siete axones respondieron únicamente a estímulos de intensidad mayor o igual a 50 μA , por lo que fueron clasificados como axones de tipo C. Los restantes cuatro axones no pudieron ser clasificados debido a la variabilidad en sus respuestas o por falta de alguno de los datos necesarios para su clasificación, no presentando ninguno de ellos un umbral de activación de axones de tipo C (ver umbrales medios en tabla 6).

Como puede observarse en la tabla número 6, el umbral de activación de los axones clasificados como tipos A y B fue prácticamente idéntico y se situó alrededor de 12 μA , mientras que los axones de tipo C presentaron un umbral de activación significativamente superior ($p < 0.01$, *t-test*), llegando a ser casi seis veces superior respecto al umbral de los otros dos tipos de axones. También se observaron variaciones significativas en la latencia de los axones de tipo A y B respecto a la

latencia de los axones de tipo C ($p < 0.01$, t -test), siendo la latencia de estos últimos muy superior a la de los primeros (tabla 6), aunque todos los grupos presentaron una gran dispersión en sus latencias (figura 30-B). La latencia media de los axones de tipo A fue inferior respecto a la observada en los axones de tipo B, pero no se observaron variaciones significativas entre ambas.

| Tipo Axón | Umbral (μ A) | Latencia (ms) | Pot. Acc. I_B (n°) | Pot. Acc. I_A (n°) | Act. Esp. (%) |
|-----------|-----------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| Tipo A | 13 ± 2 (5) | 14.5 ± 3 (6) | 2 ± 0.2 (6) | 2.1 ± 0.1 (6) | 50 % |
| Tipo B | 11 ± 3.5 (13) | 22 ± 1.7 (46) | 13 ± 5 (46) | 43 ± 8 (46) | 69.5 % |
| Tipo C | $65 \pm 9.5^{**}$ (7) | $35.7 \pm 5.2^{**}$ (7) | 0 (7) | 2.3 ± 0.5 (7) | 42 % |

Tabla 6.- Datos promediados de la respuesta de los diferentes tipos de axones estudiados. Los datos en la tabla se muestran como la media \pm EEM, con el número de observaciones entre paréntesis. La primera columna corresponde con los umbrales de disparo de potenciales de acción, calculado como la menor intensidad requerida para provocar la respuesta en el axón estudiado (duración fija de 200 μ s). La segunda columna muestra las latencias de los axones ascendentes, medidas en estímulos de alta intensidad (200 μ s y 200 μ A). La tercera y cuarta columnas muestran el número de potenciales de acción registrados en respuesta a estímulos de baja (50 μ s y 50 μ A) y alta (200 μ s y 200 μ A) intensidad. La quinta columna muestra el porcentaje de axones que presentaron actividad espontánea respecto al total de axones registrados en cada grupo. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (** $p < 0.01$) entre los umbrales y latencias de los axones tipo C respecto de los axones de tipo A y B.

El número de potenciales de acción disparados por los axones clasificados como tipo A cuando fueron estimulados con baja y alta intensidad fue prácticamente idéntico, y se situó alrededor de 2 potenciales en ambos casos. El disparo de potenciales por parte de los axones clasificados como tipo B varió significativamente al pasar de una media de 13 potenciales tras la aplicación de estimulación de baja intensidad, a una media de 43 potenciales tras la estimulación con alta intensidad ($p < 0.01$, t -test). Por último los axones clasificados como tipo C únicamente respondieron a estímulos de alta intensidad con una media de sólo 2 potenciales de acción, valor que compartieron con los axones de tipo A (tabla 6).

La estimulación de la raíz dorsal con trenes de alta intensidad produjo una baja proporción de respuestas de tipo *wind up* en los axones ascendentes registrados. Únicamente 5 axones presentaron una respuesta que podría ser considerada como tipo *wind up* de potenciales de acción, de los cuales 4 se clasificaron como axones de

tipo B, los cuales presentaron una característica peculiar en común, y es que sus latencias fueron superiores a 30 ms. El axón restante fue clasificado como tipo A, y mostró una latencia de tan sólo 7 ms. En la mayoría de los casos los axones ascendentes respondieron a estimulación repetitiva con una respuesta sostenida (n=12) o incluso decreciente (n=30) (figura 32). Estas respuestas sostenidas o decrecientes se observaron simultáneamente con respuestas *wind-up* en la raíz ventral.

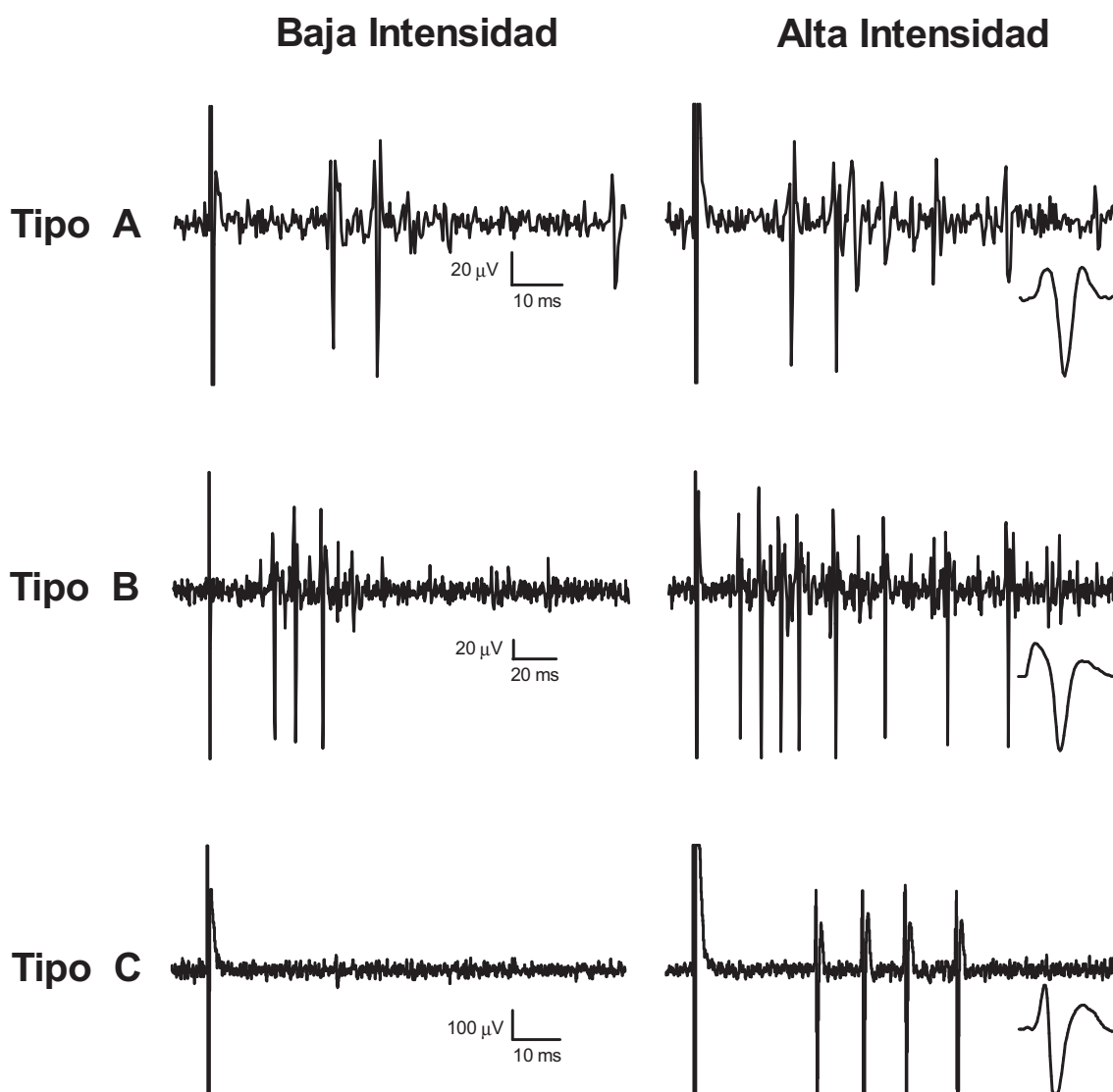


Figura 31.- Respuestas originales obtenidas de registros de los tres principales tipos de axones ascendentes estudiados. En el lado izquierdo se representan las respuestas a estímulos de baja intensidad (50 μ s y 50 μ A), en el lado derecho se representan las respuestas a estímulos de alta intensidad (200 μ s y 200 μ A). Al pie de las respuestas a alta intensidad se representa la forma promediada de cada uno de los potenciales de acción estudiados en los ejemplos. Nótese cómo los axones de tipo C únicamente responden a estímulos de alta intensidad.

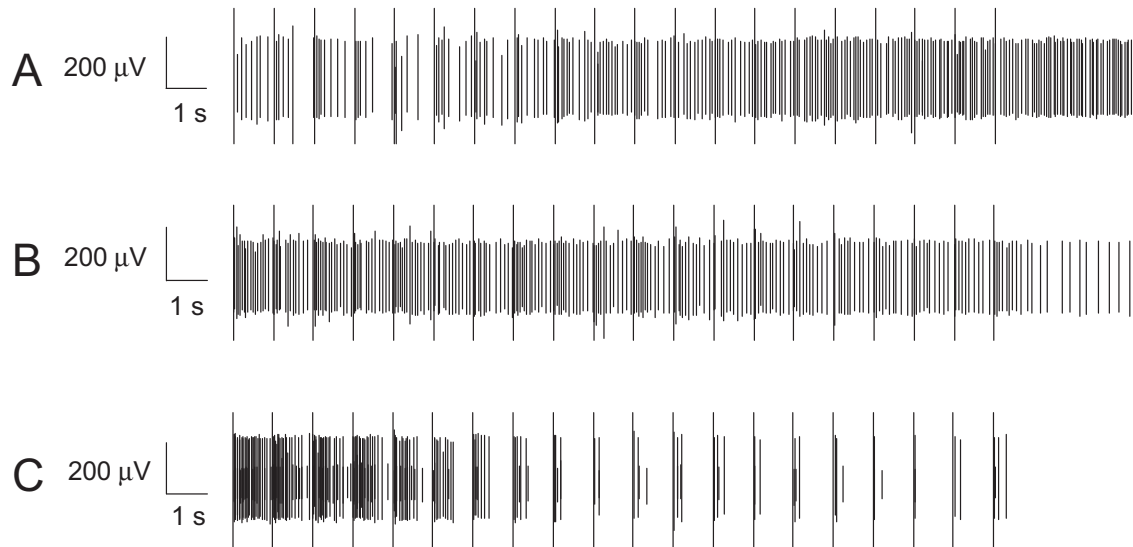


Figura 32.- Registros originales de la respuesta de tres axones ascendentes diferentes durante su estimulación con trenes de alta intensidad (20 estímulos, 1 Hz). **A** axón con respuesta en aumento al aplicar la estimulación (*wind up*). **B** Axón que mantiene su respuesta durante la estimulación. **C** Axón cuya respuesta disminuye según se aplica la estimulación (*wind down*).

3.4.- Actividad espontánea de los axones ascendentes.

Una proporción relativamente alta de axones mostraron actividad espontánea (tablas 6 y 7), normalmente esta actividad ocurría sin un patrón definido, en intervalos irregulares con baja frecuencia (0.5-0.1 Hz). Sin embargo, en algunos casos se llegó a observar actividad espontánea de alta frecuencia (hasta 10 Hz), llegando a coincidir claramente con actividad espontánea subumbral de motoneuronas (canal DC, figura 33). Del total de los 59 axones estudiados, 38 presentaron actividad espontánea distribuyéndose por tipo de axón como muestra la tabla 7.

| Tipo Axón | Nº Axones Estudiados | Axones con Act. Espont. | Act. Espontánea (Hz) | Axones sin Act. Espont. |
|-----------|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| Tipo A | 6 | 3 | 0.015 ± 0.02 | 3 |
| Tipo B | 46 | 32 | 0.15 ± 0.03 | 14 |
| Tipo C | 7 | 3 | 0.011 ± 0.01 | 4 |

Tabla 7.- Datos sobre la actividad espontánea de los axones estudiados. La actividad espontánea mostrada en esta tabla se midió en periodos de tiempo largos (>10 minutos).

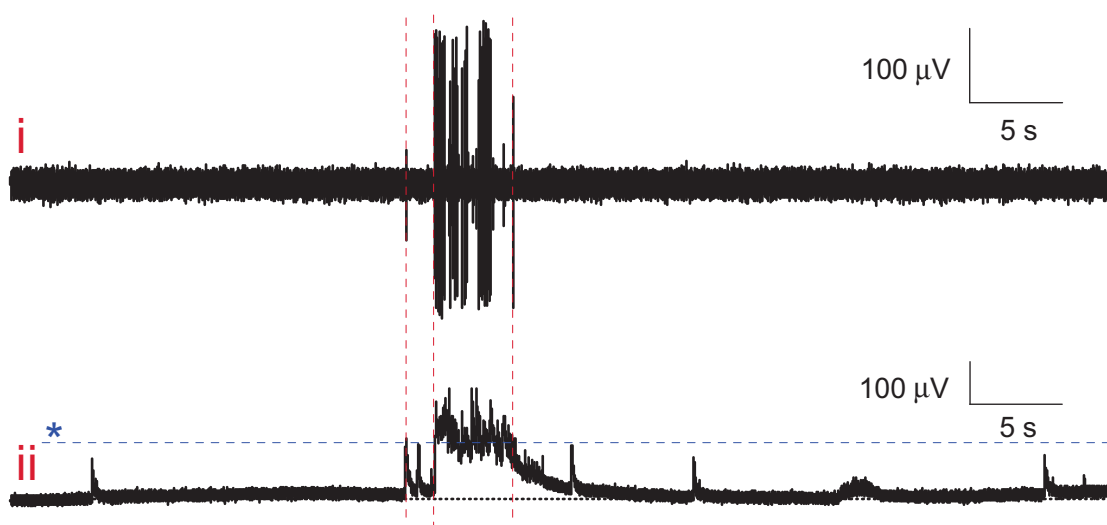


Figura 33.- Registro original de actividad espontánea paralela en el canal de registro de axones ascendentes (canal superior (i)), y el canal DC de la raíz ventral (canal inferior (ii)). Obsérvese cómo únicamente la actividad espontánea del canal DC que supera la línea discontinua azul (marcada con un asterisco) coincide con la actividad espontánea de los axones ascendentes.

3.5.- Registros de axones ascendentes en la región de las columnas dorsales.

La colocación de los microelectrodos de succión en zonas diferentes a la región anterolateral también permitió registrar axones ascendentes. Este es el caso de las columnas dorsales, constituidas por axones ascendentes originados a partir de ramas de fibras aferentes primarias y de axones de neuronas postsinápticas de las columnas dorsales (ver apartado 2.5.a, página 11). El trayecto de estas columnas dorsales en la médula espinal se realiza por el lado ipsilateral respecto a la raíz dorsal de entrada, ascendiendo por la sustancia blanca dorsal hasta los núcleos cuneado y grácil del bulbo raquídeo (Willis, 1999 y 2001). En esta región de las columnas dorsales se realizaron tres estudios en los que se registraron un total de cuatro axones ascendentes, los cuales presentaron algunas características en común, como el bajo número de potenciales de acción disparados y la nula capacidad para realizar respuestas de tipo *wind up* tras estimulación repetitiva de alta estimulación.

El primer axón registrado presentó un umbral de activación de 25 μ A, con una latencia de 12 ms, disparando únicamente un potencial de acción independientemente de la intensidad de estimulación aplicada en la raíz dorsal (figura 34-A). De igual forma, durante la aplicación de trenes de estímulos de alta y baja intensidad sólo disparó un potencial por estímulo.

El segundo axón registrado en las columnas dorsales presentó un umbral de activación de 15 μA y una latencia de 18 ms. Las características de disparo de potenciales de acción fueron idénticas al axón anterior, sólo generó un potencial por estímulo (figura 34-B).

En el último registro realizado se obtuvo la respuesta de dos axones (figura 34-C). El primer axón presentó un umbral de activación de 15 μA y una corta latencia de 3.5 ms, muy cercana a la latencia del RMS. Sus características de disparo fueron idénticas a los dos axones anteriores. El segundo axón obtenido en este registro no respondió a estímulos de baja intensidad, ya que su umbral de activación fue de 50 μA , con una latencia de 9.5 ms. A pesar de presentar un umbral muy superior al resto de axones registrados en las columnas dorsales, al igual que ellos sólo generó un potencial de acción por estímulo aplicado.

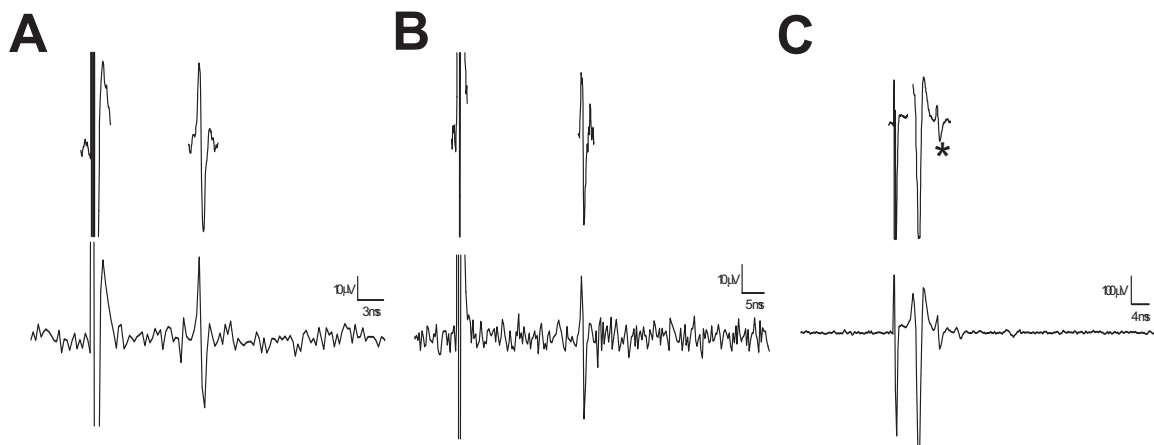


Figura 34.- Registros originales obtenidos en la región de las columnas dorsales. En todas las figuras se muestra el canal de registro de alta y baja definición (panel superior e inferior respectivamente). En **A** y **B** sólo se muestra un potencial de acción por estímulo, mientras que en **C** se muestran dos potenciales de acción, el segundo de ellos marcado con un asterisco. Obsérvese la baja latencia del primer potencial en la figura C.

4.- DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que utilizando una médula espinal completa de ratón es posible registrar, de forma simultánea, información motora a nivel de una raíz ventral e información ascendente a nivel de axones neuronales situados en la sustancia blanca ventral, contralateral respecto de la raíz dorsal estimulada. De igual forma también permite el registro en otras regiones medulares como las columnas dorsales.

Utilizando el procedimiento descrito se han obtenido preparaciones de médula espinal capaces de responder a la estimulación eléctrica de la raíz dorsal durante prolongados períodos de tiempo, en unas condiciones de estabilidad suficientes para llevar a cabo estudios farmacológicos y fisiológicos, permitiendo obtener nueva información sobre el funcionamiento de los circuitos medulares.

Los estudios realizados sobre el nervio safeno mostraron una respuesta típica compuesta principalmente por las ondas correspondientes a la conducción de las fibras A_{β} y C, observándose también una onda de menor amplitud que se corresponde con la conducción de las fibras nerviosas de tipo A_{δ} . Las velocidades de conducción obtenidas aquí se corresponden bien con los valores obtenidos en otras preparaciones para las aferentes sensoriales (Hedo y col., 1999). Dado que el nervio safeno es de naturaleza sensorial cutánea, las ondas obtenidas son muy puras y no se encuentran contaminadas con las que podrían producir eferentes musculares.

De acuerdo con esta interpretación, los umbrales de activación fueron menores para fibras A y mayores para fibras C. Las fibras A_{β} y A_{δ} se activaron con estímulos de baja intensidad (10 μ A y 200 μ s), mientras que las fibras nerviosas de tipo C presentaron un umbral medio de activación de $42 \pm 8 \mu$ A. Estos datos obtenidos en el nervio safeno aislado nos permitieron establecer intensidades de estimulación relevantes y ajustadas para estudios posteriores. A partir de aquí consideramos que estímulos de 200 μ s e intensidades superiores a 50 μ A activarían fibras C. Por otra parte estos datos nos indicaron que los estímulos de 200 μ s y 200 μ A producen una activación prácticamente máxima de todos los tipos de fibras aferentes presentes en el nervio, evitándose así la utilización de estímulos mayores que podrían dañar el tejido.

Se puede discutir la validez de estos datos obtenidos en animales jóvenes cuando se aplican a preparaciones de animales neonatales. De acuerdo con trabajos anteriores llevados a cabo en ratas, las fibras aferentes de tipo C no muestran cambios significativos en sus propiedades durante el desarrollo (Fitzgerald, 1985), y por lo tanto es bastante probable que los datos obtenidos en este estudio sobre umbrales de activación y velocidad de conducción en nervio safeno de ratón de 30 días de edad, sean válidos para utilizarlos como referencia en estudios sobre tejidos menos desarrollados. Las propiedades de las fibras nerviosas mielinizadas son más susceptibles de cambiar durante el desarrollo, de hecho varios grupos han publicado resultados demostrando que la velocidad de conducción de las fibras mielinizadas en

ratas neonatales fueron menores que la observada en este estudio para ratones de 30 días de edad (Thompson y col., 1990; Hedo y col., 1999).

La respuesta registrada a nivel de la raíz ventral tras la estimulación unitaria de la correspondiente raíz dorsal en este nuevo modelo de médula completa de ratón, fue cualitativamente similar a la obtenida en el modelo de hemimédula de rata, obteniéndose un reflejo monosináptico rápido y una onda lenta a nivel del canal DC, así como un número variable de potenciales de acción en el canal AC. Lo mismo sucedió en la respuesta ventral a estimulación repetitiva, la cual mostró los mismos componentes que la respuesta unitaria, con la peculiaridad de que en las respuestas a trenes de estimulación de alta intensidad se pudo observar una respuesta de tipo *wind up*, consistente en la acumulación progresiva del área (canal DC) y el número de potenciales de acción (canal AC). No se observan por tanto grandes diferencias entre las respuestas obtenidas de ambas preparaciones. Sí que podría resaltarse el hecho de que la médula de ratón parece un poco más excitable que la de rata. De esta forma se ha observado que los trenes de estímulos generaron una respuesta de tipo *wind up* de potenciales de acción que tendió a ser más vigorosa en ratón que en rata. Datos publicados con *wind up* motor en rata indican que el número medio de eventos en el canal AC es de 538 ± 121 potenciales utilizando estímulos de 200 μA y 300 μs (Rivera-Arconada y col., 2004), mientras que en estudios realizados en esta tesis en médula de ratón se han obtenido como media valores superiores a 1000 potenciales de acción (ver apartado 3.2.c de este capítulo, página 70). También es destacable la intensa actividad espontánea registrada en el ratón en el canal DC.

La estimulación repetitiva de la raíz dorsal puede conllevar la generación de respuestas ventrales de tipo *wind up* en función de la frecuencia e intensidad del estímulo, siendo la frecuencia más idónea entre 1-2 Hz, mientras que la intensidad del estímulo debe superar siempre el umbral de activación de las fibras aferentes de tipo C (Herrero y col., 2000). Como se observa en los resultados obtenidos tras estimular la médula espinal con trenes de estímulos de diferentes intensidades (20 estímulos, 1 Hz en todos los casos), las motoneuronas únicamente mostraron respuestas de tipo *wind up* al ser estimuladas con trenes de alta intensidad (200 μs y 200 μA ; 300 μs y 300 μA), obteniéndose en ambos casos una respuesta muy similar tanto cuantitativa como cualitativamente. En base a los resultados obtenidos en este estudio, junto a los resultados obtenidos en nervio safeno, se determinó que el estímulo más apropiado para obtener una respuesta máxima de tipo *wind up* provocando el menor daño al

tejido era aplicar estímulos de una intensidad de 200 μ s y 200 μ A. Esta intensidad, en concordancia con los experimentos de conducción nerviosa del nervio safeno, puede ser cercana a la activación máxima de las fibras de tipo C y entre 4-5 veces supraumbrales para la activación de estas fibras, siendo estos datos similares a otros obtenidos previamente para la obtención de respuestas tipo *wind up* utilizando el modelo de hemimédula de ratas neonatales (Hedo y col., 1999).

En el estudio del mantenimiento de la respuesta de tipo *wind up* a lo largo del tiempo, se observó que la respuesta ventral a nivel de área acumulada no sufre apenas variaciones durante todos los trenes aplicados. Respecto al número de potenciales de acción totales, se observó que el primer tren aplicado posee un valor algo superior al resto, manteniéndose estable en el resto de trenes, por lo que se determinó que en estudios sucesivos los tres primeros trenes se consideran como respuesta control, descartando el primero de ellos para calcular la media que determinará el valor control de referencia.

El mayor avance de este nuevo modelo de médula completa de ratón se basa en la posibilidad de estudiar la transmisión de señales a través del cuadrante anterolateral. A pesar de que una clasificación apropiada de neuronas requiere estimulación de los receptores naturales, los axones encontrados en este estudio respondieron a estimulación de la raíz dorsal como podría esperarse de los principales tipos de neuronas sensoriales de la médula espinal descritas en la literatura (Handweker y col., 1975; Cerveró y col., 1976). Los axones con un perfil de tipo C, tuvieron umbrales de activación dentro del rango de la activación de fibras aferentes de tipo C, y presentaron respuestas de larga latencia. Estos axones podrían pertenecer a la clase 3 o neuronas nociceptivas específicas. La mayoría de los axones obtenidos en este estudio mostraron un perfil concordante con el tipo B. De acuerdo con nuestros estudios de nervio safeno, estos axones transmiten información desde la médula espinal a través de fibras mielinizadas gruesas así como fibras finas mielinizadas y no mielinizadas que podrían originarse en neuronas de clase 2, también denominadas neuronas de rango dinámico amplio. Los axones de tipo A mostraron umbrales bajos, latencias rápidas y una pobre capacidad de codificación de intensidad de estimulación, sugiriendo que podrían pertenecer a las neuronas de clase 1 o de bajo umbral. Es conocido que todos estos tipos neuronales proyectan sus axones a lo largo del cuadrante anterolateral (por ejemplo ver Zhang y col., 2000). Existe muy poca información precisa sobre la composición de fibras en estos haces de proyección anterolateral. Según Willis y Coggeshall (1991) las neuronas del asta dorsal de mono

que proyectan por el tracto espinotalámico se clasifican en un 15% como clase 1 o de bajo umbral, un 59% como clase 2 o rango dinámico amplio y un 26% como clase 3 o de alto umbral. En estudios realizados por Zhang y colaboradores (1991) en neuronas del asta dorsal de mono que pertenecen al tracto espinotalámico, 40 de las 43 neuronas estudiadas se clasificaron como de rango dinámico amplio, las tres neuronas restantes no se pudieron clasificar. En el presente estudio el 10% del total de axones registrados se clasificaron como tipo A o de bajo umbral, el 78 % como tipo B o de rango dinámico amplio y el 12% como tipo C o de alto umbral. A la vista de estos porcentajes, los tipos de axones ascendentes se corresponden cuantitativamente con otras clasificaciones realizadas en el tracto espinotalámico, registrándose un porcentaje mayoritario de axones de rango dinámico amplio.

Una observación interesante es que estos tres tipos de axones muestran una gran variabilidad en sus latencias, sugiriendo que muchas de las respuestas estudiadas son mediadas por circuitos polisinápticos. De esta forma, una gran mayoría de los axones registrados respondieron a la estimulación de la raíz dorsal. Cabría preguntarse si esta falta de especificidad es una característica de la médula del ratón o si es un artefacto debido a una falta de inhibición que pueda producirse por la edad de los animales o por la falta de control supraespinal en la preparación.

Una observación sorprendente es el bajo número de axones ascendentes que producen respuestas de tipo *wind up*. En concordancia con estudios previos, los menores porcentajes de neuronas que producen *wind up* se sitúan en las capas superficiales del asta dorsal (Schouenborg y Sjolund, 1983), zona en la que hay una alta probabilidad de que se sitúen los somas de las neuronas que proyectan sus axones a través del cuadrante anterolateral. Otros factores como son el uso de una preparación *in vitro* o el uso de protocolos fijos de estimulación en lugar de usar varios protocolos distintos, son también causas probables de la obtención de un bajo número de neuronas capaces de generar *wind up*. Tampoco podemos descartar que este tipo de respuesta sea particularmente escasa en el ratón o que tenga menor repercusión de la esperada en los sistemas sensoriales. También es interesante observar que la mayoría de los axones ascendentes que mostraron respuestas de tipo *wind up* a estimulación repetitiva presentaron latencias largas, posiblemente polisinápticas. Esta observación favorece la hipótesis de que determinados circuitos neuronales median la generación de respuestas tipo *wind up* (Herrero y col., 2000). Sin embargo, debe destacarse que una gran proporción de axones correspondientes a neuronas de rango dinámico amplio con tiempos largos de latencia no produjeron *wind up*.

Finalmente cabe destacar que este primer estudio demuestra que la preparación de médula entera de ratón produce respuestas estables en vías sensoriales y motoras que pueden ser analizadas detalladamente y utilizadas para la evaluación del efecto de fármacos diversos con potencial efecto analgésico.

RESULTADOS. CAPÍTULO II:

Efectos de la noradrenalina y el sevoflurano sobre la actividad en vías motoras y sensoriales de la médula espinal de ratón *in vitro*.

1.- INTRODUCCIÓN.

Las motoneuronas son los efectores finales de la transmisión nerviosa al músculo esquelético de extremidades y tronco, mientras que los axones ascendentes llevan información sensorial a centros superiores. Estas dos vías son independientes, ya que cada una de ellas transmite un tipo particular de información, por lo que deben presentar peculiaridades en la regulación de su función específica. De igual forma, la vía motora y la sensorial están relacionadas al formar parte de una función nerviosa global, pudiendo presentar características comunes en su regulación.

En el capítulo anterior de esta tesis se desarrolló un nuevo modelo de registro simultáneo de vías motoras y sensoriales. A pesar del pequeño tamaño de la médula espinal de los ratones neonatales, es posible diferenciar fácilmente la sustancia blanca de la sustancia gris a la hora de acercar el microelectrodo de succión para registrar actividad de axones anterolaterales, sin embargo existe el inconveniente de que esta región se encuentra junto al asta ventral donde se localizan las motoneuronas. El objetivo del presente estudio es utilizar moduladores exógenos para ver si sus efectos son iguales o diferentes en las dos vías. La idea general es que si encontramos respuestas diferentes a un modulador sabremos que las vías tienen un importante grado de independencia. En este caso elegimos la amina biógena noradrenalina y el anestésico general sevoflurano.

Las aminas biógenas son monoaminas que actúan como neurotransmisores o neuromoduladores, se liberan generalmente por vías descendentes que provienen de centros superiores del encéfalo. Las monoaminas que se liberan a nivel de la médula espinal son la dopamina, la acetilcolina, la serotonina y la noradrenalina. El sistema noradrenérgico descendente se origina en los grupos celulares A5, A6 y A7 del tallo cerebral, que comprenden el locus cerúleo (LC), el locus subcerúleo (LSC), los núcleos parabraquiales y los núcleos de Kölliker-Fuse (Westlund y Coulter, 1980; Stevens y col., 1982; Proudfit, 1992; Westlund y col., 1983 y 1984). De estos núcleos se proyectan axones para inervar el asta dorsal (Dahlström y Fuxe, 1965; Clark y Proudfit, 1991 y 1993; Lakke, 1997) y el asta ventral de la médula espinal (Fung y col., 1991). La estimulación directa de estos núcleos, eléctrica o química, produce analgesia mediada por receptores adrenérgicos α_2 e inhibición de neuronas nociceptivas del asta dorsal (Margalit y Segal, 1979; Mokha y col., 1985 y 1986; Hodge y col., 1986; Jones y Gebhart, 1988; Zhao y Duggan, 1988; Proudfit, 1992; Yeomans y Proudfit, 1992; Budai y col., 1998) aunque también puede producir efectos

frecuentemente interpretados como pronociceptivos, mediados por receptores adrenérgicos α_1 (Holden y col., 1999).

Estudios previos utilizando la técnica de registro de reflejos espinales en hemimédula de rata, demostraron que la perfusión de la noradrenalina produce un aumento del disparo de potenciales de acción de las motoneuronas. Por el contrario, esta monoamina produjo de forma paralela una disminución de la despolarización acumulada por estas mismas neuronas (Hedo y López-García, 2001). Esto sugiere que la noradrenalina podría tener una doble acción: inhibitoria sobre neuronas dorsales y excitatoria sobre motoneuronas. Si éste fuera el caso, sería posible registrar una acción inhibitoria de la noradrenalina sobre la actividad de los axones ascendentes, y al mismo tiempo un efecto excitador sobre el disparo de potenciales de acción en las motoneuronas.

