

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament de Farmacologia,
de Terapèutica i de Toxicologia

**INTERACCIONES NEUROINMUNES Y
DOLOR NEUROPÁTICO: PAPEL DEL
FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL**

**Tesis presentada por Guido Raúl Ruiz Barría para optar al
grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona y
dirigida por el Dr. Josep-E. Baños Díez**

2005

Josep-Eladi Baños i Díez, professor titular de Farmacologia del Departament de Ciències de la Salut i de la Vida de la Universitat Pompeu Fabra,

CERTIFICA

Que la memòria presentada per Guido Raúl Ruiz i Barría amb el títol de **Interacciones neuroinmunes y dolor neuropático: papel del factor de crecimiento neuronal** ha estat realitzada sota la seva direcció i reuneix les condicions per ser presentada per optar al grau de Doctor.

I per què així consti, signa la present en Barcelona a 29 de març de 2005.

Fernando de Mora, professor titular de Farmacologia del Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA

Que ha revisat la memòria de tesis presentada per Guido Raúl Ruiz i Barría amb el títol de **Interacciones neuroinmunes y dolor neuropático: papel del factor de crecimiento neuronal** i considera que és apta per a ser presentada per optar al títol de Doctor.

I per què així consti, signa la present en Barcelona a 29 de març de 2005.

Agradecimientos

A mis queridos padres, por su infinito amor, apoyo y comprensión, que va más allá de tiempos y espacios.

A Josep–E. Baños, director de esta tesis, por su afecto y por el modelo que me ha generado.

A todos los que me han acompañado en el transcurrir de esta aventura, tanto en Chile como España, los que me han escuchado, los que han creído en mí: mis queridos amigos.

A Dios, por iluminar mi vida, y mostrarme el Tao de la ciencia, que no es el que aquí nombro y que no conoce de ciencia.

“La angustia, como el sufrimiento físico y psíquico, forman parte de la naturaleza humana y no son erradicables. Esto ni siquiera resulta deseable, porque una serenidad imperturbable –nirvánica- no es concebible frente al espectáculo cotidiano que ofrece la vida, de una humanidad en continuo aumento y en lucha por la supervivencia. Se puede esperar encontrar un remedio parcial a este sufrimiento con una distribución más justa de los bienes, y no de eliminar la angustia que deriva de darse cuenta de las injusticias perpetradas en perjuicio nuestro y de los otros.”

Rita Levi-Montalcini.

Premio Nobel de Fisiología o Medicina 1986. Descubridora del NGF.

ÍNDICE GENERAL

Índice general	1
Índice de figuras	4
Índice de tablas	5
Principales abreviaturas	6
I. INTRODUCCIÓN	7
1. El dolor neuropático	8
1.1 Aspectos generales.....	8
1.2 Principales mecanismos propuestos para el dolor neuropático.....	12
1.2.1 Descarga aferente: cambios en el sitio de la lesión.....	13
1.2.2 Cambios plásticos en el ganglio de la raíz dorsal.....	14
1.2.3 Papel del sistema nervioso simpático.....	18
1.2.4 Sensibilización espinal: aminoácidos excitadores y dinorfina.....	19
1.2.5 Activación de facilitación descendente: dinorfina y CGRP.....	19
2. El factor de crecimiento neuronal (NGF)	20
2.1 Aspectos generales.....	20
2.2. La familia de las neurotrofinas.....	21
2.3 Los receptores de neurotrofinas.....	21
2.4 Breve caracterización funcional del NGF en el sistema nervioso sensorial.....	22
3. NGF y dolor	23
3.1 NGF e inflamación.....	23
3.2 NGF y dolor neuropático.....	24
3.2.1 Generalidades	24
3.2.2 Acciones directas en el sitio de la lesión.....	25
3.2.3 Acciones sobre el sistema simpático: formación de cestillas simpáticas.....	26
3.2.4 Inducción de cambios plásticos en el DRG y la médula espinal: posible relación con la inflamación neurogénica.....	26
II. OBJETIVOS	28
1. Objetivo general	29
2. Objetivos específicos	29
III. MATERIAL Y MÉTODOS	31
1. Material	32
1.1 Material biológico.....	32
1.2 Fármacos, anticuerpos y derivados séricos.....	32
1.3 Reactivos.....	32

2. Métodos	33
2.1 Procedimientos generales.....	33
2.1.1 Preparación de la solución de NGF.....	33
2.1.2 Administración endoneural de NGF.....	33
2.2 Estudio del efecto conductual de la administración endoneural de NGF: evaluación de la hiperalgesia térmica y de la alodinia mecánica.....	34
2.2.1 Consideraciones éticas, supervisión del estado del animal y manipulación previa.....	35
2.2.2 Pruebas conductuales: hiperalgesia térmica y alodinia mecánica.....	36
2.2.3 Análisis estadístico.....	37
2.2.4 Validación de la técnica de inyección endoneural mediante las evaluaciones de hiperalgesia térmica y de la alodinia mecánica.....	37
2.3 Evaluación del efecto de la administración endoneural de NGF sobre un modelo de dolor tónico inflamatorio.....	38
2.3.1 Procedimiento de la prueba de la formalina.....	40
2.3.2 Análisis estadístico.....	40
2.4 Estudio histológico del nervio ciático inyectado.....	41
2.4.1 Perfusión transcardíaca.....	41
2.4.2 Procesamiento de las muestras.....	42
2.5 Estudios de inmunohistoquímica en el ganglio de la raíz posterior y la médula espinal: Modificaciones en los patrones de expresión de los neuropéptidos CGRP y SP.....	42
2.5.1 Procesamiento de las muestras.....	43
2.5.2 Análisis de las imágenes.....	44
2.5.3 Análisis estadístico.....	47
IV. RESULTADOS	48
1. Estudio del efecto del NGF sobre conductas de dolor neuropático	49
1.1 Efecto del NGF sobre conductas de dolor espontáneo.....	49
1.1.1 Observación pasiva.....	49
1.1.2 Peso de los animales.....	49
1.2 Efecto de la administración endoneural de NGF sobre conductas de dolor por estimulación: hiperalgesia térmica y alodinia mecánica.....	50
1.2.1 Efecto de la administración de vehículo.....	50
1.2.2 Efecto de la administración de 1,10 y 30 ng de NGF.....	52
2. Estudio histológico del nervio ciático inyectado	55
2.1 Secciones de nervios inyectados con vehículo.....	55
2.2 Secciones de nervios inyectados con NGF 1 ng.....	55
2.3 Secciones de nervios inyectados con NGF 30 ng.....	56

3. Estudio del efecto de la administración de NGF sobre la expresión de CGRP y SP en el ganglio de la raíz posterior y en la médula espinal.....	59
3.1 Efecto de la administración de NGF sobre la expresión de CGRP	59
3.1.1 Efecto de la administración de NGF sobre la expresión de CGRP en el ganglio de la raíz posterior.....	59
3.1.2 Cambios en la expresión de CGRP en el asta posterior producidos por el NGF endoneural.....	64
3.2 Efecto de la administración de NGF sobre la expresión de SP.....	67
3.2.1 Efecto de la administración de NGF sobre la expresión de SP en el ganglio de la raíz posterior.....	67
3.2.2 Cambios en la expresión de SP en el asta posterior producidos por el NGF endoneural.....	71
4. Estudio del efecto de la administración de NGF sobre un modelo de dolor tónico inflamatorio: la prueba de la formalina en la rata.....	74
4.1 Validación de la técnica en la prueba de la formalina.....	74
4.2 Efecto de la administración de vehículo en la prueba de la formalina.....	74
4.3 Efecto de la administración de NGF en la prueba de la formalina.....	76
V. DISCUSIÓN.....	79
1. Efectos de la administración de NGF sobre conductas de dolor neuropático y sobre la morfología del nervio ciático inyectado.....	80
2. Efectos de la administración de NGF sobre la expresión de CGRP y SP en la neurona aferente primaria.....	83
2.1 Consideraciones generales.....	83
2.2 Cambios en el patrón de expresión de CGRP en el ganglio de la raíz posterior.....	83
2.3 Incremento de la expresión de CGRP en las láminas profundas del asta posterior.....	85
2.4 Significado funcional de los cambios en la expresión de CGRP.....	86
2.5 Efecto sobre la expresión de SP en el ganglio de la raíz posterior y en las láminas profundas del asta posterior.....	87
3. Efecto de la administración endoneural de NGF en la prueba de la formalina.....	89
VI CONCLUSIONES.....	93
VII BIBLIOGRAFÍA.....	96
VIII ANEXO: PUBLICACIONES.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Efectos conductuales de la administración endoneural de suero salino apirogénico.....	39
Fig. 2. Efectos conductuales de la administración endoneural de vehículo.....	51
Fig. 3. Efecto de la administración endoneural de 1, 10 y 30 ng de NGF en la prueba de la hiperalgnesia térmica.....	53
Fig. 4. Curva dosis-efecto de la administración endoneural de NGF en la prueba de la hiperalgnesia térmica.....	53
Fig. 5. Efecto de la administración endoneural de 30 ng de NGF comparado con el efecto del vehículo en la prueba de la hiperalgnesia térmica.....	54
Fig. 6. Efecto de la administración endoneural de NGF en la prueba de la alodinia mecánica.....	54
Fig. 7. Secciones transversales semifinas de nervios ciáticos, teñidos con azul de toluidina.....	57
Fig. 8. Secciones transversales semifinas de nervios ciáticos teñidos con azul de toluidina.....	58
Fig. 9. Curso temporal del efecto del NGF endoneural sobre el porcentaje de perfiles CGRP-positivos.....	61
Fig. 10. Fotomicrografías de perfiles de neuronas CGRP-positivas en el DRG L4, un día después de la inyección de vehículo.....	62
Fig. 11. El efecto de la administración de NGF sobre la inmunoreactividad a CGRP en el ganglio de la raíz posterior, de acuerdo al tamaño de los perfiles neuronales.....	62
Fig. 12. Curso temporal del NGF endoneural (30 ng) sobre la expresión de CGRP en las láminas III y IV del asta medular posterior.....	65
Fig. 13. Fotomicrografías de secciones transversales de médula espinal con tinción inmunohistoquímica para CGRP.....	66
Fig. 14. Curso temporal del efecto del NGF endoneural (30 ng) sobre la expresión de CGRP en las láminas I y II del asta medular posterior.....	67
Fig. 15. Curso temporal del efecto del NGF endoneural sobre el porcentaje de perfiles SP-positivos.....	69
Fig. 16. Efecto de la administración endoneural de NGF sobre la inmunoreactividad a SP de los perfiles SP-positivos en el DRG.....	70
Fig. 17. Fotomicrografías de perfiles de neuronas SP-positivas en el DRG L5, un día después de la inyección endoneural de vehículo (a) y NGF (b).....	70
Fig. 18. Curso temporal del efecto del NGF endoneural (30 ng) sobre la expresión de SP en las láminas I y II del asta medular posterior.....	72
Fig. 19. Fotomicrografías de secciones transversales de médula espinal con tinción inmunohistoquímica para SP.....	73

Fig. 20. Evolución de la puntuación compuesta de dolor (PCD) en la prueba de la formalina en animales sin tratamiento previo (no tratados) y en animales inyectados tres días antes con vehículo.....	75
Fig. 21. Evolución de la puntuación compuesta de dolor (PCD) en la prueba de la formalina en animales sin tratamiento previo (no tratados) y animales inyectados cinco días antes con vehículo.....	76
Fig. 22. Evolución de la puntuación compuesta de dolor (PCD) en la prueba de la formalina en animales inyectados tres días antes (A) o cinco días antes (B) con vehículo o NGF.....	77
Fig. 23. Tiempo acumulado que los animales pasaron en las conductas de elevación y lamido agitación durante la prueba de la formalina.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clases y subtipos de dolor neuropático atendiendo a su etiología.....	10
Tabla 2. Clasificación de los fármacos utilizados actualmente en el tratamiento del dolor neuropático.....	11
Tabla 3. Principales modelos animales de dolor neuropático.....	12
Tabla 4. Cambios en la expresión de SP y CGRP en el asta medular posterior (láminas I y II) descritos tras lesión nerviosa parcial.....	18
Tabla 5. Efecto del NGF (30 ng) sobre las proporciones (expresadas como porcentaje) de las distintas subpoblaciones de neuronas CGRP-positivas en los DRG L4 y L5 según tamaño.....	63

PRINCIPALES ABREVIATURAS

AINE: antiinflamatorio(s) no esteroideo(s)

ANOVA: (*analysis of variance*) análisis de varianza

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BDNF: (*brain-derived neurotrophic factor*) factor de crecimiento derivado del cerebro

CCI: (*chronic constriction injury*) lesión constrictiva crónica

CCK: (*colecistokinine*) colecistocinina

CGRP: (*calcitonin gene-related peptide*) péptido relacionado al gen de la calcitonina

DRG: (*dorsal root ganglion*) ganglio de la raíz posterior

DO: densidad óptica

GAL: galanina

IASP: (*International Association for the Study of Pain*) Asociación Internacional para el Estudio del Dolor

IHQ: inmunohistoquímica

IL-1: interleucina 1

MRV: médula rostral ventromedial

NGF: (*nerve growth factor*) factor de crecimiento neuronal

NPY: neuropeptido Y

PCD: puntuación compuesta de dolor

PPT: preprotaquicinina

RIE: radioinmunoensayo

SOM: somatostatina

SP: sustancia P

SDRC: síndrome de dolor regional complejo

TF: tampón fosfato

TNF- α : (*tumor necrosis factor- α*) factor de necrosis tumoral- α

trk: (*tropomyosin receptor kinase*) receptor tropomiosina cinasa

Tri-X: tritón X

UI: umbral para cada imagen

VIP: (*vasoactive intestinal peptide*) péptido intestinal vasoactivo

VFE: valor de fondo estándar

VUE: valor de umbral estándar

I. INTRODUCCIÓN

1. EL DOLOR NEUROPÁTICO

1.1 Aspectos generales

“Consideren esto: Cuando un cable telefónico es cortado, la línea se muere. ¿Por qué, entonces, no ocurre lo mismo cuando un tronco nervioso es dañado? ¡Una lesión nerviosa debería eliminar, o al menos aplacar la sensación, no amplificarla!” Con este ejemplo, Marshall Devor, uno de los más importantes investigadores en el tema del dolor neuropático, intentó ilustrar tanto la paradoja como el desafío intelectual que representa el estudio de este tipo de dolor [25]. Actualmente muchos grupos científicos aceptan este desafío, y no sólo por el interés intrínseco que presenta, sino también por el interés humanitario en encontrar terapias eficaces contra este mal. Aunque actualmente no es posible estimar el impacto social que tiene el dolor neuropático, es un hecho establecido el que este estado afecta significativamente la calidad de vida de los pacientes que lo padecen y, en ocasiones, sus manifestaciones pueden prolongarse durante muchos años, por lo que su manejo y tratamiento merecen especial atención [32].

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (*International Association for the Study of Pain, IASP*) define al dolor neuropático como “*el dolor causado por una lesión o disfunción en el sistema nervioso*” [1]. Esta definición, establecida durante las últimas décadas del siglo XX, hace referencia a un concepto clínico bastante más antiguo, distinguido hacia 1870 por el médico norteamericano Silas Weir Mitchel, quien describió los dolores asociados a daños en tejido nervioso que presentaban algunos excombatientes de la Guerra Civil estadounidense [87].

Recientemente se ha planteado que, desde el punto de vista clínico, la definición de la *IASP* para el dolor neuropático puede resultar inespecífica, pues abarca un grupo muy diverso de síndromes dolorosos en cuanto a su etiología y sus manifestaciones [8]. Así, el dolor neuropático se presenta en síndromes como la neuropatía diabética dolorosa, la neuralgia posherpética, la causalgia y la distrofia simpático-refleja, el dolor neuropático posapoplejía y el dolor neuropático asociado al cáncer, entre muchos otros (en la Tabla 1 se recogen los distintas clases y

subtipos de dolor neuropático atendiendo a su etiología). En cuanto a las manifestaciones clínicas propias del dolor neuropático, éstas se clasifican en:

- a) dolor espontáneo o estímulo-independiente, descrito como un dolor quemante, lancinante, punzante o eléctrico [159], y
- b) dolor estímulo-dependiente, que incluye a la hiperalgesia y la alodinia¹ [159, 85].

Toda esta variedad de etiologías y manifestaciones clínicas colaboran a promover la actual discusión que existe en torno a la definición del dolor neuropático [10]. Otro posible factor de confusión, también desde la perspectiva clínica, resulta de lo difícil de establecer relaciones claras entre la etiología, los mecanismos y la sintomatología del dolor neuropático. Es decir, el que un tipo de dolor neuropático se asocie a una lesión patológica, no implica que todos los pacientes que la presenten padezcan también de dolor neuropático, ni implica que el mecanismo del dolor neuropático sea el mismo en todos los pacientes afectados de una misma patología de base, ni tampoco que la sintomatología sea similar en todos estos pacientes [159]. Aunque la definición de dolor neuropático está actualmente en revisión [10], desde el punto de vista farmacológico es posible sostener que la definición de la *IASP* sigue siendo útil, pues todos los síndromes que incluye comparten características fundamentales en cuanto a terapéutica farmacológica (tabla 2). Se conoce que el dolor neuropático es refractario al tratamiento con AINE. Por otro lado, los opioides son útiles en la terapia analgésica de ciertos tipos de dolor neuropático, aunque muchas veces sólo producen un alivio parcial del dolor, siendo necesario utilizar dosis muy elevadas para conseguir analgesia, con el consiguiente riesgo de aparición de intensos efectos adversos y de la generación de dependencia [117].

¹ Se conoce como hiperalgesia al estado en el que se manifiestan respuestas (conductas o expresiones) de dolor exacerbadas frente a estímulos normalmente dolorosos. Se conoce como alodinia al estado en el que se manifiestan respuestas (conductas o expresiones) de dolor frente a estímulos que normalmente no producen dolor.

Tabla 1. Clases y subtipos de dolor neuropático atendiendo a su etiología

Clase	Subtipo de dolor neuropático
Lesión traumática mecánica	Neuropatía por atrapamiento Transección de nervio Causalgia Lesión de la médula espinal Dolor posquirúrgico Dolor del miembro fantasma Formación de escaras
Metabólica o nutricional	Neuropatía alcohólica Pelagra Beriberi Síndrome de ardor del pie
Vírica	Neuralgia posherpética Asociado a VIH/SIDA
Neurotoxicidad	Vincristina Cisplatino Taxol Talio Arsénico Radioterapia
Enfermedades (no víricas)	Diabetes Tumores Esclerosis múltiple Neuralgia del trigémino Síndrome de Guillain-Barré Enfermedad de Fabry Enfermedad de Tangier Dolor neuropático vasculítico/angiopático dolor neuropático amieloide dolor neuropático idiopático
Isquemia	Síndrome talámico Dolor posaccidente vascular encefálico
Función de neurotransmisores	Síndrome de dolor regional complejo

En la actualidad, además de los opioides, se utilizan diversos tipos de fármacos en el tratamiento del dolor neuropático, y algunos de ellos, como los antidepresivos tricíclicos y los antiepilépticos, se han convertido en analgésicos de primera línea dada su contrastada actividad sobre este tipo de dolor [117]. Sin embargo, y tal como ocurre con los opiodes, a menudo se requiere administrar estos fármacos en dosis elevadas y por periodos prolongados, lo que inevitablemente implica la aparición de efectos adversos, situación que en ocasiones obliga a la suspensión de la terapia [117]. Por tales razones, y dada la actual ausencia de terapias específicas, eficaces y seguras contra el dolor neuropático, se hace sumamente necesario conocer los mecanismos que generan y mantienen estos estados de dolor y encontrar dianas farmacológicas específicas sobre las que actúen nuevos fármacos que puedan revertir o anular dichos mecanismos [159].

Tabla 2: Clasificación de los fármacos utilizados actualmente en el tratamiento del dolor neuropático

Clasificación General	Tipo de fármaco	Fármacos prototipos	Diana farmacológica
Analgésicos primarios	Opioides	Morfina, tramadol	Receptores opioides
	Capsaicina	Capsaicina	Receptor vaniloide
Analgésicos secundarios	Antidepresivos	Amitriptilina	Inhibición de la recaptación de monoaminas
	Antiepilépticos	Carbamazepina, gabapentina	Canales de Na ⁺ y/o de Ca ⁺⁺ a nivel central o periférico
	Anestésicos locales y antiarrítmicos	Lidocaína, mexiletina	Canales de Na ⁺ a nivel periférico y central
	Fármacos simpaticolíticos	Clonidina, prazosina, guanetidina	Interferencia de las vías adrenérgicas

1.2 Principales mecanismos propuestos para el dolor neuropático

Hasta hace poco tiempo el conocimiento acerca a la fisiopatología del dolor neuropático era muy limitado, pero durante la década pasada y gracias al desarrollo de diversos modelos de dolor neuropático en animales (tabla 3) se ha conocido más sobre el dolor neuropático que en todas los siglos anteriores [10]. Por lo mismo, en la actualidad existen cientos de teorías basadas en evidencias acerca del origen y el mantenimiento del dolor neuropático [25]. En términos muy generales, es posible señalar que el dolor neuropático es inducido por un desequilibrio entre factores excitadores e inhibidores de la nocicepción, el que puede darse en la periferia, en el sistema nervioso central o en ambos. Dicho desequilibrio se produciría como un mecanismo fallido de adaptación frente a una lesión nerviosa que genera cambios plásticos de largo plazo que perpetúan una experiencia dolorosa sin ningún papel protector o reparativo [121].

Tabla 3. Principales modelos animales de dolor neuropático

Tipo de afectación	Modelo	Conductas de dolor más estudiadas	Alcance de la desaferenciación
Lesión traumática	Transección [148]	Autotomía	Completa
	Lesión por constricción crónica (<i>Chronic constriction injury; CCI</i>)[12]	Alodinia al frío Alodinia táctil Hiperalgnesia térmica	Amplia
	Lesión por ligadura parcial del ciático (<i>Partial sciatic nerve ligation; PSNL</i>) [123]	Alodinia táctil Hiperalgnesia térmica	Moderada
	Ligadura del nervio espinal (<i>Spinal nerve ligation; SNL</i>)[57]	Alodinia táctil Hiperalgnesia mecánica	Moderada
	Lesión selectiva del nervio (<i>Spared nerve injury</i>) [23]	Alodinia táctil Hiperalgnesia mecánica Alodinia al frío	Moderada
Metabólica	Estreptozotocina (Neuropatía diabética) [161]	Alodinia táctil Hiperalgnesia térmica Hipoalgnesia térmica	Ninguna
Quimiotóxica	Vincristina [3]	Alodinia táctil Hiperalgnesia térmica	Ninguna

A continuación se describen brevemente los principales mecanismos propuestos para el dolor neuropático. Se discutirán de un modo especial los estudios que evaluaron cambios en la expresión de neuropéptidos en el ganglio de la raíz posterior y la médula espinal, por estar relacionados con la hipótesis y la metodología de la presente investigación.

1.2.1 Descarga aferente: cambios en el sitio de la lesión

En 1974 Wall y Gutnick caracterizaron los impulsos anormales (descargas ectópicas) provenientes de un neuroma producido por una transección nerviosa, como un posible mecanismo para la generación de dolor neuropático [149]. A partir de entonces, numerosos estudios se han centrado en la evaluación de la hipótesis de que, al menos en su inicio, el dolor neuropático es dependiente de las descargas ectópicas provenientes de axones lesionados [26]. Pese a que a partir de estos estudios se ha obtenido importante información sobre la fisiopatología del dolor neuropático, se ha de notar que la hipótesis planteada se basa en un modelo de desaferenciación total [148], mientras que en humanos las neuropatías más frecuentes y dolorosas se observan tras lesiones parciales. Por otro lado, la información que se ha ido obteniendo gracias a los distintos modelos animales de dolor neuropático por lesión parcial indica que los mecanismos que se activan tras una desaferenciación parcial son distintos de los que se activan tras una desaferenciación total. Recientemente se ha postulado que en el dolor neuropático por lesión parcial no sólo participan las fibras lesionadas, sino también las fibras no lesionadas adyacentes, que ascienden por el mismo nervio [162,70]. Las fibras no lesionadas o “disponibles” (*spared axons*) resultarían entonces sensibilizadas al estar en contacto con fibras adyacentes en degeneración, y podrían conducir potenciales ectópicos provenientes de las fibras lesionadas [70]. En este punto parecen tener un papel fundamental los mediadores producidos durante el proceso de degeneración axonal poslesión o degeneración walleriana. De estos, los más estudiados han sido el factor de necrosis tumoral- α (*tumor necrosis factor- α* , TNF- α) [147,133,134] y la IL-1 (interleucina-1) [132]. Además de estas citocinas, se ha hipotetizado un papel para el factor de crecimiento neuronal (*nerve growth factor*, NGF), cuya expresión por las células de Schwann aumenta en la degeneración walleriana, en la producción de las descargas aferentes desde la zona de la lesión [90,108,16,70]. Dicha hipótesis está siendo explorada actualmente.

De cualquier forma, es un hecho establecido que la producción de potenciales ectópicos, tanto en la zona de la lesión como en el ganglio de la raíz posterior (*dorsal root ganglion*, DRG), es un factor determinante en la generación del dolor neuropático, y sobre todo de su componente espontáneo [26]. Se conoce que, tras

la transección nerviosa, los potenciales ectópicos se producen por el aumento en la densidad de canales de Na⁺ (los principales mediadores de la electrogénesis) en la membrana del extremo axonal proximal de nervios seccionados [26]. En cambio en el caso del dolor neuropático producido por lesiones parciales del nervio la situación parece ser diferente. De todos los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, los canales Na_v 1.8 resistentes a tetrodotoxina (antes conocidos como PN3 o SNS), expresados normalmente en las fibras-C, parecen ser los principales implicados en la génesis de dolor neuropático [61,60]. Recientes hallazgos indican que en las neuropatías dolorosas la expresión de estos canales no aumenta en las fibras lesionadas, sino que disminuye, mientras que aumenta considerablemente en las fibras intactas adyacentes a éstas [60,30]. Actualmente se asume que esta redistribución, y no el aumento del número absoluto de canales, sería la responsable de la producción de los potenciales ectópicos observados al inicio de cuadros de dolor neuropático por lesión parcial.