El sevoflurano es un anestésico volátil de uso clínico que pertenece a la familia de los éteres halogenados. Estudios con el sevoflurano utilizando entre otras técnicas la de registro de reflejos espinales en hemimédula de rata, demostraron que este anestésico induce una fuerte depresión en el reflejo monosináptico, así como de la despolarización acumulada y el disparo de potenciales de acción en motoneuronas tras estimulación unitaria y repetitiva de la médula espinal (Tsutahara y col., 1996; Matute y López-García, 2003; Matute y col., 2004). Además, como anestésico inhibe completamente las respuestas a la estimulación sensorial. Por lo tanto, es de esperar que el sevoflurano inhiba la actividad en ambas vías.

Utilizando el modelo de registro simultáneo de vías motoras y vías ascendentes en médula espinal de ratón, se ha estudiado el efecto de la perfusión de la amina biógena noradrenalina y del anestésico sevoflurano. De esta forma se busca demostrar que los registro ascendentes obtenidos mediante microelectrodos, son realmente de una vía sensorial independiente de la vía motora que se registra a través de la raíz ventral, teniendo en cuenta que ambas vías están relacionadas.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

Todos los experimentos se realizaron empleando 25 ratones CD-1 de entre 7 y 13 días de edad, y con un peso de entre 3.9 y 9.5 gramos. La metodología para la preparación de la médula espinal, su registro y estimulación, así como el tratamiento de los datos es idéntica a la mencionada en los capítulos anteriores. En todos los casos se aplicaron distintos estímulos eléctricos a la raíz dorsal un mínimo de tres veces antes de la perfusión de las sustancias a estudiar, y tres veces más durante el lavado de estas sustancias. Los tests de estimulación eléctrica se aplicaron cada 20 minutos, y constaban de un estímulo unitario de alta intensidad y, dos minutos después, de un tren de estímulos de alta intensidad (figura 35).

La noradrenalina (Sigma) y el sevoflurano (Abbott Laboratories) se aplicaron a toda la médula espinal disueltos en el LCRA. La noradrenalina se preparó en alícuotas de alta concentración, disueltas en agua ultra pura y almacenadas a -20°C , las cuales finalmente eran diluidas en LCRA a una concentración de $5\mu\text{M}$ momentos antes de su utilización. Esta concentración se eligió en base a estudios precedentes en ratas y a los resultados obtenidos en estudios preliminares realizados en ratón. La noradrenalina se perfundió sobre la médula espinal durante 10 minutos a una sola concentración de $5\mu\text{M}$ en todos los casos (figura 35-A).

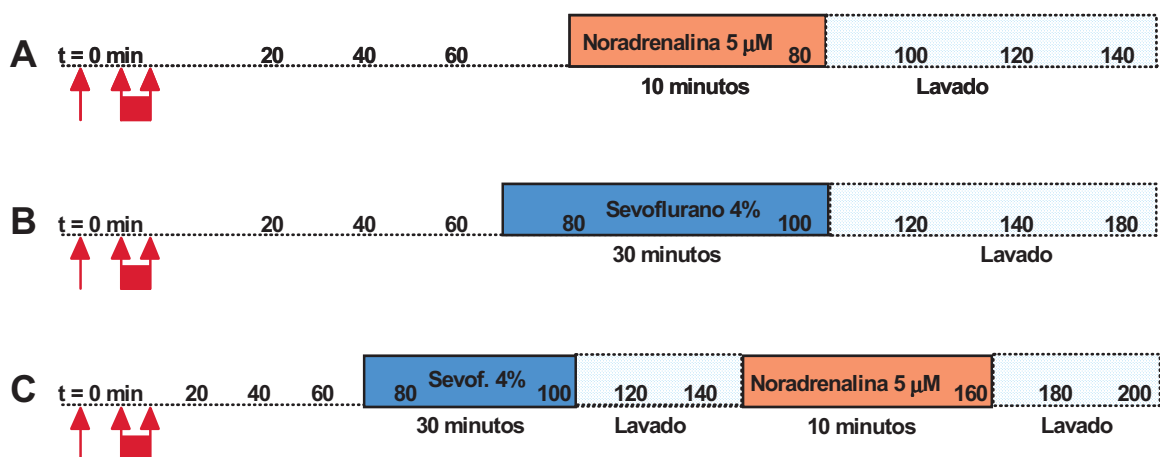


Figura 35.- **A** Protocolo para estudiar los efectos de la noradrenalina sobre la respuesta de la médula espinal de ratón. **B** Protocolo para estudiar los efectos del sevoflurano sobre la respuesta de la médula espinal de ratón. **C** Protocolo de aplicación secuencial del sevoflurano y la noradrenalina. En estos experimentos sólo se aplicaron estímulos de alta intensidad. Las zonas coloreadas corresponden a la aplicación de los compuestos y las zonas punteadas a los periodos de lavado.

El sevoflurano, al tratarse de un éter muy volátil, se vaporizó en carbógeno a un porcentaje de volumen del 4%, a través de un vaporizador específico (Quick Fil Dräger Vapor 19.n). Esta mezcla gaseosa se utilizó para burbujear un reservorio de LCRA, a partir del cual se perfundió la médula espinal durante 30 minutos. La concentración del sevoflurano en el LCRA se calculó a través de una cromatografía gaseosa utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard (HP-5890 serie II) y un procedimiento modificado de Lin y colaboradores (1992) como se detalla en Matute y López-García (2003). En estas condiciones se demostró que a su paso por la cámara de registro, el LCRA contenía una concentración de 0.5 mM del sevoflurano.

Para verificar que las diferencias en los efectos observados debido a la perfusión de la noradrenalina y el sevoflurano no fueron artefactuales, se llevaron a cabo una nueva serie de experimentos en los que se perfundieron ambas sustancias de forma secuencial en la misma preparación de médula espinal con registros simultáneos (n=5). Una vez realizadas las pertinentes aplicaciones de estímulos en LCRA control se perfundió el sevoflurano al 4%, procediendo posteriormente a lavar esta sustancia durante 40 minutos, tras lo cual se perfundió la noradrenalina 5 μ M y por último se realizó un segundo lavado (figura 35-C).

Los principales parámetros utilizados para cuantificar la respuesta en las raíces ventrales fueron el número de potenciales de acción (registro AC), el área acumulada y la amplitud del RMS (registro DC). La cuantificación de la respuesta en la vía ascendente se realizó contando el número de potenciales de acción registrados. Las medidas se realizaron con programas semiautomáticos construidos dentro del contexto Spike-2. Los valores directos, no transformados, obtenidos para cada variable se analizaron mediante el test *t* de Student, aunque en el texto y las figuras los valores se muestran transformados en porcentajes \pm EEM.

3.- RESULTADOS.

La noradrenalina y el sevoflurano han sido estudiados en preparaciones con registros simultáneos de la raíz ventral y axones ascendentes. La perfusión de noradrenalina 5 μ M se estudió en 13 preparaciones de médula espinal, mientras que los efectos de la perfusión de sevoflurano a una concentración aproximada de 0.5 mM se estudiaron en un total de 7 médulas espinales.

3.1.- Efectos de la Noradrenalina.

3.1.a.- Reflejo monosináptico.

La aplicación de la noradrenalina provocó una disminución de la amplitud del RMS superior al 20%, que no alcanzó significación estadística dada la gran variabilidad de este parámetro. El RMS se recuperó por completo tras el periodo de lavado (valores en tabla 8; figura 36).

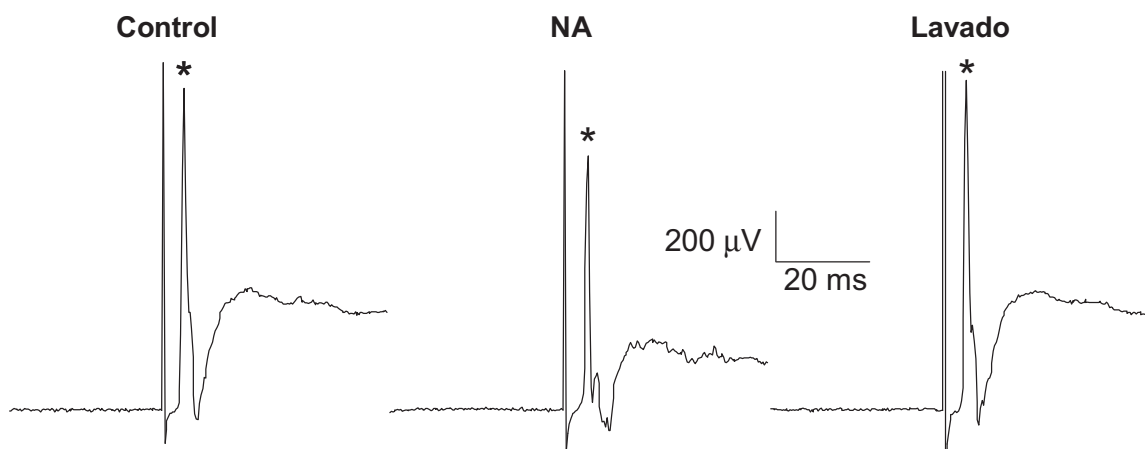


Figura 36.- La figura muestra el efecto de la perfusión de la noradrenalina (NA) sobre la amplitud del reflejo monosináptico (RMS, marcado con un asterisco), tras estimulación unitaria de alta intensidad en situación control, tras la perfusión de la noradrenalina 5 μ M y después del periodo de lavado.

| Motoneuronas | Control | Noradrenalina | Lavado |
|--|-----------------|-------------------|-----------------|
| Amplitud RMS (mV) | 0.71 \pm 0.14 | 0.56 \pm 0.13 | 0.72 \pm 0.15 |
| Pot. de Acción (n ^o ; unitario) | 117 \pm 32 | 436 \pm 96 ** | 120 \pm 35 |
| Pot. de Acción (n ^o ; tren) | 1864 \pm 544 | 4381 \pm 1060 * | 1873 \pm 571 |
| Área (μ V*s; unitario) | 0.67 \pm 0.09 | 0.42 \pm 0.07 * | 0.69 \pm 0.1 |
| Área Acumulada (μ V*s; tren) | 7.5 \pm 1.0 | 4.1 \pm 0.7 * | 7.1 \pm 1.1 |

Tabla 8.- Valores medios de la amplitud del RMS, del número de potenciales de acción y el área tomados en la raíz ventral tras la estimulación unitaria y repetitiva de alta intensidad en situación control, tras la perfusión de la noradrenalina 5 μ M y después del periodo de lavado. Los asteriscos indican diferencias con significación estadística (*t-test*) entre la situación control y la posterior perfusión de noradrenalina (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

3.1.b.- Potenciales de acción disparados por las motoneuronas.

La perfusión de la noradrenalina produjo un aumento significativo del número de potenciales de acción registrados en la raíz ventral en todos los casos estudiados ($n=13$), tanto en respuesta a estímulos unitarios como repetitivos (t -test, $p<0.01$ y $p<0.05$ respectivamente). La respuesta a ambos tipos de estimulación aumentó considerablemente, en especial la respuesta a estímulos unitarios que aumentó casi cuatro veces respecto al control. En todos los casos los valores control se recuperaron tras el periodo de lavado (figuras 37 y 39, valores en tabla 8).

3.1.c.- Área en registros DC.

El área de despolarización acumulada tras estimulación unitaria y repetitiva de alta intensidad resultó disminuida de forma significativa por la perfusión de la noradrenalina (t -test, $p<0.05$ ambos casos). La disminución del área fue alrededor del 40% en todos los casos, recuperándose totalmente tras el periodo de lavado (figuras 37 y 39, valores en tabla 8).

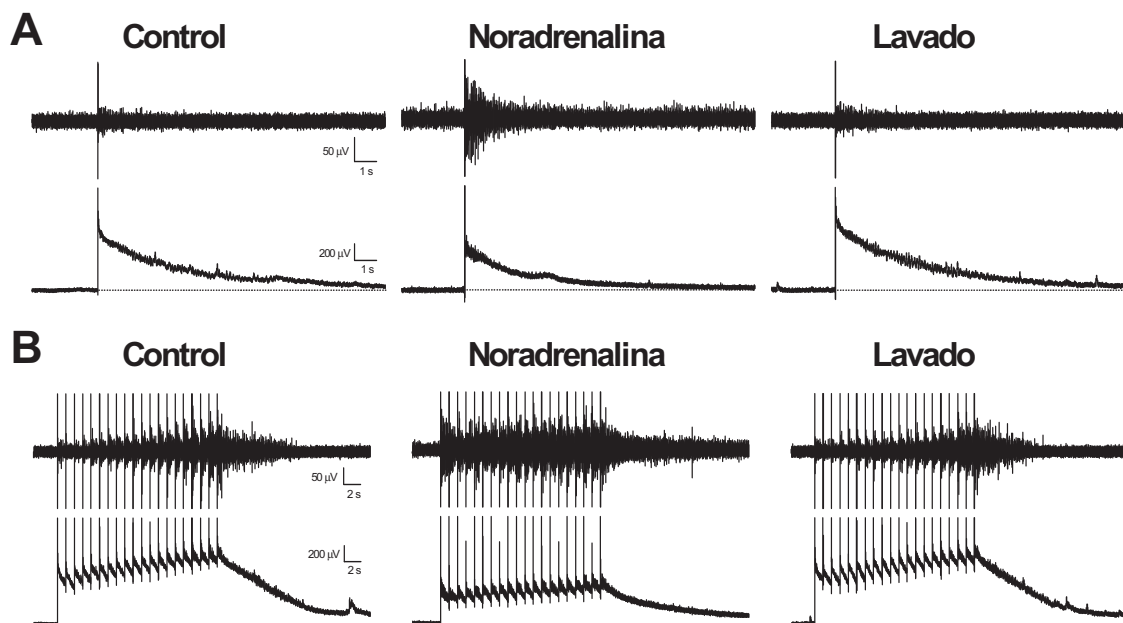


Figura 37.- Registros originales de las respuestas de la raíz ventral tras estimulación unitaria (A) y repetitiva (B) de alta intensidad (registros AC en el panel superior; registros DC en el panel inferior), en situación control, tras la perfusión de la noradrenalina 5 μ M y después de su lavado. Obsérvese cómo la noradrenalina aumenta el disparo de potenciales de acción en respuesta a ambos tipos de estímulo pero disminuye el área bajo la curva en registros DC.

3.1.d.- Potenciales de acción disparados por los axones ascendentes.

Al contrario de lo observado en el disparo de potenciales de acción por parte de las motoneuronas, las respuestas registradas simultáneamente en axones anterolaterales fueron deprimidas tras la aplicación de la noradrenalina en 9 de los 13 casos estudiados. De los nueve axones inhibidos, 8 fueron clasificados como tipo B y 1 como tipo A. Teniendo en cuenta estos nueve axones en conjunto, el número de potenciales de acción disparados como respuesta a estímulos unitarios y repetitivos de alta intensidad se vio disminuido significativamente tras la perfusión de la noradrenalina (*t-test*, $p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente). Esta disminución del disparo fue cercana al 60% en ambos casos, recuperando los valores control después del periodo de lavado (figuras 38 y 39, valores en tabla 9).

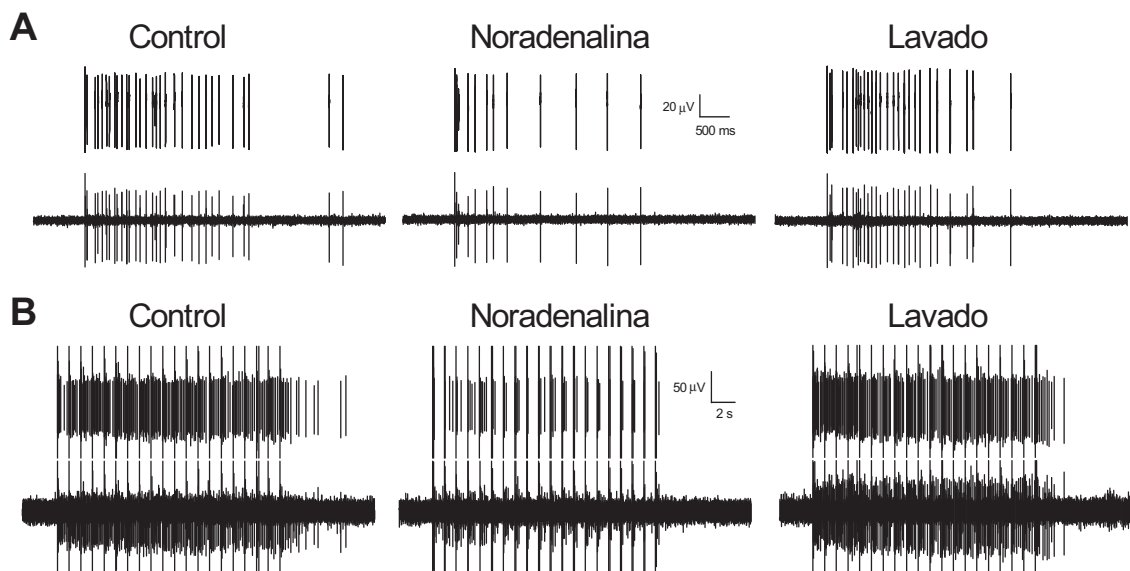


Figura 38.- Las figuras A y B muestran registros originales de un axón ascendente tras estimulación unitaria y repetitiva de alta intensidad, respectivamente, en situación control, tras la perfusión de la noradrenalina 5 μ M y después de su lavado. En los paneles superiores de cada figura se muestran registros discontinuos de alta resolución y en los inferiores registros continuos de menor resolución. Obsérvese cómo la noradrenalina disminuye el disparo de potenciales de acción.

De los cuatro axones restantes, dos fueron potenciados por noradrenalina llegando a generar respuestas un 200% superior respecto a su valor control. Uno de estos axones fue clasificado como tipo B y el otro no fue clasificado por falta de datos. Los dos axones restantes no mostraron variaciones significativas en su disparo durante la perfusión de noradrenalina, uno de estos axones fue clasificado como tipo B y el otro como tipo A.

| Axones Ascendentes | Control | Noradrenalina | Lavado |
|--------------------------------------|----------|---------------|----------|
| Potenciales de Acción (n°; unitario) | 39 ± 10 | 13 ± 3 ** | 39 ± 11 |
| Potenciales de Acción (n°; tren) | 213 ± 51 | 105 ± 28 * | 185 ± 57 |

Tabla 9.- Valores medios del número de potenciales de acción registrados en los axones ascendentes tras la estimulación unitaria y repetitiva de alta intensidad en situación control, tras la perfusión de la noradrenalina 5 μ M y después del periodo de lavado. Los asteriscos indican la significación estadística obtenida con el test *t* de Student, entre la situación control y la posterior perfusión de noradrenalina (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Sólo se incluyen los axones inhibidos por noradrenalina.

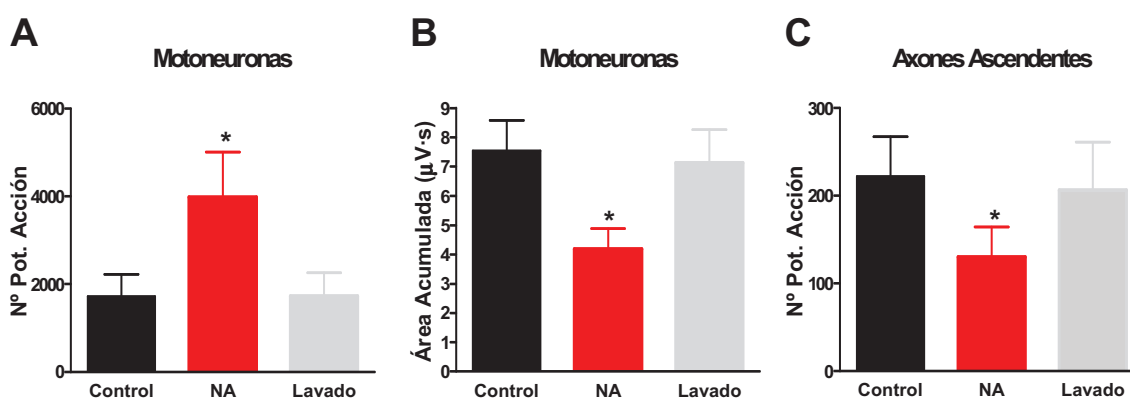


Figura 39.- La figura muestra la cuantificación de los efectos de la perfusión de la noradrenalina sobre las respuestas registradas en la raíz ventral (**A** potenciales de acción; **B** área acumulada) y en los axones anterolaterales (**C**) tras estimulación repetitiva de alta intensidad. Únicamente se han incluido datos de preparaciones en las que la perfusión de la noradrenalina causa depresión de las respuestas ascendentes. El número de casos estudiados con noradrenalina es de 13 en motoneuronas y de 9 en axones ascendentes. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas entre la situación control y la perfusión de la noradrenalina mediante el test *t* de Student (* $p < 0.05$).

3.2.- Efectos del Sevoflurano.

3.2.a.- Reflejo monosináptico.

La perfusión del sevoflurano disminuyó ligeramente la amplitud del RMS de forma no significativa respecto al control. Tras el periodo de lavado la amplitud del RMS alcanzó un valor algo superior al control inicial (figura 40, valores en tabla 10).

| Motoneuronas | Control | Sevoflurano | Lavado |
|-------------------------------|--------------|---------------|--------------|
| Amplitud RMS (mV) | 0.43 ± 0.13 | 0.36 ± 0.12 | 0.54 ± 0.17 |
| Pot. de Acción (n°; unitario) | 160.6 ± 76.2 | 8.5 ± 4.0 * | 141.4 ± 80.9 |
| Pot. de Acción (n°; tren) | 1734 ± 581 | 123 ± 82 ** | 1577 ± 839 |
| Área (μV*s; unitario) | 0.74 ± 0.22 | 0.19 ± 0.06 * | 0.64 ± 0.2 |
| Área Acumulada (μV*s; tren) | 8.44 ± 2.2 | 2.79 ± 0.76 * | 7.28 ± 1.83 |

Tabla 10.- Valores medios de la amplitud del RMS, del número de potenciales de acción y del área acumulada registrados en la raíz ventral tras estimulación unitaria y repetitiva en situación control, tras la perfusión del sevoflurano al 4 % y después del período de lavado. Los asteriscos indican la significación estadística obtenido con el test *t* de Student entre la situación control y la posterior perfusión del sevoflurano (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

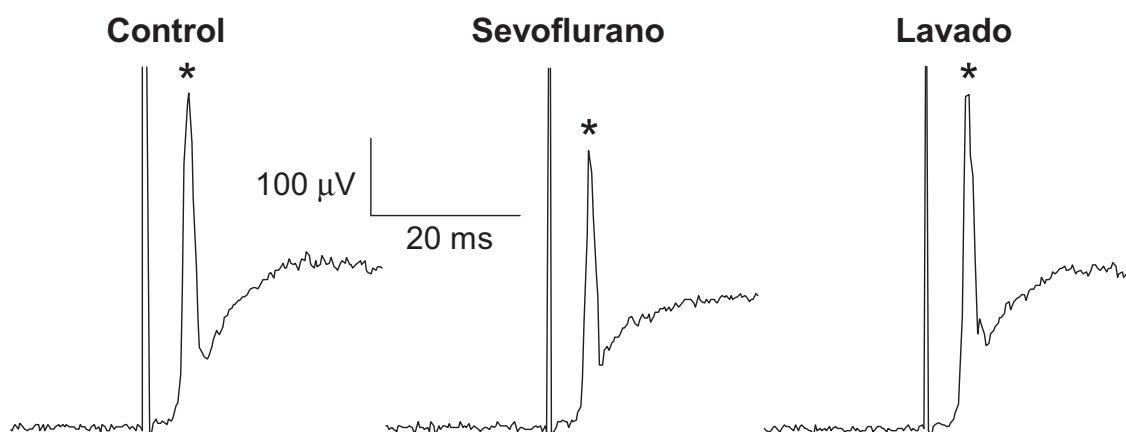


Figura 40.- La figura muestra el efecto de la perfusión del sevoflurano (sevo) sobre la amplitud del reflejo monosináptico (RMS, marcado con un asterisco), tras estimulación unitaria de alta intensidad en situación control, tras la perfusión del sevoflurano al 4% y después del periodo de lavado.

3.2.b.- Potenciales de acción disparados por las motoneuronas.

La perfusión del sevoflurano prácticamente suprimió los potenciales de acción disparados por las motoneuronas en respuesta a estimulación unitaria y repetitiva de alta intensidad (*t*-test, $p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente). En ambos casos la reducción del disparo fue superior al 90%, recuperándose casi por completo tras el periodo de lavado (figuras 41 y 43, valores en tabla 10).

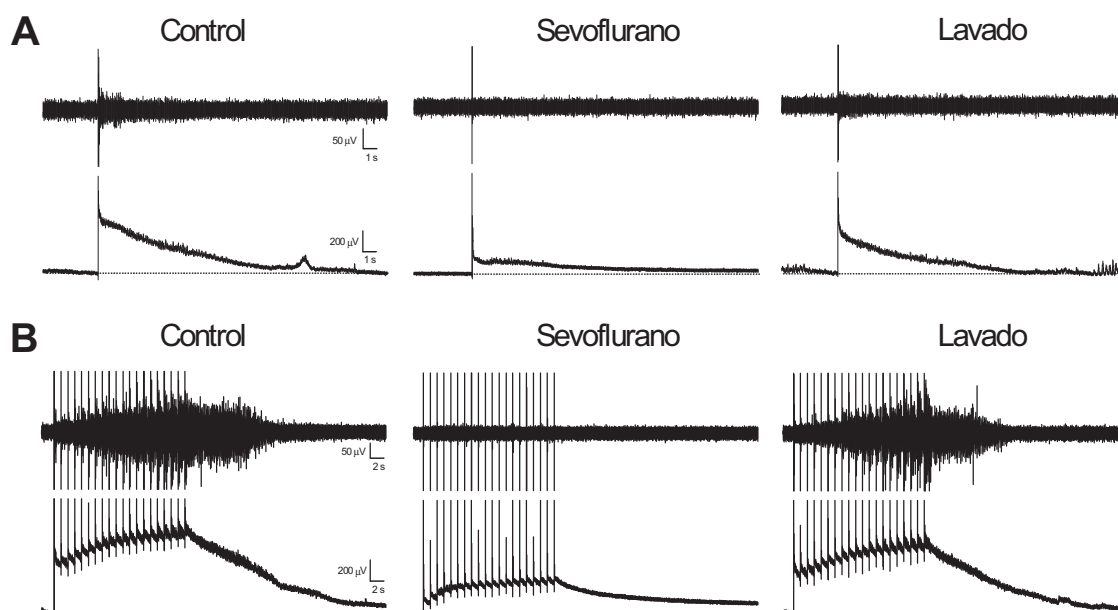


Figura 41.- Las figuras **A** y **B** muestran registros originales de la respuesta ventral a la estimulación unitaria y repetitiva de alta intensidad respectivamente (registros AC en el panel superior; registros DC en el panel inferior), en situación control, tras la perfusión del sevoflurano al 4% y después del lavado de esta sustancia. Obsérvese la fuerte inhibición del disparo de potenciales de acción tras la perfusión del sevoflurano en la respuesta a estimulación repetitiva.

3.2.c.- Área en registros DC.

La perfusión del sevoflurano disminuyó significativamente el área acumulada por las motoneuronas en respuesta a la estimulación unitaria y repetitiva (*t-test*, $p < 0.05$ ambos casos). En ambos casos la reducción es cercana al 70%, observándose una recuperación tras el periodo de lavado próxima a los valores control (figuras 41 y 43, valores en tabla 10).

3.2.d.- Potenciales de acción disparados por los axones ascendentes.

El efecto de la perfusión del sevoflurano sobre el disparo de potenciales de acción de los axones ascendentes se estudió en 7 médulas espinales. En todos los casos se realizaron estudios simultáneos con registros de la raíz ventral, y en algunos casos se registraron y analizaron dos axones ascendentes de forma conjunta. Se estudiaron un total de 11 axones, 6 de los cuales fueron clasificados como tipo B, 3 como tipo A y los dos restantes no fueron clasificados por falta de datos. En todos los casos estudiados el disparo de potenciales de acción por parte de los axones ascendentes se vio reducido significativamente tras la perfusión del sevoflurano (*t-test*,

$p < 0.001$ y $p < 0.01$, estímulos unitarios y repetitivos respectivamente). La reducción del disparo fue cercana al 75%. Tras el periodo de lavado el disparo de potenciales de acción volvió a los niveles del control inicial (figuras 42 y 43, valores en tabla 11).

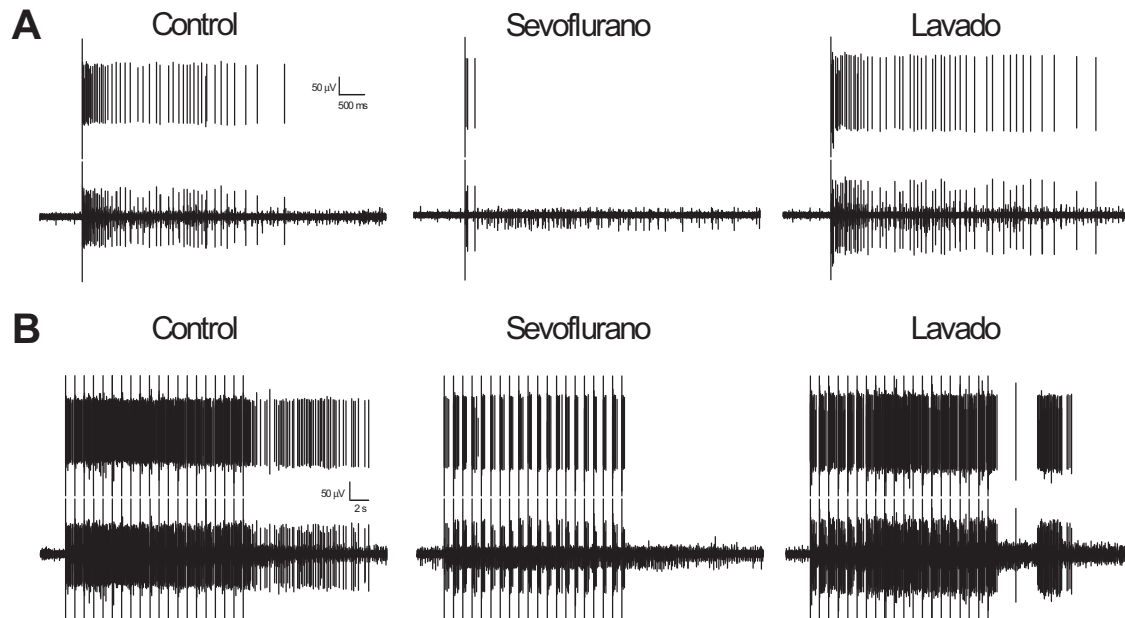


Figura 42.- Las figuras A y B muestran registros originales de la respuesta de un axón ascendente tras estimulación unitaria y repetitiva de alta intensidad respectivamente (alta frecuencia de registro en el panel superior; baja frecuencia en el panel inferior), en situación control, tras la perfusión del sevoflurano al 4% y después del lavado de esta sustancia. Obsérvese cómo durante el paso del sevoflurano disminuye fuertemente el disparo de potenciales de acción.

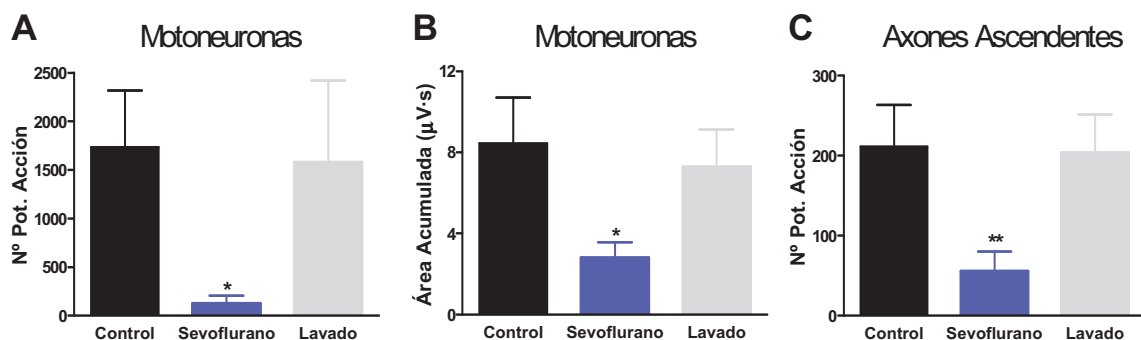


Figura 43.- La figura muestra los efectos de la perfusión del sevoflurano sobre las respuestas registradas en la raíz ventral (A potenciales de acción; B área acumulada) y en los axones ascendentes (C) tras estimulación repetitiva. El número de médulas espinales estudiadas fueron de 7, en las cuales se obtuvieron registros de 11 axones ascendentes. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas entre la situación control y el paso del sevoflurano mediante el test *t* de Student (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

| Axones Ascendentes | Control | Sevoflurano | Lavado |
|--------------------------------------|----------|-------------|----------|
| Potenciales de Acción (n°; unitario) | 28 ± 8 | 8 ± 6 *** | 31 ± 11 |
| Potenciales de Acción (n°; tren) | 211 ± 51 | 55 ± 24 ** | 203 ± 47 |

Tabla 11.- Valores medios del número de potenciales de acción registrados en los axones ascendentes tras la estimulación unitaria y repetitiva en situación control, tras la perfusión del sevoflurano y después del período de lavado. Los asteriscos indican la significación estadística según un test *t* de Student entre la situación control y la posterior perfusión del sevoflurano (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3.3.- Aplicación secuencial del Sevoflurano y la Noradrenalina.