El desarrollo de descargas ectópicas se correlaciona adecuadamente con el inicio de la hipersensibilidad táctil y térmica [72], lo que sugiere que este fenómeno cumple un papel fundamental en el inicio del dolor neuropático. Por otro lado, la actividad eléctrica incrementada disminuye rápidamente después de tres a ocho días de producida la lesión, mientras los signos de dolor neuropático se mantienen durante meses. Esto indica que otros son los mecanismos que contribuyen al mantenimiento del dolor neuropático luego de que los potenciales ectópicos han desaparecido [72,73].

1.2.2 Cambios plásticos en el ganglio de la raíz posterior y la médula espinal

Ya en 1970, Cragg describía algunos de los profundos cambios observados en el soma de la primera neurona sensorial tras una axotomía, y planteaba la pregunta ¿cuál es la señal para la cromatolisis²? [21]. Durante los años siguientes se ha visto que, además de la apoptosis, muchos y diversos son los cambios observados tanto en las fibras axotomizadas como en las no axotomizadas tras una lesión nerviosa. Dichos cambios en la citoarquitectura y en el fenotipo de las neuronas

² Nombre con el que originalmente se designó el fenómeno de apoptosis.

sensoriales son probablemente la clave tanto del origen como del mantenimiento del dolor neuropático [159]. La mayor parte de ellos se cree están relacionados con el déficit de factores tróficos provenientes de la periferia, principalmente NGF, que es el encargado de la regulación fenotípica de la primera neurona sensorial [34,49,143].

En estudios recientes se ha utilizado la técnica de *microarray* de oligonucleótidos (*chip* de genes) para determinar los cambios en la expresión génica en el DRG en animales con neuropatía por ligadura del nervio espinal [150,140]. Estos estudios han mostrado que, en animales neuropáticos, la expresión de alrededor de 150 genes se ve modificada después de la lesión. Dichos genes codifican la expresión de distintas moléculas, entre neuropéptidos, reguladores del ciclo celular, mediadores de neuroinflamación, canales iónicos, receptores y moléculas-señal, factores de transcripción y genes involucrados en el mantenimiento y la plasticidad neuronal. De ese universo de modificaciones es importante reconocer cuáles son las fundamentales o primarias, es decir, aquellas que tienen mayor influencia en el mantenimiento del dolor neuropático. Los estudios realizados con la técnica de *microarray* indican que los genes que aumentan mayormente su expresión son los que codifican para el neuropéptido Y (NPY), la galanina (GAL) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), mientras que los que disminuyen mayormente su expresión son los que codifican para la somatostatina (SOM) y la amilina.

Los datos obtenidos con la técnica de *microarray* en general coinciden con aquellos obtenidos en investigaciones previas realizadas mediante otras técnicas y en distintos modelos de lesión parcial, principalmente CCI (*chronic constriction injury*, lesión por constricción crónica). Estas investigaciones se centraron principalmente en la determinación de cambios en la expresión o la cantidad de neuropéptidos, siendo los más estudiados el péptido relacionado al gen de la calcitonina (*calcitonine gene-related peptide*, CGRP) y la sustancia P (SP). El interés por estos neuropéptidos se debe fundamentalmente a dos razones: 1) son los que principalmente disminuyen tras la transección nerviosa [52,48,49,143] y 2) cumplen papeles protagónicos en la transmisión nociceptiva desde la periferia, tanto en estados fisiológicos [15,156,157] como patológicos [94,154,9]. Pese a la relación establecida *a priori* entre los cambios postransección y los cambios

poslesión nerviosa parcial, recientes investigaciones indican que los cambios fenotípicos observados en el DRG tras transección y tras lesión parcial no son homologables. A continuación se detallan los hallazgos de estas investigaciones.

1.2.2.a Principales cambios en la expresión de neuropéptidos observados tras transección del nervio

Los cambios en la expresión de neuropéptidos en las neuronas sensoriales primarias producidos tras la transección nerviosa están bastante establecidos. Se observa una importante o total disminución en los niveles de SP [52,137], SOM [95] y de ambas formas, α y β , de CGRP [126,143]. Además se observa un aumento en la expresión de otros neuropéptidos como VIP y GAL [48,143].

La relación entre la disminución de CGRP y SP en la neurona sensorial primaria y el dolor neuropático aún no esta clara. *A priori*, resulta confuso que la drástica disminución de SP y CGRP, péptidos que median o favorecen la transmisión nociceptiva, repercuta de algún modo en la producción de dolor. En este punto, la paradoja planteada por Devor y presentada al comienzo de la presente introducción, vuelve a ponerse de manifiesto. Se ha determinado que, tras la transección del ciático, células grandes del DRG comienzan a expresar SP, observándose además un aumento de SP en el núcleo grácil [96,97]. Del mismo modo, tras la transección de los nervios espinales L4 y L5 se ha observado un aumento de la expresión de CGRP en células grandes del DRG y en las zonas en las que sus fibras se proyectan: las láminas III y IV del asta posterior y el núcleo grácil [86]. Se ha postulado que estos cambios podrían participar del mecanismo del dolor neuropático observado tras la axotomía [76,86].

1.2.2.b Principales cambios en la expresión de neuropéptidos observados tras lesión nerviosa parcial

En comparación con los estudios en transección total, se han realizado menos estudios con el objeto de determinar concentraciones o expresión de neuropéptidos sensoriales en DRG tras una lesión parcial del nervio, y los resultados de estos estudios son disímiles entre sí. Se ha descrito que la expresión

de ARNm para SP y CGRP en el DRG aumenta entre el día 1 y el día 7 post CCI, para luego caer hasta la mitad del nivel normal el día 14, recuperándose entre los días 28 y 42 [93]. Otro trabajo investigó cualitativa y cuantitativamente la expresión de SP en el DRG, los días 2, 5, 10 y 14 post CCI, mediante histología de hibridización *in situ* para preprotaquicinina (PPT) e inmunocitoquímica para SP. La hibridización *in situ* confirmó de un modo cuantitativo que la expresión de ARNm para PPT aumenta entre los días 2 y 5 post CCI, disminuyendo el día 10. No obstante, la observación cualitativa de inmunohistoquímica para SP reveló una disminución evidente de IR el día 14, mientras entre los días 2 a 10, los autores no apreciaron diferencias entre los ganglios ipsi y contralateral a la lesión [80]. Finalmente, Ma y Bisby no observaron diferencias significativas en la expresión de SP los días 4 y 14 post CCI o postransección parcial del nervio ciático [76], ni en la expresión de CGRP 28 días post CCI ó post transección parcial del nervio ciático [77].

En cuanto a los cambios en las concentraciones de neuropéptidos en el asta posterior de la médula espinal, en un comienzo se publicó que tanto la SP como el CGRP disminuían luego de una lesión parcial del nervio ciático, lo que homologaba los cambios poslesión parcial con los cambios observados postransección del nervio. Posteriores investigaciones indican que los niveles del CGRP en el asta posterior de la médula no varían producto de la CCI, mientras que la SP disminuiría sólo durante el primer mes de hiperalgesia, recuperándose posteriormente (ver tabla 4). Por otro lado, la expresión de neuropéptidos no constitutivos de la médula, como el NPY, así como el marcaje de crecimiento neuronal (por ejemplo, por GAP-43 y ciertas lectinas), aumentan notablemente tras la CCI [17].

Son pocas las afirmaciones concluyentes que se pueden hacer en cuanto a los cambios de expresión y concentración de SP y CGRP en el DRG y la médula espinal tras una lesión parcial de nervio periférico y, tal como se señala anteriormente, no es posible ni conveniente extrapolar los resultados obtenidos mediante el modelo de lesión total a los de los modelos de lesión parcial.

En cuanto a la metodología utilizada, si bien la técnica de *microarray* permite un inestimable avance en el conocimiento de los cambios plásticos observados en el dolor neuropático, sólo permite el paso inicial en la investigación de dichos cambios. En otras palabras, además de conocer qué moléculas modifican su expresión tras una lesión nerviosa, se hace necesario conocer cómo y dónde se modifican, esto es, conocer los patrones celulares de expresión molecular en el DRG y en la médula espinal. Esta es, pues, la tendencia de las últimas investigaciones que buscan analizar los cambios fenotípicos en el DRG y la médula espinal [97,76,99,45].

Tabla 4. Cambios en la expresión de SP y CGRP en el asta medular posterior (láminas I y II) descritos tras lesión nerviosa parcial.

Autor y año	Técnicas	Días post CCI estudiados	Resultados
Bennett et al. (1989) [11]	IHQ: apreciación subjetiva RIE	10,20 (28)	↓ CGRP, ↓ SP
Cameron et al. (1991) [18]	IHQ: apreciación subjetiva	28	↓ CGRP, ↓ SP
Garrison et al. (1993) [38]	IHQ: densitometría	7 y 14	CGRP no varía, ↓ SP
Munglani et al. (1995) [91]	IHQ: densitometría	28	CGRP no varía, ↓ SP
Kajander y Xu (1995) [55]	RIE	10 y 60	CGRP no varía, SP no varía
Cameron et al. (1997) [17]	IHQ: densitometría	3,5,14,28 y 70	CGRP no varía; ↓ SP, recuperándose el día 28;
Ma y Bisby (1998) [76]	IHQ: densitometría	4 y 14	↓ SP el día 14;
Malmberg y Basbaum (1988) [79]	IHQ: densitometría	3,7,14, 42, 70	↓ SP sólo los días 7 y 14
Ma et al. (1999) [77]	IHQ: densitometría	28	CGRP no varía

IHQ: inmunohistoquímica; RIE: radioinmunoensayo.

1.2.3 Papel del sistema nervioso simpático

Utilizando su modelo de axotomía, y también en 1974, Wall y Gutnick demostraron que algunas neuronas axotomizadas se vuelven sensibles a la aplicación de agonistas adrenérgicos [149]. La década pasada, este efecto se explicó como un

producto de la formación de “cestillas simpáticas” (*sympathetic baskets*) alrededor de células grandes del DRG [110]. Estas estructuras permitirían un acoplamiento entre el sistema simpático y el sistema sensorial. Dicho acoplamiento sería el gran responsable de ciertos síndromes de dolor regional complejo, como la causalgia y la distrofia simpático-refleja [166,110]. Se hace necesaria una mayor investigación sobre este tema para determinar la participación del sistema simpático en otros tipos de dolor neuropático.

1.2.4 Sensibilización espinal: aminoácidos excitadores y dinorfina

Se ha establecido que la sensibilización espinal es una consecuencia de la lesión nerviosa y la actividad ectópica, producto del aumento en la liberación de aminoácidos excitadores desde la neurona aferente primaria hiperactiva [160,75,159]. Este mecanismo estaría principalmente involucrado en el dolor neuropático estímulo independiente, y puede ser bloqueado por antagonistas del receptor NMDA [160,75].

Muchos estudios han demostrado que existe una estrecha relación entre una lesión del nervio periférico y el aumento en la expresión de dinorfina en la médula espinal [119]. Pese a que la dinorfina es un agonista del receptor opioide κ con acciones antinociceptivas, se ha determinado que en estados de dolor neuropático la dinorfina y algunos de sus fragmentos peptídicos tendrían propiedades pronociceptivas, que contribuyen de un modo fundamental a mantener las hiperestesias propias del dolor neuropático a partir de la segunda semana poslesión [151].

1.2.5 Activación de facilitación descendente: dinorfina y CGRP

La médula rostral ventromedial (MRV) ha sido ampliamente estudiada como un sitio crucial para la modulación de la facilitación descendente. Recientemente se ha determinado que las células ON de la MRV responden positivamente a una lesión nerviosa, generando un estallido de descargas que presumiblemente activan las vías facilitadoras espinopetales. Se ha sugerido que el mantenimiento del dolor neuropático estaría mediado por la activación de estas vías facilitadoras que

descienden desde la MRV. Esta facilitación se produciría en parte por la acción de la dinorfina [103], la que produciría además un aumento de la expresión y la liberación de CGRP en fibras sensoriales [37].

2. EL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL (NGF)

2.1 Aspectos generales

“... fue en Río de Janeiro donde él se reveló, y lo hizo de gran y teatral manera, como si hubiese sido contagiado por la brillante atmósfera de esa explosiva y exuberante manifestación de vida que es el Carnaval de Río” [64]. Con estas palabras Rita Levi-Montalcini ilustra el momento del descubrimiento, a comienzos de la década de 1950, de cierta sustancia difusible, derivada de un tumor de ratón, que actuaba como factor trófico y trópico para células simpáticas y sensoriales de embriones de pollo [65]. El reconocimiento de dicho factor generaría una verdadera revolución en el entonces naciente campo de la neurociencia, y abriría las puertas al descubrimiento de una familia de sustancias cuyos mecanismos relacionan e integran los sistemas nervioso, inmunológico y endocrino de los vertebrados superiores.

El factor descubierto por Levi-Montalcini fue aislado por Stanley Cohen, hacia 1954, y bautizado como factor de crecimiento neuronal (*nerve growth factor, NGF*) [64]. En 1960 Cohen purificó el NGF extraído de glándulas submaxilares de ratón que, aún ahora, es la principal fuente natural del NGF utilizado en investigación [22]. En 1971 el NGF fue secuenciado y su estructura proteica develada: se trata de un dímero constituido por dos subunidades idénticas asociadas por uniones no covalentes. El NGF es sintetizado como una proteína precursora de aproximadamente 30 kDa (pre-pro-neurotrofina) y segmentado hacia la forma madura, en la cual cada monómero pesa alrededor de 13 kDa. La actividad biológica del NGF depende de la estabilidad de su estructura terciaria. En 1983 se localizó en el brazo corto del cromosoma 1, al gen que codifica para el NGF en humanos [22].

2.2 La familia de las neurotrofinas

El NGF es el miembro prototipo de la familia de las neurotrofinas, constituida además por el factor de crecimiento derivado del cerebro (*brain derived neurotrophic factor*, *BDNF* -denominado así pues inicialmente fue aislado desde cerebros de cerdo-), y las neurotrofinas 3 (NT-3), 4/5 (NT-4/5) y 6 (NT-6), esta última identificada sólo en peces. En general todas las neurotrofinas comparten una estructura similar a la del NGF, como homodímeros asociados por uniones no-covalentes [22] .

2.3 Los receptores de neurotrofinas

Las neurotrofinas se unen a dos diferentes tipos de receptores proteicos transmembrana: la familia de receptores tropomiosina cinasa (trk) y el receptor p75. Este sistema dual permite la transducción de señales muy diferentes tras la unión con el ligando, las que, según la situación, pueden determinar procesos tan disímiles como la supervivencia celular y la apoptosis [14, 74]. Originalmente trk y p75 fueron denominados receptores de alta y baja afinidad respectivamente. Hoy en día se considera inadecuada dicha denominación, puesto que el grado de afinidad del NGF en un determinado tejido depende del grado de asociación de ambos receptores [14].

Los receptores trk son miembros de la familia de los receptores tirosina-cinasa. Tres genes trk han sido identificados en mamíferos: trkA, trkB, trkC. El NGF es el ligando preferencial para trkA; el BDNF y la NT-4/5 son los ligandos preferenciales para trkB mientras que NT-3 es el ligando preferencial para trkC. Es preciso aclarar que esta especificidad relativa no implica exclusividad. Así, la NT-3 es también el ligando para trkA y trkB [14]. En cuanto a su estructura, los receptores trk son glicoproteínas de un solo dominio transmembrana, de alrededor de 140 kD. Mientras los dominios intracelulares de estos receptores son relativamente similares, los dominios extracelulares son disímiles y, además de los sitios de unión, contienen múltiples sitios de glicosilación que regulan la actividad del receptor [35,22]. Los dominios intracelulares contienen el dominio transmembrana, un típico dominio cinasa y una corta cola C-terminal de 15 residuos [35]. La

activación de los receptores trk sigue el esquema canónico para los receptores tirosina cinasa: 1) dimerización inducida por el ligando, 2) activación inicial de la actividad cinasa y autofosforilación y 3) fosforilación y activación subsecuente de vías de segundos mensajeros [35]. Además, el receptor trk activado junto al NGF, forman un endosoma que es transportado al soma neuronal, donde ejerce muchas acciones, pues aparentemente este organelo mantiene su actividad catalítica [42,41].

El receptor p75 está clasificado como miembro de la familia de los receptores de TNF, junto a los receptores Fas, CD40 y alrededor de otros 15 miembros. Se trata de una glicoproteína transmembrana que contiene en su dominio extracelular cuatro repeticiones de cisteína, que conforman el dominio de unión al ligando. El receptor p75 posee un dominio intracelular muerto, es decir, no exhibe ninguna actividad catalítica intrínseca, por lo que su hallazgo fue inicialmente devaluado [35]. No fue hasta mediados de los noventa que se demostró que el receptor p75 sí puede transmitir señales y, más aún, que posee funciones altamente específicas en procesos como el crecimiento axonal, la migración de células de Schwann y la inducción de muerte celular [74].

2.4 Breve caracterización funcional del NGF en el sistema nervioso sensorial

El NGF, así como las otras neurotrofinas, es un factor esencial en el crecimiento, diferenciación y supervivencia de neuronas en los sistemas nerviosos autonómico y sensorial durante el inicio de la ontogenia. Además, en individuos adultos regula tanto positiva como negativamente la supervivencia y el fenotipo de diversas neuronas, tanto sensoriales, como adrenérgicas y colinérgicas del prosencéfalo [22].

En estadios precoces de desarrollo, el NGF es necesario para la supervivencia de las neuronas sensoriales de pequeño diámetro, tanto mielinizadas como no mielinizadas, que se proyectan hacia las láminas I y II del asta posterior de la médula espinal y que median la nocicepción y la termocepción [66,116]. El NGF influye además el apropiado desarrollo fenotípico y la regulación de los mecanorreceptores cutáneos de alto umbral [113,114].

En animales adultos el papel principal del NGF es mantener la diferenciación fenotípica de las células sensoriales y simpáticas periféricas. Esto se ha evidenciado al constatar tres hechos: 1) El NGF regula la expresión de SP y CGRP *in vitro* [71] 2) El NGF exógeno contrarresta *in vivo* la pérdida de expresión de SP y CGRP observada tras la transección del nervio ciático [34,49,143] y 3) la administración de anticuerpo anti-NGF induce cambios similares a la transección en neuronas sensoriales [124]. Además, se ha descrito que el NGF tendría un papel supresor de la expresión en las neuronas sensoriales primarias de los péptidos GAL, NPY, VIP y colecistocinina (CCK) [143].

Normalmente el NGF es producido en pequeñas cantidades en los tejidos periféricos [33], es capturado por la neurona sensorial primaria y trasladado por transporte retrogrado al soma neuronal [135,111]. Aproximadamente el 40% de las neuronas del DRG presentan el receptor trkA [112,144]. Se trata principalmente de una población de células pequeñas y medianas del DRG, correspondientes a fibras-C y a fibras mielínicas A δ [142,7], existiendo también en alrededor de un 10% de las células grandes del DRG [104]. En estas neuronas el NGF regula la síntesis de los neuropéptidos CGRP y SP en la rata adulta [71,145].

3. NGF Y DOLOR

3.1 NGF e inflamación

Las neurotrofinas, y especialmente el NGF, son reconocidos mediadores de la inflamación, así como de la hiperalgesia térmica observada en estos estados [66,127]. Inicialmente se observó que los niveles de NGF en la piel están aumentados en inflamación [4,155]. En 1993, el grupo de Lorne Mendell demostró que administraciones sistémicas de NGF producen estados de hiperalgesia tanto en ratas neonatas como adultas [67]. A partir de entonces se han realizado numerosos estudios con el objeto de determinar el mecanismo del efecto hiperalgésico del NGF. Estos se han basado en administraciones sistémicas [68,78] o intraplantares [5,6] de NGF. El mecanismo de acción propuesto postula que en la inflamación, un aumento de la producción de NGF desde mastocitos y neutrófilos en el tejido inflamado produciría a) la sensibilización directa de

nociceptores periféricos [68,6] y b) el aumento de la síntesis y de la liberación de neuropéptidos en la médula espinal, principalmente de sustancia P [78]. Este último mecanismo sería consecuencia de la captación del NGF por los receptores trkA en la periferia y su posterior actividad en el DRG.

3.2 NGF y dolor neuropático

3.2.1 Generalidades

Además de su conocida actividad en inflamación, diversos estudios indican que el NGF tiene un papel importante en el origen y el mantenimiento del dolor neuropático producido por una lesión parcial [16]. En el proceso de degeneración walleriana secundario a una lesión nerviosa, las células de Schwann y los fibroblastos endoneurales liberan NGF durante semanas [125]. Diversos estudios indican que dicha expresión está vinculada al dolor neuropático: 1) La expresión glial de NGF, posterior a la lesión por CCI, aumenta el dolor neuropático [109,100,108], 2) anticuerpos anti-NGF aplicados en el sitio de la CCI inmediatamente después de la ligadura, retardan la aparición de hiperalgesia térmica y de alodinia mecánica [47] 3) El tratamiento con anti-NGF previene completamente la aparición de hiperalgesia térmica y de alodinia mecánica en CCI [105].

Varios mecanismos se han postulado para explicar la participación del NGF en estados de dolor neuropático, y cada uno de estos posibles mecanismos puede incluirse dentro de los mecanismos generales de dolor neuropático anteriormente descritos. Así, el NGF puede estar relacionado a los cambios en el sitio de la lesión que modifican la descarga aferente, puede estar relacionado a la actividad del sistema nervioso simpático, puede originar cambios plásticos en el DRG y la médula espinal y, probablemente, modificaciones funcionales a nivel espinal y central superior. A continuación se describen y discuten brevemente algunos de estos potenciales mecanismos.

3.2.2 Acciones directas en el sitio de la lesión

Tal como se señaló anteriormente, en la zona de la lesión nerviosa se genera un medio con una elevada concentración de NGF, además de otras citocinas como IL-6 y TNF- α , todos miembros de la llamada “red de citocinas de la degeneración walleriana” [125]. La regulación del proceso de degeneración walleriana es compleja y ha sido escasamente estudiada [20], aunque se sabe que es inducida y regulada por moléculas de secreción paracrina y autocrina, como son las citocinas y el NGF [125]. Un posible papel del NGF en el origen del dolor neuropático en la zona de la lesión es el de inductor de los brotes colaterales de fibras mielínicas que se observan al inicio de las conductas de dolor [90,131]. Se cree que dichos brotes maladaptativos producen contactos entre axones que originan potenciales ectópicos. La probabilidad de que el NGF induzca este *sprouting* no es baja, si se considera que el NGF es un conocido inductor de *sprouting* en los tejidos periféricos [28,27,83]. Además, la producción de potenciales ectópicos podría relacionarse a la capacidad del NGF de inducir la producción de canales Na_v 1.8 resistentes a tetrodotoxina [40]. De cualquier modo, esto implicaría que la aparición del dolor neuropático estaría mediada por las fibras no dañadas o disponibles (*spared*), que serían sensibilizadas por las fibras en degeneración o en *sprouting*. Esta hipótesis se conoce como “hipótesis de la degeneración walleriana” [70]. Confirmando esta hipótesis, recientemente se ha demostrado que no es necesario lesionar fibras sensitivas, sino sólo algunas fibras motoras para producir un cuadro de dolor neuropático en ratas. Este efecto estaría mediado, al menos en parte, por NGF [69].

Pese a los antecedentes expuestos, puede decirse que el papel del NGF en el sitio de la lesión ha sido escasamente estudiado. Luego de un interés inicial a mediados de los 90, su estudio fue postergado en favor de otros mecanismos mediados por NGF como las interacciones simpáticas y los cambios plásticos en el DRG y la médula espinal. Solo hasta hace un par de años la idea del efecto del NGF en el sitio de la lesión ha vuelto a ser materia de interés, estudio y revisión.

3.2.3 Acciones sobre el sistema simpático: formación de cestillas simpáticas

Tal vez el mecanismo de acción del NGF en dolor neuropático más estudiado es el que se basa en la capacidad del NGF de inducir la invasión del DRG por fibras adrenérgicas simpáticas [108,164,105,24]. Dicho mecanismo explica sobretodo la participación del NGF en el origen de la causalgia y demás síndromes de dolor neuropático mantenidos por el sistema simpático [110]. Mediante el modelo de CCI, y a través del uso de anticuerpos anti-NGF se ha observado que el NGF induce tanto la formación de “cestillas” de fibras adrenérgicas que envuelven a las neuronas sensoriales en el DRG, como la aparición de hiperalgesia y la alodinia observadas en este modelo [105]. Por otro lado, estos efectos no son dependientes del NGF en el modelo de SNL [105]. Esta última observación indica que la producción de cestillas simpáticas no es el principal mecanismo de acción del NGF en dolor neuropático [105].

3.2.4 Inducción de cambios plásticos en el DRG y la médula espinal: posible relación con la inflamación neurogénica

Tal como se señala en el apartado respecto a NGF e inflamación, algunos de los cambios plásticos en el DRG inducidos por NGF que median parcialmente el dolor inflamatorio ya han sido determinados. No obstante, es un hecho que los cambios plásticos observados tras lesiones parciales de nervios periféricos son muy distintos a los observados en inflamación. La principal diferencia es que en inflamación la expresión de neuropéptidos sensoriales SP y CGRP está elevada, mientras que en dolor neuropático por lesión parcial estaría, según los últimos datos, inalterada (ver datos y referencias mostrados anteriormente).

Es un hecho aparentemente contradictorio que, aunque el NGF participa tanto en el dolor inflamatorio como en el neuropático, la expresión de péptidos en el DRG no se vea regulada de la misma manera en ambos tipos de estados dolorosos. Para aumentar esta contradicción, se puede señalar que en los síndromes de dolor neuropático asociados a una hiperfunción del sistema simpático, como el síndrome de dolor regional complejo, se evidencia, además de dolor neuropático, inflamación neurogénica, sintomatología dependiente de los neuropéptidos CGRP y SP que

son sobreexpresados en axones de la primera neurona sensorial [154]. Cabe recordar que es en este tipo de síndromes donde más énfasis se le ha dado al posible papel del NGF [110]. Lamentablemente, no existen aún modelos animales que reproduzcan adecuadamente el síndrome de dolor regional complejo.

Por todo esto, se hace necesario determinar de qué modo el NGF actúa en el DRG y la médula espinal en estados de dolor neuropático, y cuales son sus efectos a este nivel. Además, y tal como se señala anteriormente, más que cuantificar la cantidad absoluta de los distintos neuropéptidos o el número de células que expresan un determinado péptido o su ARNm, es importante conocer los cambios en los patrones de expresión celular de dichos péptidos, dada las diferencias funcionales de las células que pueblan el DRG.

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Tal y como se señala en la introducción, es un hecho establecido que el NGF tiene un papel en el origen y, probablemente, en el mantenimiento de ciertos estados del dolor neuropático. Aunque existen varias hipótesis sobre los mecanismos responsables, aún no ha sido posible determinar con precisión de qué modo el aumento de la expresión de NGF observada tras una lesión nerviosa periférica participa del dolor neuropático.

El objetivo general de la presente tesis fue evaluar algunos de los posibles mecanismos que relacionan al NGF con el dolor neuropático. Para realizar este estudio se utilizó un modelo experimental directo: la administración endoneural de NGF. Partiendo de esta base metodológica, el abordaje experimental consideró estudios conductuales, histológicos e inmunohistoquímicos.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El objetivo general fue dividido en cuatro **objetivos específicos**. A saber:

1. Determinar si la administración endoneural de NGF produce hiperalgesia térmica y alodinia mecánica, conductas de dolor estímulo-dependiente características de estados de dolor neuropático.
2. Determinar si la administración endoneural de NGF produce cambios morfológicos en el nervio ciático inyectado y analizar si dichos cambios pueden estar relacionados con el efecto del NGF sobre las conductas de dolor neuropático.
3. Determinar si la administración endoneural de NGF, a una dosis que produce conductas de dolor neuropático, produce:
 - a) cambios fenotípicos en las células del ganglio de la raíz posterior, en cuanto a la expresión de los péptidos sensoriales SP y CGRP y

- b) cambios en los patrones de expresión de los péptidos sensoriales SP y CGRP en el asta posterior la médula espinal.
4. Determinar si la administración endoneural de NGF, a una dosis que produce conductas de dolor neuropático, modifica las conductas de dolor inducidas en un modelo de dolor tónico inflamatorio: la prueba de la formalina. Se estudiará si dichos cambios pueden correlacionarse tanto con las observaciones conductuales de dolor neuropático, como con las observaciones histológicas e inmunohistoquímicas del presente estudio.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1 Material biológico

En todos los experimentos se utilizaron ratas macho de la raza Sprague-Dawley de 2 a 3 meses de edad y de un peso comprendido entre 250 y 350 g. Las ratas fueron compradas a través del Servicio de Estabulario de la Universitat Autònoma de Barcelona. Durante el período en que fueron sometidos a evaluaciones conductuales los animales fueron estabulados, de a 3 por jaula, en el estabulario de la Unidad de Fisiología del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universitat Autònoma de Barcelona. En dicho recinto se mantuvieron en condiciones estándar de luz (ciclos de luz/oscuridad de 12 h), temperatura (20 ± 2 ° C) y humedad (50-60%). Los animales tuvieron acceso libre a agua y alimento.

1.2 Fármacos, anticuerpos y derivados séricos

El NGF-2,5S (de glándulas submaxilares de ratón) fue comprado a SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU). El anticuerpo anti-CGRP se compró a Amersham International (Buckinghamshire, Inglaterra), el anticuerpo anti-SP, a DiaSorin (Stillwater, MN, EEUU) y el anticuerpo secundario Cy3-IgG a Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA, EEUU). La seroalbúmina se compró a SIGMA, y el suero normal de cabra (NGS, *normal goat serum*) a ICN Biomedicals, Inc (Aurora, OH, EEUU).

1.3 Reactivos

Todos los reactivos fueron de pureza adecuada para análisis, y comprados a Fluka, Panreac o Merck.

2. MÉTODOS

2.1 Procedimientos generales

2.1.1 Preparación de la solución de NGF

Una vez recibido, el NGF se reconstituyó inmediatamente con una solución al 0,1% de seroalbúmina en tampón fosfato 0,1 M recién preparado. Esta solución fue también la solución vehículo para la inyección y, por lo tanto, la solución inyectada a los animales control en cada uno de los estudios. Se empleó un tampón no potásico para evitar una potencial estimulación de las fibras nerviosas producida directamente por el ión potasio. A la botella que contenía 10 μg de NGF se le añadió 1 mL de la solución vehículo. De este modo se obtuvo una solución madre (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que se dividió en volúmenes de 100 μL y se conservó en viales siliconados a -18°C . Dependiendo de la dosis a inyectar, la solución de los viales se rediluyó adecuadamente.

2.1.2 Administración endoneural de NGF

La administración endoneural se llevó a cabo según la técnica descrita previamente por Wagner y Meyers [147], para lo cual se realizó una intervención quirúrgica en el animal. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p., suplementado con 10 mg/kg cuando fue necesario). Se afeitó la piel en la zona a intervenir y se desinfectó con una solución de polividona yodada. Una vez comprobado que el grado de anestesia era el adecuado por ausencia del reflejo de compresión de la cola, se inició la incisión de la piel. Se expuso el nervio ciático común en el tercio medio de la extremidad posterior por disección a través del bíceps femoral. En la porción próxima a la trifurcación del nervio se insertó cuidadosamente una aguja de calibre 30 conectada a una microjeringa Hamilton. Una vez dentro del espacio subperineural se inyectaron lentamente 10 μL de la solución de NGF. El sitio de inyección se marcó mediante una pequeña sutura en el músculo adyacente. Este procedimiento se realizó en la extremidad posterior izquierda, mientras

que en la derecha el nervio fue expuesto y disecado del mismo modo, pero no fue inyectado (*sham*). Finalmente la incisión se suturó por capas con un hilo de seda. Las ratas fueron colocadas en una jaula con calefacción hasta que comenzaron a deambular, momento en el que fueron trasladados a su jaula de estabulación donde tuvieron acceso libre a agua y comida.

2.2 Estudio del efecto conductual de la administración endoneural de NGF: evaluación de la hiperalgesia térmica y de la alodinia mecánica

Mediante las pruebas de hiperalgesia térmica y de alodinia mecánica se estudió el efecto de tres dosis de NGF: 1, 10 y 30 ng. Las dosis fueron elegidas en base estudios dosis-respuesta preliminares, dirigidos a encontrar la dosis más baja que permitiese obtener resultados conductuales significativos y reproducibles bajo la asunción de que, cuanto mayor es la dosis de NGF, el experimento es menos representativo de la posible situación fisiopatológica mediada por NGF que se intenta estudiar.

En la misma sesión experimental se evaluaron las dos conductas de dolor. La evaluación de la alodinia mecánica se realizó al inicio de la sesión para evitar una posible sensibilización de los animales tras la evaluación de hiperalgesia térmica.

Para cada grupo de animales evaluados, las pruebas de alodinia mecánica e hiperalgesia térmica se realizaron durante los tres días previos a la inyección; de este modo se obtuvieron las medidas basales. Luego de ser inyectados, los animales fueron evaluados los días 1, 3, 5 y 7.

2.2.1 Consideraciones éticas, supervisión del estado del animal y manipulación previa

Todos los estudios conductuales se realizaron de acuerdo a las normas éticas de la *International Association for the Study of Pain* [165]. Además, todos los protocolos experimentales utilizados fueron aprobados por la Comisión de Ética para la Experimentación Animal y Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona y por el *Departament de Agricultura, de Ramaderia i de Pesca de la Generalitat de Catalunya*.

Desde el momento de su llegada y hasta ser eutanasiados, los animales fueron inspeccionados con el objeto de supervisar su estado general. Aunque los estudios conductuales practicados en la presente investigación evaluaron conductas de dolor, se evitó, dentro de lo posible, someter a los animales a dolor excesivo. Esto, porque además de ocasionar sufrimiento innecesario al animal, puede afectar la correcta interpretación de las conductas observadas. La supervisión del estado del animal se realizó de acuerdo al Protocolo de Supervisión propuesto por Morton y Griffiths [89], adaptado para este estudio, y que permite evaluar si el animal sufre dolor o molestia, al detectar cambios en el peso, la apariencia física, la conducta no provocada y la respuesta a la manipulación de los animales. Por otro lado, se observó diariamente el estado de la herida quirúrgica de los animales, con el objeto de detectar y controlar una posible infección.

Las evaluaciones de conductas de dolor, para ser fiables deben realizarse en un ambiente ya conocido por el animal, y nunca en animales en estado de estrés [63]. Por tanto, fue necesario someter a los animales a un proceso de adaptación tanto a la presencia y contacto con el experimentador como al lugar de experimentación. Dos días antes de iniciar las evaluaciones conductuales, los animales fueron recibidos del Estabulario de la Universitat Autònoma de Barcelona. Una vez en el laboratorio y durante dos días, los animales fueron pesados, manipulados durante 5 minutos, y colocados durante 5 a 10 min en los lugares en los cuales su conducta fue posteriormente estudiada.

2.2.2 Pruebas conductuales: hiperalgesia térmica y alodinia mecánica

La hiperalgesia térmica fue evaluada de acuerdo al método descrito por Hargreaves et al. [46]. Según dicho método, el umbral nociceptivo térmico al calor radiante se determina midiendo la latencia de separación de la pata del animal. La latencia de separación se define como el tiempo transcurrido desde la aplicación del calor radiante hasta la separación de la extremidad.

Las ratas fueron depositadas individualmente en los compartimentos del aparato *Plantar Test*[™] (Hugo Basile, Italia): cajas de metacrilato transparente (17 × 22 × 13 cm) elevadas del suelo. Se esperó entre 5 y 15 min a que las ratas disminuyeran su conducta de estrés característica (acicalado o *grooming*) y de exploración. Al realizar la medición, una fuente de calor radiante situada inmediatamente bajo el suelo del compartimiento fue colocada bajo la zona media de la superficie plantar de la pata trasera del animal, zona inervada por el nervio ciático. Se realizó un barrido previo de lecturas de latencias y, basándose en éste, se ajustó la intensidad del haz IR de modo que la latencia de la pata sin tratamiento (control) fuese de alrededor de 10 s. Las lecturas se realizaron cada 5 min, alternando las patas tratada y control, hasta un total de 5 por cada pata en cada sesión experimental.

La alodinia mecánica se estudió utilizando filamentos de Von Frey (*Touch-Test*[™], North Coast Medical, Inc. San José, CA, EEUU), según el método descrito por Tal y Bennett [136]. Los filamentos de Von Frey son monofilamentos de nailon que ejercen una presión definida cuando sus puntas se aplican contra una superficie con una fuerza suficiente para doblarlos. Las ratas fueron depositadas individualmente en compartimentos con el suelo perforado (enrejado) y elevado. Los filamentos, enumerados del 1 al 14 (# 1=0,07 g a #14=5,88 g; con #15= No responde a ninguno entre 1 y 14), fueron aplicados de forma seriada, en orden creciente de dureza. Cada filamento fue aplicado tres veces en ambas patas traseras de la rata, en sitios adyacentes de la superficie plantar. Se consideró como respuesta la elevación rápida de la

pata del animal. El primer filamento en producir al menos dos respuestas fue considerado como umbral de alodinia mecánica.

2.2.3 Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como registro de diferencias \pm error estándar. Este valor se obtuvo restando a los registros de la pata inyectada los registros de la pata no inyectada (*sham*). De este modo, las desviaciones negativas a partir de la basal indicaron la presencia de hiperalgesia térmica o alodinia mecánica, según el caso.

En los estudios de hiperalgesia térmica, el registro de diferencias posinyección de cada grupo fue analizado mediante un análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas, seguido de una prueba post-hoc de Dunnett para comparar los registros posinyección con la basal. En los estudios de alodinia mecánica, los registros de diferencia posinyección fueron comparados con la basal mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon para datos pareados (*non-parametric Wilcoxon signed-ranks matched-paired test*). Se consideró como diferencia significativa un valor de $P < 0,05$.

2.2.4 Validación de la técnica de inyección endoneural mediante las evaluaciones de hiperalgesia térmica y de alodinia mecánica.

Muchos modelos de dolor neuropático periférico en animales consisten en la producción de una lesión del nervio ciático, mediante la constricción, la ligadura, o la sección total o parcial del nervio [163]. De esto se desprende que una excesiva manipulación del nervio o una técnica de inyección inadecuada podría producir una lesión y por ende una neuropatía dolorosa en el animal. Aunque la inyección endoneural es una técnica previamente descrita y que ha demostrado que no produce conductas de dolor neuropático en la rata, ponerla en práctica requiere precisión y destreza de parte del experimentador, para no lesionar el nervio. Antes de realizar los experimentos conductuales fue necesario comprobar que ni la perforación del perinervio ni la administración del volumen de líquido producen *per se* dolor neuropático espontáneo ni las

conductas de dolor estímulo-dependiente evaluadas en los experimentos. Un grupo de 6 animales recibió una inyección endoneural de suero salino estéril no pirogénico. Durante los días 1, 3, 5, y 7 posinyección, los animales fueron evaluados en cuanto a hiperalgesia térmica y alodinia mecánica. Luego de la operación y la administración del suero salino, los animales se recuperaron normalmente, poniéndose de pie, caminando y manteniendo su conducta exploradora habitual. No se observó ninguna anomalía postural que pudiera interpretarse como una disfunción motora o dolor. Los días siguientes a la inyección los animales no manifestaron signos de dolor descritos en modelos animales de dolor neuropático o en el protocolo de supervisión de Morton y Griffith (pérdida de peso, piloerección marcada, cromodacriorrea o autotomía, entre otros). La incisión realizada cicatrizó sin problemas al cabo de 3 a 4 días.

El valor de las medidas basales fue cercano a cero tanto en la prueba de hiperalgesia térmica ($0,1 \pm 0,7$ s) como en la de alodinia mecánica ($0,4 \pm 0,4$ rangos), indicando que no existe diferencia en la respuesta entre ambas patas de un mismo animal. No se observaron diferencias significativas al comparar los valores de los días posoperatorios con la basal en ninguna de las dos pruebas conductuales (Fig. 1).

2.3 Evaluación del efecto de la administración endoneural de NGF sobre un modelo de dolor tónico inflamatorio

Se realizó la prueba de la formalina en animales previamente inyectados con NGF con el objeto de determinar el efecto del aumento de NGF en el nervio periférico asociado a una estimulación sostenida de los nociceptores. La prueba de la formalina, modelo muy común de dolor tónico inflamatorio, consiste en la inyección de una solución de formalina (formaldehído al 37% peso/peso) por vía subcutánea en una de las patas traseras del animal, y la inmediata evaluación de las respuestas o conductas inducidas por el dolor quimiogénico [31,139]. La formalina se inyectó en la planta de la pata cuyo nervio ciático había sido inyectado 1 ó 5 días antes con vehículo, ó 1, 3, 5, ó 10 días antes con 30 ng de NGF.

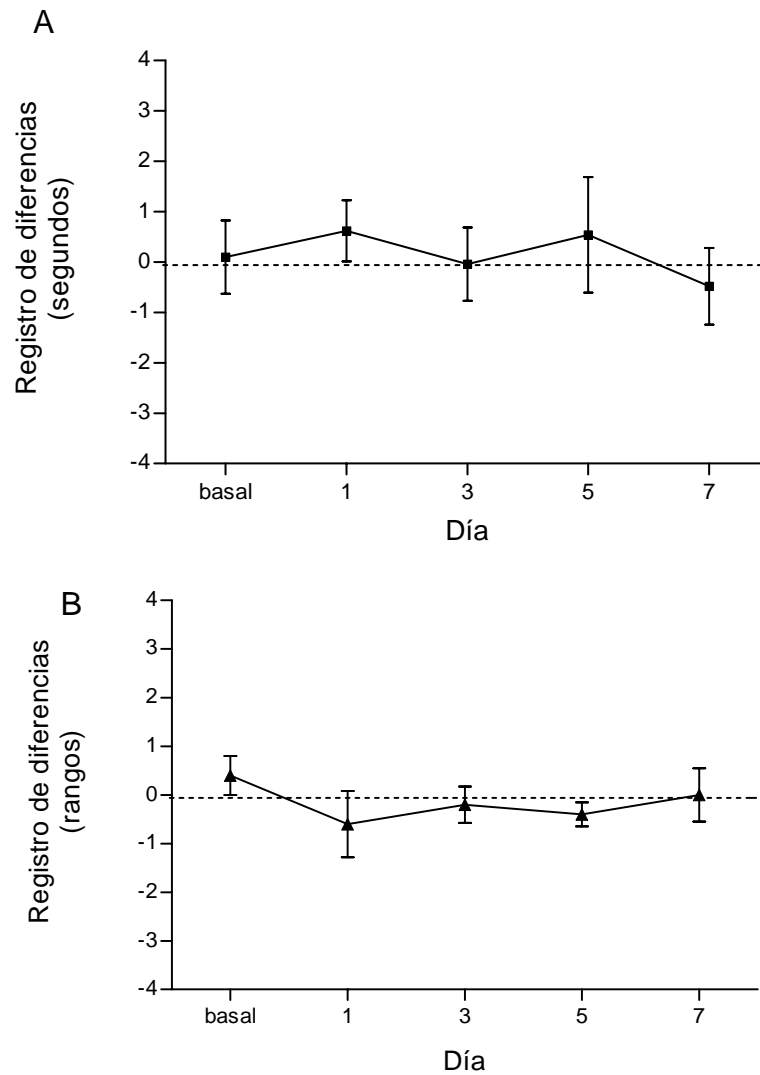


Fig. 1. Efectos conductuales de la administración endoneural de suero salino apirogénico A. Efecto de la administración endoneural de suero salino apirogénico en la prueba de hiperalgesia térmica (s, promedio \pm error estándar). Las medidas basales son cercanas a cero; las medidas de los días posinyección no son significativamente distintas de las medidas basales ($n=12$) (ANOVA para medidas repetidas, seguido de la prueba post-hoc de Dunnett, $P<0,05$). B. Efecto de la administración endoneural de suero salino apirogénico en la prueba de la alodinia mecánica (rangs, promedio \pm error estándar). Las medidas basales son cercanas a cero; las medidas de los días posinyección no son significativamente distintas de las medidas basales ($n=12$) (prueba no paramétrica de Wilcoxon para datos pareados $P<0,05$).

2.3.1. Procedimiento de la prueba de la formalina

En medio de la superficie plantar de la pata de la rata (zona inervada por la rama tibial del nervio ciático) se inyectaron 50 µl s.c. de una solución de formalina al 1% (formaldehído al 0,37 %) en suero salino estéril no pirogénico. Se utilizó una aguja de calibre 30. Inmediatamente después de la inyección, el animal fue puesto en una caja de metacrilato de paredes y suelo transparentes de 17 × 22 × 13 cm. El estudio se realizó según la estrategia descrita por Watson et al. [153]. Se consideraron dos conductas de dolor la elevación de la pata (valor de intensidad 1), y el lamido o la agitación de ésta (valor de intensidad 2) y se midió el tiempo que el animal mantuvo dichas conductas.

2.3.2 Análisis estadístico

Se calculó la “puntuación compuesta de dolor” (PCD), para intervalos de 5 min (300 s) a partir del momento de la inyección y durante 1 h, mediante la fórmula:

$$PCD = \frac{(1 \times TPE) + (2 \times TPLA)}{300}$$

donde:

TPE: tiempo (s) que el animal está con la pata elevada

TPLA: tiempo (s) que el animal está lamiendo o agitando la pata

Se consideró que la pata del animal estaba elevada, toda vez que no tocaba el suelo con la superficie plantar inyectada, no obstante el animal apoye levemente los dedos (*favouring*) o afirme el borde trasero de la pata en su escroto.

Con esta medida se construyó una curva PCD (promedio ± error estándar) versus duración del experimento. Los datos se examinaron mediante un ANOVA para medidas repetidas y una prueba post-hoc de Newman-Keuls para comparaciones dentro del un mismo grupo de animales. Los valores de diferentes grupos experimentales fueron comparados con los de los grupos

inyectados con vehículo, mediante una comparación punto por punto utilizando la prueba *t* de Student.

Cuando se detectaron diferencias significativas entre valores de las curvas de PCD entre un grupo experimental y el vehículo, se comparó el tiempo total que los animales de cada grupo realizaron las conductas consideradas en TPE y TPLA. Esto, con el objeto de detectar cuál de las dos conductas es la principal responsable de las diferencias observadas, dato que puede arrojar información sobre el cambio de percepción dolorosa que experimenta el animal. La comparación se realizó mediante la prueba *t* de Student. En todos los casos se consideró como diferencia significativa un valor de $P < 0,05$.

2.4 Estudio histológico del nervio ciático inyectado

Se realizó un estudio histológico del nervio ciático inyectado con el objeto de determinar el efecto de la administración de 1 ó 30 ng NGF sobre los axones en el sitio de inyección. Se observaron y estudiaron cortes transversales semifinos de la zona del nervio que fue inyectada con 1 ó 30 ng de NGF o con vehículo. Además, en los animales inyectados con 30 ng de NGF, se estudió una zona proximal del nervio separada 7 mm del punto de inyección. Se tomaron muestras de nervio inyectado, los días 1, 5, 8 y 10 posinyección de NGF y 1 y 5 posinyección de vehículo (n=3 por día).

2.4.1 Perfusión transcardíaca

A los animales se les indujo anestesia profunda con pentobarbital sódico (50 mg/Kg i.p.). Una vez comprobado que el grado de anestesia era el adecuado por ausencia del reflejo de compresión de la cola, se procedió a la apertura de la cavidad torácica del animal, y a la inserción de un catéter a nivel del ventrículo izquierdo. Luego se realizó un corte en la vena cava inferior y de inmediato se perfundió con 500 ml de una solución fría de tampón fosfato (pH 7,4) y paraformaldehído al 4%. La velocidad de perfusión se reguló mediante una bomba de perfusión de modo que no tardase más de 30 min.

2.4.2 Procesamiento de las muestras

Se procedió a la disección del nervio inyectado, y se extrajo un segmento de 4 mm conteniendo el sitio señalado (con una sutura en el músculo adyacente) como punto de inyección. En los animales inyectados con 30 ng de NGF, se extrajo además una sección proximal del nervio, separada 7 mm del punto de inyección. El tejido fue fijado por inmersión en una solución de glutaraldehído-paraformaldehído (3% : 3%) en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4) a 4° C durante toda una noche. Posteriormente, el tejido fue posfijado con tetróxido de osmio al 2% durante 2 h y a 4° C, y luego fue deshidratado por inmersión en soluciones etílicas de concentración creciente (70, 90, 96 y 100% de etanol), durante 15 min en cada una. Una vez deshidratadas, las muestras fueron incubadas con acetato de uranilo al 2 % -la solución de contraste-, durante una noche. Finalmente las muestras fueron orientadas longitudinalmente en un molde de silicona e incluidas en resina Agar 100. Se obtuvieron secciones transversales del nervio ciático, de 0,5 μ m de grosor, con un ultramicrotomo (LKB III 6802), se tiñeron con azul de toluidina y se examinaron con un microscopio (Olympus BX-40).

Se captaron imágenes con los objetivos 10 \times y 40 \times utilizando una cámara (Olympus DP-50) asociada a un ordenador. Las imágenes fueron estudiadas en busca de edema, respuesta inflamatoria, anormalidades en la distribución de las fibras mielínicas, anormalidades en la mielina y células de Schwann, desmielinización y degeneración de axones. Las mediciones de áreas y de número de fibras se realizaron utilizando el programa SCIONIMAGE (Scion Corporation, Frederick, MD, EEUU).

2.5 Estudios de inmunohistoquímica en el ganglio de la raíz posterior y la médula espinal: Modificaciones en los patrones de expresión de los neuropéptidos CGRP y SP

Los estudios de inmunohistoquímica se realizaron con el objeto de determinar si la administración endoneural de una dosis de NGF que produce efectos conductuales significativos y reproducibles, modifica los patrones de expresión

de los neuropéptidos SP y CGRP en el DRG y en la médula espinal. Dichas modificaciones se estudiaron los días 1, 3, 5 y 10 posinyección de NGF o vehículo (n=4 por grupo para cada marcador).

Grupos de tres a cuatro animales inyectados con NGF o vehículo fueron perfundidos del modo descrito en el apartado 2.4.1. Tras la perfusión, a los animales se le extrajeron los ganglios de las raíces posteriores L4 y L5, y el segmento espinal L4 y L5.