Para verificar que las diferencias en los efectos observados debido a la perfusión de la noradrenalina y el sevoflurano no fueron artefactuales, se llevaron a cabo una nueva serie de experimentos en los que se perfundieron ambas sustancias de forma secuencial en la misma preparación de médula espinal con registros simultáneos (n=5). Las características del estudio se detallan en la sección de materiales y métodos de este capítulo (página 89, figura 35-C).

3.3.a.- Respuestas registradas en la raíz ventral.

La perfusión del sevoflurano provocó una ligera disminución no significativa de la amplitud del RMS, llegando a superar la amplitud inicial tras el primer lavado. El posterior paso de noradrenalina produjo una disminución significativa del $40.7 \pm 6.8\%$ (*t-test*, $p < 0.05$) respecto al control, disminución que recuperó los valores iniciales en el posterior lavado.

La aplicación del sevoflurano produjo una reducción significativa en el número de potenciales de acción disparados tras estimulación unitaria y repetitiva. La posterior aplicación de noradrenalina aumentó significativamente el disparo de potenciales de acción. En los lavados se recuperó la respuesta con valores cercanos al control (ver significación en figuras 44-A y B).

De nuevo los resultados obtenidos en las respuestas a estimulación unitaria y repetitiva fueron muy similares, ya que en ambos casos el paso de sevoflurano redujo el área de forma significativa, observándose el mismo efecto significativo tras la

perfusión de noradrenalina. En ambos lavados se recuperó la respuesta en valores cercanos al 80% del control inicial (figuras 44-C y D).

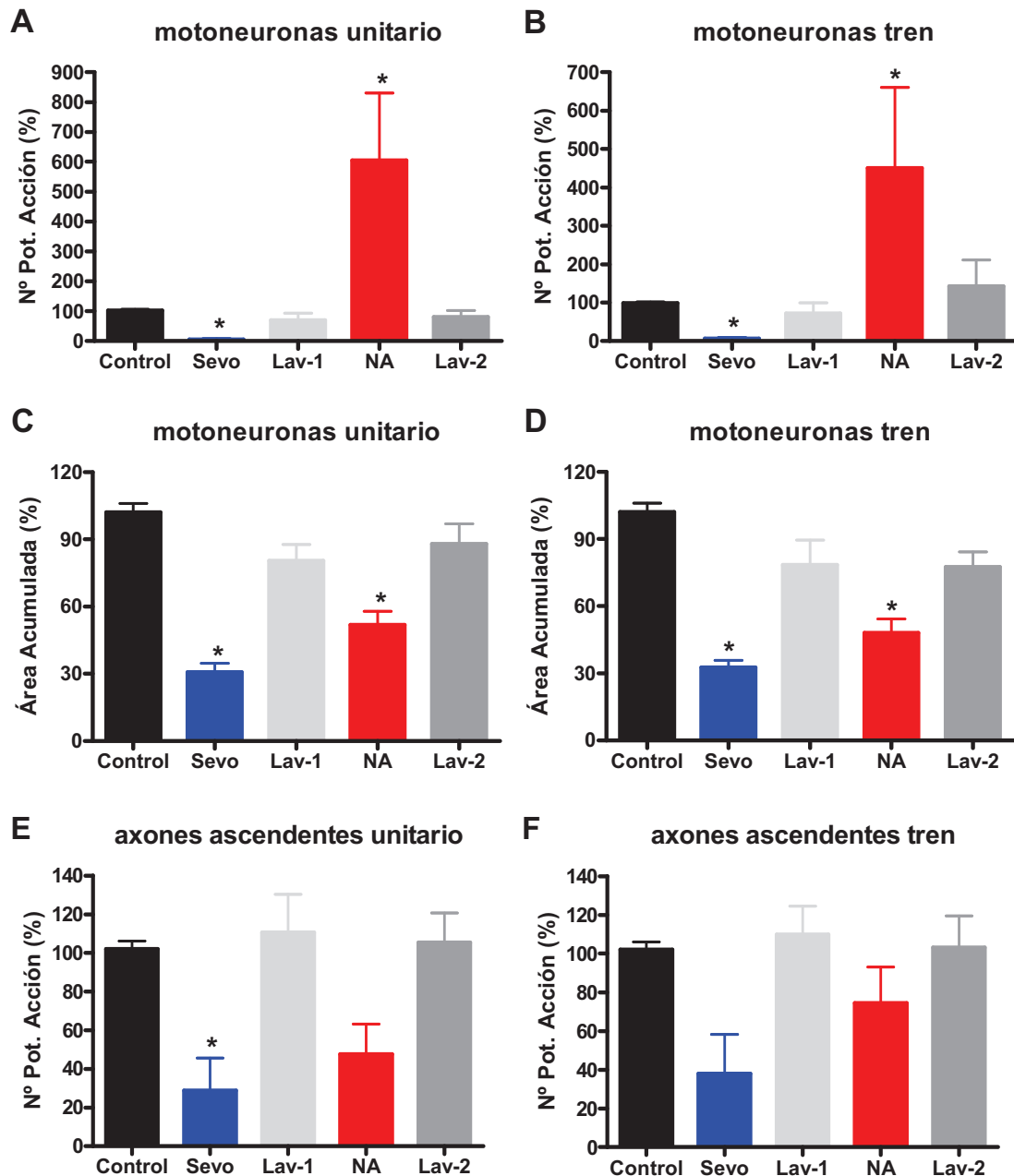


Figura 44.- Efectos de la perfusión secuencial del sevoflurano (Sevo) y la noradrenalina (NA) sobre el disparo de potenciales de acción de las motoneuronas (A y B), área de la respuesta DC en raíz ventral (C y D) y disparo de potenciales de acción de los axones ascendentes (E y F), en respuesta a estímulos unitarios y repetitivos como se indica en las figuras. Después de la perfusión de cada sustancia se realizó un periodo de lavado (Lav-1 y Lav-2). Los valores se muestran como % de la respuesta control. Los asteriscos muestran variaciones significativas entre cada uno de los periodos de estudio respecto al control inicial a través del test *t de Student* (* $p < 0.05$).

3.3.b.- Respuesta de los axones ascendentes.

En cada una de las cinco médulas espinales estudiadas se obtuvo un registro simultáneo de un axón ascendente, de los cuales cuatro se clasificaron como tipo B y uno se clasificó como tipo A. En todos los casos estudiados la perfusión del sevoflurano produjo una reducción significativa del disparo de potenciales de acción de los axones tras estimulación unitaria, recuperando totalmente los valores control tras el primer lavado. La posterior perfusión de la noradrenalina redujo el disparo de potenciales en los cuatro axones clasificadas como tipo B, aunque esta reducción no resultó significativa. El axón clasificado como tipo A no varió su respuesta tras la perfusión de noradrenalina. En el segundo lavado se volvieron a recuperar por completo los niveles iniciales de respuesta (figuras 44-E y 45).

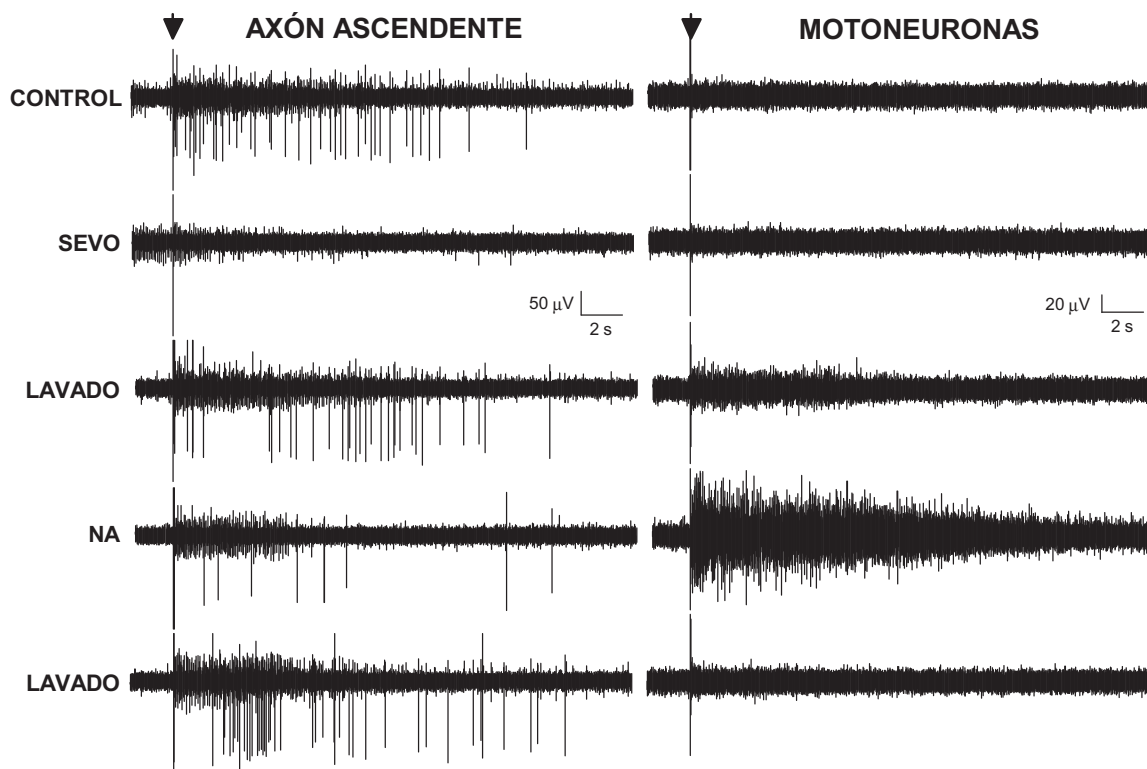


Figura 45.- La figura muestra registros simultáneos originales tomados en una raíz ventral (panel derecho) y un axón anterolateral (panel izquierdo) en respuesta a estimulación unitaria de alta intensidad. Observar los efectos inhibitorios producidos por el paso del sevoflurano (SEVO) en ambas vías, así como los efectos inhibitorios/excitatorios producidos por el paso de la noradrenalina (NA) tras el lavado del sevoflurano. El artefacto del estímulo está marcado con una flecha.

En el caso de la respuesta a estimulación repetitiva se observaron unos resultados muy similares, con la peculiaridad de que el sevoflurano disminuyó el disparo de potenciales de acción pero de forma no significativa, seguramente debido a la variabilidad de las respuestas (figura 44-F).

4.- DISCUSIÓN.

Una de las dificultades en el desarrollo del modelo de registro simultáneo de axones ascendentes y reflejos espinales en la médula completa de ratón, fue determinar que los registros obtenidos a través de los microelectrodos se originan realmente en axones ascendentes, y no son registros de los somas de las motoneuronas, debido a que éstos se sitúan en el asta ventral. La diferenciación entre la sustancia blanca y la sustancia gris del asta ventral en este modelo es clara, y los electrodos nunca se situaron en el límite entre ambas. Aun así la obtención de una modulación diferente de ambos registros certifica que se trata de dos vías de información diferente.

El principal objetivo del estudio en este capítulo fue determinar si la respuesta de los axones ascendentes registrados (vía sensorial) y de las motoneuronas (vía motora) podrían ser moduladas de forma diferente por un compuesto como la noradrenalina. La elección de este compuesto se debe a que hay un gran número de publicaciones que muestran que esta amina biógena provoca principalmente efectos inhibitorios a nivel de neuronas del asta dorsal de la médula espinal, actuando a nivel de receptores α_2 adrenérgicos, mientras que potencia la actividad de las motoneuronas actuando a nivel de los receptores α_{1A} adrenérgicos (ver referencias en Hedo y López-García, 2001).

La perfusión de la noradrenalina produjo los efectos esperados en el disparo de potenciales de acción, excitando fuertemente a las motoneuronas e inhibiendo parcialmente el disparo de la mayor parte de los axones ascendentes. Cabe destacar que la reducción del disparo de potenciales de acción por parte de los axones ascendentes fue muy similar en valores porcentuales a la reducción del área acumulada en las motoneuronas provocada por la perfusión de noradrenalina, indicando que ambos parámetros podrían estar relacionados.

El efecto inhibitorio de la noradrenalina sobre los axones ascendentes fue predominante pero no exclusivo. De los 18 axones registrados, 14 fueron inhibidos en

su disparo por noradrenalina, siendo 12 de ellos de tipo B. Otros dos axones fueron insensibles a noradrenalina, e incluso otros dos resultaron excitados. En este sentido nuestro estudio sugiere que las neuronas de tipo B, potencialmente neuronas de rango dinámico amplio, podrían ser más susceptibles a la inhibición por noradrenalina que las neuronas de tipo A, semejantes en comportamiento a las neuronas de bajo umbral y más importantes en el procesamiento de información táctil.

El uso del sevoflurano en este estudio se debe a que hay diversos trabajos que sugieren que este anestésico es capaz de bloquear tanto la vía sensorial como la motora (Matute y López-García, 2003; Matute y col., 2004). Por tanto este compuesto se utilizó como control para contrastar los posibles efectos diferenciales de noradrenalina en las vías motoras y sensoriales. Como esperábamos el sevoflurano disminuyó fuertemente el disparo de potenciales de acción en vías ascendentes y motoneuronas, así como el área acumulada en registros DC.

Los resultados obtenidos con ambos compuestos se ajustaron a las previsiones. La noradrenalina presentó efectos excitatorios sobre la vía motora y efectos principalmente inhibitorios sobre la vía sensorial, mientras que los efectos del sevoflurano fueron inhibitorios en todas las vías. Estos efectos se volvieron a repetir durante la aplicación secuencial de ambas sustancias, con la peculiaridad de que la reducción de la amplitud de RMS por noradrenalina se pudo ver potenciada por la aplicación previa de sevoflurano.

Ya se ha discutido que la noradrenalina provoca efectos inhibitorios sobre neuronas medulares por medio de la activación del receptor α_2 adrenérgico mientras que la activación del receptor α_1 adrenérgico provoca efectos excitatorios. Por tanto, los efectos complejos desvelados en nuestro estudio podrían ser fácilmente explicados por una localización diferencial de estos receptores: una concentración mayoritaria de receptores α_1 en asta ventral, en los somas de las motoneuronas, y una concentración de receptores α_2 en interneuronas sensoriales del asta dorsal. A este respecto se ha observado la presencia de RNA mensajero del receptor adrenérgico α_1 únicamente en la sustancia gris del asta ventral de la médula espinal de humanos, mientras que el RNA mensajero del receptor α_2 se observa en ambas astas (Smith y col., 1995 y 1999). Es muy posible que la noradrenalina medie, al menos en parte, los efectos analgésicos producidos por el estrés físico y las situaciones de peligro, en las que se

puede mantener un nivel motor adecuado mientras se suprime la sensación de dolor que podría ser perjudicial para este tipo de situaciones.

Sin embargo aquí se ha demostrado que la noradrenalina también es capaz de potenciar la actividad de neuronas del asta dorsal, aunque hay que tener en cuenta que la activación o inhibición de una neurona específica puede participar en una función global con un efecto contrario, como por ejemplo la excitación de una interneurona inhibidora.

Por otra parte el sevoflurano tiene mecanismos de acción que no han sido completamente establecidos. Se sabe que disminuye la respuesta mediada por la activación específica del receptor NMDA y AMPA en médula espinal (Matute y López-García, 2003). También se ha observado que puede modificar la conductancia de algunos canales de potasio. A este respecto los canales de potasio de tipo 2P pueden ser activados por anestésicos inhalatorios, aunque no de forma uniforme (Scholz, 2002). Estudios realizados en corazón demuestran que el sevoflurano puede activar diferentes tipo de canales de potasio (Hara y col., 2001; Kehi y col, 2002). Estos mecanismos son muy generales, y seguramente actúan sobre todas las neuronas medulares independientemente de su localización.

Al margen de los mecanismos específicos que median estas acciones, los resultados obtenidos aquí, demuestran claramente que la vía sensorial y la vía motora presentan formas de modulación específicas, y que por lo tanto determinados compuestos podrían actuar sobre ellas produciendo efectos puramente analgésicos sin interferir (o produciendo interferencias mínimas) con vías motoras.

Como conclusión general, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que se puede registrar de forma paralela información sensorial e información motora, y que ambas vías se pueden modular por compuestos específicos como noradrenalina o inespecíficos como el sevoflurano, provocando efectos opuestos o similares en ambas vías.

RESULTADOS. CAPÍTULO III:

Efectos de los antagonistas de la corriente de calcio tipo L en la transmisión por vías sensoriales y motoras de la médula espinal de ratón.

1.- INTRODUCCIÓN.

Los canales que participan en la generación de las corrientes de calcio de tipo L son miembros de la familia de Canales de Calcio Dependientes de Voltaje (CCDV), cuya estructura molecular consiste en una subunidad principal (α_1) que constituye el poro de paso de los iones, asociada a varias subunidades accesorias (α_2 - δ , β) (Catterall, 2000). El sistema nervioso central sólo expresa las isoformas C y D de la subunidad principal α_1 , denominándose los canales resultantes $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ respectivamente (Ertel y col., 2000). Las corrientes de tipo L generadas por los canales $Ca_v1.3$ muestran un umbral de activación menor y una sensibilidad más baja a dihidropiridinas que las corrientes generadas por los canales $Ca_v1.2$ (Lipscombe y col., 2004).

Estudios de inmunohistoquímica demostraron que ambas variantes de los canales se expresan en la médula espinal de ratón y rata (Jiang y col., 1999; Dobremez y col., 2005). Los canales $Ca_v1.3$ se encuentran en todas las láminas espinales de ratón y rata, mientras que la distribución de los canales $Ca_v1.2$ puede variar entre especies, siendo más densa en áreas ventrales en el ratón y en láminas dorsales profundas en la médula espinal de rata. Los canales $Ca_v1.2$ tienden a localizarse en el soma y dendritas proximales, mientras que los canales $Ca_v1.3$ también se encuentran en dendritas distales. En las neuronas de la médula espinal, las corrientes de tipo L promueven los “potenciales meseta” (“plateau potentials”) y facilitan respuestas de tipo *wind up* al estimular aferentes nociceptivas con estímulos de baja frecuencia (Morisset y Nagy, 2000; Perrier y col., 2002). Los potenciales meseta en estas neuronas son generados por despolarizaciones moderadas, y muestran una sensibilidad a dihidropiridinas relativamente baja sugiriendo la intervención de los canales $Ca_v1.3$ (Perrier y col., 2002).

Las corrientes de tipo L juegan un papel importante en la regulación de la excitabilidad de las motoneuronas, y por lo tanto en las funciones motoras espinales, mientras que su papel en el procesamiento de información sensorial no está claramente establecido (Malmberg y Yaksh, 1994; Díaz y Dickenson, 1997). El papel de las corrientes de tipo L en el procesamiento de información nociceptiva ha sido estudiado utilizando dihidropiridinas (DHP), así como benzotiazepinas (BTC) y fenilalquilaminas (FAA), las tres familias de antagonistas más importantes para estos canales (para revisión ver Striessnig y col., 1998). Los compuestos que conforman estas tres familias poseen diferentes grados de selectividad y afinidad por las

corrientes de tipo L. Los valores CI50 calculados para el bloqueo de las corrientes L en tejido nervioso son normalmente superiores a concentraciones de 10 μM (Lipscombe y col., 2004), aunque hay publicaciones que encuentran un alto grado de afinidad para el bloqueo de estas corrientes (McCarthy y Tanpiengco, 1992). Por el contrario, se han encontrado valores de CI50 muy superiores para BTC y FAA en células auditivas (Dobrev y col., 1999).

Estudios de comportamiento, así como registros electrofisiológicos de neuronas del asta dorsal, encuentran resultados contradictorios respecto a los efectos de los antagonistas de la corriente de tipo L sobre el procesamiento de estímulos nociceptivos bajo diferentes condiciones experimentales, incluyendo inflamación y neuropatía (para revisión ver Vanegas y Schaible, 2000). Estudios recientes sugieren que daños en fibras nerviosas producen cambios en la expresión de los canales de tipo L en aferentes primarias y neuronas de segundo orden del asta dorsal (Xiao y col., 2002; Dobremez y col., 2005). Sin embargo, bloqueantes de la corriente de tipo L fueron inefectivos para aliviar los signos del dolor neuropático (Chaplan y col., 1994). En base a los resultados disponibles hasta ahora, no está claro si la entrada de calcio a través de los canales de tipo L en neuronas del asta dorsal está relacionada con la codificación inmediata de señales de dolor, o con procesos bioquímicos lentos asociados a hiperalgesia de larga duración.

Gran parte de la confusión respecto al posible papel de las corrientes de tipo L en procesos sensoriales espinales proviene de la selectividad de los antagonistas utilizados, así como de la vía de administración, la cual puede influir de forma dramática en la concentración con la que los antagonistas llegan a interactuar con los receptores. Un factor adicional que debe tenerse en cuenta es la presencia de canales de calcio de tipo L en las motoneuronas, en especial en los estudios de comportamiento, en los cuales puede influir en los resultados de forma decisiva.

El principal propósito en este capítulo es valorar los efectos de compuestos representativos de las tres principales familias de antagonistas de los canales de calcio de tipo L sobre la respuesta de las neuronas sensoriales y motoras tras la activación de aferentes nociceptivas.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

Los experimentos se llevaron a cabo en 34 médulas espinales extraídas de ratones con una edad comprendida entre 6 y 13 días, con un peso que osciló entre 3.5 y 7.9 gramos. Los procedimientos generales de extracción y registro de la médula espinal se describen en la sección de materiales y métodos generales (apartado 5, página 41).

2.1.- Protocolo Experimental.

Los compuestos utilizados en esta fase experimental fueron los antagonistas de la corriente de calcio de tipo L (+)-cis-diltiazem hidroclicorato, S (-) verapamil hidroclicorato y nimodipina.

Diltiazem y verapamil se disolvieron a alta concentración en agua ultrapura y nimodipina en DMSO, se dividieron en pequeñas alícuotas y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Estos antagonistas se aplicaron al baño tras ser disueltos en LCRA en un rango de concentraciones de 1, 3, 10, 30, 100 y 300 μM para verapamil y diltiazem, mientras que nimodipina sólo se aplicó hasta 100 μM debido a la dificultad encontrada para disolverlo a mayores concentraciones.

Cada una de las concentraciones se aplicó durante 20 minutos. En la mayoría de los casos se llegaron a aplicar hasta tres concentraciones del mismo compuesto de forma acumulativa, ya que experimentos preliminares demostraron que la recuperación de la respuesta base tras la aplicación de altas concentraciones es muy lenta. La aplicación de las sustancias en el baño comenzó tras el registro de tres respuestas control (figura 46).

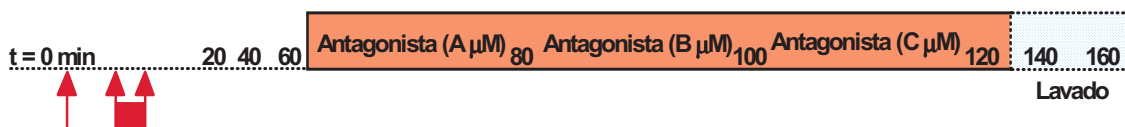


Figura 46.- El gráfico muestra el protocolo empleado para el estudio de los antagonistas verapamil, diltiazem y nimodipina. Las concentraciones A, B y C son siempre crecientes y de un solo antagonista. En cada punto temporal indicado se aplica un test de estímulos consistente en un estímulo unitario y un tren de estímulos, ambos de alta intensidad (200 μA y 200 μs), con una separación entre ellos de 60 segundos. Los test se repiten cada 20 minutos. La aplicación de los antagonistas comienza después de tres test control.

2.2.- Tratamiento de los Datos.

Los efectos de la aplicación de los antagonistas en la respuesta de la médula espinal fueron analizados substrayendo los correspondientes valores control de aquellos obtenidos tras la aplicación del antagonista a estudiar. Los valores control fueron previamente comparados con variaciones aleatorias entre pares de respuestas control obtenidas con anterioridad a la aplicación de los antagonistas. Los parámetros estudiados son el número de potenciales de acción en vías ascendentes y motoras. En vías motoras se estudió además el área acumulada de la respuesta (registros DC) y la amplitud del RMS.

Estos parámetros se representan en los gráficos como la media del porcentaje respecto al control o como la media de los valores originales (\pm error estándar de la media, EEM). El ajuste a la curva y el cálculo del Log CI_{50} (\pm EEM) se realizaron utilizando un software comercial para análisis estadístico (GraphPad Software Inc., CA, USA). La comparación de las medias de los datos originales se realizó mediante diferentes cálculos estadísticos como el ANOVA o *t*-test utilizando el mismo software.

3.- RESULTADOS.

De las 34 médulas espinales que fueron utilizadas en este estudio se obtuvieron registros de la raíz ventral en todos los casos, sin embargo los registros simultáneos con axones anterolaterales se lograron únicamente en 27 de las médulas estudiadas.

Los axones ascendentes fueron clasificados en base a los criterios expuestos en el capítulo 1 de esta tesis (apartado 10.2, página 49) según se refleja en la tabla 12, en la que también se detalla el número y tipo de los axones ascendentes que han sido estudiados con cada uno de los antagonistas. Hay que destacar que no se obtuvo ningún registro de axones de tipo C.

La estimulación repetitiva de la raíz dorsal con estímulos de alta intensidad produjo una típica respuesta de suma progresiva o *wind-up* en los registros de la raíz ventral, con un aumento progresivo del número de potenciales de acción, y del área acumulada de la respuesta. Por el contrario, únicamente dos axones ascendentes produjeron una respuesta típica de suma progresiva en el número de potenciales de acción tras la aplicación de la estimulación repetitiva. En el resto de los axones

ascendentes la estimulación repetitiva provocó una disminución progresiva de la respuesta o un mantenimiento de la misma.

| Axones Registrados (n=30) | Tipo A | Tipo B | Tipo C |
|---------------------------|--------|--------|--------|
| Número total | 6 | 24 | 0 |
| Verapamil | 2 | 9 | 0 |
| Diltiazem | 3 | 7 | 0 |
| Nimodipina | 1 | 8 | 0 |

Tabla 12.- Número total de axones ascendentes registrados así como su clasificación en función de su respuesta a estímulos de baja y alta intensidad (criterios de clasificación en apartado 10.2, página 49). En las tres últimas filas se detalla el número y tipo de los axones estudiados con cada antagonista.

3.1.- Efectos de los antagonistas sobre las respuestas registradas en los axones anterolaterales.

3.1.a.- Estímulos Unitarios.

La perfusión de **verapamil** produjo una disminución significativa y concentración dependiente del número de potenciales de acción transmitidos por los axones ascendentes (*One-way ANOVA*, $p < 0.001$; figuras 47 y 48-A). En el análisis posterior con tests de *Bonferroni* se detectaron reducciones significativas respecto al control inicial al aplicar las concentraciones de 100 y 300 μM ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente). Verapamil 300 μM produjo una anulación prácticamente total del disparo de potenciales de acción en todos los casos estudiados.

La perfusión de **diltiazem** produjo una disminución significativa y concentración dependiente del número de potenciales de acción registrados en los axones ascendentes (*One-way ANOVA*, $p < 0.001$; figuras 47 y 48-B). Al aplicar la concentración 30 μM ya se observó una disminución significativa respecto al control (*Bonferroni post-test*, $p < 0.05$), significación que aumentó al aplicar las concentraciones de 100 y 300 μM ($p < 0.001$ en ambos casos). En este caso la aplicación de la concentración de 30 μM produjo una anulación de la respuesta cercana a la observada al aplicar las concentraciones superiores. Cabe destacar también que a diferencia del antagonista verapamil, diltiazem 300 μM no produjo una anulación de la respuesta.

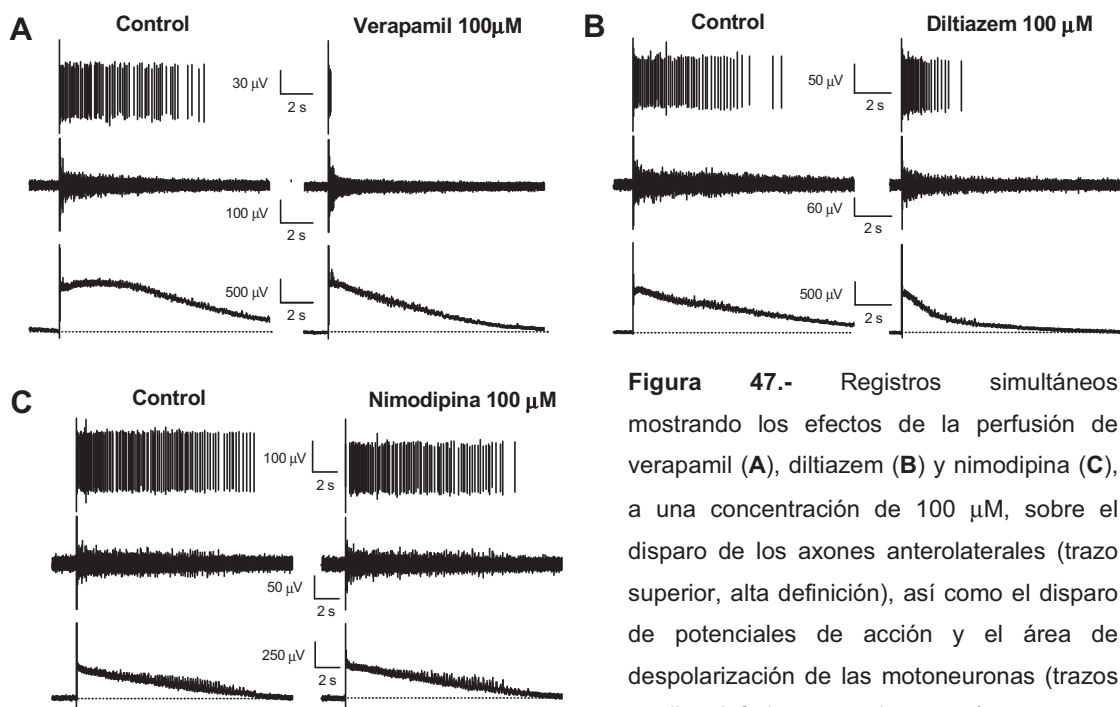


Figura 47.- Registros simultáneos mostrando los efectos de la perfusión de verapamil (A), diltiazem (B) y nimodipina (C), a una concentración de 100 μM, sobre el disparo de los axones anterolaterales (trazo superior, alta definición), así como el disparo de potenciales de acción y el área de despolarización de las motoneuronas (trazos medio e inferior respectivamente).

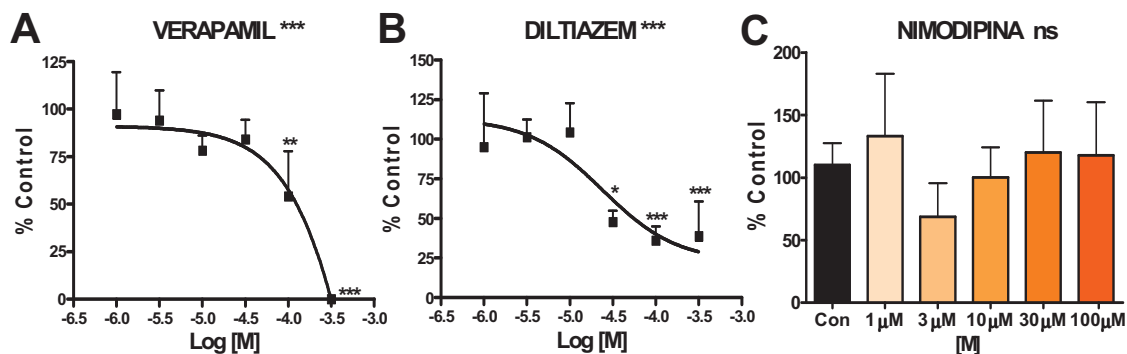


Figura 48.- Efecto de los bloqueantes de calcio de tipo L sobre el disparo de potenciales de acción de los axones ascendentes tras estimulación unitaria. Las figuras A y B muestran los efectos inhibitorios y concentración dependientes de verapamil y diltiazem respectivamente. El gráfico C muestra las variaciones en la respuesta debido a la perfusión de nimodipina.

La perfusión de **nimodipina** no produjo variaciones significativas en el disparo de los axones ascendentes (*One-way ANOVA*; figuras 47 y 48-C). Al contrario de lo observado tras la aplicación de verapamil y diltiazem, nimodipina no provocó un efecto claro ni siquiera a las concentraciones más elevadas. Únicamente se observó un descenso de la respuesta al aplicar nimodipina 3 μM, lo cual podría deberse a la variabilidad de la respuesta y al bajo número de observaciones.

3.1.b.- Estímulos Repetitivos.

Verapamil, diltiazem y nimodipina provocaron una disminución significativa y concentración dependiente del número total de potenciales de acción disparados por los axones ascendentes como respuesta a la estimulación repetitiva (*One-way ANOVA*, $p < 0.001$ en todos los casos). En la figura 49 se muestran registros originales en los que se puede apreciar los efectos de la aplicación de cada antagonista a una concentración de 30 y 100 μM .

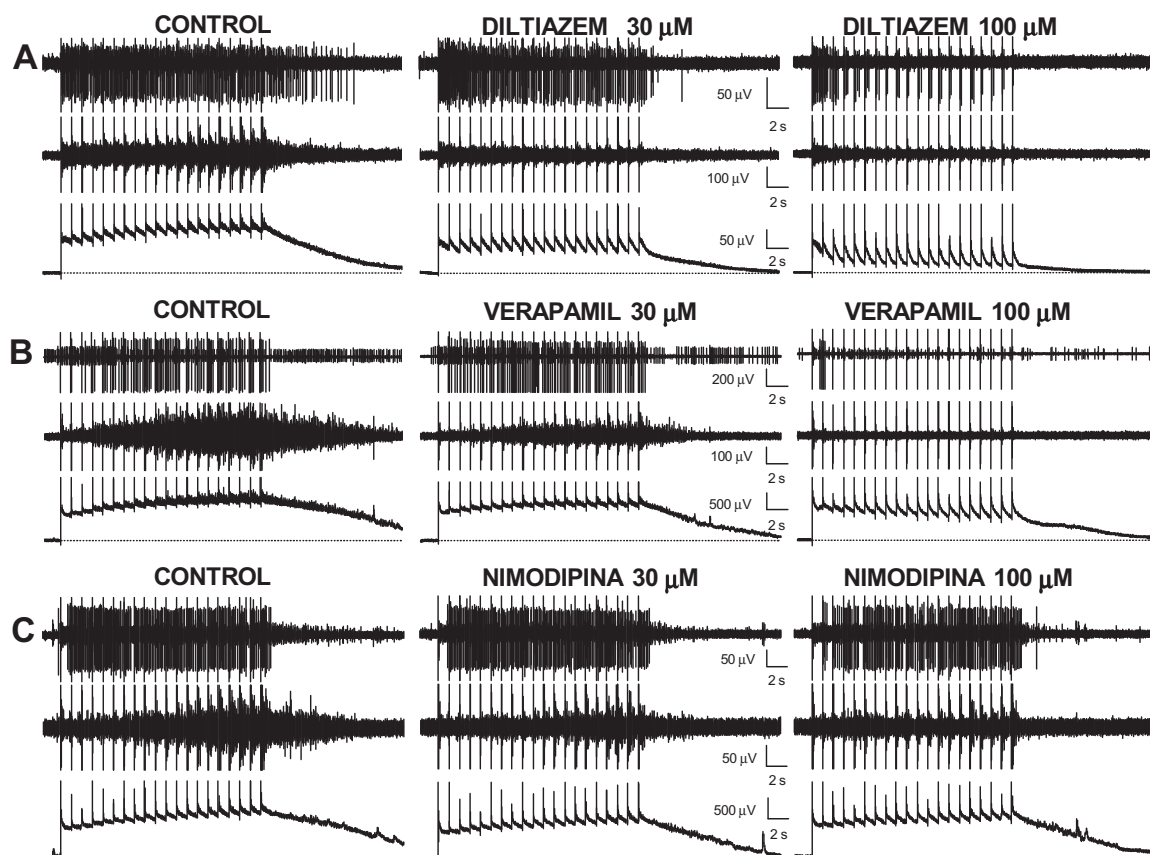


Figura 49.- Registros simultáneos de tres experimentos diferentes (A, B y C), mostrando la respuesta control a estimulación eléctrica de la raíz dorsal (trenes de 20 estímulos a 1 Hz y alta intensidad) y los efectos de los tres bloqueantes de calcio de tipo L a las concentraciones especificadas. Para cada respuesta el trazo superior muestra registros de los axones anterolaterales, los trazos en posición media muestran los disparos de potenciales de acción de las motoneuronas, y el trazo inferior muestra la despolarización acumulada de la respuesta de las motoneuronas. Las líneas verticales en intervalos regulares son artefactos de estimulación eléctrica.

La perfusión de **verapamil** provocó unos efectos prácticamente idénticos a los observados en la estimulación unitaria, ya que produjo una disminución significativa respecto al control tras la perfusión de verapamil 100 y 300 μM (*Bonferroni post-test*, $p \leq 0.001$ en ambos casos, figura 50-A). De nuevo su aplicación a una concentración de 300 μM casi anuló por completo la respuesta en todos los casos estudiados. No se observaron cambios en el coeficiente de incremento de la respuesta, el cual se mantuvo siempre en valores negativos (figura 50-B; valores en tabla 13).

La perfusión de **diltiazem** produjo unos efectos muy similares a los de verapamil, ya que aplicado a concentraciones de 100 y 300 μM provocó una disminución significativa del número de potenciales disparados respecto al control (*Bonferroni post-test*, $p \leq 0.001$ en ambos casos, figura 50-C). A diferencia de lo observado con estimulación unitaria, su aplicación a una concentración de 300 μM redujo la respuesta hasta casi eliminarla. El coeficiente de incremento tampoco sufrió variaciones significativas (*One-way ANOVA*), permaneciendo siempre en valores negativos (figura 50-D, valores en tabla 13).

| Coef. Incremento (pot./s) | Control | 30 μM | 100 μM |
|----------------------------------|------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Verapamil | -0.13 ± 0.11 | -0.20 ± 0.06 | -0.19 ± 0.12 |
| Diltiazem | -0.17 ± 0.08 | -0.24 ± 0.15 | -0.25 ± 0.17 |
| Nimodipina | -0.09 ± 0.03 | -0.11 ± 0.06 | -0.11 ± 0.2 |

Tabla 13.- Valores del coeficiente de incremento medio del disparo de potenciales de acción por los axones ascendentes en situación control, y tras la aplicación de verapamil, diltiazem y nimodipina a unas concentraciones de 30 y 100 μM .

El efecto de **nimodipina** sobre la respuesta ascendente fue considerablemente menor que el observado tras la perfusión de verapamil y diltiazem, aunque a diferencia de lo indicado en el apartado anterior, sí provocó una reducción significativa del disparo de potenciales de acción. La reducción fue significativa a una concentración de 100 μM , aunque porcentualmente esta reducción fue muy inferior a la producida por los otros dos antagonistas estudiados (figura 50-E). El coeficiente de incremento de la respuesta no se vio afectado por la aplicación de nimodipina, presentando unos valores negativos y muy similares en todos los puntos estudiados (figura 50-F; tabla 13).

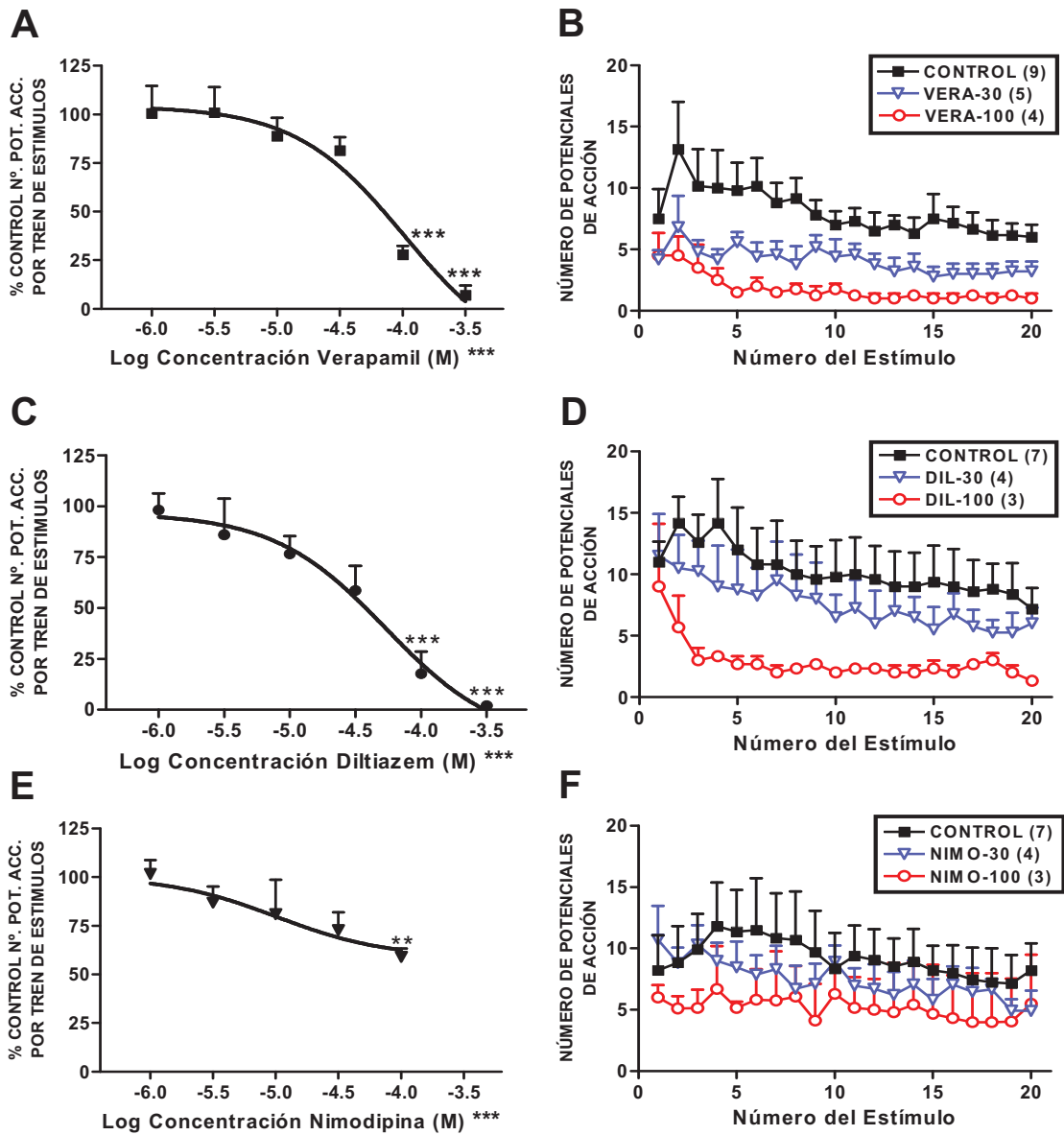


Figura 50.- Efecto de verapamil (A y B), diltiazem (C y D) y nimodipina (E y F) sobre la respuesta de los axones ascendentes a estimulación repetitiva. Las figuras A, C y E muestran el efecto concentración-dependiente sobre el número total de potenciales de acción expresado como % del valor control \pm EEM. Las figuras B, D y F muestran el número medio de potenciales de acción \pm EEM registrados en los axones ascendentes en cada estímulo del tren, en situación control y tras la perfusión de cada antagonista a una concentración de 30 y 100 μ M. El número de observaciones se indica entre paréntesis.

3.2.- Efectos de los antagonistas sobre las respuestas de la raíz ventral.

3.2.a.- Estimulación Unitaria. Reflejo monosináptico.

La perfusión de **verapamil** y **diltiazem** provocó un efecto depresor, concentración dependiente, en la amplitud del reflejo monosináptico registrado tras la aplicación de un estímulo de alta intensidad (*One-way ANOVA*, $p < 0.001$ ambos

casos). Verapamil y diltiazem produjeron curvas semejantes con reducciones significativas a una concentración 300 μM , si bien los efectos de verapamil fueron mayores (figura 51). En el caso de la perfusión de **nimodipina** no se observaron variaciones significativas, mostrándose todos los valores registrados muy cercanos al control inicial en todo el rango de concentraciones estudiado.

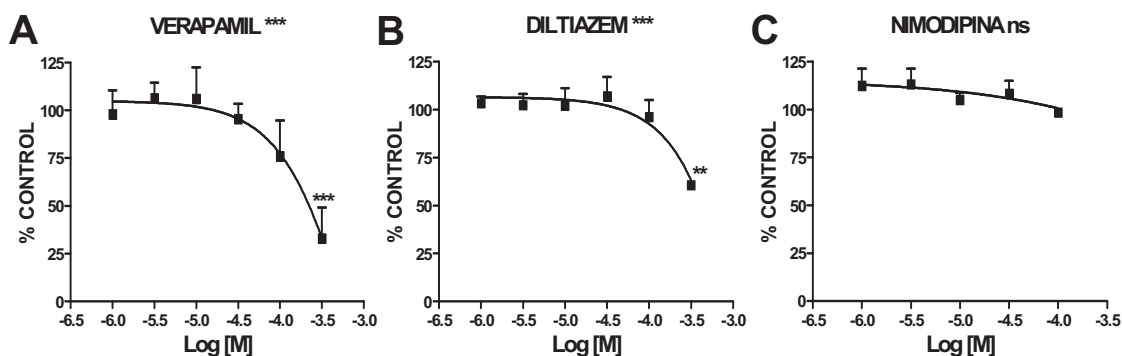


Figura 51.- Efecto de los bloqueantes de la corriente de calcio tipo L sobre la amplitud del RMS expresado como % del valor control \pm EEM, (A) verapamil, (B) diltiazem y (C) nimodipina.

3.2.b.- Estimulación Unitaria. Potenciales de Acción.

Verapamil y **diltiazem** mostraron de nuevo un fuerte efecto depresivo concentración dependiente (*One-way ANOVA*, $p < 0.001$) y curvas concentración-respuesta semejantes con porcentajes de reducción muy elevados y significativos para concentraciones de 100 y 300 μM (figuras 47 y 52).

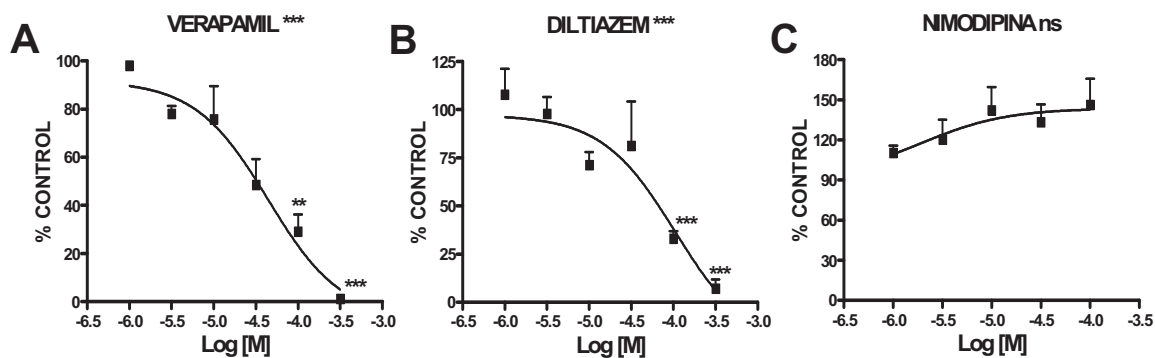


Figura 52.- Efecto de los bloqueantes de calcio de tipo L sobre el disparo de potenciales de acción de las motoneuronas en respuesta a estimulación unitaria. Las figuras **A** y **B** muestran el efecto depresor concentración dependiente de la perfusión de verapamil y diltiazem respectivamente. La figura **C** muestra el ligero aumento no significativo del disparo de potenciales de acción tras aplicar nimodipina.

En claro contraste con los potentes efectos de verapamil y diltiazem, **nimodipina** no produjo ningún efecto significativo, si bien se puede observar una tendencia hacia el incremento de la respuesta (figuras 47 y 52-C).

3.2.c.- Estimulación Unitaria. Área de la respuesta.

De forma similar al efecto sobre el disparo de potenciales de acción, verapamil y diltiazem produjeron una disminución significativa y concentración dependiente del área de la respuesta de las motoneuronas (*One-way ANOVA*, $p \leq 0.001$, figuras 47 y 53). La aplicación de nimodipina no produjo variaciones significativas sobre este parámetro, manteniendo en todos los puntos valores muy cercanos al control.

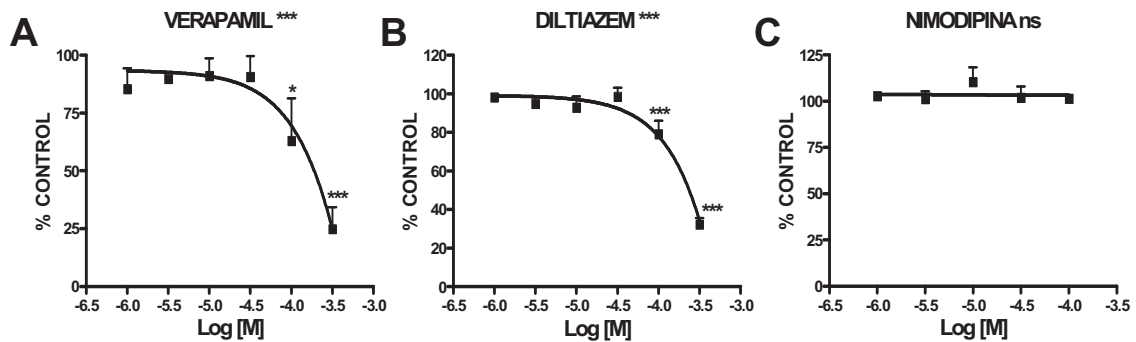


Figura 53.- Efecto de los bloqueantes de calcio de tipo L sobre el área de la respuesta de las motoneuronas. Las figuras **A** y **B** muestran el efecto depresor concentración dependiente de verapamil y diltiazem respectivamente. La figura **C** muestra el efecto nulo de nimodipina sobre el área acumulada en registros DC de la raíz ventral.

Al comparar la respuesta control con cada una de las concentraciones estudiadas, se observó que **verapamil** y **diltiazem** generaron variaciones muy escasas a concentraciones inferiores a 100 y 300 μM, siendo estas dos últimas concentraciones en las que sí se observaron variaciones significativas (ver significación en figura 53). A diferencia del disparo de potenciales de acción, verapamil y diltiazem 300 μM redujeron la respuesta control alrededor de un 75%, no llegando a anular por completo la respuesta.

La perfusión de **nimodipina** no alteró el área de despolarización de las motoneuronas a ninguna de las concentraciones estudiadas, permaneciendo siempre en valores cercanos al control (figura 53-C). Como en el caso del disparo de

potenciales de acción, nimodipina presentó una tendencia diferente a los efectos provocados por verapamil y diltiazem, aunque en este caso no se observó un aumento en los valores del parámetro estudiado, sino un mantenimiento del valor control inicial.

3.2.d.- Estimulación Repetitiva. Potenciales de acción.

A diferencia de lo que ocurrió con los otros parámetros estudiados anteriormente, el número de potenciales de acción disparados por las motoneuronas en respuesta a estimulación repetitiva se vio fuertemente reducido por los tres antagonistas. En todos los casos la reducción de las respuestas fue concentración dependiente (*One-way ANOVA*, $p \leq 0.001$, todos los casos). En la figura 49 se muestran registros originales en los que se puede apreciar la potente disminución de la respuesta debido a la perfusión de cada uno de los tres antagonistas.

Una vez más verapamil y diltiazem mostraron unas curvas concentración-respuesta prácticamente idénticas (figuras 54-A y 55-A). Ambos antagonistas produjeron reducciones significativas a las concentraciones de 30, 100 y 300 μM , y valores máximos de reducción próximos al 100 %. Al aplicar concentraciones de 100 y 300 μM se llegó a anular prácticamente por completo el disparo de potenciales.

El coeficiente de incremento de la respuesta sufrió una variación notablemente significativa tras la perfusión de verapamil y diltiazem (*One-way ANOVA*, $p \leq 0.001$ ambos casos, figura 54-B y 55-B). En ambos casos el valor del coeficiente de incremento control fue positivo, el cual disminuyó significativamente a valores negativos tras la perfusión de las concentraciones 30 y 100 μM (*Bonferroni post-test*, $p \leq 0.001$, todos los casos, valores en tabla 14).

En el caso de **nimodipina** se observó una disminución significativa del disparo motoneuronal a partir de la perfusión de nimodipina 10 μM (*Bonferroni post-test*, $p \leq 0.01$). De igual forma la perfusión de nimodipina 30 y 100 μM produjo una reducción significativa de la respuesta (*Bonferroni post-test*, $p \leq 0.001$, ambos casos). Cabe destacar que durante la perfusión de nimodipina 1 μM la respuesta control se redujo en un $27.3 \pm 7.6\%$, y por esta razón se amplió el rango de concentraciones de nimodipina hasta 100 nM (figura 56-A). A diferencia de verapamil y diltiazem, el efecto inhibitorio de nimodipina se observó a una concentración inferior (10 μM), aunque su aplicación a la concentración máxima de 100 μM mostró una reducción de la respuesta

porcentualmente inferior a la mostrada por la misma concentración de diltiazem y verapamil, ya que la máxima reducción mostrada por nimodipina no superó el 75% del valor control inicial.

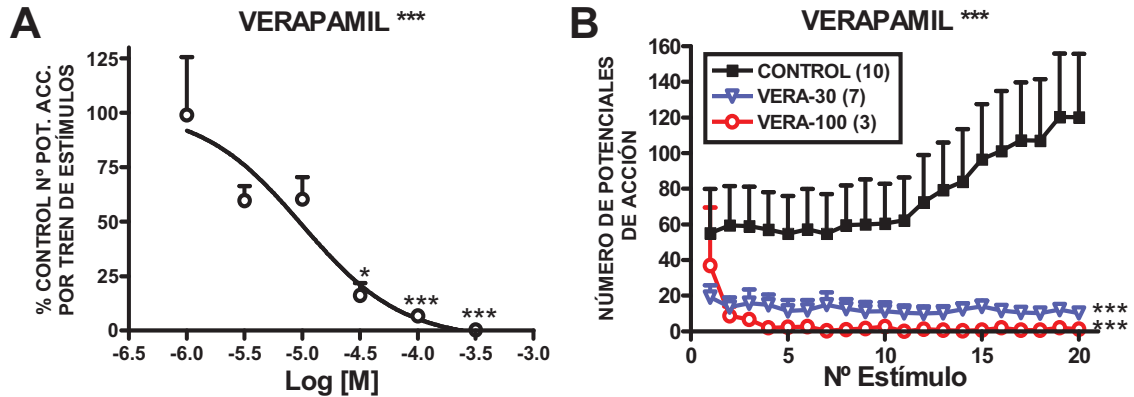


Figura 54.- Efecto de verapamil sobre el disparo de potenciales de acción de las motoneuronas tras la estimulación repetitiva de la raíz dorsal. La figura **A** muestra el efecto concentración-dependiente sobre el número total de potenciales de acción expresado como % del valor control \pm EEM. La figura **B** muestra el número medio de potenciales de acción \pm EEM registrados en la raíz ventral en cada estímulo del tren, así como los efectos de la perfusión de verapamil 30 μ M y 100 μ M. El número de observaciones se indica entre paréntesis.

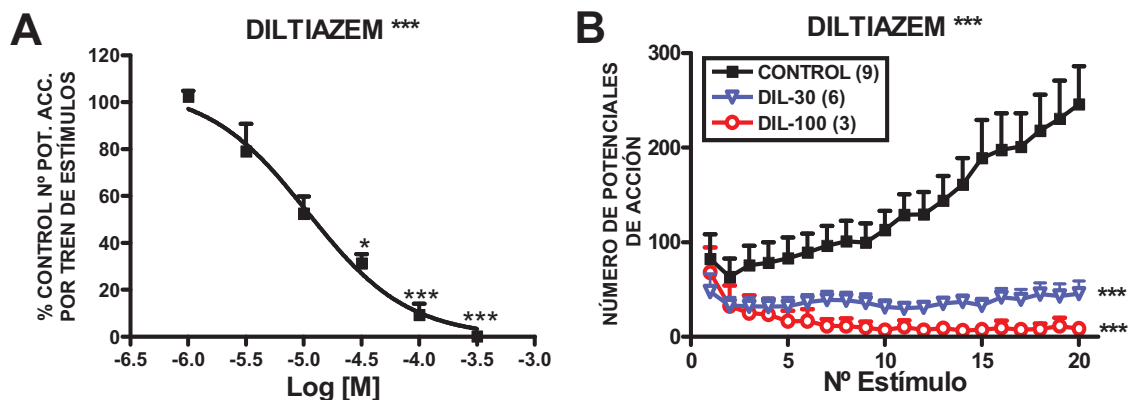


Figura 55.- Efecto de diltiazem sobre el disparo de potenciales de acción de las motoneuronas tras la estimulación repetitiva de la raíz dorsal. La figura **A** muestra el efecto concentración-dependiente sobre el número total de potenciales de acción expresado como % del valor control \pm EEM. La figura **B** muestra el número medio de potenciales de acción \pm EEM registrados en la raíz ventral en cada estímulo del tren, así como los efectos de la perfusión de diltiazem 30 μ M y 100 μ M. El número de observaciones se indica entre paréntesis.

El coeficiente de incremento de la respuesta control también se vio modificado significativamente tras la perfusión de nimodipina (*One-way ANOVA*, $p \leq 0.001$, tabla

14). Hay que destacar que nimodipina 30 y 100 μM redujeron significativamente el coeficiente de incremento control, pero nunca llegó este parámetro a mostrar valores negativos (*Bonferroni post-test*, $p \leq 0.001$, ambos casos, figura 56-B). El perfil de la respuesta registrada tras la perfusión de nimodipina 30 μM fue creciente, a diferencia de los perfiles observados tras el paso de la misma concentración de verapamil y diltiazem (figuras 54-B, 55-B y 56-B).

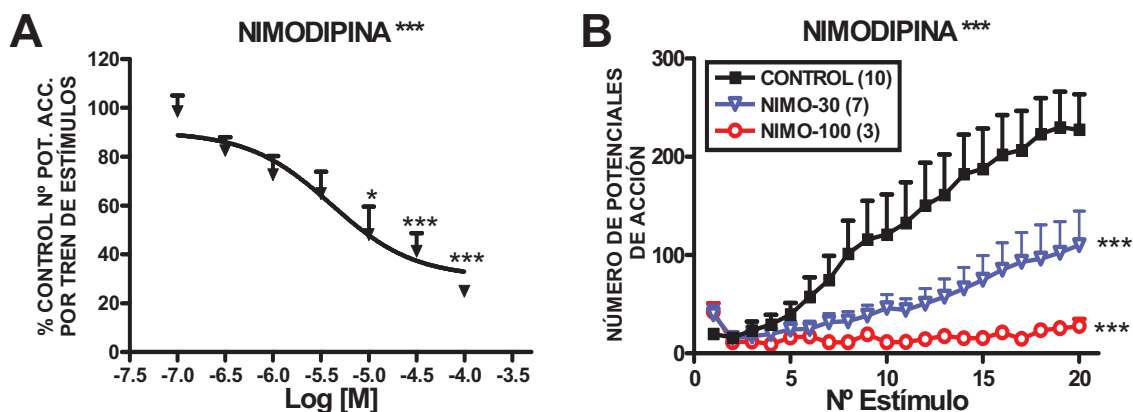


Figura 56.- Efecto de nimodipina sobre el disparo de potenciales de acción de las motoneuronas tras la estimulación repetitiva de la raíz dorsal. La figura A muestra el efecto concentración-dependiente sobre el número total de potenciales de acción expresado como % del valor control \pm EEM. La figura B muestra el número medio de potenciales de acción \pm EEM registrados en la raíz ventral en cada estímulo del tren, así como los efectos de la perfusión de nimodipina 30 μM y 100 μM . El número de observaciones se indica entre paréntesis.

| Coef. Incremento (pot./s) | Control | 30 μM | 100 μM |
|---------------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| Verapamil | 5.55 \pm 2.0 | -0.5 \pm 0.2 *** | -1.8 \pm 1.0 *** |
| Diltiazem | 7.4 \pm 1.9 | -0.1 \pm 0.9 *** | -3.2 \pm 1.1 *** |
| Nimodipina | 10.3 \pm 1.3 | 3.4 \pm 1.5 *** | 0.8 \pm 0.2 *** |

Tabla 14.- Valores del coeficiente de incremento medio del disparo de potenciales de acción por parte de las motoneuronas en situación control, así como tras la aplicación de verapamil, diltiazem y nimodipina a concentraciones de 30 y 100 μM , (test posterior de Bonferroni respecto al control, *** $p < 0.001$).

3.2.e.- Estimulación Repetitiva. Área Acumulada.

Los efectos de los antagonistas sobre el área acumulada en las respuestas DC de las raíces ventrales fueron similares a los observados sobre el disparo de potenciales de acción de los axones ascendentes. Verapamil, diltiazem y nimodipina

mostraron un efecto depresor significativo, concentración dependiente, sobre el área acumulada por la despolarización de la respuesta de las motoneuronas a la estimulación repetitiva (*One-way ANOVA*, $p \leq 0.001$, para verapamil y diltiazem; $p \leq 0.01$ para nimodipina).

La perfusión de **verapamil** y **diltiazem** produjo una disminución significativa de la despolarización acumulada cuando se aplicaron a concentraciones de 100 y 300 μM , mostrando unas curvas de reducción de la respuesta muy similares (significación en figuras 57-A y 58-A). En ambos casos se produjeron reducciones máximas cercanas al 80 % del valor control.

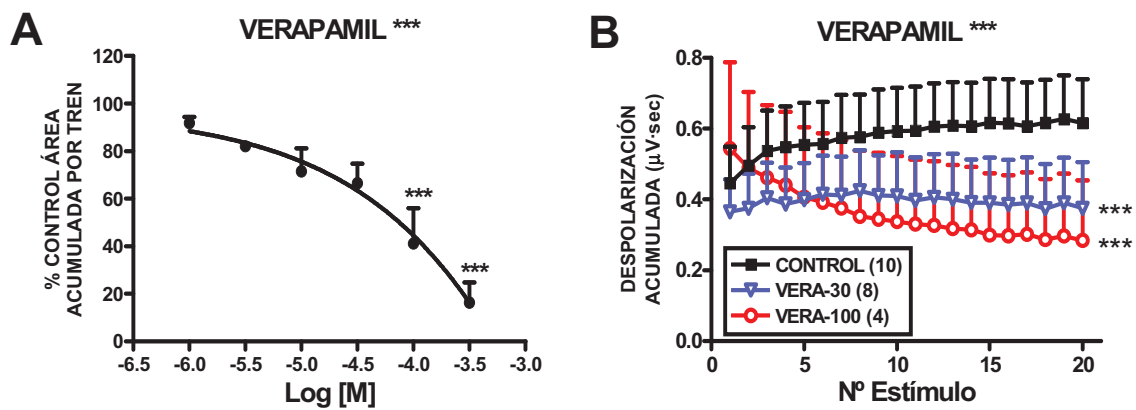


Figura 57.- La figura **A** muestra el efecto concentración-dependiente de verapamil sobre el área acumulada (expresado como % del control \pm EEM). La figura **B** muestra el área acumulada media \pm EEM registrada para cada estímulo del tren y los efectos de verapamil 30 μM y 100 μM .

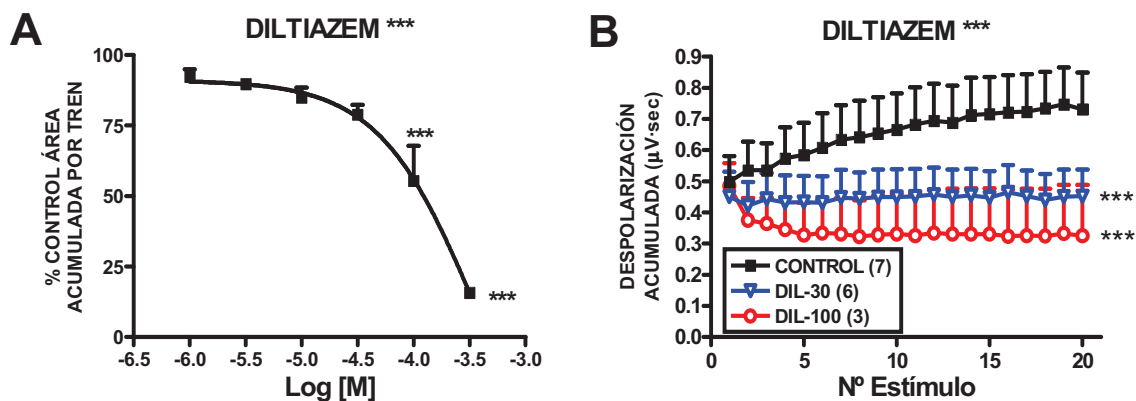


Figura 58.- La figura **A** muestra el efecto concentración-dependiente de diltiazem sobre el área acumulada (expresado como % del control \pm EEM). La figura **B** muestra el área acumulada media \pm EEM registrada para cada estímulo del tren y los efectos de diltiazem 30 y 100 μM .

Verapamil y diltiazem también produjeron un efecto similar sobre el coeficiente de incremento de la respuesta, el cual se vio significativamente reducido por la aplicación de los dos antagonistas (*One-way ANOVA*, $p \leq 0.001$). Este coeficiente pasó de un valor control positivo a unos valores incluso negativos tras la perfusión de la concentración 100 μM (figura 57-B y 58-B, valores en tabla 15).