2.5.1 Procesamiento de las muestras

Se utilizó un protocolo de marcaje simple, es decir, cada muestra fue tratada con sólo un anticuerpo primario. El tejido fue fijado por inmersión en medio Zamboni a 4° C durante 1 h. Luego se traspasó a un baño de tampón fosfato 0,1 M/sacarosa 30 % y se mantuvo a 4° C hasta el momento de ser procesado. Las muestras de tejido fueron incluidas en un bloque de medio de montaje (OCT Tissue-Tek Sakura, Zoetarwoude, Países Bajos), congeladas y cortadas con un microtomo de congelación. Se hicieron cortes de 25 µm de grosor para los ganglios y se escogió uno de cada tres cortes. Se hicieron cortes de 35 µm para el segmento de médula espinal. Las secciones fueron incubadas durante 1 h y en constante agitación, en una solución de TF 0,1 M/Tri-X 0,3%/NGS 1%. Posteriormente se aplicó el anticuerpo primario, anticuerpo de conejo anti-CGRP (1:1000) o anti-SP (1:1000) diluído en TF 0,1 M/Tri-X 0,3%/NGS 1% y se incubó con la muestra durante toda la noche, a 4° C, en constante agitación. Al día siguiente se realizaron cuatro lavados de 1 h cada uno con una solución de TF 0,1 M/Tri-X 0,3%. Se aplicó el anticuerpo secundario, IgG-Cy3 anti-anticuerpo de conejo, y se incubó con la muestra durante toda la noche a 4° C, en constante agitación. Finalmente se realizaron dos lavados de 1 h cada uno con la solución de TF 0,1 M/Tri-X 0,3% /NGS 1%. Las secciones fueron montadas sobre portaobjetos gelatinados y se secaron en una estufa a 40° C durante 10 minutos. La muestra así montada se deshidrató en un baño de etanol 95%, seguido de un baño de etanol 100%, ambos de 2 minutos de duración. Posteriormente la muestra se limpió en un baño en metilsalicilato durante 15 min. Por último, se montó el cubreobjetos con medio de montaje

DPX y se dejó secar. Como control de especificidad, algunas secciones de ganglio y de médula espinal fueron incubados sin anticuerpo primario y procesados del modo aquí descrito, dando como resultado una completa ausencia de tinción. Las muestras fueron observadas utilizando un microscopio (Olympus, Tokio, Japón) equipado con epifluorescencia. Las imágenes fueron captadas utilizando una cámara digital (Olympus, Tokio, Japón) acoplada al microscopio. Los parámetros de captura de imágenes se mantuvieron constantes para todas las fotografías. Algunas secciones con tinción defectuosa, pliegues o burbujas fueron excluidas del análisis. Los tejidos de cada día/tratamiento fueron procesados simultáneamente.

2.5.2 Análisis de las imágenes

Las imágenes se captaron con el objetivo 10× y fueron analizadas usando el programa SCIONIMAGE (Scion Corporation Frederick, MD, EEUU) de análisis de imágenes. El programa fue calibrado para realizar mediciones de área en μm^2 , mientras que la densidad de inmunoreacción se cuantificó utilizando una escala de 256 niveles de gris.

2.5.2.a Perfiles inmunopositivos a CGRP y a SP en el ganglio de la raíz posterior

Se analizaron los siguientes parámetros (i) para CGRP y SP se determinó el porcentaje de células inmunoreactivas y (ii) la densidad promedio del total de células inmunoreactivas. En el caso de CGRP, esta densidad fue estudiada considerando las tres poblaciones de células que expresan el péptido.

El producto de inmunoreacción para cada marcador fue cuidadosamente discriminado observando imágenes de secciones de DRG de ratas no tratadas. A partir de estas imágenes se estableció un valor umbral estándar (VUE) de inmunoreactividad y un valor de fondo (*background*) estándar (VFE). Estos valores permitieron calcular el umbral específico para cada una de las imágenes dependiendo del valor del fondo de estas. El valor de fondo para

cada imagen (FI) se obtuvo desde una zona sin inmunoreacción, y el valor de umbral para cada imagen (UI) se calculó con la fórmula:

$$UI = VUE + (VFE - FI)$$

Mediante este cálculo se pretendió corregir el posible error derivado de la oscilación en la intensidad del fondo de una imagen a otra. Para CGRP los valores de VUE y VFE establecidos fueron 100 y 35 respectivamente, mientras que para SP dichos valores fueron 120 y 60. Dado que es inadecuado asumir linealidad para la relación entre el fondo y el umbral, excepto para un trozo corto de la curva teórica, las imágenes cuyos valores de fondo escaparon del intervalo $[VFE \pm 10]$ fueron descartados del análisis. Se detectaron todos los perfiles por imagen mediante el oscurecimiento artificial y provisorio de éstas. Ésta herramienta de SCIONIMAGE permite alterar la imagen sin modificar los valores de densidad de los píxeles de la imagen. De este modo fueron contados todos los perfiles CGRP-positivos (perfiles con núcleo visible cuya densidad citoplasmática estuvo por sobre el UI) a los que además se les midió la IR promedio y el área, y todos los perfiles CGRP-negativos (perfiles con núcleo visible cuya densidad citoplasmática estuvo por debajo del UI). Para cada rata, 4 a 5 secciones de DRG L4/5 fueron seleccionadas aleatoriamente en el momento del montaje, y de estos se contaron los perfiles en uno a tres campos de cada sección, escogidos también aleatoriamente. Se contó un mínimo de 200 perfiles para cada marcador. Para cada animal se calculó un porcentaje promedio de perfiles inmunoreactivos a CGRP o SP, relativo al número total de perfiles con núcleo visible observados; posteriormente se obtuvo un valor promedio para cada grupo experimental. Dicho valor fue expresado como porcentaje promedio \pm error estándar.

Con el objeto de distinguir cambios específicos de inmunoreactividad según el tamaño de las células, éstas fueron clasificadas en pequeñas ($< 600 \mu\text{m}^2$), medianas ($600-1200 \mu\text{m}^2$) y grandes ($> 1200 \mu\text{m}^2$), de acuerdo a su área transversal y siguiendo el criterio planteado por el grupo de Koichi Noguchi [36] [99]. La proporción de cada subpoblación fue expresada como porcentaje, considerando como 100% el total de las células inmunopositivas a CGRP o SP

respectivamente. Se calculó además la densidad de cada grupo de células. Para cada imagen, se calculó la densidad promedio de cada subpoblación inmunopositiva a CGRP, y se expresó como porcentaje, considerando el umbral de la imagen como 100%. Los datos fueron promediados para cada animal, agrupados por grupo experimental y expresados como porcentaje de densidad \pm error estándar.

2.5.2.b Inmunoreactividad a CGRP y a SP en la médula espinal

Se analizaron los siguientes parámetros: (i) la densidad óptica del producto de inmunoreacción para CGRP y SP en las láminas I y II del asta posterior y (ii) el área ocupada por las fibras inmunoreactivas a CGRP en las láminas III y IV. El producto de inmunoreacción fue estudiado tanto en el lado inyectado como en el lado no inyectado de al menos cuatro secciones de cada rata, seleccionadas aleatoriamente. Para el análisis densiométrico de las láminas I y II, se dibujaron tres cuadrados de tamaño $20 \times 20 \mu\text{m}$ sobre la imagen en tres diferentes regiones de las láminas I-II, y se midió la densidad promedio de las áreas encerradas en los cuadrados. Dichas densidades fueron promediadas para obtener la densidad de la imagen (DO). Se calculó una diferencia porcentual entre el lado inyectado y el lado no inyectado mediante la fórmula $100 \times (DO_{\text{inyectado}} - DO_{\text{no inyectado}}) / DO_{\text{no inyectado}}$. Esta medida fue positiva cuando la tinción del lado experimental es mayor que la del lado control y es negativa en el caso contrario. Se obtuvieron valores de diferencia porcentual de DO para cada animal, los valores fueron promediados para cada grupo experimental y fueron expresados como diferencia porcentual de DO \pm error estándar.

Para medir el área ocupada por las fibras inmunoreactivas a CGRP en las láminas III y IV, se dibujó un cuadrado de $300 \mu\text{m}$ de ancho y $200 \mu\text{m}$ de alto sobre la imagen, en el centro del asta posterior, señalando el área a cuantificar. La inmunoreactividad a CGRP dentro del área designada fue identificada generando un umbral de píxeles en el programa SCIONIMAGE, el cual convierte las zonas de inmunoreactividad en píxeles negros sobre un fondo blanco. El UI se calculó con la misma fórmula descrita para las imágenes de

ganglio. El fondo de cada imagen se midió desde la materia blanca. Para establecer el VUE y el VFE se utilizó una imagen tipo de asta posterior de una rata no tratada. Después de generar el umbral de píxeles, el número total de píxeles negros fue cuantificado y convertido automáticamente en medidas en μm^2 . Se calculó un registro de diferencias restando el área del lado no inyectado al área del lado inyectado. Dicho valor fue calculado para cada animal, los valores fueron promediados para cada grupo experimental y expresados como *registro de diferencias* (μm^2) \pm error estándar.

2.5.3 Análisis estadístico

Los porcentajes de perfiles inmunopositivos de los distintos grupos experimentales fueron comparados mediante un ANOVA seguido de comparaciones individuales con la prueba de Newman-Keuls. Las proporciones de las distintas subpoblaciones de células en los distintos grupos experimentales fueron comparadas mediante la prueba Chi cuadrado. Las densidades promedio de las distintas subpoblaciones de células en los distintos grupos experimentales fueron comparadas mediante un ANOVA de dos colas seguidas de una prueba de Scheffe. Los registros de diferencias de inmunoreactividad en las láminas I y II del asta posterior de los distintos grupos experimentales fueron comparados mediante un ANOVA seguido de comparaciones individuales con la prueba de Newman-Keuls. Los registros de diferencias de áreas ocupadas por fibras inmunoreactivas a CGRP en las láminas III y IV del asta posterior fueron comparados mediante un ANOVA seguido de comparaciones individuales con la prueba de Newman-Keuls. En todos los casos se consideró como diferencia significativa un valor de $P < 0,05$.

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL NGF SOBRE CONDUCTAS DE DOLOR NEUROPÁTICO

1.1 Estudio del efecto del NGF sobre conductas de dolor espontáneo

1.1.1 Observación pasiva

De acuerdo con las pautas de observación pasiva sugeridas por la *IASP* para el estudio del dolor neuropático en animales [163] y siguiendo el protocolo de supervisión de Morton y Griffiths [89], los animales fueron observados para detectar autotomía y cromodacriorrea. También se observó la conducta no provocada de los animales y su respuesta frente a la manipulación. Ni los animales inyectados con las distintas dosis de NGF ni con solvente desarrollaron autotomía, cromodacriorrea u otras conductas o signos sugestivos de dolor o sufrimiento en los días posteriores a la intervención. Tras la operación, la inyección, y salir del estado de anestesia, los animales se enderezaron, caminaron y se recuperaron normalmente. La incisión cicatrizó al cabo de 3 a 4 días, y no se detectaron signos de infección en ningún animal. Durante los días de evaluación no se observaron anomalías posturales ni conductas de dolor, a excepción del día 1, en el que los animales de todos los grupos disminuyeron sus conductas típicas de exploración y de acicalado a consecuencia del trauma posoperatorio.

1.1.2 Peso de los animales

Los animales fueron pesados el día previo a la operación y cada día de evaluación conductual. A excepción del día 1 del período posoperatorio, en el que el peso del día de la operación se mantuvo, el peso de todos los animales aumentó a lo largo del período de evaluación siguiendo un patrón común (datos no mostrados).

1.2 Estudio del efecto de la administración endoneural de NGF sobre conductas de dolor por estimulación: hiperalgesia térmica y alodinia mecánica

1.2.1 Efecto de la administración del vehículo

1.2.1.a Hiperálgesia térmica

En la prueba de la hiperálgesia térmica, la administración del vehículo no produjo ninguna modificación significativa de los registros de diferencias en ninguno de los días estudiados, al compararlos con la medida basal (n=12). Además, todos los valores, tanto basales como posoperatorios fueron cercanos a cero (Fig. 2A). Por lo tanto, se establece que la administración de solvente no produce hiperálgesia térmica (potencia del test $> 0,8$ para un $n \geq 10$ cuando la desviación estándar de cada medida es $\sim 1,5$ s)

1.2.1.b Alodinia mecánica

En la prueba de alodinia mecánica, la administración del vehículo no produjo ninguna modificación significativa de los registros de diferencias en ninguno de los días estudiados, al compararlos con la medida basal (n=12). La medida basal presentó una disminución no significativa respecto a cero ($-0,33 \pm 0,4$), lo que podría interpretarse como un leve estado de alodinia basal. No obstante, dicha diferencia se mantuvo estable durante cada día de evaluación (Fig. 2B). Por lo tanto, se establece que la administración de solvente no produce alodinia mecánica (potencia del test $> 0,8$ toda vez que se trabaja con un $n \geq 5$)

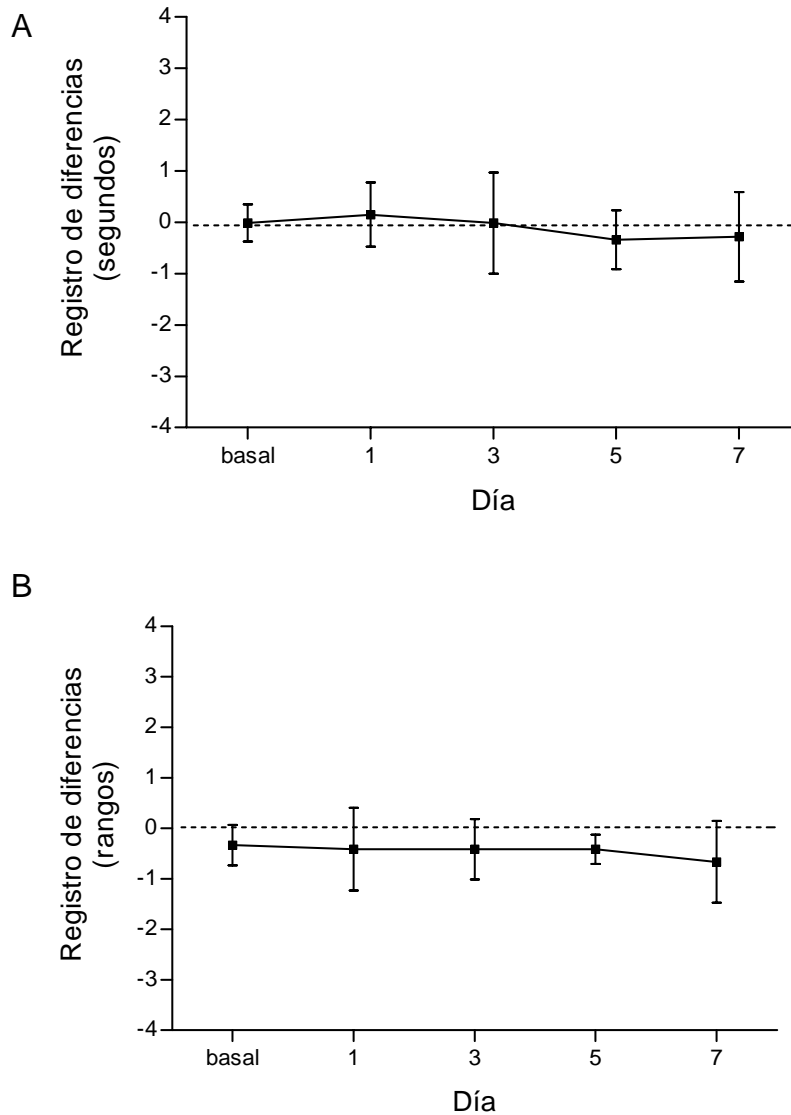


Fig. 2. Efectos conductuales de la administración endoneural de vehículo (seroalbúmina 0,1% en tampón fosfato 0,1 M). (A) Efecto de la administración endoneural de vehículo en la prueba de hiperalgesia térmica. La medida basal es cercana a cero; las medidas de los días posinyección no son significativamente distintas de las basales (ANOVA para medidas repetidas y prueba post-hoc de Dunnett, $P < 0,05$). (B) Efecto de la administración endoneural de vehículo en la prueba de la alodinia mecánica. La medida basal es levemente menor que cero; dicha desviación se mantiene durante los días posinyección. Las medidas posinyección no son significativamente distintas de las basales (prueba no paramétrica de Wilcoxon para datos pareados $P < 0,05$).

1.2.2 Efecto de la administración de 1, 10 y 30 ng de NGF

1.2.2.a Hiperalgnesia térmica

En la prueba de hiperalgnesia térmica, la administración de NGF (1 a 30 ng) produjo un efecto dosis dependiente (Fig. 4) y de corta duración, que se prolongó hasta 5 días posinyección. La administración de 1 ng de NGF (n=17) produjo una leve desviación negativa a partir de la medida basal, los días 3 ($-0,62 \pm 0,41$ s) y 5 ($-0,71 \pm 0,24$ s) posinyección, volviendo a un valor cercano a ésta en el día 7 ($-0,11 \pm 0,44$ s). Dicha desviación no alcanzó un valor de diferencia significativo (Fig. 3). La dosis de 10 ng de NGF produjo el día 3 una desviación negativa similar a la producida por dosis de 1 ng ($-0,65 \pm 0,58$ s), y el día 5 una desviación aún mayor ($-1,52 \pm 0,56$), aunque no alcanzó valores de diferencia significativos con respecto a la basal (Fig. 3). Un grupo de animales (n=6), inyectado con 10 ng de NGF fue evaluado hasta el día 13 posinyección. No se detectaron cambios significativos en el patrón de hiperalgnesia previamente observado, pues a partir del día 7 se obtuvieron registros de diferencias cercanos a la basal (día 7, día 9, día 11, día 13) (datos no mostrados). Tal como se menciona anteriormente, los animales inyectados con NGF no mostraron signos de dolor espontáneo tras la operación. Sin embargo, al realizar la evaluación de la hiperalgnesia térmica y luego de las primeras medidas, los animales adoptaron una postura de protección de la pata inyectada, manteniéndola flexionada y apegada a su vientre. Esta es una postura anormal, similar a la descrita para estados de dolor neuropático en modelos animales [54,12]. La dosis de NGF de 30 ng produjo valores de hiperalgnesia significativos con respecto a la basal, los días 3 ($-1,93 \pm 0,72$ s) y 5 ($-1,93 \pm 0,54$ s) (Fig. 3), y respecto al vehículo, el día 5 (Fig. 5).

1.2.2.b Alodinia mecánica

En la prueba de la alodinia mecánica, la administración de NGF (1 a 30 ng) no produjo diferencias significativas respecto a las medidas basales en ninguno de los días evaluados (Fig. 6).

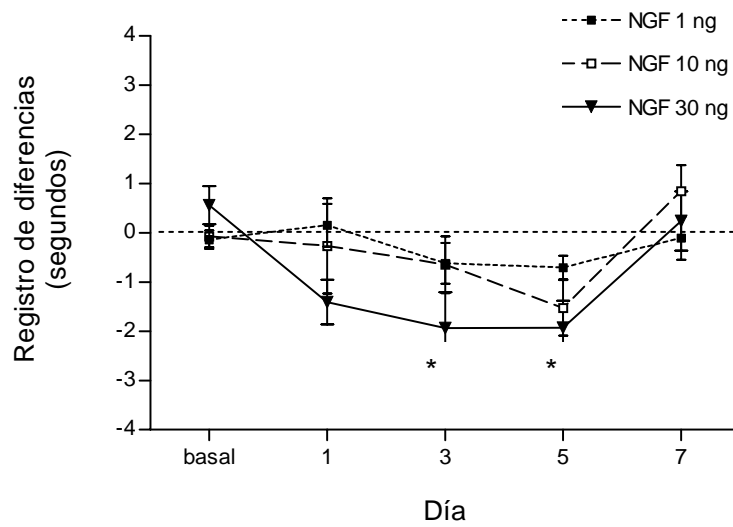


Fig. 3. Efecto de la administración endoneural de 1, 10 y 30 ng de NGF en la prueba de la hiperalgesia térmica. Las dosis de NGF de 1 y 10 ng no producen valores de hiperalgesia significativos. La dosis de NGF de 30 ng produce valores de hiperalgesia significativos los días 3 y 5 al compararlos con las medidas basales (Los asteriscos denotan diferencias significativas. ANOVA para medidas repetidas y test post-hoc de Dunnett, $p < 0,05$, $n=12$ por grupo).

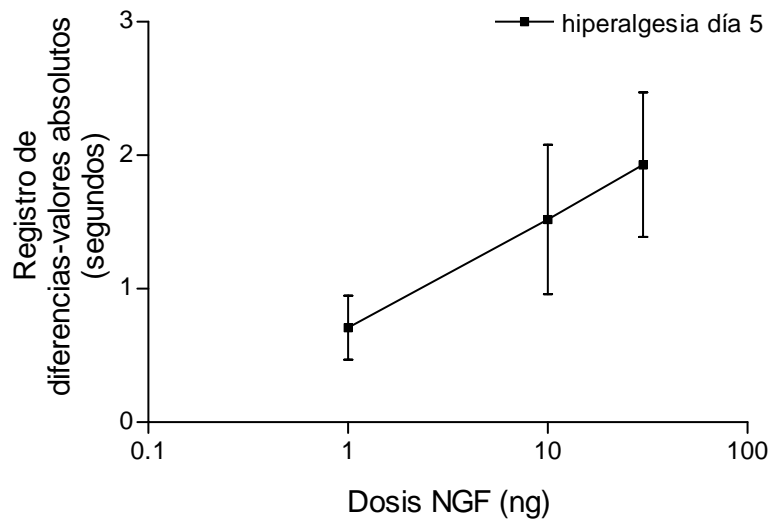


Fig. 4. Curva dosis-efecto de la administración endoneural de NGF 1 a 30 ng el día 5 en la prueba de la hiperalgesia térmica.

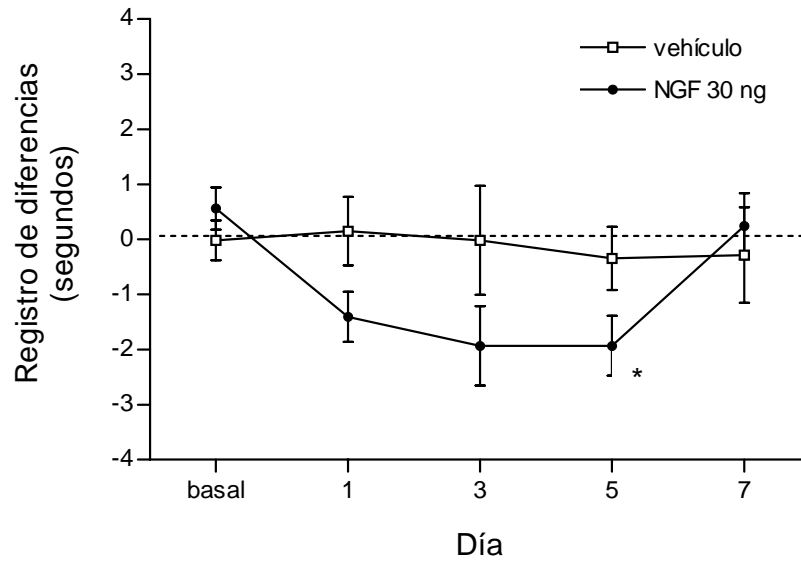


Fig. 5. Efecto de la administración endoneural de 30 de NGF comparado con el efecto del vehículo en la prueba de la hiperalgesia térmica. Se observó una diferencia significativos el día 5 (el asterisco denota diferencia significativa; prueba *t* de Student, $p < 0,05$)

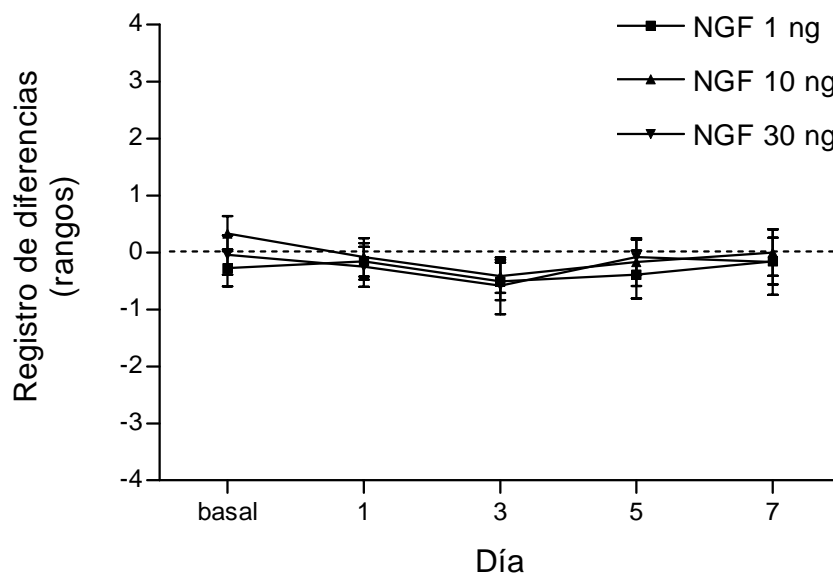


Fig. 6. Efecto de la administración endoneural de NGF el la prueba de la alodinia mecánica. Ninguna de las dosis de NGF estudiadas (1,10 y 30 ng) produjo valores significativamente distintos de las medidas basales ninguno de los días estudiados (prueba no paramétrica de Wilcoxon para datos pareados).

2. ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL NERVIU CIÁTICO INYECTADO

2.1 Secciones de nervios inyectados con vehículo

No se observaron anomalías histológicas al comparar las secciones de nervio inyectado con vehículo con secciones de nervio no inyectado. Además, el aspecto de las secciones de nervio inyectado con vehículo concuerda con las descripciones de un nervio ciático normal de rata realizadas por otros autores [128,120] (Fig. 7a). En las secciones se apreció el epinervio del ciático rodeando axones mielínicos de diversos diámetros, distribuidos paralelamente, dejando un mínimo espacio interaxonal. Se reconoció el espectro normal de fibras según tamaño, con un predominio evidente de fibras grandes, y las fibras mielínicas de pequeño diámetro, correspondientes a los mecanoreceptores de alto umbral (fibras A δ), intercaladas entre las grandes. En las secciones de nervio inyectadas con vehículo no se observó ningún signo patológico.