La perfusión de **nimodipina** no conllevó una disminución tan clara en el área acumulada como los dos antagonistas anteriores, únicamente nimodipina 100 μM fue capaz de disminuir significativamente la despolarización acumulada control en un $17.0 \pm 6.2\%$ (*Bonferroni post-test*, $p \leq 0.05$, figura 59-A). En el resto de concentraciones estudiadas la reducción del área es inferior al 13% y no significativa. De forma similar, el coeficiente de incremento de la respuesta control varió significativamente tras la aplicación de nimodipina (*One-way ANOVA*, $p \leq 0.01$), aunque únicamente se observaron variaciones significativas respecto al control tras la perfusión de nimodipina 100 μM (figura 59-B, valores en tabla 15).

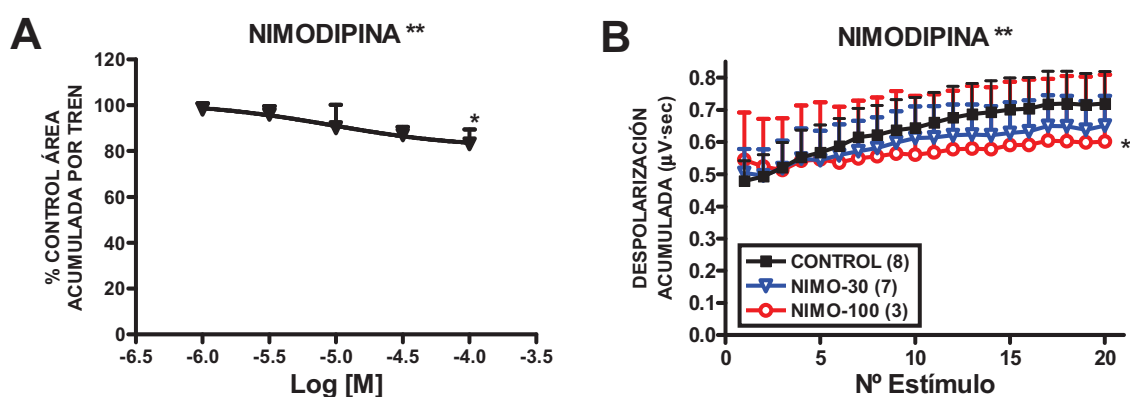


Figura 59.- La figura **A** muestra el efecto concentración-dependiente de nimodipina sobre el área acumulada (expresado como % del control \pm EEM). La figura **B** muestra el área acumulada media \pm EEM registrada para cada estímulo del tren y los efectos de nimodipina 30 y 100 μM .

| Coef. Incremento (μV) | Control | 30 μM | 100 μM |
|------------------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|
| Verapamil | 0.01 ± 0.003 | 0.0006 ± 0.003 *** | -0.01 ± 0.005 *** |
| Diltiazem | 0.013 ± 0.002 | 0.0001 ± 0.002 *** | -0.009 ± 0.006 *** |
| Nimodipina | 0.013 ± 0.002 | 0.008 ± 0.002 | 0.003 ± 0.001 * |

Tabla 15.- Valores del coeficiente de incremento medio del área acumulada por parte de las motoneuronas en situación control, así como tras la aplicación de verapamil, diltiazem y nimodipina a las concentraciones indicadas, (test posterior de Bonferroni respecto al control, *** $p < 0.001$).

3.3.- Comparación de los efectos de los antagonistas de la corriente L sobre la respuesta a estimulación repetitiva.

En este apartado se relacionan los efectos de verapamil, diltiazem y nimodipina sobre la respuesta de los axones ascendentes y las motoneuronas a la estimulación repetitiva, para mostrar sus efectos sobre los procesos de *wind up* o suma progresiva de la respuesta (figura 60).

En las figuras 60-A y C, en las que se muestra respectivamente la reducción del disparo de potenciales de acción por los axones ascendentes y el área acumulada de la respuesta de las motoneuronas, se observó que en el rango de concentraciones de 1-30 μM los tres antagonistas dibujaban una curva muy similar que incluso se solapa en algunos puntos. Es a partir de la concentración 100 μM cuando nimodipina se distanció de los otros dos antagonistas mostrando reducciones considerablemente inferiores de la respuesta, mientras que verapamil y diltiazem continuaron mostrando curvas prácticamente idénticas.

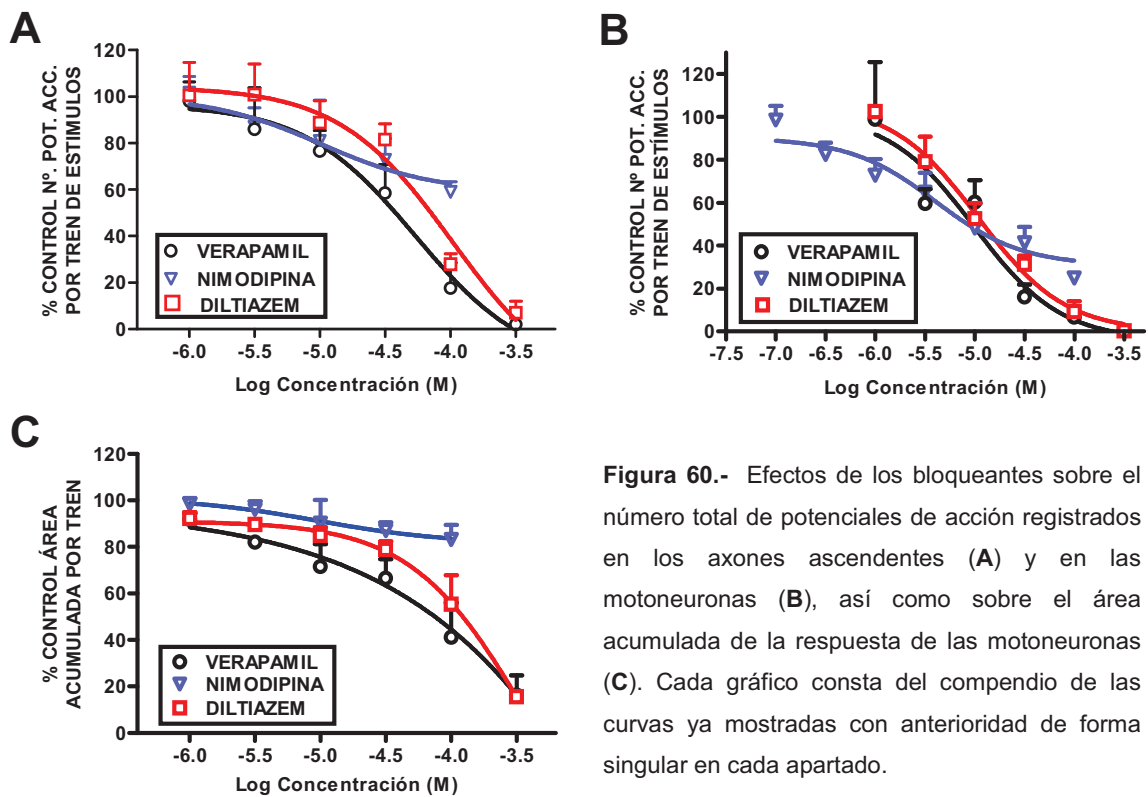


Figura 60.- Efectos de los bloqueantes sobre el número total de potenciales de acción registrados en los axones ascendentes (A) y en las motoneuronas (B), así como sobre el área acumulada de la respuesta de las motoneuronas (C). Cada gráfico consta del compendio de las curvas ya mostradas con anterioridad de forma singular en cada apartado.

En el caso del disparo de potenciales de acción por las motoneuronas (figura 60-B), verapamil y diltiazem volvieron a mostrar unas curvas idénticas, pero nimodipina mostró unos efectos considerablemente diferentes a los que presentó para los otros parámetros. La curva dibujada por nimodipina mostró un punto de inflexión en la concentración de 10 μM , punto en el que coincide con las curvas de los otros dos antagonistas. A concentraciones inferiores a 10 μM nimodipina presentó una mayor reducción de la respuesta respecto a verapamil y diltiazem, efecto que pasó a ser menor en las concentraciones de 30 y 100 μM , aunque en estos dos últimos puntos las diferencias de reducción de la respuesta respecto a los otros dos antagonistas no fueron tan patentes como en el resto de parámetros estudiados.

Por lo tanto se puede considerar que nimodipina mostró un efecto reductor de estas respuestas considerablemente superior con respecto al resto de parámetros estudiados. Mientras verapamil y diltiazem presentaron un fuerte efecto reductor de todos los parámetros estudiados, nimodipina mostró un efecto muy selectivo sobre el disparo de potenciales de acción a estímulos repetitivos a través de las vías motoras. Esta selectividad de nimodipina frente al efecto generalizado de diltiazem y verapamil quedó cuantitativamente establecida en la tabla 16.

| (μM) | Axones Ascendent. | | Motoneuronas | | | | |
|-----------------|--------------------|----------------|--------------|--------------------|---------------|----------------|----------------|
| | Pot. Acc. Unitario | Pot. Acc. Tren | RMS | Pot. Acc. Unitario | Área Unitario | Pot. Acc. Tren | Área Acu. Tren |
| Verapamil | 100 | 100 | 300 | 100 | 100 | 30 | 100 |
| Diltiazem | 30 | 100 | 300 | 100 | 100 | 30 | 100 |
| Nimodipina | ns | 100 | ns | ns | ns | 10 | 100 |

Tabla 16.- Valores de la concentración mínima que provoca un efecto significativo para cada uno de los antagonistas respecto a cada parámetro estudiado, en la respuesta de axones ascendentes y motoneuronas. Los valores se muestran en concentración μM (ns, no significativo).

3.4.- Comparación de los efectos de los antagonistas de la corriente L sobre la vía sensorial y la vía motora.

Para estudiar las variaciones en los efectos provocados por los diferentes antagonistas sobre las vías sensorial y motora, se realizó una comparación ANOVA de dos vías entre los efectos de los antagonistas sobre la vía ascendente y la vía motora

a través de los datos normalizados mostrados en las figuras 60-A y B, en las que el número total de potenciales de acción de ambas vías se consideró en función de la concentración del antagonista. De acuerdo con estos análisis, diltiazem, verapamil y nimodipina presentaron resultados significativamente superiores en la inhibición de la señal motora respecto a la inhibición de la respuesta sensorial ascendente (en todos los casos $p < 0.05$, interacción no significativa).

Se sabe que los antagonistas de la corriente L bloquean las respuestas de tipo *wind up* provocadas por estimulación repetitiva (Perrier y col., 2002). Por lo tanto, las diferencias detectadas en este análisis podrían ser debidas al hecho de que se han registrado respuestas tipo *wind-up* en la raíz ventral, pero no ha sido posible en los axones ascendentes. Para resolver esta posible confusión se consideró el efecto de los antagonistas en las respuestas a los 5 primeros estímulos del tren, ya que en este corto intervalo de 5 segundos todavía no se ha desencadenado el efecto *wind-up* en la vía motora.

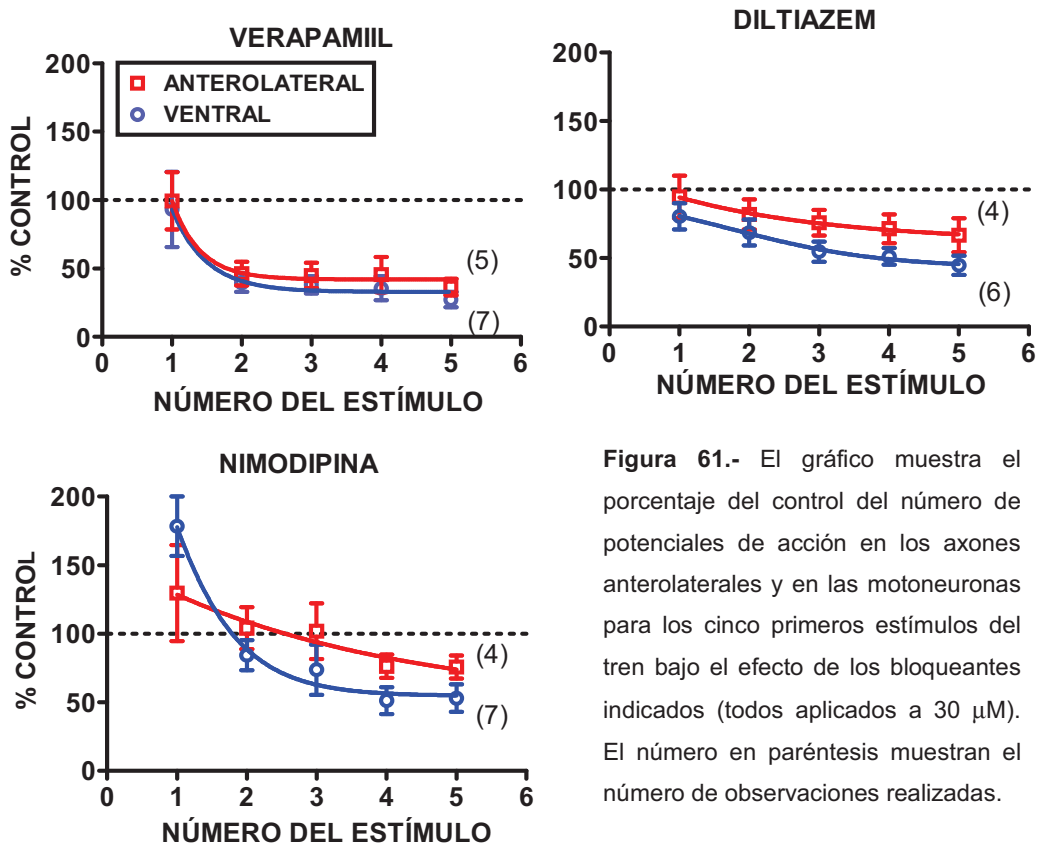


Figura 61.- El gráfico muestra el porcentaje del control del número de potenciales de acción en los axones anterolaterales y en las motoneuronas para los cinco primeros estímulos del tren bajo el efecto de los bloqueantes indicados (todos aplicados a 30 μ M). El número en paréntesis muestran el número de observaciones realizadas.

Para este análisis los potenciales de acción provocados por cada estímulo fueron representados como el porcentaje de su correspondiente valor control, para ser posteriormente promediados. Sobre estos datos se realizaron análisis de regresión lineal y no lineal. Para los antagonistas aplicados a una concentración de 10 y 30 μM el mejor ajuste fue obtenido con un modelo de caída exponencial en todos los casos ($R^2 > 0.74$ y $R^2 > 0.94$ respectivamente, ver figura 61). Los tres antagonistas mostraron menores efectos inhibitorios en la respuesta del primer estímulo respecto a las siguientes respuestas, a pesar de que en esta temprana fase de la estimulación repetitiva todavía no se ha activado el proceso de suma progresiva. De la misma forma, los efectos de todos los antagonistas parecen ser mayores en la respuesta motora que en la respuesta de axones ascendentes, aunque estas diferencias no fueron significativas. Como dato peculiar, la aplicación de nimodipina 30 μM produce una aparente potenciación de la respuesta al primer estímulo del tren, hecho que también se observa con la aplicación de nimodipina 10 μM aunque en menor grado.

4.- DISCUSIÓN.

En los experimentos descritos se han utilizado registros simultáneos de neuronas motoras y sensoriales para comparar las sensibilidad de ambas vías a una serie de moduladores de las corrientes de calcio de tipo L, representativos de las principales familias de compuestos activos sobre esta diana. La idea general que emana de los resultados obtenidos es que la vía motora es fuertemente inhibida por estos moduladores, mientras que la vía ascendente teóricamente sensorial que proyecta a lo largo del cuadrante anterolateral, es comparativamente menos sensible a estos moduladores.

Verapamil y diltiazem mostraron efectos depresores significativos sobre la actividad en axones ascendentes únicamente a concentraciones muy altas ($\geq 100 \mu\text{M}$). Existe evidencia experimental que indica que a estas altas concentraciones la selectividad de verapamil y diltiazem por las corrientes de calcio tipo L podría estar comprometida (Dobrev y col., 1999). Por el contrario, la dihidropiridina nimodipina, que presenta una mayor selectividad para las corrientes de tipo L (Diochot y col., 1995; Dobrev y col., 1999), produjo un efecto muy escaso sobre las vías ascendentes. Este efecto se manifestó a altas concentraciones y afectó sólo a las respuestas a estimulación repetitiva. El hecho de que verapamil y diltiazem hayan mostrado mayores efectos que nimodipina sobre la vía ascendente, teniendo considerablemente

menos afinidad por las corrientes de tipo L, sugiere que estos compuestos producen sus efectos actuando en parte a través de dianas no específicas como podrían ser otros canales iónicos (Diochot y col., 1995; Dobrev y col., 1999). Un respaldo adicional para esta interpretación proviene de la observación de que verapamil y diltiazem reducen la amplitud del reflejo monosináptico, el cual representa una respuesta muy rápida en la que no deberían estar involucradas las corrientes de calcio de tipo L.

Los resultados muestran que los moduladores de la corriente de calcio de tipo L pueden tener un modesto efecto sobre las neuronas sensoriales y de forma simultánea un efecto considerable sobre las vías motoras, como demuestran las concentraciones eficaces mínimas obtenidas tras estimulación repetitiva (tabla 16). Los efectos de nimodipina cuadran en esta visión general. Aplicado a un rango amplio de concentraciones, este compuesto produjo una pequeña reducción de la actividad en vías ascendentes, y una mayor reducción de la respuesta en la vía motora. De forma similar diltiazem y verapamil aplicados a bajas concentraciones, mostraron un perfil de acción muy similar al mostrado por nimodipina. Aplicados a mayores concentraciones, estos compuestos pudieron haber producido efectos no selectivos sobre un número variable de dianas, pero aún así sus efectos sobre las vías motoras fueron superiores a los observados en la vía sensorial. Los resultados mostrados indican que las vías motoras fueron más sensibles a los bloqueantes de las corrientes de tipo L que las vías sensoriales anterolaterales. En consonancia con esta observación, estudios comportamentales mostraron que la aplicación de bloqueantes de la corriente L puede interferir fuertemente con la función motora (Hara y col., 1998).

La variable más sensible en nuestro estudio a los antagonistas fue el número de potenciales de acción registrados en respuestas a estimulación repetitiva en las vías motoras. Verapamil y diltiazem mostraron una concentración eficaz mínima de 30 μM mientras que en otras variables se requirieron concentraciones de 100 a 300 μM (ver tabla 16). De forma similar nimodipina mostró una concentración eficaz mínima de 10 μM en esta variable, mientras que en la mayoría de las otras variables estudiadas no produjo efectos significativos. Esto sugiere que los CCDV de tipo L pueden jugar un papel de importancia en los procesos de suma progresiva del disparo de potenciales en situaciones de estimulación sostenida como indican otros estudios (Perrier y col., 2002; Morisset y Nagy, 2000).

Hay una serie de cuestiones que necesitan ser discutidas. Las presentes condiciones experimentales pueden restarle importancia al papel de las corrientes de

calcio de tipo L en el procesamiento sensorial de la médula espinal debido a la corta edad de los animales estudiados o a peculiaridades de la médula espinal del ratón. Este no debe ser el caso ya que en experimentos previos que han utilizado ratas adultas *in vivo*, se observa que los moduladores de las corrientes L tienen poco efecto sobre las respuestas de neuronas del asta dorsal a estímulos nociceptivos (Neugebauer y col., 1996; Díaz y Dickenson, 1997). Además, estudios de comportamiento en ratas adultas mostraron que las dihidropiridinas son menos efectivas que verapamil o diltiazem para reducir las respuestas a estímulos nociceptivos persistentes (Malmberg y Yaksh, 1994), sugiriendo que los efectos no selectivos de estos compuestos pueden ser relevantes para su actividad analgésica. Por lo tanto creemos que nuestro modelo refleja ciertas características estructurales del procesamiento espinal, común en ratas y ratones, que está presente en animales de corta edad.

Es posible pensar que los compuestos utilizados no difunden correctamente en el interior de la médula espinal y que las motoneuronas se ven más afectadas por los antagonistas. Creemos que este factor debe haber sido minimizado en los presentes experimentos porque todos los compuestos se han perfundido durante periodos prolongados. Nosotros creemos que la diferente sensibilidad detectada en las dos vías se debe a otros factores. Dadas las presentes condiciones experimentales, lo más probable es que los antagonistas hayan alcanzado neuronas en astas dorsal y ventral de forma semejante. Dado que las neuronas en ambas áreas poseen CCDVs, podría ocurrir que las diferencias se deban a la densidad y variedad de canales que cada área expresa. Un factor adicional se deriva de la propia arquitectura de la médula espinal, puesto que las motoneuronas reciben información de interneuronas dorsales, aquellas podrían verse doblemente afectadas por los efectos de los compuestos en el área dorsal sumados a los efectos en las propias motoneuronas.

Investigaciones previas han mostrado que las corrientes de calcio de tipo L son importantes para la generación de respuestas de tipo *wind-up* a la estimulación repetida (Morisset y Nagy, 2000; Perrier y col., 2002). Otra posible razón para explicar la diferente sensibilidad a antagonistas de corrientes L en vías motoras y sensoriales es la ausencia de respuestas de tipo *wind-up* en la vía sensorial. En los dos estudios que hemos realizado con este modelo *in vitro* se ha observado un bajo número de axones anterolaterales que presenten respuestas tipo *wind-up*, lo cual puede ser debido a varias causas ya discutidas (apartado 4 del capítulo 1). Nosotros hemos observado que nimodipina, así como los otros dos otros antagonistas de corriente L

perfundidos a concentraciones bajas, a las que sus efectos son teóricamente específicos, producen una caída exponencial de la respuesta a los primeros estímulos del tren en los que aún no se ha desarrollado el efecto sumatorio del *wind-up*. Nuestros resultados sugieren que el bloqueo de canales de calcio tipo L dificulta que las neuronas de la médula espinal produzcan disparos sostenidos durante periodos de segundos. Por supuesto que este efecto podría contribuir a bloquear el efecto *wind up* de forma muy efectiva (Herrero y col., 2000; Fossat y col., 2007).

La conclusión general de este estudio es que los antagonistas de los canales de calcio de tipo L dificultan la capacidad de las neuronas espinales para producir descargas sostenidas en respuesta a la activación sináptica repetitiva. Este efecto aparece en vías sensoriales y de forma más marcada en vías motoras, posiblemente debido a un efecto acumulativo. Los antagonistas utilizados pueden mostrar ciertos efectos analgésicos actuando sobre dianas selectivas y no selectivas localizadas en neuronas sensoriales, sin embargo su potencial como analgésicos se vería muy limitado por sus efectos no deseados sobre el sistema motor.

RESULTADOS. CAPÍTULO IV:

Estudio del efecto del agonista de la corriente de calcio de tipo L Bay K8644 sobre la actividad en vías sensoriales y motoras de la médula espinal de ratón.

1.- INTRODUCCIÓN.

La despolarización de la membrana por encima de un determinado umbral conlleva la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, lo que conduce a un rápido incremento en la concentración intracelular de calcio. La situación preferente de los canales de calcio de tipo L está en las membranas postsinápticas, participando más en la regulación de procesos intracelulares dependientes de calcio que en la rápida transmisión sináptica (Heinke y col., 2004). Esta situación postsináptica no resta importancia a la función de estos canales, ya que participan en la regulación de la excitabilidad, en procesos de neuroplasticidad y expresión génica (Schaible y col., 2000).

Por otra parte la entrada de calcio en las neuronas de la médula espinal juega un papel importante en los procesos de hiperexcitabilidad, ya que los antagonistas de los canales NMDA previenen e incluso bloquean estos procesos con gran eficiencia (Schaible y col., 2000). Debido a las cinéticas lentas de los canales de calcio de tipo L junto a su falta de inactivación, su activación por despolarización provoca una corriente de entrada persistente y estable durante una despolarización mantenida (Perrier y col., 2002), la cual podría también participar en procesos de hiperexcitabilidad de forma autónoma o en colaboración con otras vías de entrada de calcio como los receptores de rianodina (Chavis y col., 1996; Wang y col., 2001).

La antinocicepción provocada por opioides está relacionada con los niveles de calcio en el sistema nervioso central, de forma que los agentes que incrementan los niveles de calcio citosólico en neuronas bloquean esta actividad antinociceptiva (Dogrul y col., 2001). Respecto a la transmisión nociceptiva, el influjo de calcio parece ser crítico en modelos de dolor persistente donde se presentan procesos de sensibilización y plasticidad (Coderre y col., 1993).

En relación a la regulación de la expresión génica, se ha observado que la entrada de calcio en neuronas del hipocampo a través de los canales NMDA y CCDV de tipo L, participa en la transmisión de señales al núcleo celular para regular la transcripción génica a través de dos vías de señalización de calcio distintas (Bading y col., 1993). De esta forma la entrada de calcio a través de diferentes canales puede activar procesos bioquímicos de forma diferencial, y así controlar diversas funciones celulares.

En estudios realizados utilizando del test de formalina, se ha observado que la administración intratecal de nifedipina, verapamil o diltiazem de forma previa a la aplicación de formalina, sólo reduce el comportamiento nociceptivo en la fase tardía, resultado en concordancia con la aplicación intratecal de Bay K8644, el cual aumenta el comportamiento nociceptivo en las fases intermedia y tardía de este test de formalina. De esta forma ninguno de estos agentes son capaces de variar la fase temprana del test (Coderre y Melzack, 1992; Malmberg y Yaksh, 1994), por lo que los CCDV de tipo L podrían estar involucrados en los cambios que se dan en procesos de sensibilización central.

La dihidropiridina Bay K8644 es un agonista de los CCDV de tipo L que aumenta el tiempo medio de apertura del canal (Hess y col., 1984), permitiendo un incremento de los niveles de calcio intracelular que podría variar la regulación de la excitabilidad neuronal. Los diferentes antagonistas y agonistas de tipo dihidropiridina parecen actuar en diferentes dominios de estos canales, pero relacionados de forma alostérica (O'Neill y col., 1994).

El objetivo del presente capítulo es conocer si el aumento de la entrada de calcio al interior neuronal debido a la aplicación del agonista Bay K8644, puede afectar a la transmisión nerviosa de las vías sensoriales y motoras de la médula espinal.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

Los experimentos se llevaron a cabo en 18 médulas espinales extraídas de ratones con una edad comprendida entre 7 y 14 días, con un peso que oscila entre 3.5 y 7.9 gramos. Los procedimientos generales de extracción y registro de la médula espinal ya han sido descritos en la sección de materiales y métodos generales (apartado 5, página 41).

2.1.- Protocolo Experimental.

El agonista S (-) Bay K8644 (Sigma-Aldrich, España) se disolvió a alta concentración en DMSO, se alícuota y almacena a -20 °C hasta su uso, momento en el cual se disuelve en el LCFA y se aplica a la preparación en una sola concentración de 2 μ M durante 20 minutos en todos los casos. La aplicación de Bay K8644 en el baño comenzó tras el registro de tres respuestas control (figura 62).

El protocolo básico de estudio se basa en la aplicación de un test de estímulos eléctricos cada 20 minutos, cada uno de los cuales consta de un estímulo unitario separado por 120 segundos de un estímulo repetitivo, ambos de alta intensidad (200 μ A y 200 μ s). Los tres primeros test sirvieron para evaluar la respuesta control, tras los cuales se aplicó Bay K8644 2 μ M y se realizó un seguimiento de los efectos durante 3 horas de lavado (figura 62).

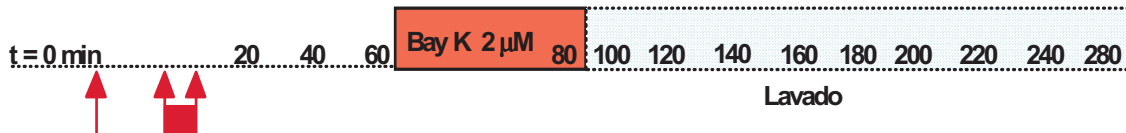


Figura 62.- El gráfico muestra el protocolo básico empleado para el estudio del agonista Bay K8644. En cada punto temporal indicado se aplica un test de estímulos constituido por un test unitario y otro repetitivo de alta intensidad (200 μ A y 200 μ s). Para más información ver la sección de protocolo experimental (página 134).

En un segundo experimento realizado para conocer el efecto de Bay K8644 sobre la respuesta a diferentes intensidades, se aplicaron trenes de estimulación empleando duraciones fijas de 200 μ s e intensidades variables, de 20 y 30 μ A para activar sólo axones mielinizados, 60 μ A como estímulo ligeramente superior a la activación de axones tipo C, y un último estímulo de 200 μ A para activar todo tipo de fibras aferentes mielinizadas y no mielinizadas (este último estímulo fue idéntico al empleado en el apartado anterior).

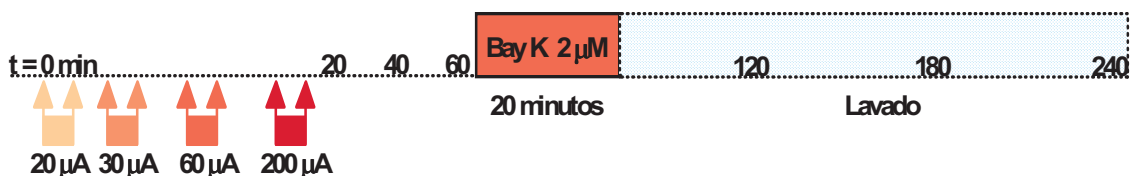


Figura 63.- El gráfico muestra el protocolo empleado para el estudio del efecto del agonista Bay K8644 sobre estimulación repetitiva de diferente intensidad. En cada punto temporal indicado se aplica un test de estímulos. Para más información ver la sección de protocolo experimental (página 134).

Cada test consistió en cuatro trenes de 20 estímulos a 1 Hz, de 20, 30, 60 y 200 μ A de intensidad respectivamente, entre los cuales se dejó una separación

temporal de 1, 2 y 3 minutos respectivamente (figura 63). Previamente a la perfusión de Bay K8644 se aplicaron tres test de estimulación control, realizados cada uno de ellos con una separación temporal de 20 minutos. Este mismo test se volvió a aplicar tras la perfusión de Bay K8644 cada 60 minutos para estudiar el curso temporal del efecto, hasta un tiempo total de 180 minutos de lavado (figura 63).

En el tercer experimento se buscó conocer el posible bloqueo del efecto generado por la aplicación de Bay K8644 perfundiendo el antagonista diltiazem. Para ello se aplicó un test cada 20 minutos, el cual consistió en dos trenes de estímulos: el primer tren se aplicó con una intensidad de 20 μA , y tras 100 segundos de separación se aplicó un segundo tren con una intensidad de 200 μA . El resto de las características del tren de estímulos fueron las mismas que las empleadas en otros apartados: 20 estímulos a 1 Hz y una duración de cada estímulo de 200 μs . Después de tres test control iniciales se perfundió Bay K8644 2 μM durante 20 minutos, tras lo cual se procedió a lavar el agonista durante 60 minutos, y posteriormente se procedió a perfundir diltiazem 30 μM durante 40 minutos, por último se realizó un lavado final de otros 40 minutos (figura 64).

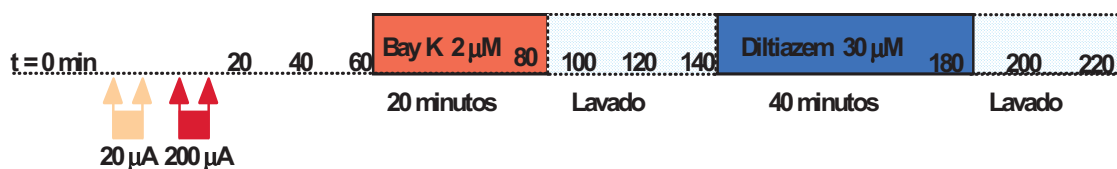


Figura 64.- El gráfico muestra el protocolo empleado para el estudio del bloqueo del efecto del agonista Bay K8644 por parte del antagonista diltiazem. En cada punto temporal indicado se aplica un test de estímulos. Más información en el texto.

2.2.- Tratamiento de los Datos.

Los efectos de la aplicación de Bay K8644 se analizaron substrayendo los correspondientes valores control de aquellos obtenidos tras la aplicación del agonista. Los valores control fueron previamente comparados con variaciones aleatorias entre pares de respuestas control obtenidas con anterioridad a la aplicación de Bay K8644. Los diferentes parámetros medidos en las respuestas se representan en los gráficos como la media del porcentaje respecto al control (\pm error estándar de la media, EEM), o como la media de los valores originales registrados. El ajuste a la curva y el cálculo

del Log CI_{50} (\pm EEM) se realizaron utilizando software comercial para análisis estadístico (GraphPad Software Inc., CA, USA). La comparación de las medias mediante diferentes cálculos estadísticos como el ANOVA o *t*-test se realizaron utilizando el mismo software.

3.- RESULTADOS.

3.1.- Efectos de Bay K8644 en las respuestas de los axones ascendentes.

Los efectos de la aplicación de Bay K8644 se estudiaron en 8 médulas espinales, en las que se obtuvieron registros simultáneos de la respuesta de motoneuronas y axones ascendentes en todos los casos, siendo 2 axones clasificados como tipo A, 5 como tipo B y 1 como tipo C.

3.1.a.- Estimulación Unitaria.

En un solo caso se observó un fuerte incremento del disparo de potenciales de acción tras la aplicación de Bay K8644 en un axón clasificado como tipo B (figura 65).

En el resto de los axones la perfusión de Bay K8644 no produjo variaciones significativas en el número de potenciales de acción disparados como respuesta a estimulación unitaria (*One-way ANOVA*). Tras la aplicación del agonista el número de potenciales disparados sufrió pequeñas variaciones aleatorias que no dieron lugar a crear una tendencia clara (figura 66-A).

3.1.b.- Estimulación Repetitiva.

Al igual que en el apartado anterior, en siete de los ocho axones estudiados la aplicación de Bay K8644 no presentó efectos significativos en el número de potenciales de acción disparados tras estimulación repetitiva (*One-way ANOVA*), aunque sí se observó una ligera disminución del disparo durante los lavados posteriores. De esta forma, a partir de los 60 minutos de lavado se observó que el disparo de potenciales de acción cayó alrededor de un 30%, aunque de forma no significativa (figura 66-B).

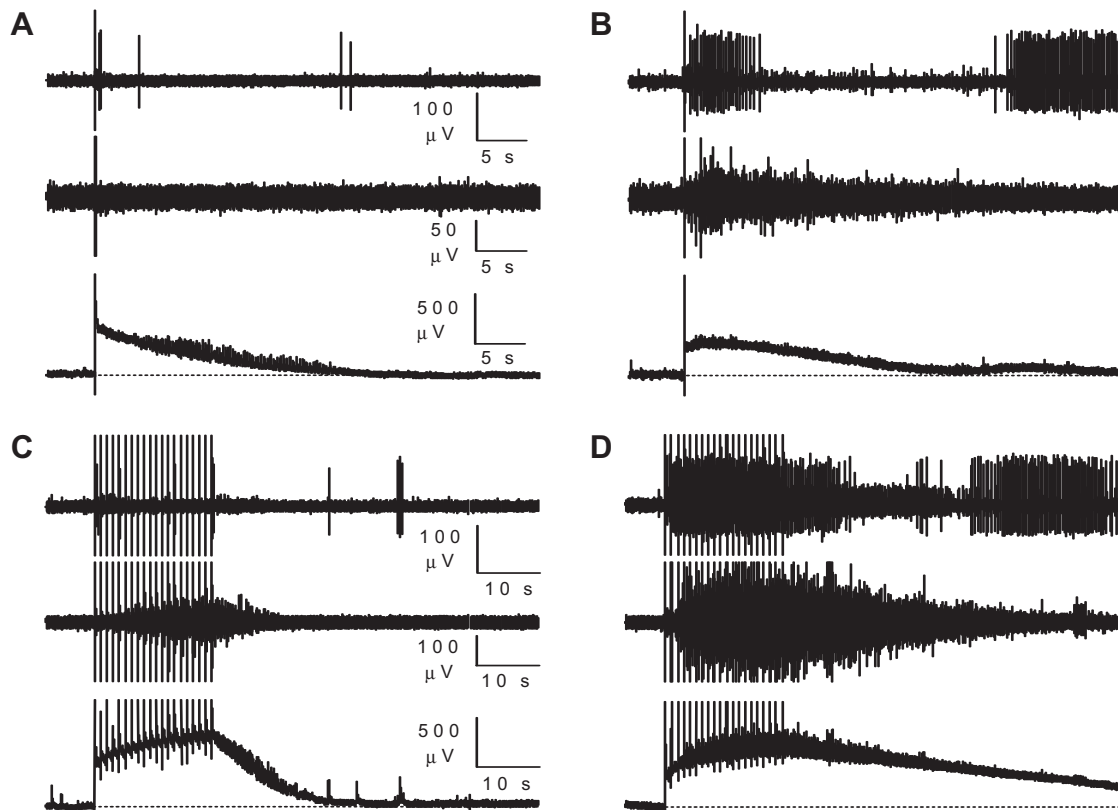


Figura 65.- Registros originales que muestran los efectos de la perfusión de Bay K8644 sobre la respuesta ascendente y motora como respuesta a estímulos unitarios (**A** y **B**) y repetitivos (**C** y **D**). En cada figura el panel superior se corresponde con la actividad de los axones ascendentes, el panel central con el disparo de potenciales de acción de motoneuronas y el panel inferior con el área acumulada en registros DC de la raíz ventral. Los registros A y C se obtuvieron en condiciones control, mientras que las figuras B y D se corresponden con la respuesta registrada a los 60 minutos de lavado de Bay K8644. El registro del axón ascendente corresponde al único de los axones registrados que aumenta claramente su disparo tras la perfusión de Bay K8644.

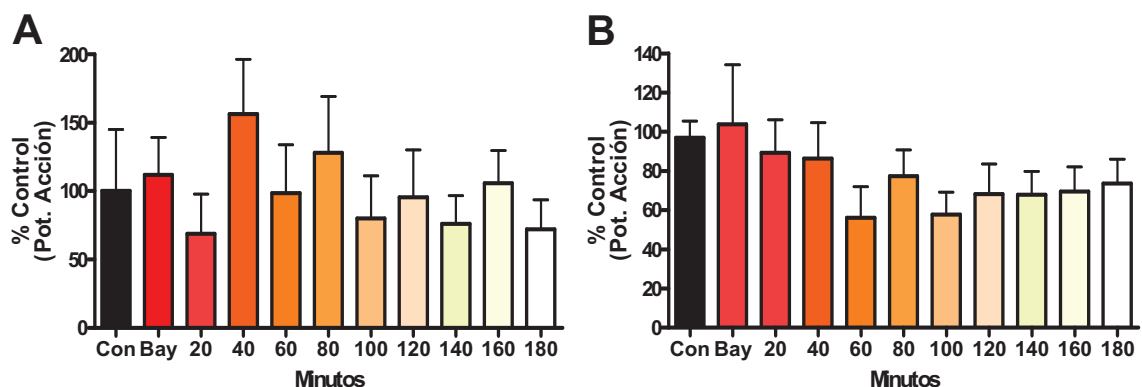


Figura 66.- Efecto del agonista Bay K8644 sobre el disparo de potenciales de acción de los axones ascendentes como respuesta a estímulos unitarios (**A**) y repetitivos (**B**) de alta intensidad. En ambos gráficos se muestra el número medio de potenciales de acción disparados en cada uno de los puntos del estudio como el % de la respuesta control \pm EEM.

El mismo axón de tipo B que mostró respuestas aumentadas a estímulos unitarios, mostró también un aumento de larga duración en el número de potenciales de acción durante todo el periodo de lavado (figura 65). Este axón presentó un número medio de potenciales de acción disparados como respuesta a estimulación repetitiva de 31 ± 2 potenciales en condiciones control, siendo potenciado su disparo hasta una media de 156 ± 12 potenciales durante los 180 minutos de lavado. Su respuesta control a estimulación repetitiva se caracterizó por una pequeña caída del número de potenciales de acción disparados tras el primer estímulo, para mantener posteriormente el disparo durante el resto de estímulos aplicados. La perfusión de Bay K8644 aumentó considerablemente el número de potenciales de acción disparados en cada estímulo del tren, pero su respuesta continuó teniendo las mismas características de caída inicial y posterior mantenimiento del disparo.

El coeficiente de incremento de la respuesta de los axones ascendentes tras estimulación repetitiva no sufrió variaciones significativas durante el proceso de aplicación del agonista Bay K8644 y los lavados posteriores (*One-way ANOVA*; figura 67-B, tabla 17).

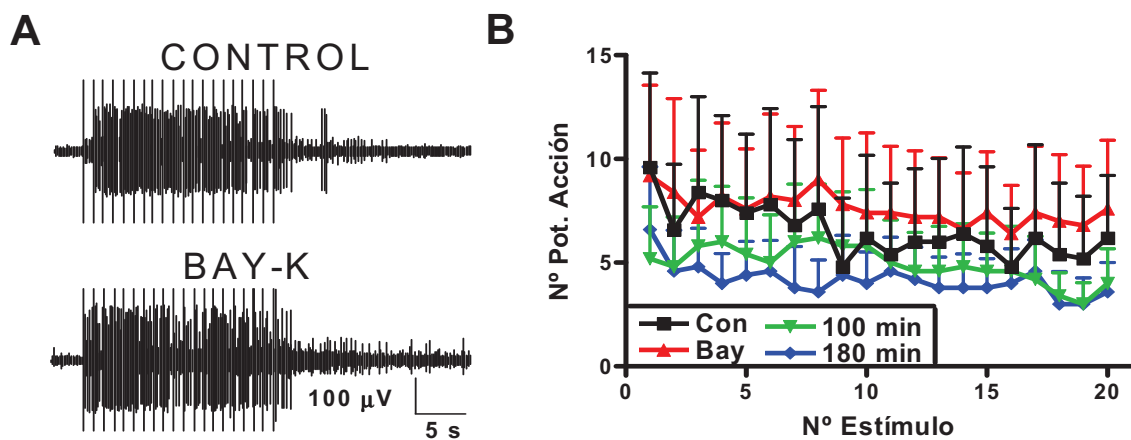


Figura 67.- A Registro original de la respuesta de un axón ascendente a estimulación repetitiva, en situación control y tras la aplicación de Bay K8644. B Efecto de la perfusión de Bay K8644 en el perfil promediado de la respuesta de los axones ascendentes tras estimulación repetitiva. En la figura se pueden apreciar los perfiles de la respuesta control, tras la perfusión del agonista, y después de 100 y 180 minutos de lavado respectivamente.

| Coef. Incremento | Control | Bay K8644 | 100 min | 180 min |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Pot. Acc./s | -0.19 ± 0.09 | -0.11 ± 0.07 | -0.11 ± 0.08 | -0.16 ± 0.08 |

Tabla 17.- Valor del coeficiente de incremento medio calculado para el número de potenciales de acción disparados por los axones ascendentes en respuesta a estimulación repetitiva.

3.1.c.- Actividad Espontánea.

Cabe destacar que la actividad espontánea de los axones ascendentes sí sufrió un aumento significativo tras la perfusión de Bay K8644, observado durante un periodo superior a 80 minutos de lavado, partiendo de una media control de 0.41 ± 0.24 Hz, hasta un valor máximo de 2.6 ± 1.1 Hz a los 80 minutos de lavado (*One-way ANOVA*, $p < 0.01$). Todos los axones estudiados aumentaron considerablemente su actividad espontánea excepto un axón clasificado como tipo B, el cual la mantuvo prácticamente constante (ver registro en la figura 68).

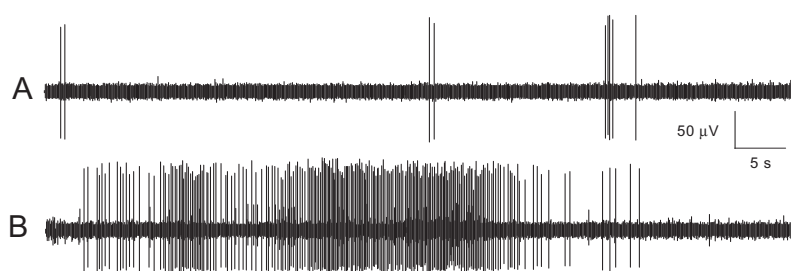


Figura 68.- Registro original de la actividad espontánea de un axón ascendente en condiciones control (A) y tras la aplicación de Bay K8644 (B).

3.2.- Efectos de Bay K8644 en las respuestas registradas en la raíz ventral.

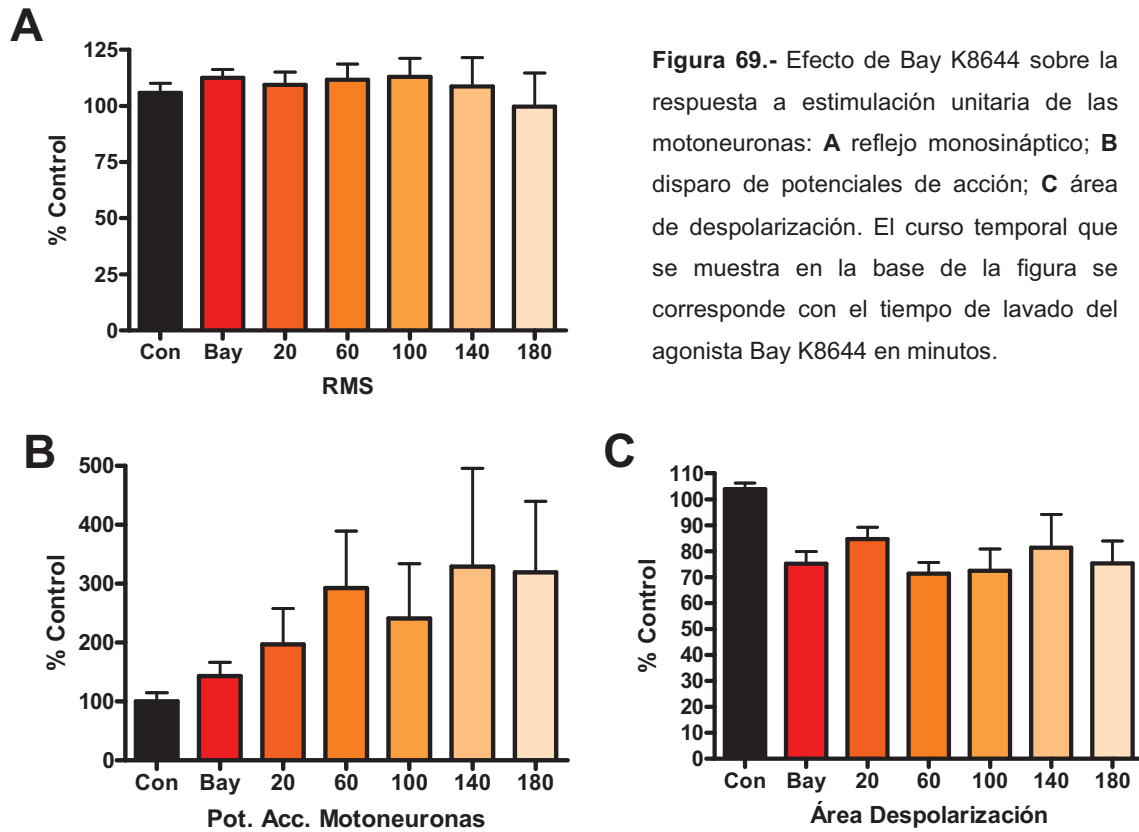
3.2.a.- Estimulación Unitaria. Reflejo Monosináptico.

La perfusión de Bay K8644 no provocó ninguna variación significativa sobre la amplitud del reflejo monosináptico de las motoneuronas, manteniéndose en todos los puntos con valores similares al control inicial (*One-way ANOVA*). La amplitud máxima del reflejo se registró a los 120 minutos de lavado, aumentando únicamente en un $13.7 \pm 8.2\%$ sobre el control (figura 69-A).

3.2.b.- Estimulación Unitaria. Disparo de Potenciales de Acción.

El número de potenciales de acción disparados por las motoneuronas como respuesta a estimulación unitaria de alta intensidad sufrió un aumento progresivo tras la perfusión de Bay K8644, alcanzando valores próximos al 250% del control. Este aumento se comenzó a apreciar tras la aplicación del agonista, aumentando de forma progresiva hasta alcanzar su valor máximo después de 160 minutos de lavado, donde la respuesta superó en un $246.2 \pm 149.6\%$ al valor control inicial (figura 69-B). A pesar

del considerable aumento, no se obtuvo significación en este parámetro debido probablemente a la gran variabilidad de los datos.



3.2.c.- Estimulación Unitaria. Área de Despolarización de la Respuesta.

El área bajo la curva en registros DC en respuesta a la estimulación unitaria no mostró variaciones significativas tras la aplicación de Bay K8644 (*One-way ANOVA*). Sí se observó una ligera disminución del área, alrededor del 20-30% respecto al control, desde la aplicación del agonista hasta el último lavado realizado, probablemente relacionado con la despolarización de la línea base provocada por Bay K8644 (figuras 69-C y 71).

3.2.d.- Estimulación Repetitiva. Disparo de Potenciales de Acción.

La aplicación de Bay K8644 produjo un incremento significativo en el número de potenciales de acción disparados por las motoneuronas como respuesta a estimulación repetitiva (*One-way ANOVA*, $p \leq 0.001$). El aumento significativo respecto

al control fue de larga duración ya que se observó a partir de los primeros 40 minutos de lavado y continuó hasta los 140 minutos de lavado posteriores (significación en figura 70-A). El aumento máximo del disparo de potenciales de acción se situó a los 80 minutos de lavado, en el cual se observó un incremento medio respecto al control del $425.2 \pm 108.3\%$.

El coeficiente de incremento de la respuesta también varió significativamente durante todo el estudio realizado tras la aplicación de Bay K8644 (*One-way ANOVA*, $p < 0.001$, figura 72-A). El coeficiente de incremento aumentó desde 5 ± 2 pot/s en situación control, a un máximo de 13 ± 2 pot/s registrados a los 80 minutos de lavado (*Bonferroni post-test*, $p < 0.001$). Esta variación siguió siendo significativa hasta el último lavado realizado, donde el coeficiente de incremento se situó en 12 ± 2 pot/s (*Bonferroni post-test*, $p < 0.05$).

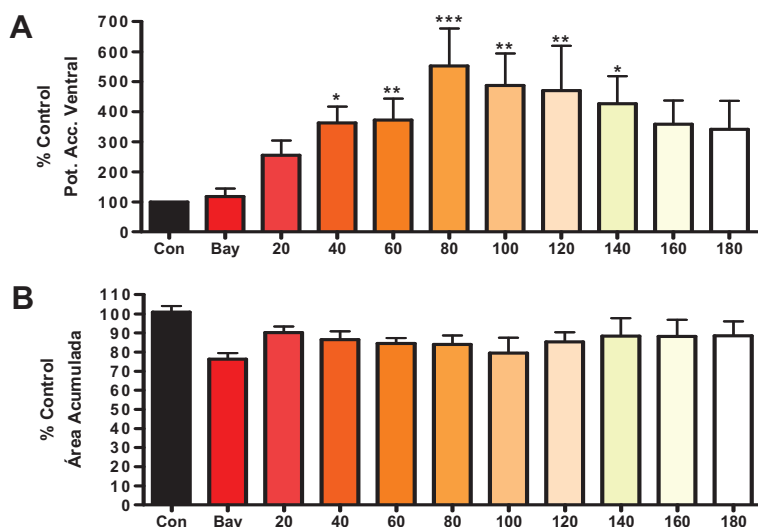


Figura 70.- La figura muestra la evolución del número total de potenciales de acción disparados (**A**) y el área acumulada de la respuesta en los registros DC (**B**) tras la perfusión de Bay K8644 y durante el proceso de lavado (en total 180 minutos indicados en la base de ambas figuras). Los asteriscos muestran significación estadística (*test posterior de Bonferroni*, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3.2.e.- Estimulación Repetitiva. Área Acumulada.

La perfusión de Bay K8644 no produjo diferencias significativas en el área acumulada en respuesta a la estimulación repetitiva (*One-way ANOVA*), aunque se apreció una disminución del área cercana al 10-20% respecto al control, posiblemente relacionada con una ligera despolarización de la línea base que se observó durante la aplicación del agonista (figuras 70 y 71).

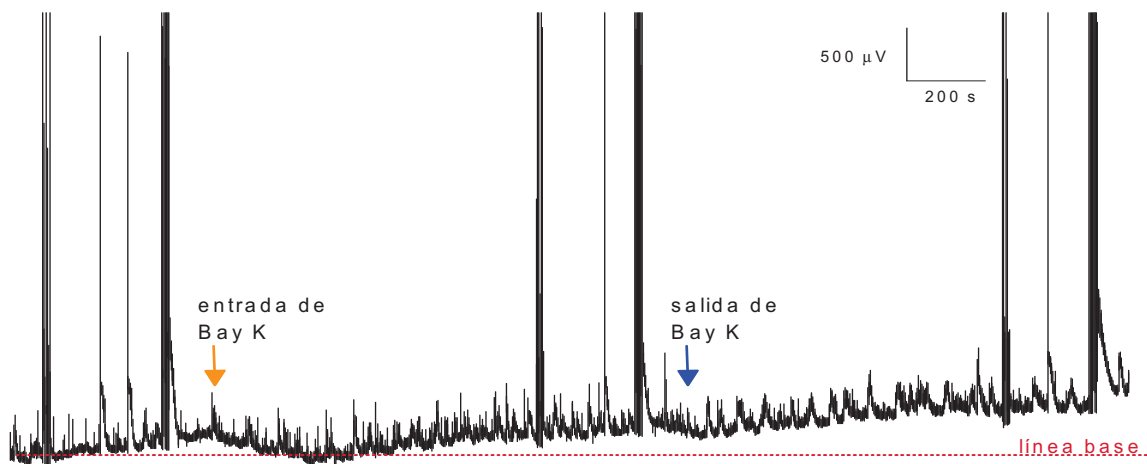


Figura 71.- La figura muestra como la aplicación de Bay K8644 produjo una ligera despolarización de la línea base del registro DC. Las líneas verticales se corresponden con los artefactos de los estímulos eléctricos aplicados.

Sin embargo, la perfusión de Bay K8644 disminuyó significativamente el coeficiente de incremento del área acumulada (*One-way ANOVA*, $p < 0.01$), pasando de un valor control de $0.008 \pm 0.003 \mu\text{V}$ a $0.003 \pm 9 \times 10^{-4} \mu\text{V}$ durante su aplicación (*Bonferroni post-test*, $p \leq 0.001$), valor que tras los lavados posteriores tiende a recuperar su rango inicial, sin observarse variaciones significativas en estos puntos respecto al control inicial (figura 72-B).

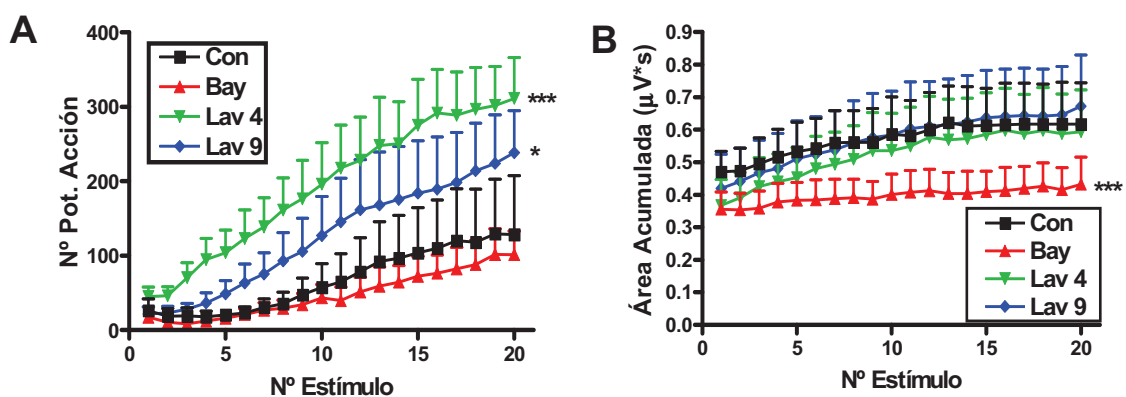


Figura 72.- Gráfico del perfil promediado de la respuesta de las motoneuronas a estimulación repetitiva: potenciales de acción (A) y área acumulada (B). Los asteriscos muestran significación estadística por el *post-test de Bonferroni* sobre el coeficiente medio de incremento respecto al control. Los puntos de lavado reflejados en la figura se corresponden con el punto de estudio realizado a los 80 minutos (Lav 4) y 180 minutos (Lav 9) de lavado respectivamente.

3.3.- Efectos de Bay K8644 en las respuestas a estimulación repetitiva de diferente intensidad.

A partir de los resultados obtenidos en el apartado anterior se diseñó un nuevo estudio para conocer si la potenciación producida por Bay K8644 en la respuesta de las motoneuronas era selectiva para las vías nociceptivas. En este caso no se realizaron estudios en los axones ascendentes ya que Bay K8644 no presentó un efecto claro en su actividad (apartado 3.1, página 137). Para ello se utilizaron cinco médulas espinales a las que se aplicaron test consistentes en estímulos repetitivos de cuatro intensidades diferentes (apartado 2.1, página 134). Así se pretendió conocer si el aumento del disparo de potenciales de acción afectaba únicamente a los estímulos de alta intensidad aplicados en el apartado anterior (200 μ A), o también a estímulos de otras tres nuevas intensidades de 20, 30 y 60 μ A que se aplicaron en este estudio. Los resultados obtenidos en este apartado con estímulos de 200 μ A fueron muy similares a los descritos en el apartado 3.2, por lo que sólo se citarán en referencia a aspectos de interés para este nuevo estudio.

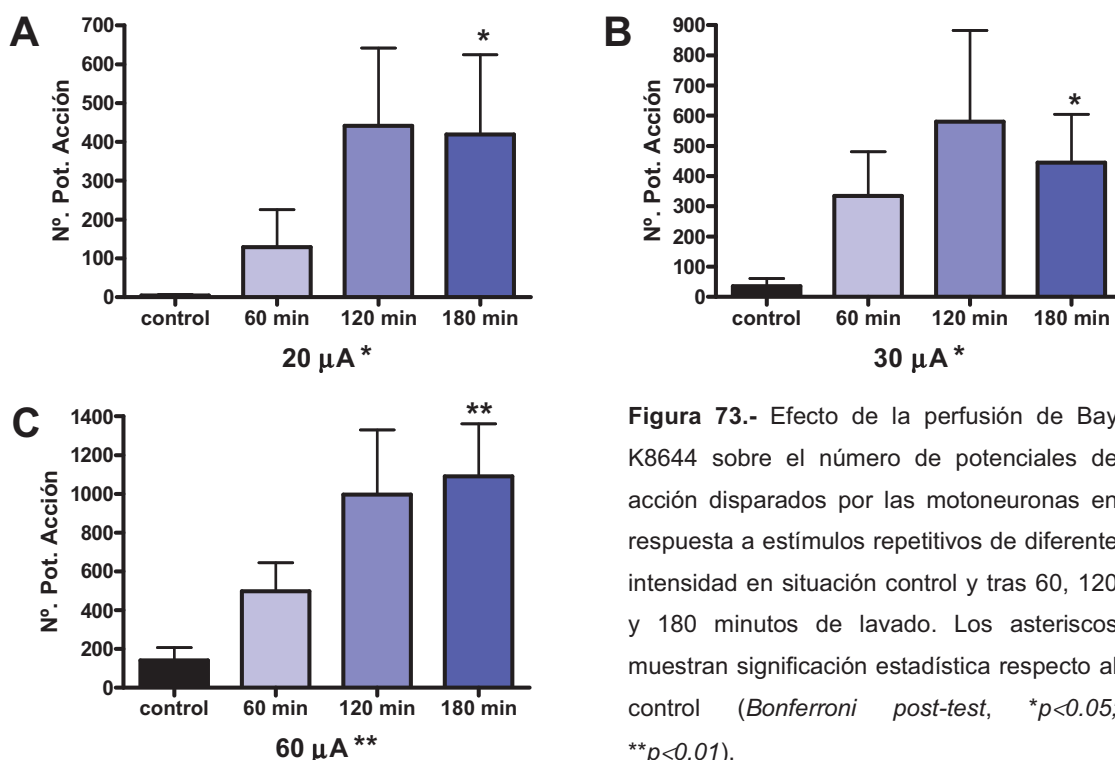
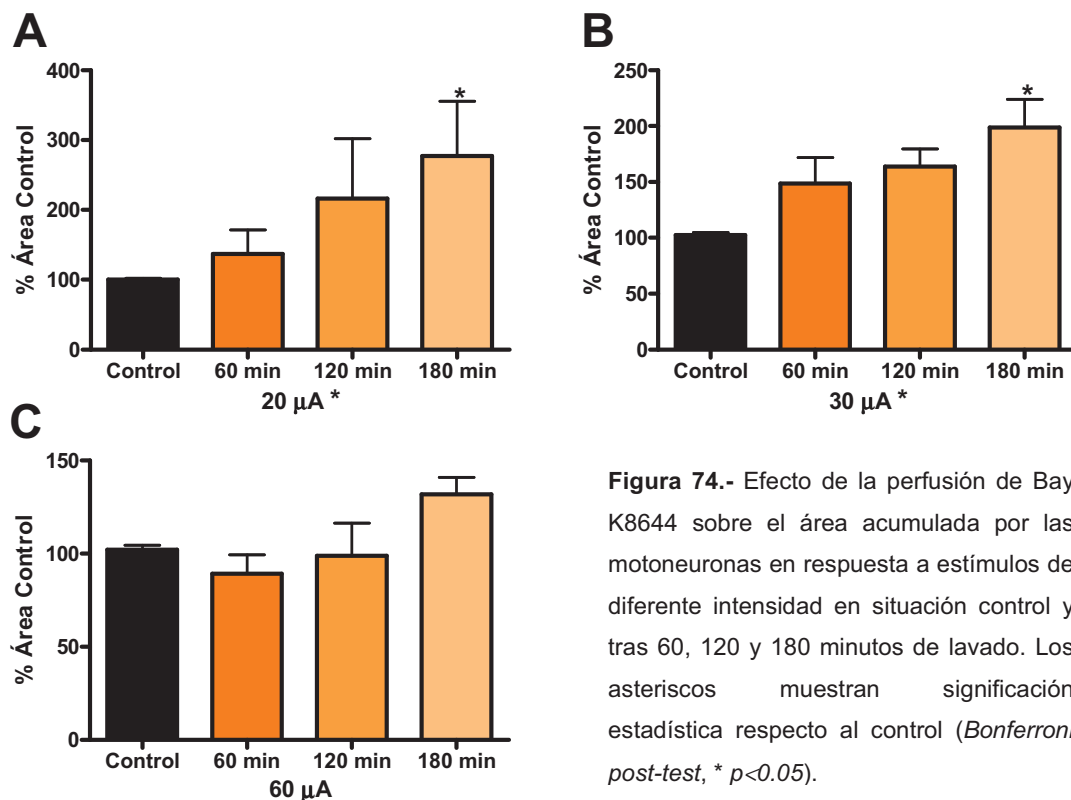


Figura 73.- Efecto de la perfusión de Bay K8644 sobre el número de potenciales de acción disparados por las motoneuronas en respuesta a estímulos repetitivos de diferente intensidad en situación control y tras 60, 120 y 180 minutos de lavado. Los asteriscos muestran significación estadística respecto al control (*Bonferroni post-test*, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

En todas las intensidades estudiadas la perfusión de Bay K8644 produjo un aumento significativo en el número de potenciales disparados durante el periodo de

lavado (*One-way ANOVA*, $p < 0.05$ para las intensidades de 20 y 30 μA ; $p < 0.01$ para 60 μA), observándose en todos los casos diferencias significativas entre la situación control y el test realizado a los 180 minutos de lavado (ver significación en figura 73).

El área acumulada aumentó significativamente después de la perfusión de Bay K8644 cuando se aplicaron intensidades de 20 y 30 μA (*One-way ANOVA*, $p < 0.05$, ambos casos), observándose un aumento significativo respecto al control en el lavado realizado a los 180 minutos para estas dos intensidades (significación en figura 74). Hay que destacar que Bay K8644 produjo un aumento del área, al contrario de lo observado con los estímulos de 200 μA de intensidad (figura 70). La estimulación con una intensidad de 60 μA se puede considerar un estado intermedio entre los efectos observados en las respuestas de baja y alta intensidad, ya que en los lavados realizados a los 60 y 120 minutos el área se reduce ligeramente respecto al control, mientras que a los 180 minutos aumentó aunque de forma no significativa (figura 74-C).



A continuación se detallan los efectos específicos observados en las respuestas a intensidades de 20, 30 y 60 μA tras la aplicación de Bay K8644.

3.3.a.- Aplicación de estímulos repetitivos de baja intensidad (20 y 30 μA).

La respuesta a estímulos de baja intensidad (20 y 30 μA) se vio afectada de la misma forma por la perfusión de Bay K8644 y por tanto se describen de forma conjunta.

Como se puede observar en la figura 75, la aplicación de estímulos repetitivos de baja intensidad generó una respuesta en las motoneuronas caracterizada por un escaso número de potenciales de acción disparados y un área acumulada muy baja, la cual presentó un coeficiente de incremento negativo, ya que su amplitud tendió a disminuir según se fueron aplicando los estímulos.

Respecto al disparo de potenciales de acción, la perfusión de Bay K8644 provocó que las motoneuronas aumentaran su número a los 60 minutos de lavado, aunque el coeficiente de incremento de la respuesta fue prácticamente idéntico al control (figura 75-A). Sin embargo, transcurridos 120 y 180 minutos de lavado del agonista, el número de potenciales de acción aumentó considerablemente, dándose un efecto de suma progresiva del disparo (*One-way ANOVA*, $p < 0.001$; tabla 18, figura 75-A).