2.2 Secciones de nervios inyectados con NGF 1 ng

En las secciones de nervio inyectadas con NGF 1 ng se detectaron anomalías en las fibras mielínicas en un área definida, ubicada en la periferia del fascículo tibial. Dicha área comprende alrededor de un 5% del área total de la sección de nervio. Como se muestra en la Fig. 8b, se observaron algunas fibras con una matriz axoplásmica densa y moteada, signo característico del proceso de degeneración walleriana, intercaladas entre otras fibras de apariencia normal. Además, se observaron otras fibras anormalmente hinchadas y con una delgada vaina de mielina, o incluso focalmente desmielinizadas. En el área afectada también fue posible apreciar un ligero edema, identificado como espacio endoneural sin estructuras. Aparte del edema no se observó ningún otro signo de inflamación endoneural. Todas estas anomalías fueron observadas el día 1, mientras que el día 5 el aspecto del nervio fue esencialmente normal.

2.3 Secciones de nervios inyectados con NGF 30 ng

Comparado con el efecto descrito para 1 ng de NGF, en las secciones de nervios inyectados con 30 ng de NGF se observó un mayor número de fibras en desmielinización y degeneración, además de un leve edema endoneural presente en las secciones de nervios extraídos entre los días 1 y 8 posinyección. El área afectada también fue mayor, comprendiendo el día 1 alrededor del 20% del área total de la sección transversal (Fig. 7b). Su ubicación fue similar, tendiendo a la periferia del fascículo tibial del nervio ciático. El día 1 (Fig. 8c) las fibras en desmielinización se vieron considerablemente hinchadas y con una capa de mielina muy delgada, o totalmente desmielinizadas y con una forma irregular. Por otro lado, el proceso de degeneración walleriana se observó principalmente en algunas fibras grandes, mientras que otras fibras adyacentes permanecieron intactas dentro del área anormal. Se observaron muy pocas células endoneurales, principalmente mastocitos y macrófagos; esto indica que las principales células fagocíticas fueron células de Schwann. En las secciones de días posteriores, la zona anormal fue de menor tamaño, y el número de fibras en degeneración disminuyó progresivamente: alrededor de un 30% del número total de fibras en degeneración que fue encontrado el día 1 pudo encontrarse el día 10. A partir del día 5 (Fig. 8d) se detectaron grupos de pequeños axones envueltos dentro de una célula de Schwann y asociados con fibroblastos. Estas estructuras revelan el inicio de un proceso de regeneración axonal. El día 8 (Fig. 8e) se observaron grupos de pequeños axones mielinizados, pero con vainas de mielina extremadamente delgadas. El día 10 (Fig. 8f) la apariencia del nervio fue más normal, aunque aún fue posible observar algunas fibras en degeneración y regeneración. En las secciones de nervio inyectado con 30 ng de NGF, pero correspondientes a un trozo de nervio 7 mm proximal a la zona de inyección no se apreció ninguna anomalía histológica.

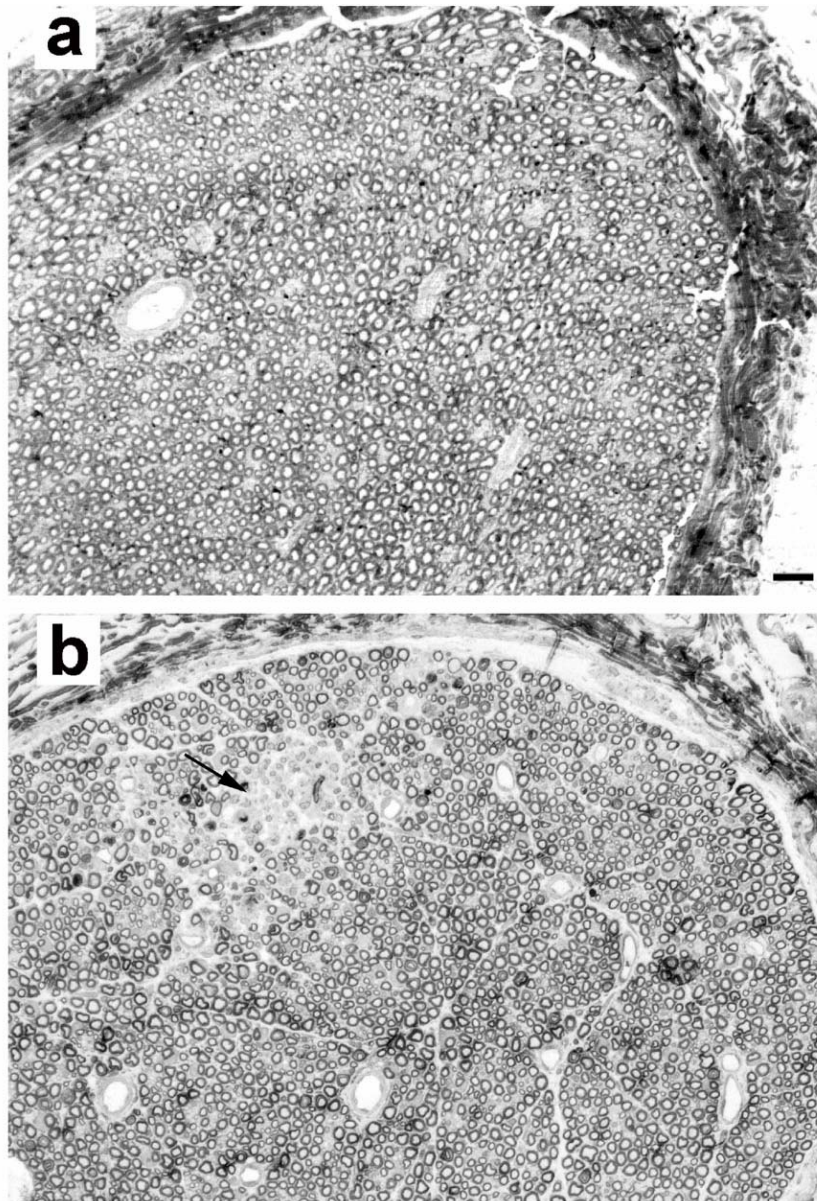


Fig. 7. Secciones transversales semifinas de nervios ciáticos, teñidos con azul de toluidina (barra= 50 μ m). (a) Nervio control inyectado con vehículo, día 1 posinyección. La apariencia de los axones mielinicos es normal y el compartimento endoneural es uniforme. (b) Nervio inyectado con 30 ng de NGF, día 1 posinyección. El área anormal se reconoce por la evidente pérdida de fibras mielínicas (flecha).

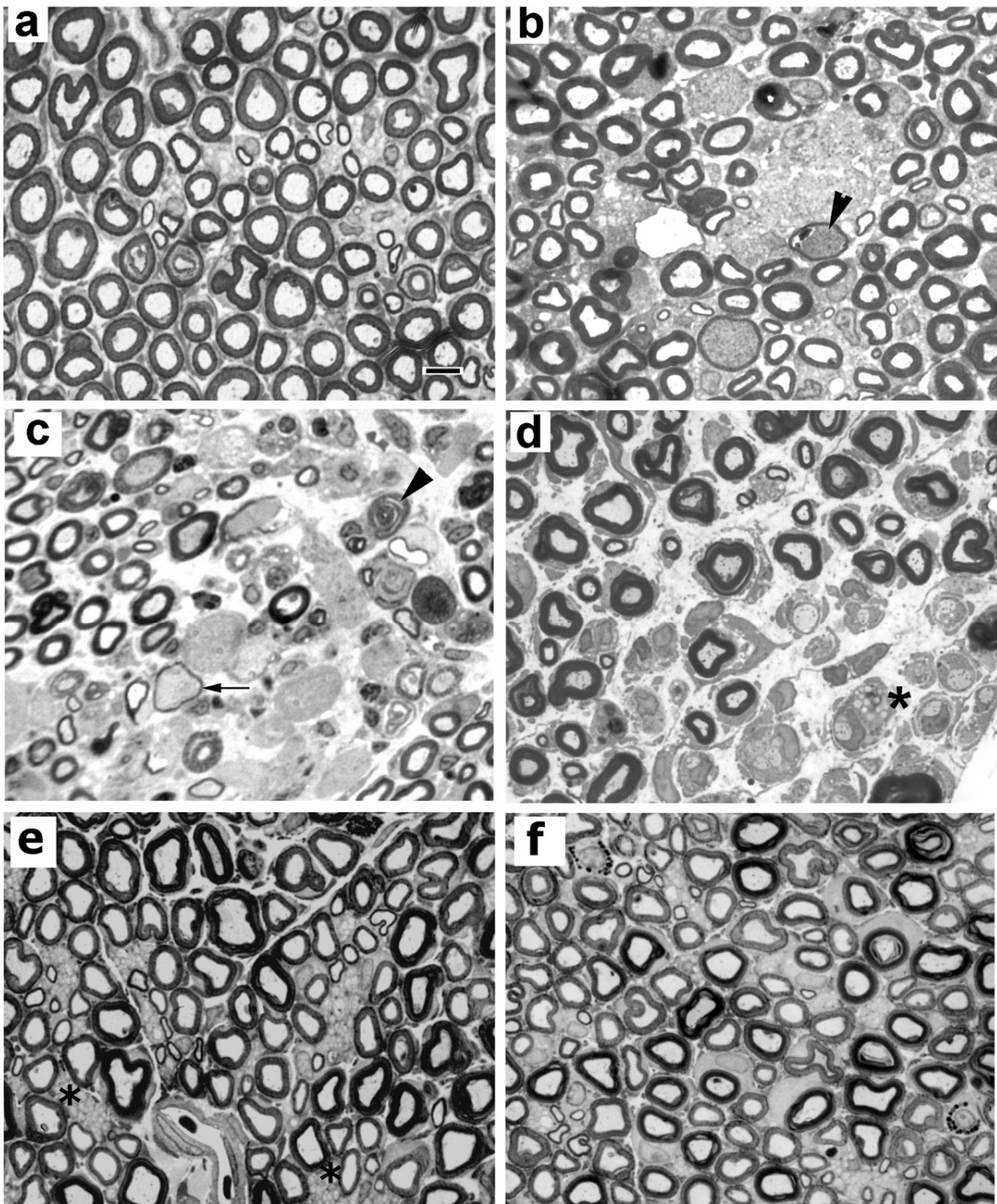


Fig. 8. Secciones transversales semifinas de nervios ciáticos teñidos con azul de toluidina (barra= 10 μ m). (a) Nervio control inyectado con vehículo, día 1 posinyección. Se aprecia la apariencia normal de las fibras mielínicas. (b) Nervio inyectado con 1 ng de NGF, día posinyección 1. Se observan fibras desmielinizadas y fibras en desmielinización; además, fibras en degeneración y desmielinización (punta de flecha) intercaladas entre fibras mielínicas de apariencia normal. (c) Nervio inyectado con 30 ng de NGF, día 1 posinyección. Se observan fibras desmielinizadas, fibras en degeneración walleriana (punta de flecha), y desmielinización

(flecha) y un leve edema intersticial (espacio sin estructura). (d) Nervio inyectado con NGF 30 ng, día 5 posinyección. Se observa un leve edema intersticial, fibras desnudas y degeneradas, y grupos de pequeños axones encerrados dentro de una célula de Schwann (asterisco). (e) Nervio inyectado con NGF 30 ng, día 8 posinyección. Se observan varios grupos de pequeños axones dentro de una célula de Schwann (asteriscos), estos se ubican cerca de vasos capilares; se distingue uno junto al borde inferior de la imagen. (f) Nervio inyectado con NGF 30 ng, día 10 posinyección. En general, la apariencia del nervio es mucho más normal que en los días anteriores, no obstante se observan zonas de *sprouting* entre las fibras normales.

3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE NGF SOBRE LA EXPRESIÓN DE CGRP Y SP EN EL GANGLIO DE LA RAÍZ POSTERIOR Y EN LA MÉDULA ESPINAL

3.1 Estudio del efecto de la administración de NGF sobre la expresión de CGRP

3.1.1 Estudio del efecto de la administración de NGF sobre la expresión de CGRP en el ganglio de la raíz posterior

3.1.1.a Efecto de la administración endoneural de vehículo

Para establecer que la inyección de vehículo no produce efectos significativos en la expresión CGRP en las neuronas del DRG, se comparó el efecto del vehículo con datos experimentales obtenidos de animales no tratados. En los animales no tratados, un $42,2 \pm 1,1\%$ de perfiles de neuronas fueron CGRP-positivos, correspondiendo principalmente a neuronas de tamaño pequeño a mediano. Este resultado concuerda con observaciones ya publicadas que señalan que aproximadamente un 40% de las neuronas del DRG son CGRP-positivas [53,142]. Uno y 5 días después de la administración endoneural de vehículo, el porcentaje de perfiles de neuronas CGRP-positivas en el DRG no se vio modificado, comparado con el porcentaje de ratas no tratadas, siendo $43,3 \pm 1,3 \%$ el día uno y $44,0 \pm 1,10 \%$ el día 5. Además, las proporciones de perfiles CGRP-positivos de acuerdo a su tamaño fueron muy similares (véase tabla 5 para los detalles numéricos). Considerando el nulo efecto de la inyección de vehículo sobre el porcentaje de perfiles CGRP-positivos en el

DRG y atendiendo a las directrices actuales para la experimentación con animales, no se consideró necesario inyectar más ratas con vehículo. En todos los casos, los datos de los grupos inyectados con NGF se compararon con datos de animales no tratados y también con los datos de ambos grupos inyectados con vehículo.

3.1.1.b Cambios en el patrón de expresión de CGRP producidos por el NGF endoneural

Después de una única inyección de 30 ng de NGF el porcentaje total de neuronas CGRP-positivas aumentó entre un 10 y un 15%. Como se muestra en la figura 9, este incremento fue evidente a partir del día 1 posinyección de NGF, y fue observable hasta el día 5. El día 1 el porcentaje de perfiles CGRP-positivos fue $50,1 \pm 0,8$ %. En los días 3 y 5 los porcentajes fueron $54,5 \pm 3,3$ % y $54,8 \pm 0,9$ %, respectivamente. Estos valores fueron estadísticamente diferentes de los de los grupos inyectados con vehículo y del de los animales no tratados ($P < 0,05$ para el día 1; $P < 0,01$ para el día 3 y $P < 0,001$ para el día 5). Finalmente, 10 días después de la inyección de NGF, el porcentaje de neuronas CGRP-positivas alcanzó valores normales. Para investigar más a fondo en los cambios en el patrón de expresión de CGRP en el DRG producidos por el NGF, se estudió la proporción y la densidad óptica de cada población -según tamaño- de neuronas CGRP-positivas. Estos análisis fueron realizados dada la relación establecida entre el tamaño celular y las propiedades electrofisiológicas de las neuronas del DRG que expresan CGRP [62]. La administración endoneural de NGF incrementó significativamente la proporción relativa y el porcentaje total de neuronas CGRP-positivas medianas y grandes (Fig 10). La proporción relativa de neuronas pequeñas disminuyó tras la inyección de NGF los días 1, 3 y 5, pero el porcentaje total de neuronas pequeñas no fue modificado por el NGF en ninguno de los días estudiados. Los valores de las proporciones de neuronas CGRP-positivas fueron estadísticamente diferentes de los propios de los animales inyectados con vehículo y de los no tratados los días 1, 3 y 5 ($P < 0,001$). Diez días después de la inyección de NGF las proporciones volvieron a valores basales (el detalle de los números se muestra en la tabla 5).

Además, se estudiaron los cambios en la densidad óptica del producto de inmunoreacción a CGRP en las tres subpoblaciones. Siguiendo el razonamiento que avala los análisis densiométricos, estos cambios pueden ser interpretados como oscilaciones en el nivel de CGRP expresado por cada subpoblación. En todos los grupos experimentales, las concentraciones de CGRP en perfiles pequeños y medianos fueron significativamente mayores que las de los perfiles de células grandes ($P < 0,05$). Como se muestra en la Figura 11, las concentraciones de CGRP de las tres subpoblaciones no fueron modificadas por la inyección de NGF, y no se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales y los controles.

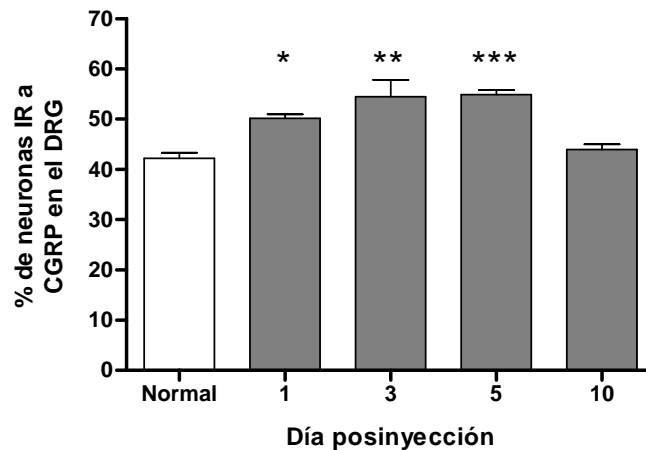


Fig. 9. Curso temporal del efecto del NGF endoneural sobre el porcentaje de perfiles CGRP-positivos. Las columnas representan los porcentajes de perfiles de neuronas CGRP-positivas en el DRG de L4/5, promediados para cada animal y agrupados según grupo experimental. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos inyectados con NGF (columnas negras) y animales sin tratar (columnas blancas) (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. ANOVA de dos colas, promedio \pm error estándar).

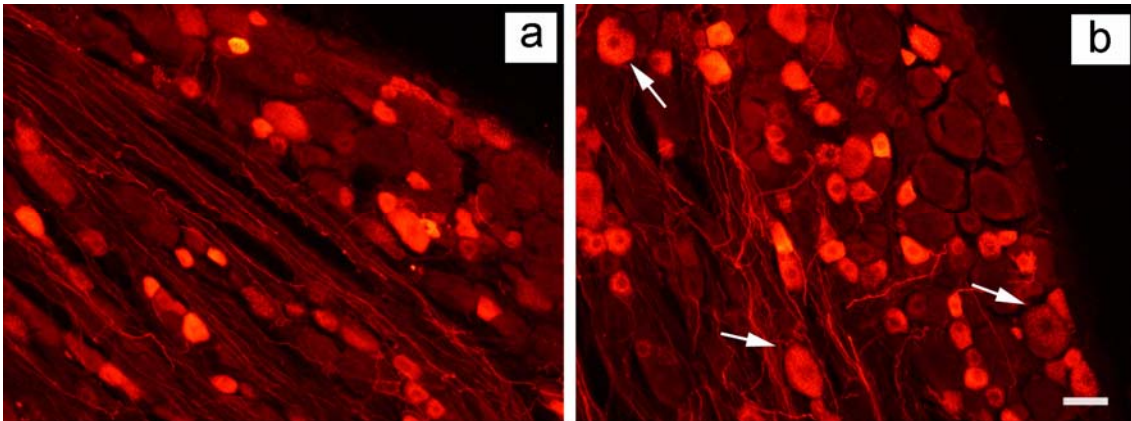


Fig. 10. Fotomicrográficas de perfiles de neuronas CGRP-positivas en el DRG L4, un día después de la inyección endoneural de vehículo (a) y NGF (b). Un día después de la inyección de vehículo, las células CGRP-positivas fueron principalmente pequeñas a medianas, correspondiendo al patrón normal de la expresión de CGRP. Un día después de la inyección de NGF, se observó un mayor número de perfiles CGRP-positivos grandes y con núcleo visible (flechas), comparado con el vehículo. Barra = 50 μ m.

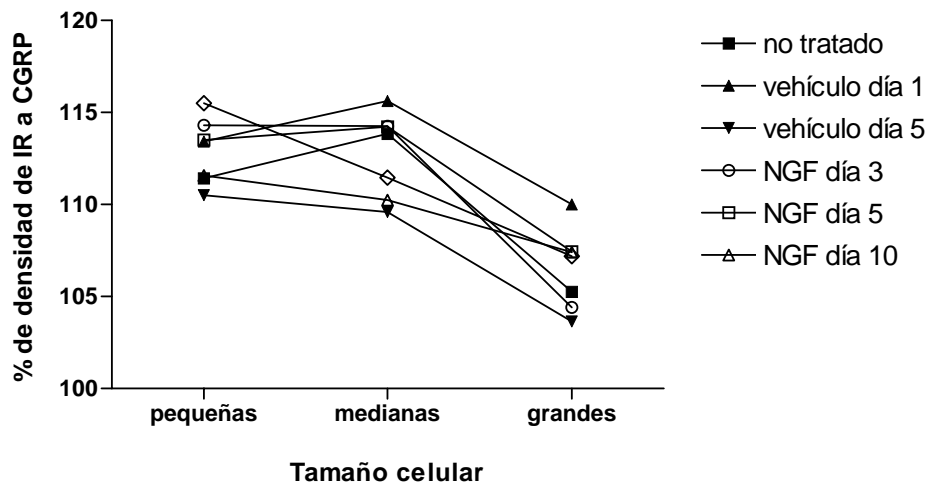


Fig. 11. El efecto de la administración endoneural de NGF sobre la inmunoreactividad a CGRP en el ganglio de la raíz posterior, de acuerdo al tamaño de los perfiles neuronales. Los puntos representan la inmunoreactividad promedio de una subpoblación neuronal con respecto al umbral (100%) en el DRG L4/L5, promediada para cada animal y agrupada para cada grupo experimental. Las barras de error fueron omitidas para facilitar la comprensión de la figura. Ni la inyección de vehículo ni la de NGF cambiaron la densidad óptica del producto de inmunoreactividad a CGRP en las subpoblaciones del DRG (ANOVA de dos colas, promedio, n=3-4)

Tabla 5

Efecto del NGF endoneural (30 ng) sobre las proporciones (expresadas como porcentaje) de las distintas subpoblaciones de neuronas CGRP-positivas en los DRG L4 y L5 según tamaño.

Tratamiento-Día	Pequeñas (> 600 μm^2)		Medianas (600-1200 μm^2)		Grandes (>1200 μm^2)		Total de perfiles observados
	Respecto al total de perfiles CGRP-positivos	Respecto al total de perfiles	Respecto al total de perfiles CGRP-positivos	Respecto al total de perfiles	Respecto al total de perfiles CGRP-positivos	Respecto al total de perfiles	
No tratados	77,7 % (341/439)	32,2 %	20,3 % (89/439)	8,4 %	2 % (9/439)	0,9 %	1058
Vehículo-Día 1	77,5 % (396/511)	33,9 %	21,9 % (112/511)	9,6 %	0,6 % (3/511)	0,3 %	1167
Vehículo-Día 5	80,8 % (354/438)	35,5 %	17,4 % (76/438)	7,6 %	1,8 % (8/438)	0,8 %	998
NGF-Día 1	70,0 % (434/620) ***	35,1 %	22,9 % (142/620) ***	11,5 %	7,1 % (44/620) ***	3,6 %	1236
NGF-Día 3	68,3 % (258/378) ***	34,4 %	25,4 % (96/378) ***	12,8 %	6,3 % (24/378) ***	3,2 %	750
NGF-Día 5	63,7 % (310/487) ***	34,8 %	30,6 % (149/487) ***	16,7 %	5,7 % (28/487) ***	3,1 %	890
NGF-Día 10	76,8 % (387/504)	35,8 %	21,4 % (108/504)	10,0 %	1,8 % (9/504)	0,8 %	1080

Las cifras entre paréntesis indican el número de perfiles con núcleo visible contados. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre estos grupos y los animales no tratados (***) P < 0,001, prueba Chi cuadrado).

3.1.2 Cambios en la expresión de CGRP en el asta posterior producidos por el NGF endoneural

Se ha demostrado, mediante cirugías selectivas que desaferencian la médula espinal, que el CGRP presente en el asta posterior de la médula espinal es fundamentalmente de origen aferente [19,82]. Se estudiaron entonces, los posibles cambios en la expresión de CGRP en el asta posterior producidos por el NGF endoneural, con el objeto de determinar si el incremento en el número de neuronas que expresan CGRP en el DRG se ve reflejado en la médula espinal. En animales no tratados, el producto de inmunoreacción a CGRP se localizó bilateralmente en el tracto de Lissauer y en las láminas I y IIo (*outer*, externa) del asta posterior. Además, algunas fibras CGRP-positivas fueron observables en las láminas profundas III a V. Un día después de la inyección del vehículo, el registro de diferencias del área ocupada por fibras CGRP-positivas en las láminas III y IV fue $21,4 \pm 6,8 \mu\text{m}^2$, lo que representa un incremento leve y no significativo en el lado inyectado. Este incremento no fue ópticamente evidente (Fig 13) ni estadísticamente significativo frente a animales no tratados, y desapareció el día 5 ($-2,7 \pm 16,7 \mu\text{m}^2$). Como se muestra en la figura 13, la administración endoneural de NGF produjo un incremento en las fibras CGRP-positivas en las láminas III a V del asta posterior. Aunque este incremento puede considerarse como discreto, fue ópticamente evidente, pues en las láminas profundas fue posible observar numerosas varicosidades CGRP-positivas. Cuantitativamente, los días 1 y 3 después de la inyección de NGF, el área ocupada por fibras CGRP-positivas en las láminas III y IV del lado inyectado fue notablemente mayor que en el lado no inyectado, y comparado con animales no tratados o inyectados con vehículo, la diferencia fue estadísticamente significativa (Fig 12) ($P < 0,01$, ANOVA seguido de la prueba de Neuman-Keuls). En el día 5, el aumento del área ocupada por CGRP fue menos pronunciado, pero el registro de diferencias aún fue estadísticamente diferente del de los animales sin tratar o tratados con el vehículo. Diez días después de la inyección de NGF, el área ocupada por las fibras CGRP-positivas en las láminas profundas del asta posterior del lado inyectado fue menor que la del lado no inyectado. Esta disminución resultó ser estadísticamente significativa, al comparar el registro de

diferencias de dicho día con los de los animales no tratados y los inyectados con el vehículo ($P < 0,05$, ANOVA seguido de la prueba de Neuman-Keuls).

El NGF produjo una disminución de la densidad de inmunoreacción en las láminas I y II, principalmente los días 5 y 10 (Fig 13). Sin embargo, los registros de diferencia de densidad tras la inyección de NGF no fueron estadísticamente diferentes de los de los animales no tratados o de los inyectados con vehículo (Fig 14). No se observó localización ectópica de producto de inmunoreacción a CGRP en el asta posterior tras la inyección de NGF, y la materia blanca no produjo inmunoreacción evidente.

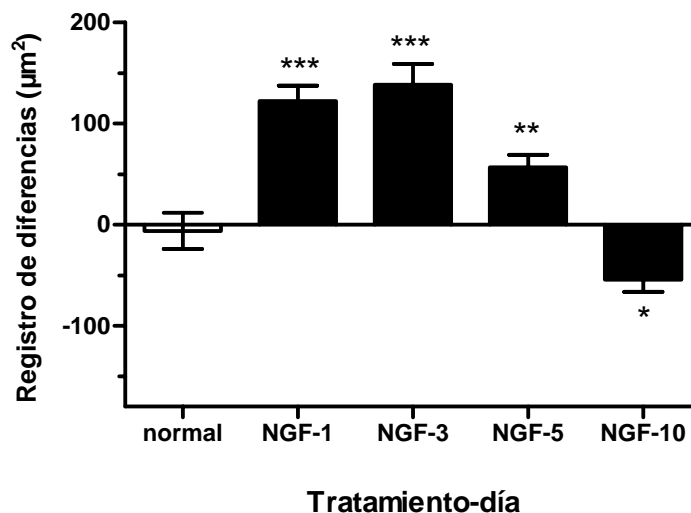


Fig. 12. Curso temporal del efecto del NGF endoneural (30 ng) sobre la expresión de CGRP en las láminas III y IV del asta medular posterior. Las columnas representan el *registro de diferencias* calculado al restar el área inmunoreactiva a CGRP en las láminas III y IV del lado inyectado el área correspondiente del lado no inyectado. Los valores fueron promediados para cada animal y agrupados para cada grupo experimental. Los asteriscos indican diferencias significativas entre estos valores y valores normales de animales no tratados (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. ANOVA de dos colas, promedio \pm error estándar, $n=3-4$).

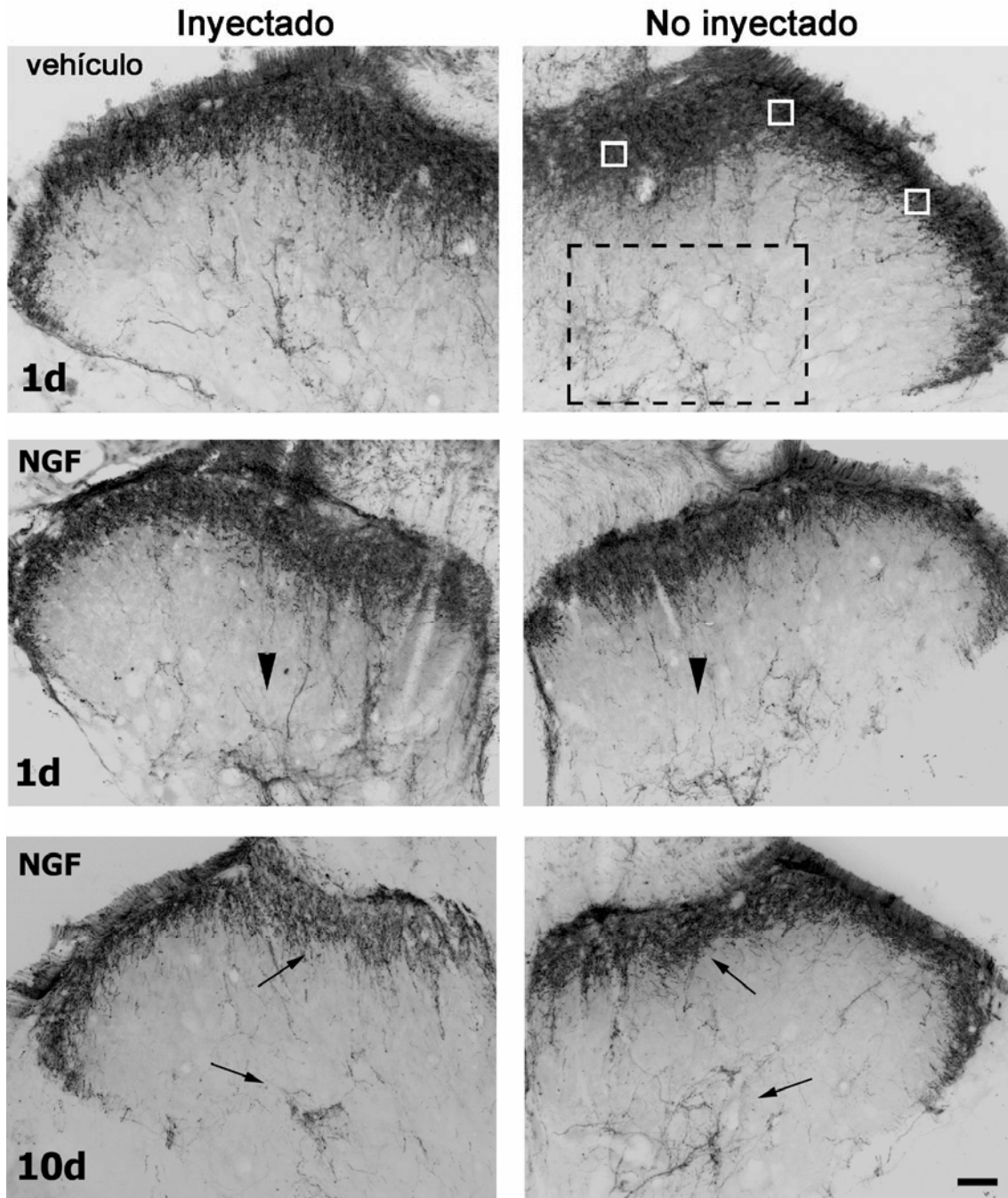


Fig. 13. Fotomicrografías de secciones transversales de médula espinal con tinción inmunohistoquímica para CGRP. Los cuadros blancos muestran las tres regiones de las láminas I y II muestreadas para análisis densiométrico. El cuadro negro comprende el área de las láminas III y IV en las que se estudió la ocupación por fibras CGRP-positivas. Un día después de la inyección de NGF, en las láminas III y IV del lado inyectado se aprecia un claro incremento en el área ocupada por fibras CGRP-positivas, comparado con el lado no inyectado (cabeza de flecha). Diez días después de la inyección, se observó una disminución del producto de inmunoreacción a CGRP tanto en las láminas superficiales como en las profundas del lado inyectado con NGF, comparado con el lado no inyectado (flechas). Barra = 50.

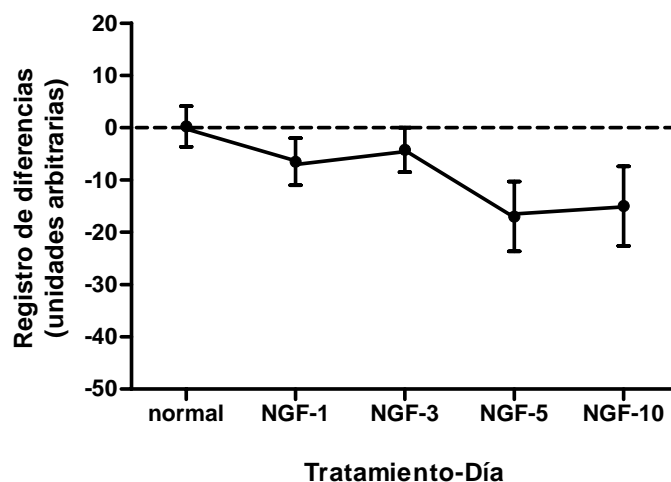


Fig. 14. Curso temporal del efecto del NGF endoneural (30 ng) sobre la expresión de CGRP en las láminas I y II del asta medular posterior. Cada punto representa el registro de diferencias calculado al restar a la densidad óptica del producto de inmunoreacción a CGRP en las láminas I y II del lado inyectado, la densidad óptica correspondiente del lado no inyectado. Los valores fueron promediados para cada animal y agrupados para cada grupo experimental. La administración de NGF produjo una disminución no significativa de la inmunoreactividad a CGRP en las láminas I y II del asta posterior (ANOVA, promedio \pm error estándar; $n=3-4$)

3.2 Estudio del efecto de la administración de NGF sobre la expresión de SP

3.2.1 Estudio del efecto de la administración de NGF sobre la expresión de SP en el ganglio de la raíz posterior

3.2.1.a Efecto de la administración endoneural de vehículo

Tal y como se realizó en el caso de CGRP, para establecer que la inyección de vehículo no produce cambios significativos en la expresión de SP en las neuronas del DRG, se comparó el efecto del vehículo con datos experimentales obtenidos de animales no tratados. En los animales no tratados, un $23,7 \pm 1,1$ % de perfiles de neuronas fueron SP-positivos, siendo casi la totalidad de éstas de tamaño pequeño. Esta observación concuerda con la distribución característica de SP en el DRG, que se localiza en la subpoblación peptidérgica de las fibras finas amielínicas o fibras C. Cuantitativamente, el resultado es

muy cercano al descrito previa y comúnmente para SP (entre un 15 y un 20%) [142] [98]. La leve diferencia puede deberse a variables metodológicas o criterios en la cuantificación, factores que comúnmente influyen sobre estas determinaciones. Uno y 5 días después de la administración endoneural de vehículo, ni el porcentaje ni la distribución de perfiles de neuronas SP-positivas en el DRG se vieron modificados, comparados con los resultados de animales no tratados. En los animales inyectados con vehículo los porcentajes fueron $20,2 \pm 1,0\%$ el día 1 y $23,9 \pm 1,2\%$ el día 5. Del mismo modo que en el estudio del efecto de CGRP, dado el nulo efecto de la inyección de vehículo sobre la expresión de SP en el DRG y atendiendo a las directrices actuales para la experimentación con animales, no se consideró necesario inyectar más ratas con vehículo. En todos los casos, los datos de los grupos inyectados con NGF se compararon con datos de animales no tratados y también con los datos de ambos grupos inyectados con vehículo. En todos los casos, los datos de los grupos inyectados con NGF se compararon con datos de animales no tratados y también con los datos de ambos grupos inyectados con vehículo.

3.2.1.b Efecto del NGF sobre el porcentaje de perfiles SP-positivos en el DRG

La administración endoneural de 30 ng de NGF no produjo modificaciones en la expresión de SP en el DRG pues tanto los porcentajes como la población de células SP-positivas fue similar cada uno de los días evaluados. El día 1 se observó una ligera disminución del porcentaje de perfiles SP-positivos, el cual alcanzó un valor de $20,2 \pm 3,1\%$. Este valor no fue estadísticamente diferente del porcentaje que se obtuvo de animales no tratados y es además muy similar al del día 1 de los animales inyectados con vehículo. Los días subsiguientes los porcentajes fueron prácticamente normales.

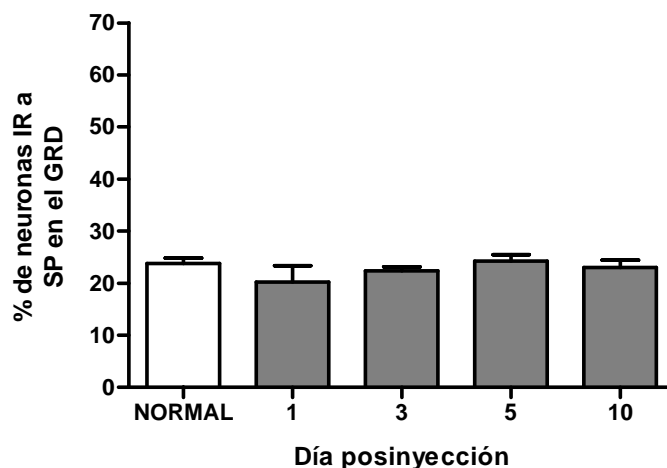


Fig. 15. Curso temporal del efecto del NGF endoneural sobre el porcentaje de perfiles SP-positivos. Las columnas representan los porcentajes de perfiles de neuronas SP-positivas en el DRG de L4/5, promediados para cada animal y agrupados según grupo experimental. La administración de NGF no produjo cambios significativos en el porcentaje de perfiles SP-positivos (ANOVA de dos colas, promedio \pm error estándar).

Del mismo modo que para CGRP, para SP se estudiaron los cambios en la densidad óptica del producto de inmunoreacción en la subpoblación de perfiles SP-positivos tras la administración de vehículo o NGF. En animales no tratados, el valor del porcentaje de densidad óptica fue de $119,7 \pm 3,5\%$. Como se muestra en la Fig 16, el día 1, la administración de vehículo produjo una disminución no significativa en la densidad óptica promedio del producto de inmunoreacción a SP ($106,3 \pm 3,2\%$). Dicha disminución prácticamente desapareció el día 5 ($117,2 \pm 5,8\%$). A su vez, el día 1 la administración de NGF produjo una disminución similar a la producida por el vehículo en dicho día ($108,0 \pm 1,5\%$), que se recuperó los días subsiguientes. Finalmente el día 10, el valor de densidad óptica fue prácticamente normal ($118,4 \pm 1,6\%$).

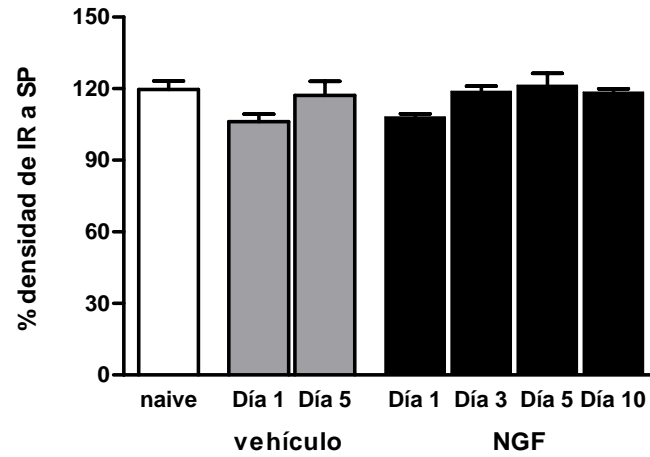


Fig. 16. Efecto de la administración endoneural de NGF sobre la inmunoreactividad a SP de los perfiles SP-positivos en el DRG. Las barras representan la inmunoreactividad promedio de la subpoblación neuronal SP-positiva con respecto al umbral (100%) en el DRG L4/L5, promediada para cada animal y agrupada para cada grupo experimental. Ni la inyección de vehículo ni la de NGF produjeron cambios significativos en la densidad óptica del producto de inmunoreactividad a SP en el DRG. El curso temporal del vehículo y del NGF es similar (ANOVA de dos colas, promedio \pm error estándar, $n=3-4$).

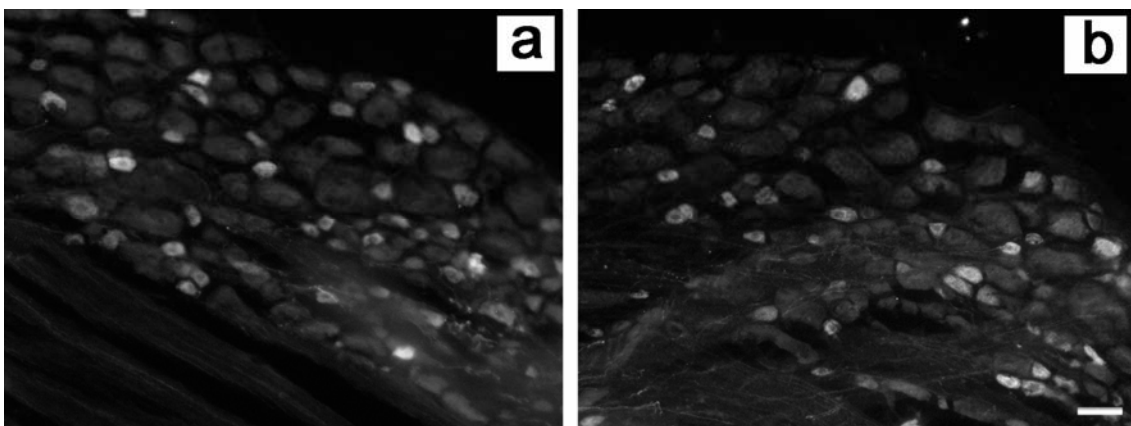


Fig. 17. Fotomicrografías de perfiles de neuronas SP-positivas en el DRG L5, un día después de la inyección endoneural de vehículo (a) y NGF (b). Un día después de la inyección de vehículo, las células CGRP-positivas fueron principalmente pequeñas, correspondiendo al patrón normal de la expresión de SP. Un día después de la inyección de NGF, no se observaron cambios en el número de perfiles SP-positivos, comparado con el vehículo. Barra = 50 μ m.

3.2.2 Cambios en la expresión de SP en el asta posterior producidos por el NGF endoneural

No obstante no se observaron cambios en la expresión de SP en el DRG, se realizó un estudio de la expresión de SP en el las láminas I y II del asta posterior de la médula, con el objeto de descartar modificaciones inducidas por el NGF a este nivel. En animales no tratados, el producto de inmunoreacción a SP se localizó bilateralmente en el tracto de Lissauer y en las láminas I y Ilo del asta posterior, las zonas donde se proyectan las fibras peptidérgicas pequeñas que llegan desde la periferia, y cuyo soma se encuentra en el DRG. En animales tratados con vehículo no se observaron cambios ópticamente evidentes en la distribución e intensidad del producto de inmunoreacción ninguno de los días estudiados, al comparar el lado inyectado con el lado no inyectado (Fig 19), y al comparar los cortes con aquellos de animales no tratados. Del mismo modo, no se observaron cambios ópticamente evidentes en los cortes de animales tratados con NGF, ni al comparar el lado inyectado con el lado control (Fig 19), ni al comparar estos cortes con aquellos de animales tratados con vehículo o de animales no tratados. Cuantitativamente, no se detectaron cambios significativos al comparar la densidad óptica del producto de inmunoreacción a SP en las láminas I y II del DRG entre los grupos tratados con NGF y los grupos tratados con vehículo o no tratados. Los registros de diferencias para todos los grupos fueron cercanos a cero (Fig 18).

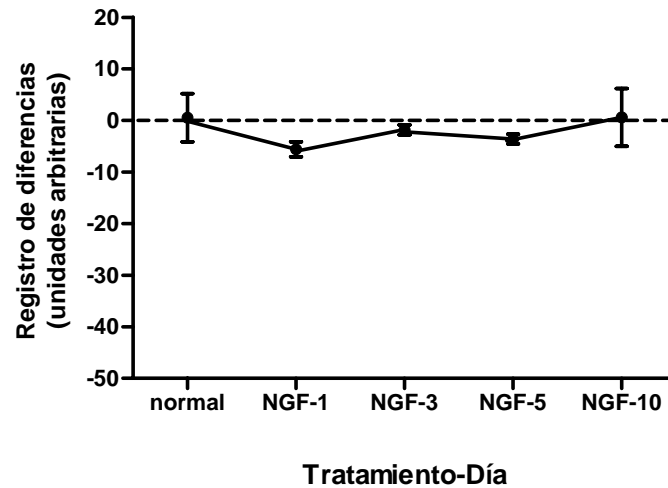


Fig. 18. Curso temporal del efecto del NGF endoneural (30 ng) sobre la expresión de SP en las láminas I y II del asta medular posterior. Cada punto representa el registro de diferencias calculado al restar a la densidad óptica del producto de inmunoreacción a SP en las láminas I y II del lado inyectado, la densidad óptica correspondiente del lado no inyectado. Los valores fueron promediados para cada animal y agrupados para cada grupo experimental. La administración de NGF no produjo modificaciones significativas de la inmunoreactividad a SP en las láminas I y II del asta posterior (ANOVA, promedio \pm error estándar; n=3-4)

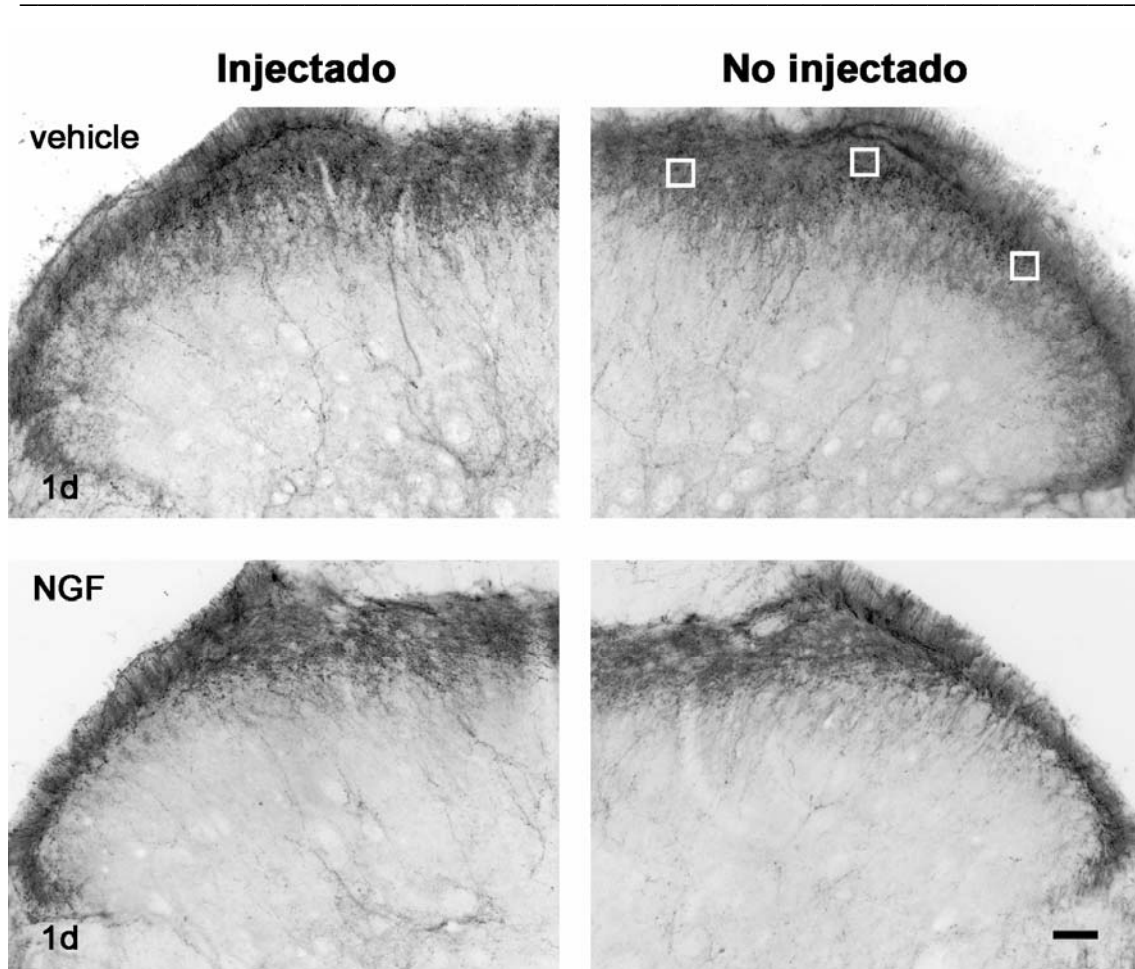


Fig. 19. Fotomicrografías de secciones transversales de médula espinal con tinción inmunohistoquímica para SP. Los cuadros blancos muestran las tres regiones de las láminas I y IIo muestreadas para análisis densitométrico. Un día después de la inyección de NGF o vehículo (*vehicle*), no se observaron cambios en la densidad de inmunoreacción en las láminas I y IIo del asta posterior. En las láminas profundas de ambos grupos se observó un leve incremento en la tinción al comparar el lado inyectado con el lado no inyectado. Barra = 50 μm .

4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE NGF SOBRE UN MODELO DE DOLOR TÓNICO INFLAMATORIO: LA PRUEBA DE LA FORMALINA EN RATA

Se realizó la prueba de la formalina en animales previamente inyectados con NGF o vehículo, con el objeto de determinar si la administración endoneural de NGF, a una dosis que produce conducta de dolor neuropático, modifica las conductas de dolor inducidas mediante un modelo de dolor tónico inflamatorio.

4.1 Validación de la técnica en la prueba de la formalina

Previo a la realización de estos experimentos y con el objeto de validar la técnica utilizada, se realizó la prueba de la formalina en animales no inyectados. Como se muestra en la Figura 20, en dichos animales la administración subcutánea de formalina produjo la característica respuesta bifásica ampliamente descrita para esta prueba [139,2], vale decir: inmediatamente después de la inyección de formalina 1% se observó un período precoz de conductas de dolor que se prolongó por alrededor de 5 min y que incluyó rápidas sacudidas y lamidos de la pata inyectada. Posteriormente se observó un período de latencia de entre 5 a 10 min en el que el animal no realizó conductas de dolor. Finalmente se observó un segundo período de conductas de dolor que se prolongó por alrededor de 30 min, y en el que se observó la elevación de la pata inyectada y lamidos esporádicos.