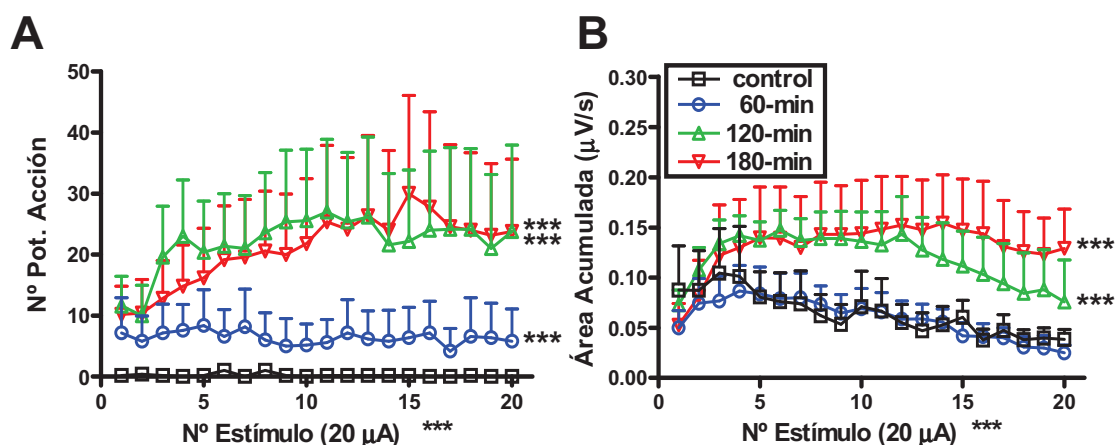


Figura 75.- Curso temporal del efecto del agonista Bay K8644 sobre el perfil de la respuesta a estimulación repetitiva de baja intensidad, del número de potenciales de acción disparados (**A**) y el área de respuesta acumulada (**B**). Las figuras muestran la respuesta a trenes de estímulos de 200 μs de duración e intensidad de 20 μA en condiciones control y después de 60, 120 y 180 minutos de lavado tras la perfusión del agonista. Efectos prácticamente idénticos se observaron con una intensidad de 30 μA . Los asteriscos muestran significación estadística del coeficiente de incremento medio respecto al control (*Bonferroni post-test*, *** $p < 0.001$).

| Coeficientes de Incremento | | Lavado Bay K8644 | | |
|----------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| Pot. Acc. (Pot/s) | Control | 60 min | 120 min | 180 min |
| 20 μ A | -0.011 \pm 0.01 | -0.078 \pm 0.03*** | 0.68 \pm 0.51*** | 0.75 \pm 0.49*** |
| 30 μ A | -0.15 \pm 0.08 | 0.45 \pm 0.17*** | 1.21 \pm 0.51*** | 1.27 \pm 0.48*** |
| 60 μ A | -0.10 \pm 0.20 | 0.91 \pm 0.63** | 1.62 \pm 0.77*** | 4.57 \pm 1.34*** |
| 200 μ A | 6.2 \pm 2.4 | 12.3 \pm 1.9*** | 13.1 \pm 3.9*** | 12.8 \pm 2.0*** |
| Área (μ V) | Control | 60 min | 120 min | 180 min |
| 20 μ A | -0.0027 \pm 0.002 | -0.0014 \pm 0.001 | 0.00015 \pm 0.002*** | 0.0042 \pm 0.001*** |
| 30 μ A | -0.006 \pm 0.002 | 0.001 \pm 0.0008*** | 0.003 \pm 0.001*** | 0.001 \pm 0.001*** |
| 60 μ A | -0.008 \pm 0.002 | 0.002 \pm 0.001 | 0.001 \pm 0.001 | 0.006 \pm 0.002*** |
| 200 μ A | 0.008 \pm 0.002 | 0.008 \pm 0.001 | 0.009 \pm 0.002 | 0.009 \pm 0.002 |

Tabla 18.- Valores del coeficiente de incremento medio calculados para los potenciales de acción disparados y el área acumulada en registros DC en situación control y 60, 120 y 180 minutos después de la perfusión de Bay K8644, en cada una de las intensidades aplicadas (20, 30, 60 y 200 μ A). La duración de los estímulos es fija para todos los casos (200 μ s). Los asteriscos muestran significación estadística respecto al control (*test posterior de Bonferroni*, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

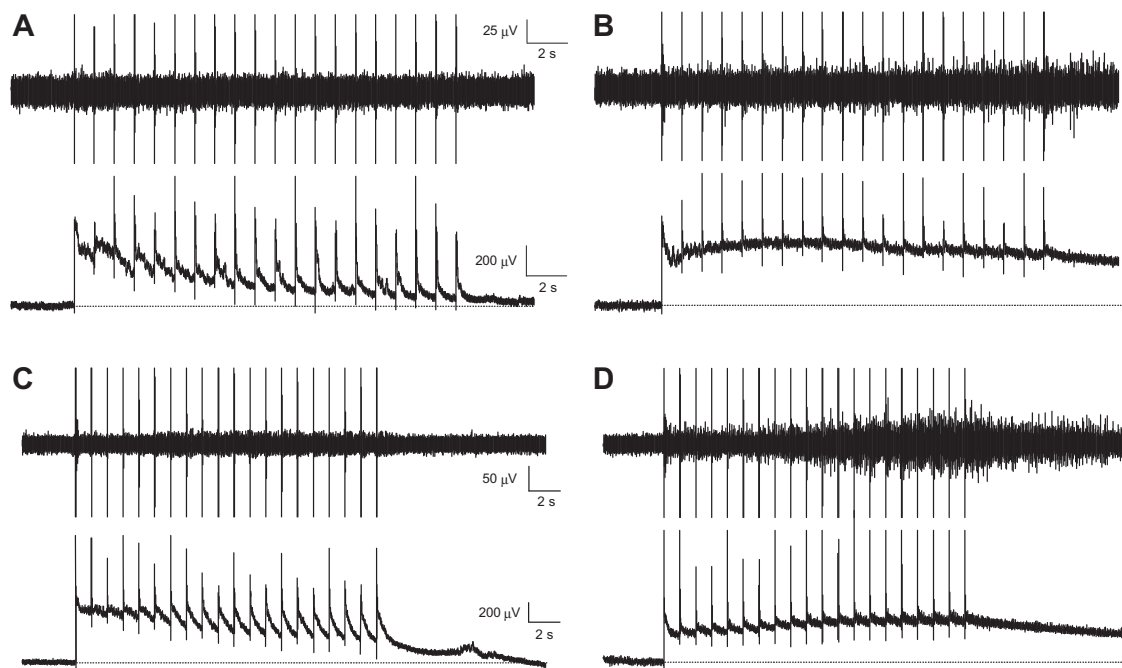


Figura 76.- Registros originales de la respuesta ventral tras estimulación repetitiva con una intensidad de 30 μ A (**A** control; **B** efecto máximo Bay K8644) y 60 μ A (**C** control; **D** efecto máximo Bay K8644) respectivamente, en situación control (paneles de la izquierda) y tras 180 minutos de lavado del agonista Bay K8644 (paneles de la derecha).

Prácticamente idénticos resultados se obtuvieron en el caso del área acumulada, la cual presentó en situación control unos valores totales muy bajos y un coeficiente de incremento negativo (figura 75-B, tabla 18). A los 60 minutos de lavado tras la perfusión de Bay K8644, el área acumulada permaneció en valores muy cercanos al control inicial, pero a los 120 y 180 minutos de lavado se observó que el área aumentó considerablemente, pasando la respuesta a presentar un coeficiente de incremento positivo a los 120 minutos de lavado (*One-way ANOVA*, $p < 0.001$; tabla 18). En este caso hay que destacar que el paso de Bay K8644 no produjo una disminución del área acumulada como se observó en el estudio del apartado anterior con estimulación de 200 μA (figura 70), sino que produjo el efecto inverso como puede observarse en los gráficos mostrados en la figura 75-B.

3.3.b.- Aplicación de estímulos de 60 μA de intensidad.

La aplicación de estímulos con una intensidad de 60 μA conllevó la activación de algunas fibras aferentes de tipo C, ya que esta intensidad fue muy cercana a su umbral de activación. La estimulación repetitiva de la médula espinal con estímulos de 60 μA de intensidad provocó el disparo de algunos potenciales de acción, manteniéndose en número durante toda la estimulación, sin llegar a generar procesos de suma progresiva o *wind up* (figura 77-A). El área acumulada por las motoneuronas al aplicar esta intensidad de estimulación provocó la generación de un área muy superior a la observada al aplicar intensidades de 20 y 30 μA , pero su perfil mostró una clara caída progresiva de la amplitud al avanzar la estimulación (figura 77-B).

Tras la perfusión de Bay K8644, el número de potenciales de acción disparados por las motoneuronas aumentó considerablemente desde los primeros 60 minutos de lavado, aumentando de forma progresiva a los 120 y 180 minutos de lavado, observándose variaciones significativas en el coeficiente de incremento de la respuesta en estos tres puntos respecto al control (*One-way ANOVA*, $p < 0.001$; *Bonferroni post-test*, $p < 0.01$ a 60 min. y $p < 0.001$ a 120 y 180 min.). En este caso el coeficiente de incremento también pasó de un valor control negativo a un valor positivo y máximo a los 180 minutos de lavado (ver tabla 18; figura 77).

En el caso del área acumulada también se observaron variaciones significativas al comparar los coeficientes de incremento (*One-way ANOVA*, $p < 0.001$; figura 77-B), aunque únicamente se dieron variaciones significativas respecto al

control a los 180 minutos de lavado, donde este parámetro fue claramente positivo (*Bonferroni post-test*, $p < 0.001$). Al contrario de lo observado en los dos apartados anteriores, en este caso el valor total de área acumulada no aumentó respecto al control tras la perfusión de Bay K8644 (figura 74-C).

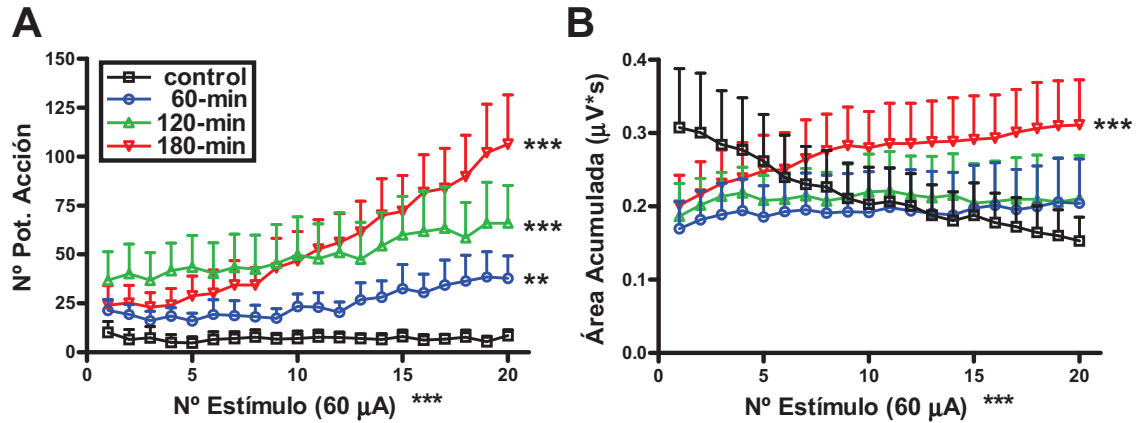


Figura 77.- Curso temporal del efecto del agonista Bay K8644 sobre los potenciales de acción disparados (A) y el área acumulada (B) por las motoneuronas. Las figuras muestran la respuesta a trenes de estímulos de 200 µs de duración e intensidad de 60 µA en condiciones control y a los 60, 120 y 180 minutos de lavado tras la perfusión del agonista. Los asteriscos muestran significación estadística del coeficiente de incremento medio respecto al control (*test posterior de Bonferroni*, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3.4.- Efectos de la aplicación de diltiazem tras la perfusión de Bay K8644 sobre la respuesta motora.

Los experimentos anteriores mostraron que Bay K8644 produce efectos potentes y muy duraderos sobre los reflejos espinales, lo cual hace pensar que este agonista facilita una entrada masiva de calcio en las neuronas y como consecuencia se inicia una cascada de reacciones que generan un estado de sensibilización. Alternativamente, los resultados se podrían explicar si Bay K8644 se uniera al canal de una forma permanente. El presente experimento se diseñó para dilucidar cual de estas dos alternativas es la más correcta en las presentes condiciones experimentales.

En los estudios realizados en el apartado anterior, la potenciación máxima del disparo de potenciales de acción en las motoneuronas tras la aplicación de Bay K8644 se observó entre los minutos 60 y 100 de lavado (figura 70), por lo que se decidió aplicar en este mismo periodo de tiempo el antagonista de calcio de tipo L diltiazem a una concentración de 30 µM. El uso de este compuesto se debió a que no es una

dihidropiridina, mientras que la elección de la concentración 30 μM se basó en que fue la menor que tuvo un efecto inhibitor significativo sobre el disparo de potenciales, buscando con ello una mayor especificidad sobre los CCDV de tipo L.

Para llevar a cabo este estudio se emplearon 5 médulas espinales a las que se aplicó un protocolo de estimulación y aplicación de sustancias ya descrito en el apartado de materiales y métodos de este capítulo (apartado 2.1).

3.4.a.- Estimulación repetitiva de alta intensidad.

La perfusión de diltiazem anuló por completo el aumento significativo del número de potenciales de acción provocado por la aplicación de Bay K8644 (*t-test*, $p < 0.05$), disminuyendo incluso el número de potenciales por debajo del valor control inicial, tendencia que se mantuvo en el lavado final (figuras 78 y 80).

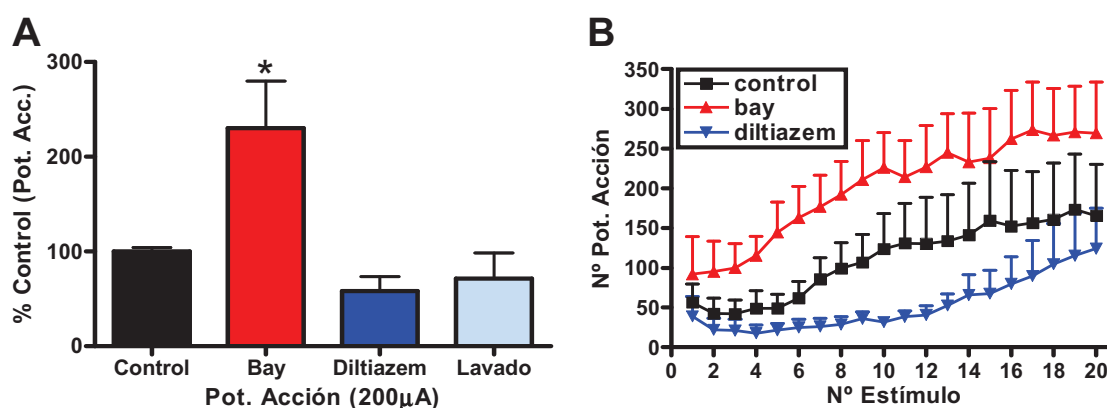


Figura 78.- El gráfico A muestra la evolución del número total de potenciales de acción disparados por las motoneuronas tras estimulación repetitiva con una intensidad de 200 μA , en situación control y tras la perfusión secuencial de Bay K8644 y diltiazem, así como su posterior lavado. El gráfico B muestra el perfil de la respuesta promedio que se corresponde con los datos mostrados en el gráfico A. Los asteriscos muestran significación estadística respecto al control (*t-test*, $* p < 0.05$).

Realizada una comparación a través de un análisis ANOVA de dos vías entre la respuesta control y la respuesta obtenida tras la aplicación de Bay K8644, se observaron variaciones significativas entre ambas ($p < 0.001$, figura 78-B), debido al aumento de la respuesta que provocó la aplicación del agonista en todos los puntos de la estimulación. En este caso Bay K8644 aumentó el coeficiente de incremento en 2.5 pot./s respecto al control (tabla 19), aunque entre todos los puntos de la estimulación

repetitiva se observa que la mayor parte de los que presentan variaciones significativas respecto al control se dan en los cinco últimos estímulos (*Bonferroni post-test*). No se observó interacción significativa.

La comparación entre la respuesta control y la respuesta tras la aplicación de diltiazem también denotó cambios significativos (*two-way ANOVA*, $p < 0.001$), de forma que la perfusión del antagonista disminuyó la respuesta en todos los puntos, observándose que el coeficiente de incremento disminuyó 2 pot./s (tabla 19). Las mayores diferencias significativas entre ambas respuestas se observaron en los puntos centrales de la estimulación repetitiva (*Bonferroni post-test*). No se observó interacción significativa.

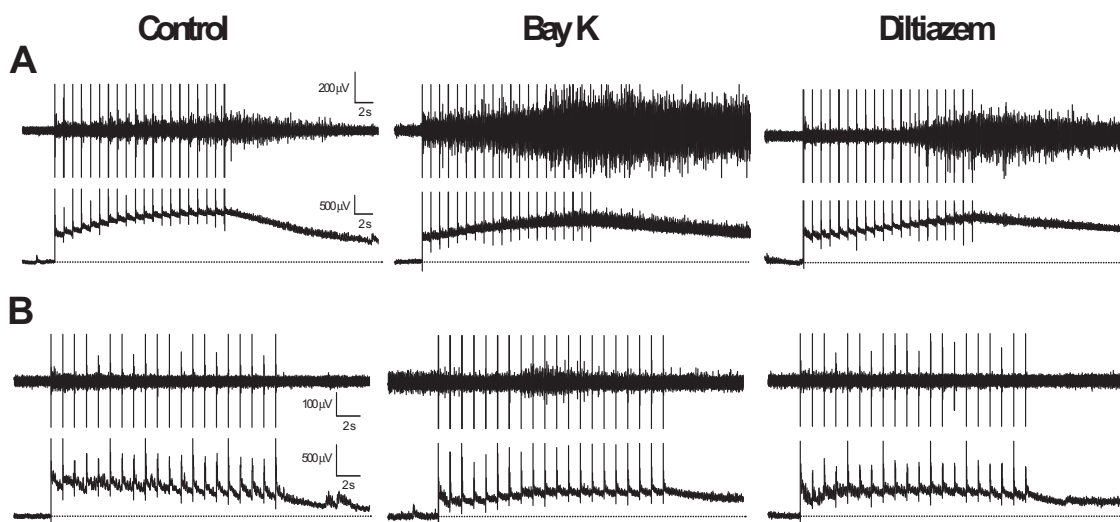


Figura 79.- Registros originales de la respuesta de las motoneuronas (AC en panel superior; DC en panel inferior) tras estimulación repetitiva de alta intensidad (200 µA; panel A), y baja intensidad (20 µA; panel B); en situación control y tras la perfusión secuencial de Bay K8644 y diltiazem.

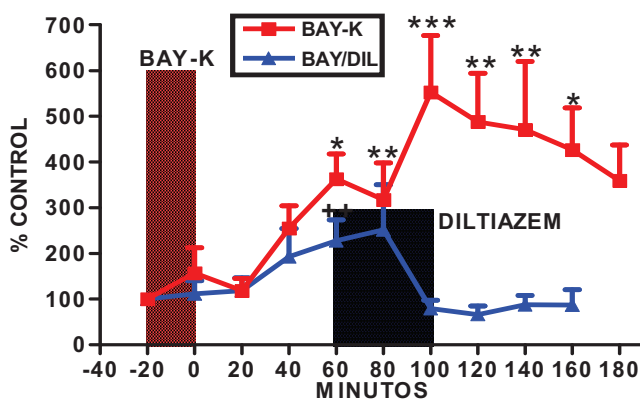


Figura 80.- El gráfico muestra el curso temporal del efecto de Bay K8644 sobre el número total de potenciales de acción disparados por las motoneuronas, así como la reversión de este efecto por diltiazem 30 µM. Los asteriscos muestran significación respecto al valor control (*Bonferroni post-test*, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

En el área acumulada de la respuesta de las motoneuronas, la posterior perfusión de diltiazem varió muy poco la disminución significativa previa provocada por Bay K8644 (*t-test*, $p < 0.05$), ya que anuló sólo una pequeña parte de esta reducción (figura 81).

Cuando se comparó la respuesta control con las respuestas registradas tras la aplicación de Bay K8644 y diltiazem respectivamente, se observaron diferencias significativas provocadas por la aplicación de ambas sustancias (*two-way ANOVA*, $p < 0.001$, ambos casos), ya que la respuesta control presentó valores más elevados en todos los puntos en comparación a la respuesta modificada por Bay K8644 y posteriormente por diltiazem, siendo estas dos últimas prácticamente idénticas (figura 81-B).

| COEF. INCREMENTO | CONTROL | BAY K8644 | DILTIAZEM |
|------------------------------|-----------------|---------------|-----------------|
| Pot. I _A (pot./s) | 7.2 ± 2.8 | 9.7 ± 1.0 | 5.2 ± 2.1 |
| Pot. I _B (pot./s) | -1.05 ± 0.40 | -0.07 ± 0.23 | -0.61 ± 0.25 |
| Área I _A (µV) | 0.009 ± 0.006 | 0.009 ± 0.004 | 0.010 ± 0.005 |
| Área I _B (µV) | -0.012 ± 0.0007 | 0.005 ± 0.002 | -0.001 ± 0.0005 |

Tabla 19.- Valores del coeficiente de incremento calculados para la respuesta de las motoneuronas a estimulación de alta y baja intensidad, en situación control y tras la perfusión secuencial de Bay K8644 y diltiazem.

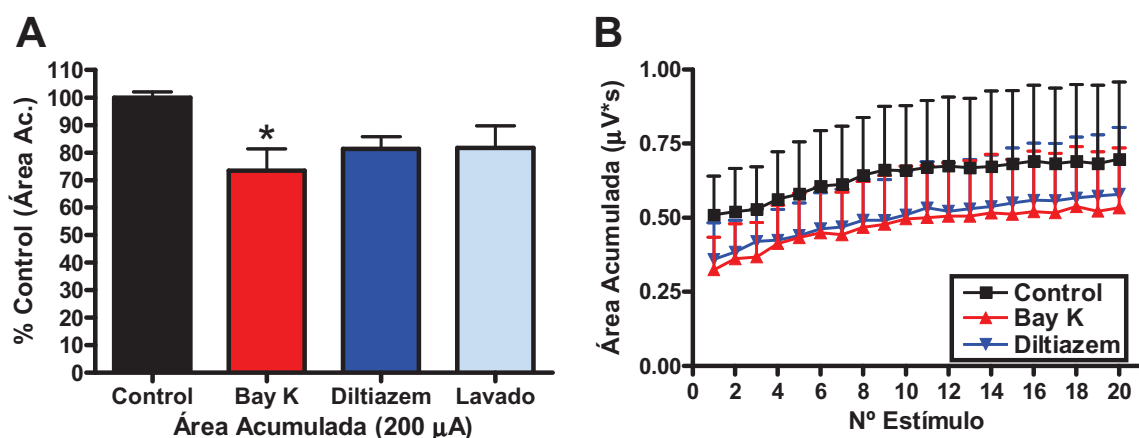


Figura 81.- El gráfico A muestra la evolución del área acumulada total tras estimulación repetitiva con una intensidad de 200 µA en situación control y tras la perfusión secuencial de Bay K8644 y diltiazem, así como su posterior lavado. El gráfico B muestra el perfil de la respuesta promedio que se corresponde con los datos mostrados en el gráfico A. Los asteriscos muestran significación estadística respecto al control (*t-test*, * $p < 0.05$).

3.4.b.- Estimulación repetitiva de baja intensidad.

Al igual que en el apartado anterior, diltiazem anuló el aumento significativo del número de potenciales de acción disparados en respuesta a estímulos repetitivos de baja intensidad (*t-test*, $p < 0.05$; figura 82). Se observaron variaciones significativas entre la respuesta control y la respuesta obtenida tras la aplicación de Bay K8644, presentado esta última valores superiores en todos los puntos de la estimulación aunque de forma irregular (*two-way ANOVA*, $p < 0.001$, figura 82-B). También se observaron diferencias significativas entre la respuesta control y la respuesta obtenida tras la aplicación de diltiazem (*two-way ANOVA*, $p < 0.001$, figura 82-B), la cual disminuyó la potenciación generada por Bay K8644, pero sin poder llegar a los valores control inicial.

La perfusión de Bay K8644 y posteriormente de diltiazem disminuyeron de forma mínima el área control inicial, no observándose variaciones significativas en ningún caso (figura 83). El coeficiente de incremento control pasó de un valor negativo a positivo tras el paso de Bay K8644, el cual volvió a cambiar de signo tras la perfusión de diltiazem (tabla 19).

Al realizar una comparación mediante un test ANOVA de dos vías entre el área acumulada control y el área acumulada tras la aplicación de Bay K8644, se observaron variaciones significativas ($p < 0.001$) y además también se observó interacción significativa ($p < 0.001$). La perfusión de Bay K8644 cambió por completo la morfología de la respuesta control, pasando de una respuesta en caída a una respuesta ascendente (figura 83-B, tabla 19). La interacción de las respuestas se puede explicar porque el agonista disminuyó los valores de la primera parte de la respuesta respecto al control, pero los aumentó en la parte final.

Idéntico resultado al anterior se obtuvo cuando se comparó la respuesta control y la respuesta obtenida tras aplicar diltiazem, dándose diferencias e interacción significativas entre ambas (*two-way ANOVA*, $p < 0.001$, ambos casos). En este caso diltiazem sí disminuyó la respuesta control, pero dejando una respuesta prácticamente plana (tabla 19). La interacción se explica por la mayor disminución de la respuesta control en la primera mitad de la respuesta respecto al control, no variando prácticamente en la segunda mitad (figura 83-B).

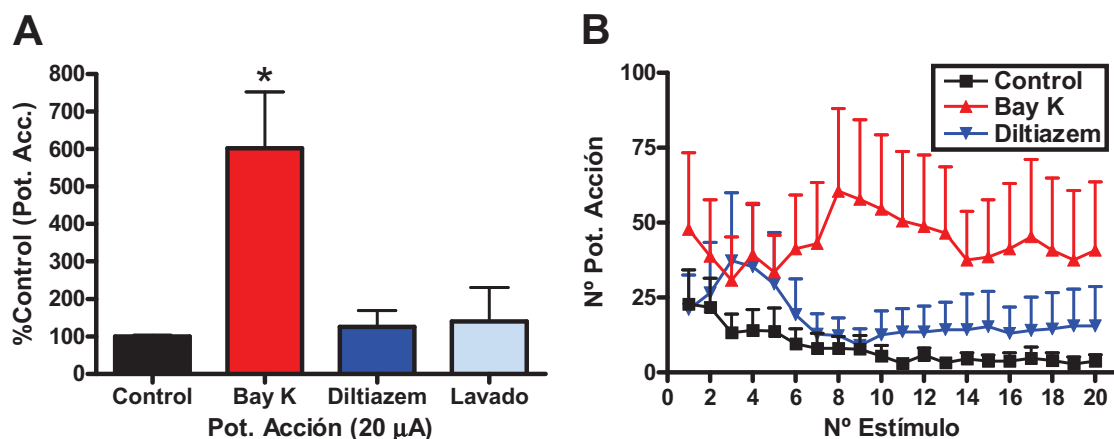


Figura 82.- El gráfico **A** muestra el número total de potenciales de acción disparados por las motoneuronas como respuesta a estimulación repetitiva de baja intensidad en situación control, tras la perfusión secuencial de Bay K8644 y diltiazem, y después del lavado posterior. Los asteriscos muestran significación estadística respecto al control (*t de Student*, * $p < 0.05$). El gráfico **B** muestra el perfil promediado de la respuesta control y tras la perfusión secuencial de Bay K8644 y diltiazem.

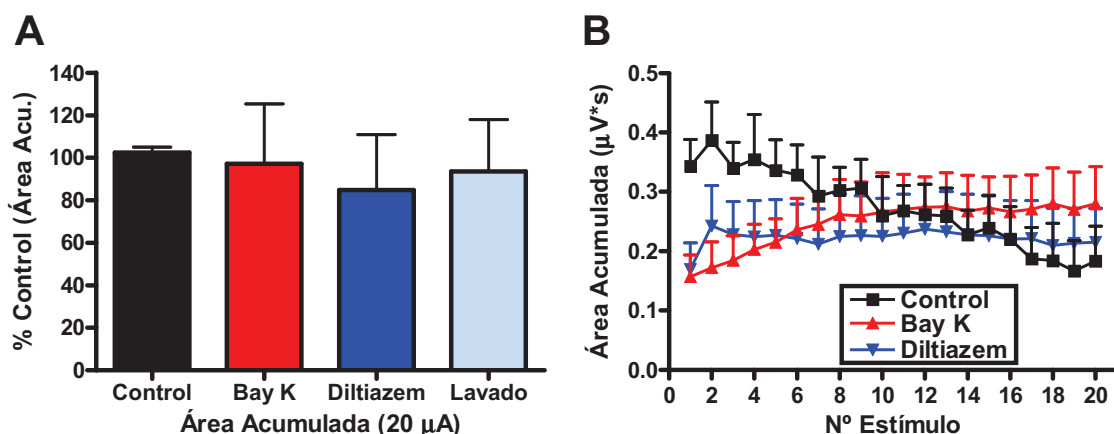


Figura 83.- El gráfico **A** muestra el área total acumulada en la respuesta de las motoneuronas como respuesta a estimulación repetitiva de baja intensidad en situación control, tras la perfusión secuencial de Bay K8644 y diltiazem, y tras el lavado posterior. El gráfico **B** muestra el perfil de la respuesta promedio que se corresponde con los datos mostrados en el gráfico **A**.

4.- DISCUSIÓN.

La perfusión de Bay K8644 provocó un gran aumento de larga duración en el disparo de potenciales de acción de las motoneuronas, mientras que a nivel de los axones ascendentes no se alteraron significativamente las respuestas a la estimulación aferente, si bien se observó un aumento de la actividad espontánea. Bay K8644 no mostró efectos sobre el RMS ni sobre el área acumulada por estimulación

unitaria y repetitiva. Hay que destacar que el número de potenciales de acción disparados por las motoneuronas tras estimulación unitaria no aumentó significativamente, aunque a la vista de los resultados parece que la variabilidad de la respuesta es la causante de la falta de significación. Por tanto el efecto esencial de Bay K8644 consistió en un aumento de los disparos de potenciales de acción en las motoneuronas, especialmente durante la estimulación repetitiva.

Estos resultados concuerdan con estudios previos obtenidos en un modelo de registro de reflejos espinales en ratas neonatales, en el que se determinó el efecto de la perfusión de Bay K8644 1 μ M sobre el RMS y reflejos polisinápticos provocados como respuesta a estimulación eléctrica (área de la respuesta), no observándose alteración alguna en ambos parámetros, pero sí se observaron variaciones en la actividad espontánea de la línea base (registro DC) (Bell, 1993), los cuales podrían estar relacionados con el aumento de actividad espontánea observada en los axones ascendentes.

Si consideramos el área de los registros DC así como el disparo en axones ascendentes como índices de la intensidad del input sináptico que llega a las motoneuronas, podemos concluir que Bay K8644 potenció muy fuertemente la actividad motora sin variar esencialmente el input sináptico que éstas recibieron. Asimismo, estos resultados mostraron que la alteración de los CCDV afectó más a las vías motoras que a las sensoriales, al menos en las presentes condiciones experimentales.

Bay K8644 incrementó el efecto de suma que subyace al *wind-up* en vías motoras, pero también incrementó las respuestas a los primeros estímulos del tren. Estos efectos motores también se han observado en estudios en los que se ha inyectado Bay K8644 por vía intraperitoneal a ratones, los cuales sufrieron diferentes alteraciones como ataxia y actividad motora reducida entre otros (Bolger y col.; 1985). Esta afectación esencial de la vía motora puede estar relacionada con una diferente distribución de los distintos tipos de canales Ca_v1, como se discutió en el capítulo anterior.

Es posible que el escaso efecto de Bay K8644 sobre las respuestas registradas en los axones ascendentes estuviera relacionado con la edad de los ratones empleados, ya que se ha descrito un aumento de las respuestas en neuronas dorsales de ratas adultas al aplicar este agonista, aumento anulado por la posterior

administración de nimodipina (Schaible y col.; 2000). De igual forma en neuronas sensoriales de ratas adultas se ha demostrado que Bay K8644 1 μ M aumentó entre 3 y 4 veces la amplitud de la corriente de calcio de tipo L, además de prolongar su cinética de desactivación en el orden de una magnitud (Carbone y col.; 1990). Por otra parte estudios de desarrollo de los canales $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$, indicaron que su presencia en la médula espinal de ratón se da a partir del séptimo día de desarrollo postnatal hasta el día dieciocho, donde su presencia se asimila ya a la de animales adultos (Jiang y col.; 1999). En el presente estudio se ha observado la fuerte potenciación de respuestas en uno de los axones ascendentes estudiados, por tanto, no se puede descartar que efectivamente la población estudiada se encontrara en fase de desarrollo en este sentido. Por otro lado se ha demostrado que Bay K8644 no afecta las respuestas de neuronas espinales a la estimulación de aferentes procedentes del mesenterio (Horváth y col., 2001). Además en nuestros estudios, las respuestas en vías ascendentes sufrieron una alteración de su actividad espontánea lo cual podría sugerir que los Ca_v1 sí que están presentes en las neuronas de proyección pero cumpliendo una función no directamente relacionada con la transmisión de señales nociceptivas.