4.2 Efecto de la administración de vehículo en la prueba de la formalina

Para descartar el posible efecto de la administración de vehículo en la prueba de la formalina, se realizó esta prueba 3 y 5 días después de una inyección endoneural de vehículo. No se realizó la prueba de la formalina 1 día después de la administración de vehículo por dos razones: 1) se asumió que el trauma postoperatorio podría afectar la interpretación de los datos obtenidos dicho día, considerando que en la prueba de la formalina las respuestas a evaluar consisten en movimientos bruscos, forzados y/o sostenidos que requieren una intacta movilidad de la pata 2) tanto la hiperalgesia térmica como los cambios

morfológicos observados tras la administración de NGF fueron pronunciados los días 3 y 5 posinyección. Dado que se investiga la relación entre los resultados previos y un posible efecto del NGF en un modelo de dolor inflamatorio, se decidió estudiar el efecto tanto del vehículo como del NGF a partir de día 3 posinyección. La administración endoneural del vehículo no modificó significativamente el curso temporal de la puntuación compuesta de dolor (PCD) durante la prueba de la formalina ni el día 3 (Fig 20) ni el día 5 (Fig 21) posinyección, comparado con los animales no inyectados. Dado el nulo efecto de la administración de vehículo en la prueba de la formalina los días 3 y 5 posinyección, y atendiendo a las directrices actuales respecto al bienestar de los animales de experimentación, no se realizó dicha prueba en otros grupos control inyectados con vehículo.

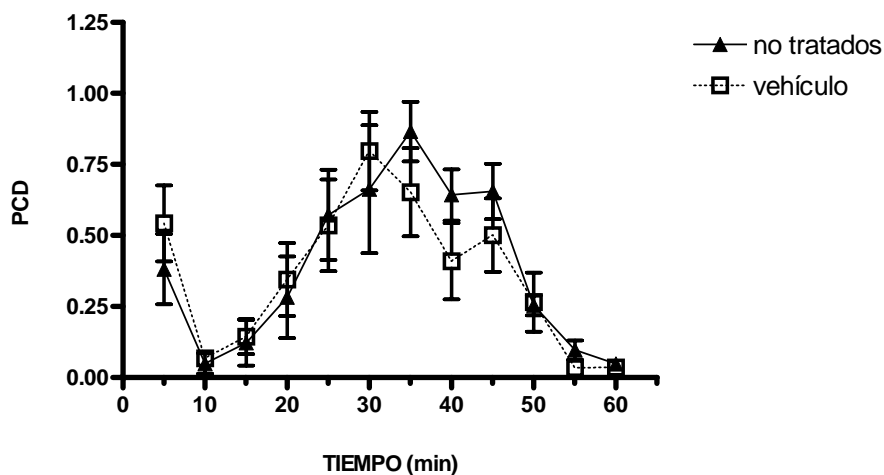


Fig. 20. Evolución de la puntuación compuesta de dolor (PCD) en la prueba de la formalina en animales sin tratamiento previo (no tratados) y animales inyectados tres días antes con vehículo. Cada punto representa la puntuación compuesta de dolor por períodos de 5 min. No se observaron diferencias significativas al comparar ambos grupos ($n = 6$, promedio \pm error estándar, ANOVA seguido de prueba t de Student).

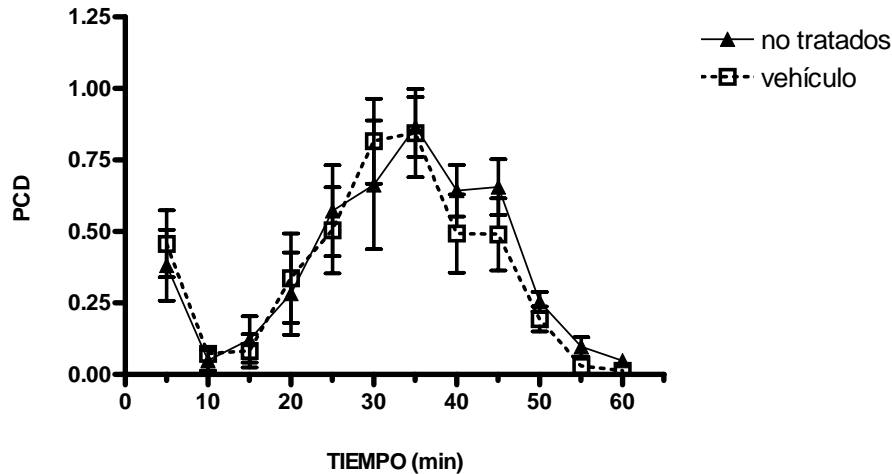


Fig. 21. Evolución de la puntuación compuesta de dolor (PCD) en la prueba de la formalina en animales sin tratamiento previo (no tratados) y animales inyectados cinco días antes con vehículo. Cada punto representa la puntuación compuesta de dolor por períodos de 5 min. No se observaron diferencias significativas al comparar ambos grupos ($n = 6$, promedio \pm error estándar, ANOVA seguido de prueba t de Student).

4.3 Efecto de la administración de NGF en la prueba de la formalina

La administración endoneural de NGF produjo un incremento en la puntuación compuesta de dolor en la segunda fase de la prueba de la formalina el día 3 posinyección, pero no el día 5 ni el día 10 posinyección (prueba t de Student para comparando punto por punto). El día 3, el incremento alcanzó valores estadísticamente significativos en los minutos 20, 40 y 45, al compararse con valores de los animales inyectados con vehículo en dichos minutos. Por otro lado, la duración de la segunda fase de la prueba se vio ligeramente incrementada, aunque las conductas de dolor desaparecieron alrededor de 1 h después de la inyección de formalina (Fig 22 A). El día 5 posinyección de NGF, el curso temporal de la PCD mostró una leve disminución en relación a los animales previamente inyectados con vehículo, que no alcanzó valores estadísticamente significativos (Fig 22 B). El día 10 el curso temporal de la PCD fue similar al de los animales inyectados previamente con vehículo (datos no mostrados).

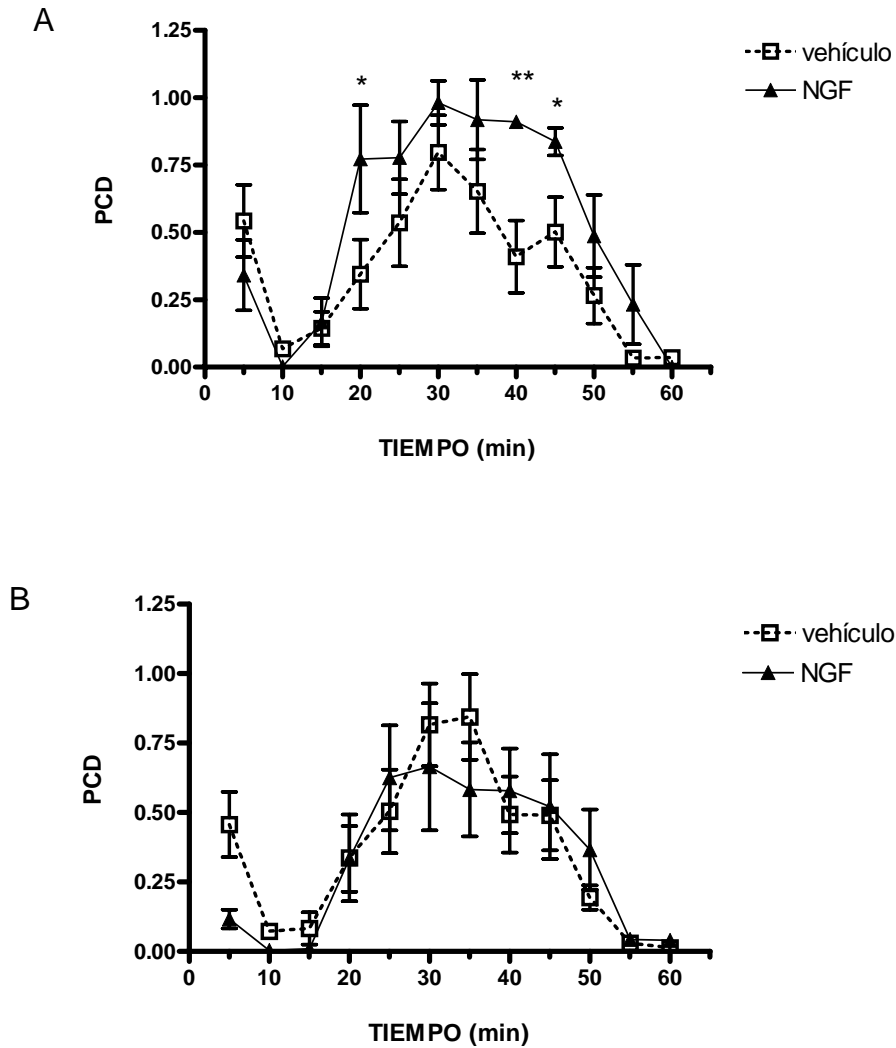


Fig. 22. Evolución de la puntuación compuesta de dolor (PCD) en la prueba de la formalina en animales inyectados tres días antes (A) o cinco días antes (B) con vehículo o NGF. Cada punto representa la puntuación compuesta de dolor por períodos de 5 min. El día 3 postinyección con NGF se observaron diferencias significativas, comparado con el vehículo. El día 5 no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ($n = 6$, promedio \pm error estándar, ANOVA seguido de prueba t de Student).

Las diferentes conductas que se han observado y descrito para la prueba de la formalina se han relacionado con distintas intensidades de dolor [31,139]. En general, se asume que el lamido de la pata es la manifestación conductual de un dolor súbito de gran intensidad, y por esta razón el lamido tiene mayor ponderación en la puntuación compuesta de dolor [139]. Por otro lado, la elevación de la pata sería la manifestación de un dolor sostenido y constante. Con el objeto de discriminar si alguna de las conductas de dolor registradas es preponderante en los cambios en la puntuación compuesta de dolor

observados, se analizaron por separado los tiempos acumulados que los animales pasaron realizando cada conducta durante el período estudiado (60 min). En cuanto a la conducta de elevación, los animales inyectados previamente con NGF pasaron un tiempo significativamente mayor realizando dicha conducta que los animales inyectados con vehículo. En cuanto a la conducta de lamido, los animales de ambos grupos pasaron un tiempo similar realizándola (Fig 23).

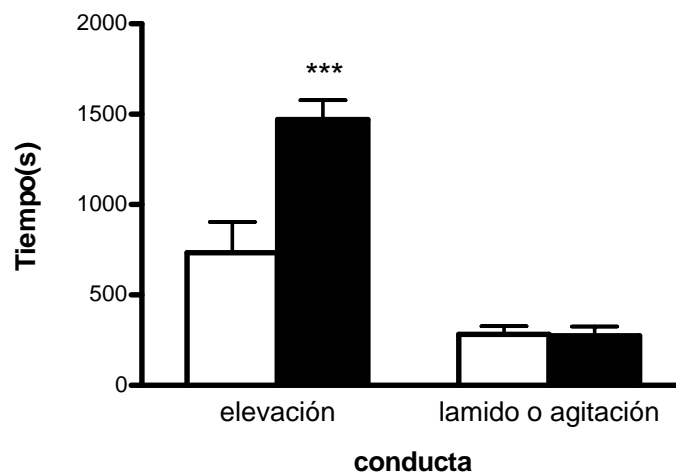


Fig. 23. Tiempo acumulado que los animales pasaron en las conductas de elevación y lamido-agitación durante la prueba de la formalina. Las barras blancas representan los tiempos acumulados en el grupo de animales inyectados tres días antes con vehículo; las barras negras representan los tiempos acumulados en el grupo de animales inyectados tres días antes con NGF. Se observó una diferencia significativa en el tiempo acumulado en la conducta de elevación en el grupo de animales inyectados con NGF comparado con el grupo de animales inyectados con vehículo. En la conducta de lamido-agitación, no se observaron una diferencia significativa al comparar ambos grupos ($n = 6$, promedio \pm error estándar, prueba t de Student).

V. DISCUSIÓN

1. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE NGF SOBRE CONDUCTAS DE DOLOR NEUROPÁTICO Y SOBRE LA MORFOLOGÍA DEL NERVIPO CIÁTICO INYECTADO

El presente estudio demostró que una baja dosis de NGF endoneural produce hiperalgesia térmica, desmielinización y brotes axonales en el sitio de administración. El NGF es un reconocido mediador del dolor inflamatorio, pues una única administración sistémica de NGF induce conductas de hiperalgesia térmica y alodinia mecánica que permanecen hasta por 4 días [67]. En el presente estudio la dosis de NGF que produjo hiperalgesia térmica es más de 5000 veces más baja que aquella utilizada para producir el mismo efecto por vía sistémica (1 mg/kg). Además, la hiperalgesia térmica y la disminución del umbral del dolor fue sólo ipsilateral. Estos datos confirman que la inyección endoneural de NGF no produce efectos sistémicos. En consecuencia, el efecto que describimos no debe ser englobado junto a la vasta información existente respecto al efecto del NGF sistémico en dolor inflamatorio. Por otro lado, esto no excluye que los mecanismos centrales descritos para la administración sistémica de NGF [78] puedan verse activados por una administración endoneural de NGF, considerando que el NGF inyectado dentro del nervio ciático puede acceder al DRG vía transporte retrógrado.

El estudio de microscopía óptica muestra un efecto dosis-dependiente sobre las fibras mielínicas directamente expuestas al NGF a partir del día 1 posinyección. El efecto puede ser resumido como desmielinización, observable a partir del día 1 posinyección, y subsecuente *sprouting*. Diversas células del endonervio, incluyendo axones, fibroblastos y células de Schwann, normalmente expresan ambos receptores de NGF, el trkA y el p75 [141]. Por esto, muchos mecanismos podrían ser activados por un repentino y anormal aumento de NGF en este sitio, mecanismos similares a aquellos que median el *sprouting* axonal en fibras intactas en la piel [83,84] o la hiperalgesia térmica y el *sprouting* de fibras peptidérgicas en la médula espinal [115]. El NGF indujo además degeneración tipo walleriana en algunas fibras mielínicas. La degeneración walleriana puede parecer un efecto inesperado, dado que habitualmente se asocia a una lesión sobre el nervio, y podría pensarse que en

nuestros experimentos esta degeneración responde al daño mecánico producido por la mera inyección. El que este efecto fue producido por el NGF, y no por la inyección, queda demostrado toda vez que no se observó degeneración walleriana en las muestras de animales inyectados con vehículo. Actualmente se conoce que la degeneración walleriana es un proceso autodestructivo mediado por citocinas, comparable a la apoptosis, y que no responde directamente a una lesión sobre un nervio, sino a la presencia de factores gatillantes [125,20]. Por esto, la influencia del NGF en la degeneración walleriana aún debe ser esclarecida.

Varios estudios han descrito que en el modelo de CCI de dolor neuropático el inicio del *sprouting* coincide con los máximas registros de conductas de dolor [90,130]. Esta información ha permitido hipotetizar que las descargas ectópicas provenientes de los brotes colaterales de los axones sensoriales pueden constituir uno de los mecanismos involucrados en la producción de hiperalgesia térmica en CCI [43,90,131]. Esto también coincide con la teoría inicial de Devor y Wall, que otorga un papel protagónico en el inicio del dolor neuropático a las descargas ectópicas producidas en el neuroma postransección [26]. Nuestros datos demuestran que el NGF produce *sprouting* e hiperalgesia de un modo concurrente, lo que sugiere que en estados de dolor neuropático el NGF sobreexpresado en el sitio de la lesión participa en el origen de ambos procesos. La corta duración de los efectos observados, comparada con la de modelos animales de dolor neuropático periférico puede deberse al efecto limitado de una única dosis de NGF, que no puede imitar la continua liberación observada tras degeneración walleriana.

La alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica son conductas comúnmente asociadas. Sin embargo, la ausencia de alodinia en nuestro estudio no representa un hallazgo contradictorio. En la patología de la CCI, muchos axones medianos a grandes ($A\alpha$ y $A\beta$) se pierden por degeneración [43,130,131] y estos animales normalmente desarrollan alodinia mecánica. Esto implica que, en lesiones nerviosas parciales, la alodinia mecánica se genera por la transmisión aferente vía fibras $A\delta$ y C como un cambio

maladaptativo a la pérdida de fibras A β . Apoyando esta idea, recientemente se ha demostrado que tras la lesión del nervio espinal L5, la alodinia mecánica se desarrolla y persiste de un modo independiente de las descargas de las fibras aferentes lesionadas [70]. En nuestro estudio, la administración local de NGF indujo degeneración de sólo un pequeño número de axones de tamaño mediano a grande. Es entonces probable que sea necesaria una pérdida significativa de fibras A β para producir la alodinia mecánica observada en modelos animales de dolor neuropático. Por otro lado, se sabe que el NGF es necesario para la generación de alodinia, dado que el pretratamiento con anti-NGF previene la alodinia inducida por la CCI [105]. Con todos estos datos es posible concluir que mientras un incremento en el NGF endoneural sería suficiente para el desarrollo de hiperalgesia térmica, la presencia de otros factores (como el TNF- α y otras citocinas proinflamatorias) sería necesaria para el desarrollo de alodinia mecánica.

En conclusión, en esta primera parte se describió la inducción de hiperalgesia y *sprouting* por la administración directa de NGF en un nervio periférico. Este resultado da un gran apoyo a la hipótesis que postula que el NGF sobreexpresado en el sitio de la lesión induce la generación de brotes colaterales que mediarían la hiperalgesia térmica. Este hallazgo puede contribuir a la comprensión de los mecanismos que ocasionan el dolor neuropático en humanos. Por otro lado, y tal como ha sido señalado por otros autores [106], muchos estudios respecto al efecto de factores neurotróficos exógenos han enfatizado el papel neuroprotector de tales factores, y han ignorado notablemente sus efectos sobre axones intactos. Dados los conocidos efectos adversos de algunos factores neurotróficos, y particularmente del NGF, este vacío del conocimiento no es trivial, y debe ser abordado antes de aplicar factores neurotróficos terapéuticamente.

2. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE NGF SOBRE LA EXPRESIÓN DE CGRP Y SP EN LA NEURONA AFERENTE PRIMARIA

2.1 Consideraciones generales

La administración endoneural de NGF aumentó el porcentaje de perfiles de neuronas medianas a grandes que expresan CGRP en el ganglio de la raíz posterior, no modificó el porcentaje de neuronas pequeñas que expresan CGRP y aumentó la expresión de CGRP en las láminas III y IV del asta posterior de la médula. Por otro lado, la administración endoneural de NGF no produjo cambios significativos en la expresión de SP ni en el DRG ni en la médula espinal. Dado que estos estudios fueron realizados *in vivo*, es necesario hacer algunas consideraciones respecto al sitio de acción del NGF administrado. Tal y como ocurre con el NGF endógeno, el NGF exógeno administrado en el nervio ciático es transportado hacia el DRG, en donde puede ser detectado pocas horas después de la administración [29,111]. Estudios pioneros en el área, en los que se utilizaron neuronas aisladas del DRG, demostraron que la expresión de ARNm para CGRP aumenta significativamente tras 8 a 24 h de exposición al NGF [71]. Estos datos sugieren que todos los efectos observados pueden ser atribuidos exclusivamente a la acción del NGF sobre neuronas del DRG. Sin embargo, y tal como fue señalado en la primera parte de la presente discusión, en los nervios periféricos muchos tipos de células expresan ambos receptores de NGF, trkA y p75, incluyendo células de Schwann, macrófagos y fibroblastos [141]. Por esto, es preciso hacer notar que algunos eventos mediados por el NGF al actuar sobre células no neuronales pueden también haber modulado los efectos aquí descritos, así como los efectos del NGF sobre el CGRP después de una lesión de un nervio periférico.

2.2 Cambios en el patrón de expresión de CGRP en el ganglio de la raíz posterior

En la presente investigación se estudiaron los cambios en el patrón de expresión de CGRP en neuronas del DRG, y no los cambios en números

absolutos de células en el DRG. Por esta razón se cuantificaron y estudiaron perfiles neuronales en algunas secciones del DRG, en vez de llevar a cabo los procedimientos estereológicos para obtener un conteo celular exacto. Los datos fueron, pues, expresados como perfiles por sección en vez de neuronas por DRG.

Los días 1, 3 y 5 después de la inyección endoneural de NGF, el porcentaje de neuronas CGRP-positivas del DRG se vio significativamente aumentado al compararse con valores de animales inyectados con vehículo y animales no tratados. Estos datos son consistentes con los de reportes previos que señalan que administraciones intraplantares de NGF incrementan la expresión de CGRP en el DRG [5,122]. Recientemente se ha publicado que, tras tres semanas de infusión intratecal de NGF, el porcentaje de neuronas que expresan CGRP en el DRG aumenta entre un 15 a un 20 % [107]. Estos autores también describen una hipertrofia celular de neuronas del DRG tras el tratamiento con NGF. Sus datos sugieren que la influencia específica del NGF sobre neuronas medianas a grandes descrita en la presente investigación puede deberse realmente a un aumento general del tamaño celular producido por la administración de NGF. No es posible descartar la hipertrofia celular como resultado de la administración endoneural de NGF. Sin embargo, dado que todos los efectos observados en el presente estudio fueron de corta duración, no parece probable que se haya producido un aumento inicial y una posterior normalización del tamaño celular en el transcurso de una semana, tras una única inyección de una baja dosis de NGF. Además, a lo largo de nuestro estudio el porcentaje total de células pequeñas CGRP-positivas ($< 600 \mu\text{m}^2$) no cambió, por lo que podemos utilizarlo como referencia para establecer que el NGF aumenta la expresión de CGRP en fundamentalmente en neuronas medianas a grandes. En cualquier caso, la determinación de la influencia de un crecimiento general de neuronas sobre nuestros resultados es un problema de difícil abordaje, que requiere de diversos enfoques experimentales para ser totalmente cubierto.

Dado que el NGF no establece el fenotipo neuronal en el DRG [44,88], la única posible explicación para el incremento en el porcentaje de perfiles CGRP-

positivos observado en este y otros estudios tras administraciones de NGF, es un aumento del CGRP en células que expresan trkA y que normalmente no expresan niveles detectables de CGRP. Se ha demostrado que la localización del ARNm para CGRP no siempre coincide con la localización del CGRP [58]. Esto se debe a que el proceso post-translacional de un péptido precursor puede originar un producto que no es reconocible por el anticuerpo contra el péptido de interés. En base a los resultados de la presente investigación es posible postular que la expresión de CGRP en neuronas medianas a grandes del DRG es activada por el NGF. Esto es razonable, considerando que un porcentaje de neuronas grandes del DRG expresan trkA y ARNm de CGRP pero no CGRP [7,142].

En el presente estudio no se detectaron diferencias en la densidad de inmunoreacción de perfiles CGRP-positivos entre grupos experimentales. Considerando las limitaciones técnicas de la inmunohistoquímica, con nuestros resultados no es posible descartar que el NGF haya producido un aumento del contenido de CGRP en todas las células que pueden expresar el péptido, y se requieren otros experimentos para aclarar este punto. Sin embargo, los resultados indican que el aumento de perfiles CGRP-positivos es el efecto más evidente producido por una baja dosis de NGF endoneural.

2.3 Incremento de la expresión de CGRP en las láminas profundas del asta posterior

El NGF endoneural indujo un incremento en el área ocupada por fibras marcadas para CGRP en las láminas III y IV del asta posterior de la médula. Este hallazgo es consistente con el incremento en el porcentaje de perfiles CGRP-positivos medianos a grandes en el DRG, y confirma la actividad del NGF sobre esas fibras. En las laminas I y II la inmunotinción para CGRP no fue modificada por el NGF, lo que es consistente con la ausencia de efecto de NGF sobre el porcentaje de neuronas CGRP-positivas de pequeño tamaño. El aumento de contenido de CGRP en las fibras profundas del asta posterior fue ópticamente evidente, aunque no espectacular, pero proporcional al incremento en el DRG. La significativa disminución de la inmunotinción a CGRP observada

el día 10 es un hecho interesante. El día 10 el patrón de expresión de CGRP en el DRG fue normal, lo que sugiere que el aumento transitorio en la inmunotinción a CGRP en las láminas III y IV fue un reflejo del aumento en el contenido de CGRP de algunas neuronas del DRG, y no estaría evidenciando *sprouting* de estas neuronas en la médula espinal, pues dicho efecto habría de durar más tiempo. Esta idea se condice con aquella que plantea que el NGF periférico (producido en el tejido diana) no estimularía el crecimiento colateral de los axones centrales de las neuronas del DRG [45]. Una posible explicación para la disminución de inmunotinción a CGRP es una depleción del contenido de CGRP de fibras sensoriales primarias medianas a grandes que se proyectan hacia núcleos superiores. Por otro lado, la disminución puede ser también una consecuencia de un mecanismo regulatorio central para contrarrestar el repentino incremento producido por el NGF periférico.