Bay K8644 no solo potenció la respuesta ventral a estímulos de alta intensidad, sino que también aumentó considerablemente las respuestas a estímulos de baja intensidad, de forma que además de aumentar los valores totales de potenciales de acción disparados, también aumentó el área acumulada. Hay que destacar que Bay K8644 aumentó el valor total de estos parámetros y la morfología de la respuesta a estimulación repetitiva, pasando en todos los casos de una respuesta prácticamente nula o en clara caída, a respuestas en las que se observó un coeficiente de incremento positivo, indicando la presencia de procesos de suma progresiva o *wind up*. Por lo tanto Bay K8644 provocó que una estimulación que afectaba sólo a aferentes mielinizadas, generara respuestas que en situación control se corresponden con estimulación de fibras C. El resultado es un desplazamiento a la izquierda de la curva que relaciona la intensidad del estímulo con el efecto *wind-up* (figura 84), reproduciendo el cambio en la relación estímulo-respuesta descrita en los estados de hiperalgesia (Cervero y Laird, 1996).

La potenciación producida por la perfusión de Bay K8644 tuvo una gran duración, sugiriendo que la entrada de calcio a través de esta vía puede iniciar una cascada de señales intracelulares en las motoneuronas que conduzcan a un estado de hiperreflexia. La aplicación de diltiazem una vez iniciada la potenciación por la

aplicación de Bay K8644, revertió los efectos de éste. Esta anulación de la potenciación se observó tanto en el disparo de potenciales de acción de alta y baja intensidad, así como en el área acumulada por estímulos de baja intensidad. Diltiazem también anuló los efectos observados en el perfil de la respuesta, provocando en todos los casos la anulación de procesos de suma progresiva. Bajo las presentes condiciones experimentales, la potenciación de las respuestas de las motoneuronas parecieron requerir la activación continua de las corrientes de calcio tipo L, ya que una vez que se interrumpió la activación del canal la potenciación decayó. Por lo tanto, los efectos de larga duración observados podrían ser atribuidos a una dinámica lenta de interacción entre Bay K8644 y los canales Cav1.2 y Cav1.3, más que al posible inicio de un proceso intracelular de señalización que conlleve cambios fisiológicos estables.

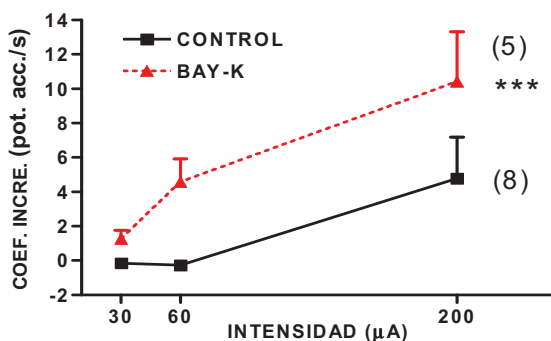


Figura 84.- Representación gráfica del efecto de Bay K8644 sobre el coeficiente de incremento calculado sobre el número de potenciales de acción disparados por las motoneuronas tras estimulación repetitiva con una intensidad de 30, 60 y 200 µA. El agonista produce un desplazamiento significativo de la curva a la izquierda ($p < 0.001$).

Hay que tener en cuenta que en relación a la transmisión nociceptiva, las corrientes de calcio parecen ser críticas en modelos de dolor persistente, donde se dan procesos de sensibilización y plasticidad (ver referencias en Coderre y col.; 1993), como por ejemplo en modelos de inyección de formalina. En este modelo de formalina la inyección intratecal de Bay K8644 aumentó el comportamiento nociceptivo en las fases intermedia y segunda (Coderre y Melzack, 1992), aunque en base a los resultados presentados en este capítulo, se debería tener en cuenta en los modelos de comportamiento los efectos propios de Bay K8644 sobre la respuesta motora.

Como conclusión general se puede afirmar que los CCDV de tipo L pueden estar implicados en la codificación inmediata de señales nociceptivas persistentes, pero parece poco probable que la entrada de calcio a través de estos canales contribuya al desarrollo de procesos de hiperalgesia en neuronas de la médula espinal en las presentes condiciones. Nuestro estudio apoya la tesis de que los CCDV son esenciales en la transmisión senso-motora pero no en la transmisión ascendente de señales nociceptivas.

CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones generales obtenidas tras el desarrollo de esta tesis doctoral son las siguientes:

- 1.- El desarrollo de este nuevo modelo permite registrar de forma simultánea reflejos motores e información ascendente a nivel de la médula espinal de ratón *in vitro*.
- 2.- La actividad neuronal motora y sensorial a nivel de la médula espinal se pueden modular de forma diferencial mediante la aplicación de la amina biógena noradrenalina.
- 3.- Los antagonistas de la corriente de calcio de tipo L verapamil, diltiazem y nimodipina, presentan una actividad inhibitora superior en la vía motora respecto a la vía sensorial.
- 4.- Nimodipina presenta una actividad sobre la vía motora más específica que los otros dos antagonistas verapamil y diltiazem.
- 5.- El agonista Bay K8644 potencia fuertemente la actividad motora en respuesta a estímulos de baja y alta intensidad, mientras que la actividad sensorial sólo es modificada a nivel de su actividad espontánea.
- 6.- Los CCDV de tipo L juegan un papel más importante en la transmisión senso-motora que en la transmisión ascendente de señales nociceptivas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Bading H., Ginty D.D., & Greenberg M.E. (1993) Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science*. 260(5105): 181-186.

Bean B.P. (1984) Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81(20): 6388-6392.

Bean B.P., Nowycky M.C., & Tsien R.W. (1984) Beta-adrenergic modulation of calcium channels in frog ventricular heart cells. *Nature*. 307(5949): 371-375.

Bell J.A. (1993) Selective blockade of spinal reflexes by omega-conotoxin in the isolated spinal cord of the neonatal rat. *Neuroscience*. 52(3): 711-716.

Berjukow S., Marksteiner R., Gapp F., Sinnegger M.J., & Hering S. (2000) Molecular mechanism of calcium channel block by isradipine. Role of a drug-induced inactivated channel conformation. *J. Biol. Chem*. 275(29): 22114-22120.

Berridge M.J. (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron*. 21(1): 13-26.

Berridge M.J., Bootman M.D., & Roderick H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4(7): 517-529.

Birnbaumer L., Campbell K.P., Catterall W.A., Harpold M.M., Hofmann F., Horne W.A., Mori Y., Schwartz A., Snutch T.P. & Tanabe T. (1994) The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron*. 13(3): 505-506.

Boivie I. & Perl E.R. (1975) Neuronal substrates of somatic sensation, in: *Neurophysiology*. C.C.Hunt (University Park Press, Baltimore).

Bolger G.T., Weissman B.A., & Skolnick P. (1985) The behavioral effects of the calcium agonist Bay K 8644 in the mouse: antagonism by the calcium antagonist nifedipine. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 328(4): 373-377.

Budai D., Harasawa I., & Fields H.L. (1998) Midbrain periaqueductal gray (PAG) inhibits nociceptive inputs to sacral dorsal horn nociceptive neurons through alpha2-adrenergic receptors. *J. Neurophysiol.* 80(5): 2244-2254.

Carbone E., Formenti A., & Pollo A. (1990) Multiple actions of Bay K 8644 on high-threshold Ca channels in adult rat sensory neurons. *Neurosci. Lett.* 111(3): 315-320.

Catalano J.V. & Lamarche G. (1957) Central pathway for cutaneous impulses in the cat. *Am. J. Physiol.* 189(1): 141-144.

Catterall W.A. (1995) Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.* 64:493-531.

Bibliografia.

Catterall W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:521-55.

Catterall W.A., Perez-Reyes E., Snutch T.P., & Striessnig J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 57(4): 411-425.

Cervero F., Iggo A., & Ogawa H. (1976) Nociceptor-driven dorsal horn neurones in the lumbar spinal cord of the cat. *Pain.* 2(1): 5-24.

Cervero F. & Sann H. (1989) Mechanically evoked responses of afferent fibres innervating the guinea-pig's ureter: an in vitro study. *J. Physiol.* 412:245-66.

Cervero F. (1994) Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiol Rev.* 74(1): 95-138.

Cervero F. & Laird J.M. (1996) Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain.* 68(1): 13-23.

Chandy K.G. & Gutman G.A. (1993) Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol. Sci.* 14(12): 434.

Chaplan S.R., Pogrel J.W., & Yaksh T.L. (1994) Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269(3): 1117-1123.

Chavis P., Fagni L., Lansman J.B., & Bockaert J. (1996) Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons. *Nature.* 382(6593): 719-722.

Chin H., Krall M., Kim H.L., Kozak C.A., & Mock B. (1992) The gene for the alpha 1 subunit of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive calcium channel (Cchl1a3) maps to mouse chromosome 1. *Genomics.* 14(4): 1089-1091.

Chung J.M., Kenshalo D.R., Jr., Gerhart K.D., & Willis W.D. (1979) Excitation of primate spinothalamic neurons by cutaneous C-fiber volleys. *J. Neurophysiol.* 42(5): 1354-1369.

Clark F.M. & Proudfit H.K. (1991) The projection of noradrenergic neurons in the A7 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat demonstrated by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *Brain Res.* 547(2): 279-288.

Clark F.M. & Proudfit H.K. (1993) The projections of noradrenergic neurons in the A5 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat: anatomical evidence that A5 neurons modulate nociception. *Brain Res.* 616(1-2): 200-210.

Coderre T.J. & Melzack R. (1992) The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J. Neurosci.* 12(9): 3671-3675.

Coderre T.J., Katz J., Vaccarino A.L., & Melzack R. (1993) Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain.* 52(3): 259-285.

- Craig A. D. & Kniffki K. D. (1985) Spinothalamic lumbosacral lamina I cells responsive to skin and muscle stimulation in the cat. *J. Physiol.* 365: 197-221.
- Dahlhaus A., Ruscheweyh R., & Sandkuhler J. (2005) Synaptic input of rat spinal lamina I projection and unidentified neurones in vitro. *J. Physiol.* 566(Pt 2): 355-368.
- Dahlström A. & Fuxe K. (1965) Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. II. Experimentally induced changes in the intraneural amine levels of bulbospinal neurons systems. *Acta Physiol Scand* 247:1-36.
- Delcomyn F. (1997) *Foundations of Neurobiology.* W.H.Freeman and Company, New York.
- Diaz A. & Dickenson A.H. (1997) Blockade of spinal N- and P-type, but not L-type, calcium channels inhibits the excitability of rat dorsal horn neurones produced by subcutaneous formalin inflammation. *Pain.* 69(1-2): 93-100.
- Diochot S., Richard S., Baldy-Moulinier M., Nargeot J., & Valmier J. (1995) Dihydropyridines, phenylalkylamines and benzothiazepines block N-, P/Q- and R-type calcium currents. *Pflugers Arch.* 431(1): 10-19.
- Dobremez E., Bouali-Benazzouz R., Fossat P., Monteils L., Dulluc J., Nagy F., & Landry M. (2005) Distribution and regulation of L-type calcium channels in deep dorsal horn neurons after sciatic nerve injury in rats. *Eur. J. Neurosci.* 21(12): 3321-3333.
- Dobrev D., Milde A.S., Andreas K., & Ravens U. (1999) The effects of verapamil and diltiazem on N-, P- and Q-type calcium channels mediating dopamine release in rat striatum. *Br. J. Pharmacol.* 127(2): 576-582.
- Dogrul A., Yesilyurt O., Isimer A., & Guzeldemir M.E. (2001) L-type and T-type calcium channel blockade potentiate the analgesic effects of morphine and selective mu opioid agonist, but not to selective delta and kappa agonist at the level of the spinal cord in mice. *Pain.* 93(1): 61-68.
- Dogrul A., Gardell L.R., Ossipov M.H., Tulunay F.C., Lai J., & Porreca F. (2003) Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain.* 105(1-2): 159-168.
- Dolmetsch R.E., Pajvani U., Fife K., Spotts J.M., & Greenberg M.E. (2001) Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science.* 294(5541): 333-339.
- Dolphin A.C. (1995) The G.L. Brown Prize Lecture. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G proteins. *Exp. Physiol.* 80(1): 1-36.
- Dolphin A.C. (2006) A short history of voltage-gated calcium channels. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1: 56-62.
- Dougherty P.M., Schwartz A., & Lenz F.A. (1999) Responses of primate spinomesencephalic tract cells to intradermal capsaicin. *Neuroscience.* 90(4): 1377-1392.

Bibliografia.

Dunlap K., Luebke J.I., & Turner T.J. (1995) Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.* 18(2): 89-98.

Erlanger J. & Gasser H.S. (1937) Electrical signs of nervous activity. Univ.Pennsylvania Press, Philadelphia .

Ertel E.A., Campbell K.P., Harpold M.M., Hofmann F., Mori Y., Perez-Reyes E., Schwartz A., Snutch T.P., Tanabe T., Birnbaumer L., Tsien R.W., & Catterall W.A. (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 25(3): 533-535.

Fatt P. & Katz B. (1953) The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J. Physiol.* 120(1-2): 171-204.

Fields H. (2004) State-dependent opioid control of pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 5(7): 565-575.

Fitzgerald M. (1985) The post-natal development of cutaneous afferent fibre input and receptive field organization in the rat dorsal horn. *J. Physiol.* 364:1-18.

Floeter M.K. & Lev-Tov A. (1993) Excitation of lumbar motoneurons by the medial longitudinal fasciculus in the in vitro brain stem spinal cord preparation of the neonatal rat. *J. Neurophysiol.* 70(6): 2241-2250.

Fossat P., Sibon I., Le Masson G., Landry M., & Nagy F. (2007) L-type calcium channels and NMDA receptors: a determinant duo for short-term nociceptive plasticity. *Eur. J. Neurosci.* 25(1): 127-135.

Fung S.J., Manzoni D., Chan J.Y., Pompeiano O., & Barnes C.D. (1991) Locus coeruleus control of spinal motor output. *Prog. Brain Res.* 88: 395-409.

Gasser H.S. (1950) Unmyelinated fibers originating in dorsal root ganglia. *J. Gen. Physiol.* 33(6): 651-690.

Glossmann H. & Striessnig J. (1990) Molecular properties of calcium channels. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* 114: 1-105.

Gregg R.G., Messing A., Strube C., Beurg M., Moss R., Behan M., Sukhareva M., Haynes S., Powell J.A., Coronado R., & Powers P.A. (1996) Absence of the beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(24): 13961-13966.

Handwerker H.O., Iggo A., & Zimmermann M. (1975) Segmental and supraspinal actions on dorsal horn neurons responding to noxious and non-noxious skin stimuli. *Pain.* 1(2): 147-165.

Hara K., Saito Y., Kiriwara Y., Sakura S., & Kosaka Y. (1998) Antinociceptive effects of intrathecal L-type calcium channel blockers on visceral and somatic stimuli in the rat. *Anesth. Analg.* 87(2): 382-387.

Hara T., Tomiyasu S., Sungsam C., Fukusaki M., & Sumikawa K. (2001) Sevoflurane protects stunned myocardium through activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Anesth. Analg.* 92(5): 1139-1145.

- Hedo G., Laird J.M., & Lopez-Garcia J.A. (1999) Time-course of spinal sensitization following carrageenan-induced inflammation in the young rat: a comparative electrophysiological and behavioural study in vitro and in vivo. *Neuroscience*. 92(1): 309-318.
- Hedo G. & Lopez-Garcia J.A. (2001) Alpha-1A adrenoceptors modulate potentiation of spinal nociceptive pathways in the rat spinal cord in vitro. *Neuropharmacology*. 41(7): 862-869.
- Heinke B., Balzer E., & Sandkuhler J. (2004) Pre- and postsynaptic contributions of voltage-dependent Ca²⁺ channels to nociceptive transmission in rat spinal lamina I neurons. *Eur. J. Neurosci*. 19(1): 103-111.
- Hell J.W., Westenbroek R.E., Warner C., Ahljianian M.K., Prystay W., Gilbert M.M., Snutch T.P., & Catterall W.A. (1993) Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J. Cell Biol*. 123(4): 949-962.
- Herrero J.F., Laird J.M., & Lopez-Garcia J.A. (2000) Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog. Neurobiol*. 61(2): 169-203.
- Hess P., Lansman J.B., & Tsien R.W. (1984) Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature*. 311(5986): 538-544.
- Hodge C.J., Jr., Apkarian A.V., & Stevens R.T. (1986) Inhibition of dorsal-horn cell responses by stimulation of the Kolliker-Fuse nucleus. *J. Neurosurg*. 65(6): 825-833.
- Hofmann F., Biel M., & Flockerzi V. (1994) Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu. Rev. Neurosci*. 17:399-418.
- Hofmann F., Lacinova L., & Klugbauer N. (1999) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol*. 139: 33-87.
- Holden J.E., Schwartz E.J., & Proudfit H.K. (1999) Microinjection of morphine in the A7 catecholamine cell group produces opposing effects on nociception that are mediated by alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Neuroscience*. 91(3): 979-990.
- Horvath G., Brodacz B., & Holzer-Petsche U. (2001) Role of calcium channels in the spinal transmission of nociceptive information from the mesentery. *Pain*. 93(1): 35-41.
- Hunt C.C. (1954) Relation of function to diameter in afferent fibers of muscle nerves. *J. Gen. Physiol*. 38(1): 117-131.
- Jiang Z., Rempel J., Li J., Sawchuk M.A., Carlin K.P., & Brownstone R.M. (1999) Development of L-type calcium channels and a nifedipine-sensitive motor activity in the postnatal mouse spinal cord. *Eur. J. Neurosci*. 11(10): 3481-3487.
- Jones S.L. & Gebhart G.F. (1988) Inhibition of spinal nociceptive transmission from the midbrain, pons and medulla in the rat: activation of descending inhibition by morphine, glutamate and electrical stimulation. *Brain Res*. 460(2): 281-296.

Bibliografía.

Kandel E.R., Schwartz J.H., & Jessell T.M. (1991) Principles of neural science. MacGraw-Hill, New York.

Kehl F., Krolikowski J.G., Tessmer J.P., Pagel P.S., Warltier D.C., & Kersten J.R. (2002) Increases in coronary collateral blood flow produced by sevoflurane are mediated by calcium-activated potassium (BKCa) channels in vivo. *Anesthesiology*. 97(3): 725-731.

Kim C., Jun K., Lee T., Kim S.S., McEnery M.W., Chin H., Kim H.L., Park J.M., Kim D.K., Jung S.J., Kim J., & Shin H.S. (2001) Altered nociceptive response in mice deficient in the alpha(1B) subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Mol. Cell Neurosci.* 18(2): 235-245.

Koschak A., Reimer D., Huber I., Grabner M., Glossmann H., Engel J., & Striessnig J. (2001) alpha 1D (Cav1.3) subunits can form I-type Ca²⁺ channels activating at negative voltages. *J. Biol. Chem.* 276(25): 22100-22106.

Lai H.C. & Jan L.Y. (2006) The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 7(7): 548-562.

Lakke E.A. (1997) The projections to the spinal cord of the rat during development: a timetable of descent. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 135:I-XIV, 1-143.

Lin L.H., Chen L.L., Zirrolli J.A., & Harris R.A. (1992) General anesthetics potentiate gamma-aminobutyric acid actions on gamma-aminobutyric acidA receptors expressed by *Xenopus* oocytes: lack of involvement of intracellular calcium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263(2): 569-578.

Lipscombe D., Helton T.D., & Xu W. (2004) L-type calcium channels: the low down. *J. Neurophysiol.* 92(5): 2633-2641.

Lloyd D.P. & Chang H.T. (1948) Afferent fibers in muscle nerves. *J. Neurophysiol.* 11(3): 199-207.

Malmberg A.B. & Yaksh T.L. (1994) Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. *J. Neurosci.* 14(8): 4882-4890.

Margalit D. & Segal M. (1979) A pharmacologic study of analgesia produced by stimulation of the nucleus locus coeruleus. *Psychopharmacology (Berl)*. 62(2): 169-173.

Matute E. & Lopez-Garcia J.A. (2003) Characterisation of sevoflurane effects on spinal somato-motor nociceptive and non-nociceptive transmission in neonatal rat spinal cord: an electrophysiological study in vitro. *Neuropharmacology*. 44(6): 811-816.

Matute E., Rivera-Arconada I., & Lopez-Garcia J.A. (2004) Effects of propofol and sevoflurane on the excitability of rat spinal motoneurons and nociceptive reflexes in vitro. *Br. J. Anaesth.* 93(3): 422-427.

McCarthy R.T. & TanPiengco P.E. (1992) Multiple types of high-threshold calcium channels in rabbit sensory neurons: high-affinity block of neuronal L-type by nimodipine. *J. Neurosci.* 12(6): 2225-2234.

- Mermelstein P.G., Bitó H., Deisseroth K., & Tsien R.W. (2000) Critical dependence of cAMP response element-binding protein phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials. *J. Neurosci.* 20(1): 266-273.
- Meyers D.E. & Snow P.J. (1982) The responses to somatic stimuli of deep spinothalamic tract cells in the lumbar spinal cord of the cat. *J. Physiol.* 329: 355-71.
- Mokha S.S., McMillan J.A., & Iggo A. (1985) Descending control of spinal nociceptive transmission. Actions produced on spinal multireceptive neurones from the nuclei locus coeruleus (LC) and raphe magnus (NRM). *Exp. Brain Res.* 58(2): 213-226.
- Mokha S.S., McMillan J.A., & Iggo A. (1986) Pathways mediating descending control of spinal nociceptive transmission from the nuclei locus coeruleus (LC) and raphe magnus (NRM) in the cat. *Exp. Brain Res.* 61(3): 597-606.
- Morisset V. & Nagy F. (2000) Plateau potential-dependent windup of the response to primary afferent stimuli in rat dorsal horn neurons. *Eur. J. Neurosci.* 12(9): 3087-3095.
- Murakami M., Fleischmann B., De Felipe C., Freichel M., Trost C., Ludwig A., Wissenbach U., Schwegler H., Hofmann F., Hescheler J., Flockerzi V., & Cavalie A. (2002) Pain perception in mice lacking the beta3 subunit of voltage-activated calcium channels. *J. Biol. Chem.* 277(43): 40342-40351.
- Murakami M., Nakagawasai O., Suzuki T., Mobarakeh I.I., Sakurada Y., Murata A., Yamadera F., Miyoshi I., Yanai K., Tan-No K., Sasano H., Tadano T., & Iijima T. (2004) Antinociceptive effect of different types of calcium channel inhibitors and the distribution of various calcium channel alpha 1 subunits in the dorsal horn of spinal cord in mice. *Brain Res.* 1024(1-2): 122-129.
- Muth J.N., Varadi G., & Schwartz A. (2001) Use of transgenic mice to study voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 22(10): 526-532.
- Neugebauer V., Vanegas H., Nebe J., Rumenapp P., & Schaible H.G. (1996) Effects of N- and L-type calcium channel antagonists on the responses of nociceptive spinal cord neurons to mechanical stimulation of the normal and the inflamed knee joint. *J. Neurophysiol.* 76(6): 3740-3749.
- Nowycky M.C., Fox A.P., & Tsien R.W. (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature.* 316(6027): 440-443.
- O'Neill S.K., Triggle C.R., & Bolger G.T. (1994) Competitive binding experiments reveal differential interactions for dihydropyridine calcium channel activators and antagonists at dihydropyridine receptors on mouse brain membranes. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 72(7): 738-745.
- Palecek J. (2004) The role of dorsal columns pathway in visceral pain. *Physiol Res.* 53 Suppl 1: 125-30.
- Perez-Reyes E. (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev.* 83 (1): 117-61.

Bibliografía.

Perrier J.F., Alaburda A., & Hounsgaard J. (2002) Spinal plasticity mediated by postsynaptic L-type Ca²⁺ channels. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 40(1-3): 223-229.

Phelan K.D. & Newton B.W. (2000) Intracellular recording of lamina X neurons in a horizontal slice preparation of rat lumbar spinal cord. *J. Neurosci. Methods.* 100(1-2): 145-150.

Proudfit H.K. (1992) The behavioural pharmacology of the noradrenergic descending system, in: Towards the use of noradrenergic agonist for the treatment of pain. J.M.Besson and G.Guilbaud (Excerpta medica/Elsevier Science, Amsterdam).

Rexed B. & Therman P.O. (1948) Calibre spectra of motor and sensory nerve fibres to flexor and extensor muscles. *J. Neurophysiol.* 11(2): 133-139.

Rexed B. (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp Neurol.* 96(3): 414-495.

Rexed B. (1954) A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J. Comp Neurol.* 100(2): 297-379.

Rivera-Arconada I., Martinez-Gomez J., & Lopez-Garcia J.A. (2004) M-current modulators alter rat spinal nociceptive transmission: an electrophysiological study in vitro. *Neuropharmacology.* 46(4): 598-606.

Rivera L., Gallar J., Pozo M.A., & Belmonte C. (2000) Responses of nerve fibres of the rat saphenous nerve neuroma to mechanical and chemical stimulation: an in vitro study. *J. Physiol.* 527 (2): 305-13.

Russo R.E., Nagy F., & Hounsgaard J. (1998) Inhibitory control of plateau properties in dorsal horn neurones in the turtle spinal cord in vitro. *J. Physiol.* 506(3): 795-808.

Saegusa H., Matsuda Y., & Tanabe T. (2002) Effects of ablation of N- and R-type Ca(2+) channels on pain transmission. *Neurosci. Res.* 43(1): 1-7.

Schaible H.G., Nebe J., Neugebauer V., Ebersberger A., & Vanegas H. (2000) The role of high-threshold calcium channels in spinal neuron hyperexcitability induced by knee inflammation. *Prog. Brain Res.* 129:173-90.

Scholz A. (2002) Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. *Br. J. Anaesth.* 89(1): 52-61.

Schouenborg J. & Sjolund B.H. (1983) Activity evoked by A- and C-afferent fibers in rat dorsal horn neurons and its relation to a flexion reflex. *J. Neurophysiol.* 50(5): 1108-1121.

Sluka K.A. (1997) Blockade of calcium channels can prevent the onset of secondary hyperalgesia and allodynia induced by intradermal injection of capsaicin in rats. *Pain.* 71(2): 157-164.

Sluka K.A. (1998) Blockade of N- and P/Q-type calcium channels reduces the secondary heat hyperalgesia induced by acute inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287(1): 232-237.

Smith M.S., Schambra U.B., Wilson K.H., Page S.O., Hulette C., Light A.R., & Schwinn D.A. (1995) alpha 2-Adrenergic receptors in human spinal cord: specific localized expression of mRNA encoding alpha 2-adrenergic receptor subtypes at four distinct levels. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 34(1): 109-117.

Smith M.S., Schambra U.B., Wilson K.H., Page S.O., & Schwinn D.A. (1999) Alpha1-adrenergic receptors in human spinal cord: specific localized expression of mRNA encoding alpha1-adrenergic receptor subtypes at four distinct levels. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 63(2): 254-261.

Stacy M.J. (1969) Free nerve endings in skeletal muscle of the cat. *J.Anat.* 105, 231-254.

Stanley E.F. & Atrakchi A.H. (1990) Calcium currents recorded from a vertebrate presynaptic nerve terminal are resistant to the dihydropyridine nifedipine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87(24): 9683-9687.

Stevens R.T., Hodge C.J., Jr., & Apkarian A.V. (1982) Kolliker-Fuse nucleus: the principal source of pontine catecholaminergic cells projecting to the lumbar spinal cord of cat. *Brain Res.* 239(2): 589-594.

Striessnig J., Grabner M., Mitterdorfer J., Hering S., Sinnegger M.J., & Glossmann H. (1998) Structural basis of drug binding to L Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 19(3): 108-115.

Thompson S.W., King A.E., & Woolf C.J. (1990) Activity-Dependent Changes in Rat Ventral Horn Neurons in vitro; Summation of Prolonged Afferent Evoked Postsynaptic Depolarizations Produce a d-2-Amino-5-Phosphonovaleric Acid Sensitive Windup. *Eur. J. Neurosci.* 2(7): 638-649.

Todorovic S.M., Pathirathna S., Meyenburg A., & Jevtovic-Todorovic V. (2004) Mechanical and thermal anti-nociception in rats after systemic administration of verapamil. *Neurosci. Lett.* 360(1-2): 57-60.

Trevino D.L., Coulter J.D. & Willis W.D. (1973) Location of cells of origin of spinothalamic tract in lumbar enlargement of the monkey. *J. Neurophysiol.* 36: 750-761.

Trimmer J.S. & Rhodes K.J. (2004) Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu. Rev. Physiol.* 66: 477-519.

Tsien R.W., Lipscombe D., Madison D., Bley K., & Fox A. (1995) Reflections on Ca(2⁺)-channel diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci.* 18(2): 52-54.

Tsutahara S., Furumido H., Ohta Y., Harasawa K., Yamamura T., & Kemmotsu O. (1996) Effects of halothane, isoflurane, enflurane, and sevoflurane on the monosynaptic reflex response in the isolated spinal cord of newborn rats. *Masui.* 45(7): 829-836.

Vacher H., Mohapatra D.P., & Trimmer J.S. (2008) Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol Rev.* 88(4): 1407-1447.

Vanegas H. & Schaible H. (2000) Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. *Pain.* 85(1-2): 9-18.

Bibliografia.

Wang R.A. & Randic M. (1996) alpha-subunit of CaM-KII increases glycine currents in acutely isolated rat spinal neurons. *J. Neurophysiol.* 75(6): 2651-2653.

Wang S.Q., Song L.S., Lakatta E.G., & Cheng H. (2001) Ca²⁺ signalling between single L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in heart cells. *Nature.* 410(6828): 592-596.

Weick J.P., Groth R.D., Isaksen A.L., & Mermelstein P.G. (2003) Interactions with PDZ proteins are required for L-type calcium channels to activate cAMP response element-binding protein-dependent gene expression. *J. Neurosci.* 23(8): 3446-3456.

Westenbroek R.E., Hoskins L., & Catterall W.A. (1998) Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J. Neurosci.* 18(16): 6319-6330.

Westlund K.N. & Coulter J.D. (1980) Descending projections of the locus coeruleus and subcoeruleus/medial parabrachial nuclei in monkey: axonal transport studies and dopamine-beta-hydroxylase immunocytochemistry. *Brain Res.* 2(3): 235-264.

Westlund K.N., Bowker R.M., Ziegler M.G., & Coulter J.D. (1983) Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. *Brain Res.* 263(1): 15-31.

Westlund K.N., Bowker R.M., Ziegler M.G., & Coulter J.D. (1984) Origins and terminations of descending noradrenergic projections to the spinal cord of monkey. *Brain Res.* 292(1): 1-16.

Willis W.D. & Coggeshall R.E. (1991) Sensory mechanisms of the spinal cord. Plenum Press, New York . 1991.

Willis W.D., Al Chaer E.D., Quast M.J., & Westlund K.N. (1999) A visceral pain pathway in the dorsal column of the spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(14): 7675-7679.

Willis W.D. & Westlund K.N. (2001) The role of the dorsal column pathway in visceral nociception. *Curr. Pain Headache Rep.* 5(1): 20-26.

Xiao H.S., Huang Q.H., Zhang F.X., Bao L., Lu Y.J., Guo C., Yang L., Huang W.J., Fu G., Xu S.H., Cheng X.P., Yan Q., Zhu Z.D., Zhang X., Chen Z., Han Z.G., & Zhang X. (2002) Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(12): 8360-8365.

Xu W. & Lipscombe D. (2001) Neuronal Ca(V)1.3alpha(1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J. Neurosci.* 21(16): 5944-5951.

Yeomans D.C. & Proudfit H.K. (1992) Antinociception induced by microinjection of substance P into the A7 catecholamine cell group in the rat. *Neuroscience.* 49(3): 681-691.

Zhang D.X., Owens C.M., & Willis W.D. (1991) Intracellular study of electrophysiological features of primate spinothalamic tract neurons and their responses to afferent inputs. *J. Neurophysiol.* 65(6): 1554-1566.

Zhang M., Sukiasyan N., Moller M., Bezprozvanny I., Zhang H., Wienecke J., & Hultborn H. (2006) Localization of L-type calcium channel Ca(V)1.3 in cat lumbar spinal cord--with emphasis on motoneurons. *Neurosci. Lett.* 407(1): 42-47.

Zhang X., Honda C.N., & Giesler G.J., Jr. (2000) Position of spinothalamic tract axons in upper cervical spinal cord of monkeys. *J. Neurophysiol.* 84(3): 1180-1185.

Zhao Z.Q. & Duggan A.W. (1988) Idazoxan blocks the action of noradrenaline but not spinal inhibition from electrical stimulation of the locus coeruleus and nucleus Kolliker-Fuse of the cat. *Neuroscience.* 25(3): 997-1005.