2.4 Significado funcional de los cambios en la expresión de CGRP

Muchos estudios que han utilizado modelos animales han demostrado que el NGF participa en el desarrollo del dolor neuropático que se observa tras una lesión nerviosa parcial. El aumento del NGF en degeneración walleriana es necesario para el inicio del dolor neuropático [47,108,109]. Pese a que se han estudiado varios mecanismos para explicar el papel del NGF en el dolor neuropático [105,110,118,138], este aún no ha sido completamente dilucidado. El CGRP es un conocido péptido relacionado al dolor [15,156,157], y recientes hallazgos indican que además está relacionado al mecanismo del dolor neuropático [9,37,50,115]. Después de la lesión del nervio, el CGRP aumenta en neuronas sensoriales que se proyectan al núcleo grácil [76,86]. En el caso de lesión nerviosa parcial, estas neuronas corresponden a neuronas sensoriales medianas a grandes [77]. Asimismo, un incremento en la liberación de CGRP media el mecanismo de facilitación descendente en el dolor neuropático [37]. Considerando que tanto la expresión como la liberación estímulo-inducida de CGRP son dependientes de NGF [49,71,78], parece lógico especular que los mecanismos del NGF y el CGRP en el dolor neuropático están relacionados. En el presente estudio inmunohistoquímico se utilizó la dosis de NGF que produjo hiperalgesia térmica para inducir una

sobreexpresión transitoria de CGRP en algunas neuronas grandes y sus proyecciones centrales, como la que se observa en modelos animales de dolor neuropático. Finalmente, cabe hacer notar que el escaso número de células grandes del DRG, que expresan CGRP, corresponden a neuronas de fibras A- α , las que tienen propiedades electrofisiológicas muy similares a las neuronas de fibras A- δ , y cuyo papel en la transmisión sensorial no es muy conocido [81,62].

En resumen, el presente estudio demostró que una administración endoneural de NGF aumenta la expresión de CGRP en neuronas del DRG y sus proyecciones centrales, actuando principalmente sobre fibras medianas y grandes. Estos hallazgos sugieren que el CGRP participa en el mecanismo del NGF en el dolor neuropático.

2.5 Efecto sobre la expresión de SP en el ganglio de la raíz posterior y en las láminas profundas del asta posterior

A diferencia de lo ocurrido con CGRP, en nuestros experimentos no se observaron cambios en la expresión de SP, ni en el DRG ni en la médula espinal, tras la administración de una inyección endoneural de 30 ng de NGF ninguno de los días estudiados. Debido a la asociación funcional de CGRP y SP en la transmisión nociceptiva [157,156], los niveles de estos péptidos suelen ser evaluados en conjunto, y es común que se intenten establecer correlaciones entre estos. Sin embargo, muchos estudios han demostrado que, pese a que la expresión de ambos péptidos es dependiente de los mismos factores, y principalmente del NGF, no siempre sus niveles evolucionan a la par tras una lesión nerviosa (tabla 4). Por esto, el hecho de que no se hayan detectado cambios tras la administración de NGF no es un resultado contradictorio en nuestra investigación.

El péptido SP es, junto al glutamato, el principal neurotransmisor de la primera sinapsis del dolor, y se ha demostrado su participación en diversos estados de dolor tanto fisiológico como patológico [13]. No obstante, su papel en el dolor neuropático no está claro y, tal como se expone en la introducción de esta

tesis, los resultados de los estudios que han determinado su expresión en diversos modelos de dolor neuropático son divergentes. Tras una transección nerviosa, la SP disminuye inicialmente en el DRG y la médula espinal [52] [137], para luego reestablecer sus niveles [98]. Por otro lado, tras una lesión nerviosa parcial los cambios en la expresión de SP en estas estructuras son mucho menos pronunciados [76,17], y un reciente estudio ha postulado que los cambios en la expresión de SP no afectarían la producción de conductas de dolor neuropático en el modelo de SNL [92]. Es preciso notar que este último estudio sólo consideró la expresión total de neuropéptidos en el asta posterior de la médula, sin caracterizar la expresión en las diversas láminas ni investigar en el DRG. Por otro lado, las investigaciones que Noguchi y colaboradores desarrollan desde hace más de 10 años indican que tras lesiones nerviosas se observaría un incremento en la producción de ARNm para preprotaquicína en células medianas a grandes del DRG y en núcleos superiores de la médula espinal [96,97]. Estos hallazgos han sido corroborados por Ma y Bisby, quienes además han realizado observaciones similares en modelos de lesión parcial de nervio [76]. En cada caso, estos cambios en la expresión de SP en el DRG se ha tratado de vincular a las conductas de dolor observadas tras lesiones nerviosas. Esta relación es sin duda razonable, no sólo por el papel que cumple la SP en la transmisión del impulso nervioso, sino porque se ha determinado que este mismo cambio fenotípico, la expresión de SP en células grandes de DRG, es responsable de la hipersensibilidad observada en el dolor inflamatorio [94]. No obstante, aún no hay correlatos concluyentes entre los cambios fenotípicos relativos a SP en la primera neurona sensorial y el dolor neuropático. Nótese que cualquier cambio fenotípico de péptidos en el DRG implicará una modificación en la actividad del NGF en las células en cuestión, dado el papel regulador de esta neurotrofina. Con todo lo anterior, un cambio en los patrones de expresión de SP en el DRG y/o la médula espinal es un efecto presumible para el NGF administrado endoneuralmente. El hecho de que no se haya observado tal cambio, a una dosis de NGF que sí genera el cambio correspondiente en CGRP, no descarta la posibilidad de que el NGF endoneural pueda generar cambios fenotípicos relativos a SP en el DRG. Lo que nuestros experimentos indican es que el CGRP es más sensible al efecto del NGF, y sugieren que la hiperalgesia térmica observada podría estar

relacionada con cambios en la expresión de CGRP, y no necesariamente con cambios en la expresión de SP. Esta idea respecto a la sensibilidad se ve reforzada por los hallazgos de Calvino y colaboradores, quienes hace poco demostraron, en un modelo de artritis, que el aumento en la expresión de los receptores de NGF en el asta posterior de la médula se observa en las fibras que expresan solamente CGRP y no en aquellas que expresan SP [101].

3. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ENDONEURAL DE NGF EN LA PRUEBA DE LA FORMALINA

En nuestro estudio, la administración endoneural de 30 ng de NGF provocó un aumento de las conductas de dolor en ciertos períodos de la segunda fase de la prueba de la formalina el día 3, pero no los días 5 ni 10 posinyección de NGF. El efecto observado fue más bien discreto, aunque arrojó valores de diferencia significativos en algunos intervalos de tiempo. El análisis por separado de las conductas que componen la PCD mostró que la diferencia observada se debe exclusivamente a un aumento en el tiempo que el animal pasó con la pata elevada. Funcionalmente, el mecanismo que originó este efecto podría relacionarse a los cambios descritos previamente: la degeneración-regeneración de axones en el nervio ciático y el aumento de la expresión de CGRP en el DRG. Así, el NGF administrado e incluso las citocinas producidas en el modesto proceso de degeneración observado, podrían sensibilizar los brotes y las fibras que inervan el dermatoma del ciático sobre el cual se realiza la prueba de la formalina, incrementando la señal que viaja por las fibras disponibles. Este mecanismo encaja y estaría completamente envuelto dentro de la hipótesis de la degeneración walleriana [70] y es perfectamente lógico si se considera que la segunda fase de la prueba de la formalina, aunque requiere sensibilización espinal, es siempre dependiente de los estímulos que se transmiten desde el dermatoma [102]. Por otro lado, en diversos modelos de dolor inflamatorio se ha observado un incremento de CGRP en la neurona sensorial primaria y en el asta posterior [59,129,56,30], que es dependiente de NGF [158,101] y necesario para la aparición de este tipo de dolor. No obstante, llama la atención que los fenómenos morfológicos y funcionales previamente descritos se mantuvieron al

menos hasta el día 5 posinyección, mientras que el efecto en la prueba de la formalina sólo se observó el día 3. Esto indica que existen otros factores que condicionan el incremento de las conductas de dolor, y que éstas no se vinculan, al menos exclusivamente, a los cambios tipo neuropatía dolorosa producidos por el NGF. Podría especularse respecto a la actividad periférica del NGF, y sugerirse que el NGF inyectado haya sido transportado a, y estuviese actuando en, la zona de la inyección de formalina. Sin embargo, esta posibilidad es descartable, dado que se ha demostrado que el efecto del NGF específicamente en la zona de la lesión, que se traduce en la sensibilización de los terminales de los nociceptores, es responsable de la hiperalgesia observada sólo durante el primer período (menos de 7 h) tras la inyección sistémica o intradérmica de NGF [6,68]. Tras este período inicial, otros mecanismos dependientes de cambios plásticos de la primera neurona sensorial mantienen el dolor inflamatorio producido por NGF [68,78]. Otro argumento contra la idea de una sensibilización de nociceptores en el tejido diana del dermatoma, es que ésta seguramente habría implicado un incremento en la primera fase de la prueba de la formalina que, como se sabe, es debida a la estimulación química de nociceptores por la formalina subcutánea [139]. Descartada esta posibilidad y con los actuales datos, no es posible determinar qué otro(s) factor(es) puede ser responsables del mantenimiento del efecto exacerbado de la formalina hacia el día 3. Esto es aún menos posible considerando el escaso conocimiento existente acerca de la relación entre el dolor neuropático y la inflamación del tejido correspondiente al dermatoma afectado. Es muy bien sabido que los pacientes con dolor neuropático tienen aumentada su sensibilidad a diversos estímulos, con una marcada hiperalgesia térmica y mecánica en el dermatoma afectado o la periferia de éste. Sin embargo, no se conoce la respuesta de estos pacientes a los estímulos que comúnmente producen dolor tónico inflamatorio y estos experimentos son evidentemente de imposible realización debido a sus implicaciones éticas. Este vacío de conocimiento no es trivial, pues podría arrojar importante información respecto a la neurofisiología de ambos estados dolorosos. Por otro lado, pese a que los principales modelos animales de dolor neuropático existen desde hace más de 15 años, se ha estudiado muy poco la relación existente entre los estados generados por estos modelos y una

inflamación concomitante del tejido diana. Llama la atención esta falta de interés, puesto que en humanos los síndromes de dolor regional complejo (SDRC) tipos I y II, cuyo mecanismo aún se desconoce, a menudo cursan con fenómenos de ambos tipos: dolor neuropático e inflamación periférica (para una revisión ver Baron et al. [152]). Se ha propuesto que los modelos de dolor neuropático por lesión parcial o total del nervio son buenos modelos de SDRC tipo II, puesto que es posible observar en ellos algunos de los cambios observados en humanos. Sin embargo el edema y la inflamación neurogénica típicos del SDRC no siempre son reproducidos por estos modelos [51]. Por otro lado, los estudios de dolor inflamatorio del dermatoma afectado realizados con estos modelos son pocos y contradictorios. En su reporte original del modelo de CCI, Bennett y Xie describen la observación de la respuesta del animal neuropático frente a la estimulación producida por la inyección subcutánea de aceite de mostaza [12]. Estos autores señalaron que los animales neuropáticos cambiaron su conducta frente al estímulo, aumentando considerablemente el tiempo que mantuvieron la pata elevada de forma sostenida, y disminuyendo la conducta de lamido. Estos datos se obtuvieron en un experimento realizado 21 días después de realizada la ligadura de la CCI. Esta conducta es similar a la observada en nuestro estudio el día 3, en el cual el incremento de la PCD se debió exclusivamente al aumento de la elevación de la pata, mientras el lamido y la agitación no se modificaron, comparados con los animales inyectados con vehículo. Este cambio de conducta puede ser interpretada como la permanencia de un dolor sostenido y constante, en vez de súbitos incrementos de dolor, con los que se suele relacionar a lamido y la agitación. Por otro lado, nuestro resultado no es relacionable con el de Vissers et al. [146] quienes recientemente han descrito que, en el modelo de CCI, los animales disminuyen las conductas de dolor de dolor provocadas por la prueba de la formalina. Este efecto “analgésico” producido por la presencia de una neuropatía, fue observado tanto en la extremidad ipsilateral como en la extremidad contralateral a la neuropatía, 8 días después de realizada la ligadura de la CCI. En este estudio no se determinó ni se comentó el mecanismo que generó el efecto descrito.

En resumen, la administración endoneural de 30 ng NGF, pero no de vehículo, produce un incremento en las conductas de dolor observadas en la prueba de la formalina cuando ésta se realiza 3, pero no 5 ni 10 días, después de la inyección de NGF. Este efecto es comparable al observado en el modelo de CCI y puede ser en parte producido por los cambios morfológicos inducidos por el NGF y descritos en el presente trabajo. Este resultado colabora a la comprensión de la escasamente conocida relación existente entre los mecanismos del dolor inflamatorio y del dolor neuropático.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados de la presente tesis doctoral fue posible obtener las siguientes conclusiones:

1. La administración endoneural de 30 ng de NGF produce hiperalgesia térmica en ratas.
2. La administración endoneural de NGF, a una dosis que produce hiperalgesia térmica, no produce alodinia mecánica en ratas.
3. La administración endoneural de NGF induce desmielinización, una modesta degeneración y la producción de brotes colaterales, en la zona de inyección expuesta al NGF.
4. Los efectos conductuales e histológicos del NGF endoneural son dosis-dependientes.
5. Los efectos conductuales e histológicos del NGF son comparables y vinculables en cuanto a su relación dosis-efecto como en cuanto a su curso temporal, lo que sugiere que el efecto histológico observado en nuestro modelo puede relacionarse a la conducta de dolor neuropático observado.
6. La administración endoneural de NGF a una dosis que produce hiperalgesia térmica, produce un aumento del porcentaje de células medianas a grandes que contienen CGRP en el DRG. Estas neuronas corresponden a neuronas sensoriales primarias. Este efecto sugiere un mecanismo de acción del NGF en el dolor neuropático.
7. La administración endoneural de NGF a una dosis que produce hiperalgesia térmica, produce un aumento del área ocupada por fibras que contienen CGRP en las láminas III y IV del asta medular posterior. Estas fibras corresponden a neuronas sensoriales primarias. Este efecto sugiere un mecanismo de acción del NGF en el dolor neuropático.

8. Los efectos producidos por NGF sobre la expresión de CGRP son limitados en el tiempo, prolongándose por hasta 5 días.

9. La administración de NGF, a una dosis que produce hiperalgesia térmica y un incremento en el contenido de CGRP en la neurona sensorial primaria, no modifica el contenido de SP en dicha neurona, ni en el DRG ni en el asta posterior de la médula espinal.

10. La administración de NGF, a una dosis que produce hiperalgesia térmica, produce un aumento en la fase 2 de la prueba de la formalina el día 3 posinyección de NGF, pero no los días 5 ni 10. Este cambio se debe principalmente a un aumento del tiempo en la conducta de elevación de la pata de la rata.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Listado de Referencias Bibliográficas

1. Task Force on Taxonomy of the IASP, IASP, Seattle, 2002, 43 pp.
2. Abbott, F.V., Franklin, K.B.J. and Westbrook, R.F., The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats, *Pain*, 60 (1995) 91-102.
3. Aley, K.O., Reichling, D.B. and Levine, J.D., Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans, *Neuroscience*, 73 (1996) 259-265.
4. Aloe, L., Tuveri, M. and Levi-Montalcini, R., Studies on carrageenan-induced arthritis in adult rats: presence of nerve growth factor and role of sympathetic innervation, *Rheumatol Int*, 12 (1992) 213-216.
5. Amann, R., Schuligoi, R., Herzog, G., and Donnerer, J., Intraplantar injection of nerve growth factor into the rat hind paw: local edema and effects on thermal nociceptive threshold, *Pain*, 64 (1995) 323-329.
6. Andreev, N.Y., Dimitreva, N., Koltzenburg, M. and McMahon, S.B., Peripheral administration of nerve growth factor in the adult rat produces a thermal hyperalgesia that requires the presence of sympathetic post-ganglionic neurones, *Pain*, 63 (1995) 109-115.
7. Averill, S., McMahon, S.B., Clary, D.O., Reichardt, L.F. and Priestley, J.V., Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons, *Eur J Neurosci*, 7 (1995) 1484-1494.
8. Backonja, M.M., Defining neuropathic pain, *Anesth Analg*, 97 (2003) 789-790.
9. Bennett, A.D., Chastain, K.M. and Hulsebosch, C.E., Alleviation of mechanical and thermal allodynia by CGRP₈₋₃₇ in a rodent model of chronic central pain, *Pain*, 86 (2000) 163-175.
10. Bennett, G.J., Neuropathic pain: a crisis of definition?, *Anesth Analg*, 97 (2003) 619-620.
11. Bennett, G.J., Kajander, K., Sahara, Y., Iadarola, M. and Sugimoto, T., Neurochemical and anatomical changes in the dorsal horn of rats with an experimental painful peripheral neuropathy. In: Cervero, F., Bennett, G.J., Headley, P. (Eds.), *Processing of sensory information in the superficial dorsal horn of the spinal cord*, Plenum Press, New York, 1989, pp. 463-471.
12. Bennett, G.J. and Xie, Y., A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders on pain sensation like those seen in man, *Pain*, 33 (1988) 87-107.
13. Besson, J.M., The neurobiology of pain, *Lancet*, 353 (1999) 1610-1615.
14. Bibel, M. and Barde, Y.-L., Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system, *Gens Dev*, 14 (2000) 2919-2937.
15. Biella, G., Panara, C., Pecile, A. and Sotgiu, M.L., Facilitatory role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on excitation induced by substance P (SP) and noxious stimuli in rat spinal dorsal horn neurons: an iontophoretic study *in vivo*, *Brain Res*, 559 (1991) 352-356.
16. Boucher, T.J., Kerr, B., Ramer, M., Thompson, S. and McMahon, S.B., Neurotrophic factor effects on pain-signaling systems. In: Devor, M., Rowbotham, M., Wiesenfeld-Hallin, Z. (Eds.), *Proceedings of the 9th world congress on pain*, IASP press, Seattle, 2000, pp. 175-189.

17. Cameron, A.A., Cliffer, K.D., Dougherty, P.M., Garrison, C.J., Willis, W.D. and Carlton, S.M., Time course of degenerative and regenerative changes in the dorsal horn in a rat model of peripheral neuropathy, *J Comp Neurol*, 379 (1997) 428-442.
18. Cameron, A.A., Cliffer, K.D., Dougherty, P., Willis, W. and Carlton, S.M., Changes in lectin, GAP-43 and neuropeptide staining in the rat superficial dorsal horn following experimental peripheral neuropathy, *Neurosci Lett*, 131 (1991) 249-252.
19. Chung, K., Lee, W.T. and Carlton, S.M., The effects of dorsal rhizotomy and spinal cord isolation on calcitonin gene-related peptide-labeled terminals in the rat lumbar dorsal horn, *Neurosci Lett*, 90 (1988) 27-32.
20. Coleman, M.P. and Perry, V., Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target, *Trends Neurosci*, 25 (2002) 532-537.
21. Cragg, B., What is the signal for chromatolysis?, *Brain Res*, 23 (1970) 1-21.
22. Dawbarn, D. and Allen, S.J., Neurotrophins and neurodegeneration, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 29 (2003) 211-230.
23. Decostered, I. and Woolf, C.J., Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain, *Pain*, 87 (2000) 149-158.
24. Deng, Y.-S., Zhong, J.-H. and Zhou, X.-F., Effects of endogenous neurotrophins on sympathetic sprouting in the dorsal root ganglia and allodynia following spinal nerve injury, *Exp Neurol*, 164 (2000) 344-350.
25. Devor, M., Neuropathic pain: what do we do with all these theories?, *Acta Anaesthesiol Scand*, 45 (2001) 1121-1127.
26. Devor, M. and Seltzer, Z., Pathophysiology of damaged nerves in relation to chronic pain. In: Wall, P. and Melzack, R. (Eds.), *Textbook of Pain*, Churchill Livingstone, London, 1999, pp. 129-164.
27. Diamond, J., Coughlin, M. and Holmes, M., Endogenous NGF and nerve impulses regulate the collateral nerve sprouting of sensory axons in the skin of the adult rat, *J Neurosci*, 12 (1992) 1454-1466.
28. Diamond, J., Coughlin, M., Macintyre, L., Holmes, M. and Visheau, B., Evidence that endogenous NGF is responsible for the collateral sprouting, but not the regeneration of nociceptive axons, in the adult rat, *Proc Natl Acad Sci*, 84 (1987) 6596-6600.
29. DiStefano, P.S., Friedman, B., Radziejewski, C., Alexander, C., Boland, P., Schik, C.M., Lindsay, R.M. and Wiegand, S.J., The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons, *Neuron*, 8 (1992) 983-993.
30. Donaldson, L.F., Harmor, A.J., McQueen, D.S. and Seckl, J.R., Increased expression of preprotachykinin, calcitonin gene-related peptide, but not vasoactive intestinal peptide messenger RNA in dorsal root ganglia during the development of adjuvant monoarthritis in the rat., *Brain Res Mol Brain Res*, 16 (1992) 143-149.
31. Dubuisson, D. and Dennis, S., The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brainstem stimulation in rats and cats, *Pain*, 4 (1977) 161-164.
32. Dworkin, R., An overview of neuropathic pain: syndromes, symptoms, signs, and several mechanisms, *Clin J Pain*, 18 (2002) 343-349.

33. Ernfors, P., Hallbook, F., Ebendal, T., Shooter, E.M., Radeke, M.J., Misko, T.P., and Persson, H., Developmental and regional expression of β -nerve growth factor receptor mRNA in the chick and rat, *Neuron*, 1 (1988) 983-996.
34. Fitzgerald, M., Wall, P.D., Goedert, M., and Emson, P.C., Nerve growth factor counteracts the neurophysiological and neurochemical effects of chronic sciatic nerve sections, *Brain Res*, 332 (1985) 131-141.
35. Friedman, W.J. and Greene, L.A., Neurotrophin signaling via Trks and p75, *Exp Cell Res*, 253 (1999) 131-142.
36. Fukuoka, T., Kondo, E., Dai, Y., Hashimoto, N. and Noguchi, K., Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model, *J Neurosci*, 21 (2001) 4891-4900.
37. Gardell, L.R., Vanderah, T.W., Gardell, S.E., Wang, R., Ossipov, M.H., Lai, J. and Porreca, F., Enhanced evoked excitatory transmitter release in experimental neuropathy requires descending facilitation, *J Neurosci*, 23 (2003) 8370-8379.
38. Garrison, C., Dougherty, P., and Carlton, S.M., Quantitative analysis of substance P and calcitonin gene-related peptide immunohistochemical staining in the dorsal horn of neuropathic MK-801-treated rats, *Brain Res*, 607 (1993) 205-214.
39. Gold, M.S., Weinreich, D., Kim, C.S., Wang, R., Treanor, J., Porreca, F. and Lai, J., Redistribution of $\text{Na}_v1.8$ in uninjured axons enables neuropathic pain, *J Neurosci*, 23 (2003) 158-166.
40. Gould, H.J. III, Gould, T.N., England, J.D., Paul, D., Liu, Z.P. and Levinson, S.R., A possible role for nerve growth factor in the augmentation of sodium channels in models of chronic pain, *Brain Res*, 854 (2000) 19-29.
41. Grimes, M., Beattie, E.C. and Mobley, W., A signaling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase, TrkA, *PNAS*, 94 (1997) 9909-9914.
42. Grimes, M., Zhou, J., Beattie, E.C., Yuen, E., Hall, D., Valletta, J., Topp, K., LaVail, J., Bunnett, N.W. and Mobley, W., Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes, *J Neurosci*, 16 (1996) 7950-7964.
43. Guilbaud, G., Gautron, M., Jazat, F., Ratinahirana, H., Hassig, R. and Hauw, J.J., Time course of degeneration and regeneration of myelinated nerve fibres following chronic loose ligatures of the rat sciatic nerve: can nerve lesions be linked to the abnormal pain-related behaviours?, *Pain*, 53 (1993) 147-158.
44. Hall, A.K., Ai, X., Hickman, G.E., MacPhedran, S.E., Nduaguba, C.O. and Robertson, C.P., The generation of neuronal heterogeneity in a rat sensory ganglion, *J Neurosci*, 17 (1997) 2775-2784.
45. Hannila, S.S. and Kawaja, M.D., Distribution of central sensory axons in transgenic mice overexpressing nerve growth factor and lacking functional p75 neurotrophin receptor expression, *Eur J Neurosci*, 18 (2003) 312-322.
46. Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. and Joris, J., A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia, *Pain*, 32 (1988) 77-88.
47. Herzberg, U., Eliav, E., Dorsey, J.M., Gracely, R.H. and Kopin, I.J., NGF involvement in pain induced by chronic constriction injury of the rat sciatic nerve, *Neuroreport*, 8 (1997) 1613-1618.

48. Hökfelt, T., Zhang, X., and Wiesenfeld-Hallin, Z., Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications, *Trends Neurosci*, 17 (1994) 22-30.
49. Inaishi, Y., Kashihara, Y., Sakaguchi, M., Nawa, H. and Kuno, M., Cooperative regulation of calcitonin gene-related peptide levels in rat sensory neurons via their central and peripheral processes, *J Neurosci*, 12 (1992) 518-524.
50. Jang, J.H., Nam, T.S., Paik, K.S. and Leem, J.W., Involvement of peripherally released substance P and calcitonin gene-related peptide in mediating mechanical hyperalgesia in a traumatic neuropathy model of the rat, *Neurosci Lett*, 360 (2004) 129-132.
51. Janig, W. and Baron, R., Experimental approach to CRPS, *Pain*, 108 (2003) 3-7.
52. Jessell, T., Tsunoo, A., Kanasawa, I. and Otsuka, M., Substance P: depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neurons, *Brain Res*, 168 (1979) 247-259.
53. Ju, G., Hökfelt, T., Brodin, E., Fahrenkrug, J., Fischer, J.A., Frey, P., Elde, R.P. and Brown, J., Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells, *Cell Tissue Res*, 247 (1987) 417-431.
54. Kajander, K.C., Pollock, C.H. and Berg, H., Evaluation of hindpaw position in rats during chronic constriction injury (CCI) produced with different suture materials, *Exp Brain Res*, 91 (1992) 73-78.
55. Kajander, K.C. and Xu, J., Quantitative evaluation of calcitonin gene-related peptide and substance P levels in rat spinal cord following peripheral nerve injury, *Neurosci Lett*, 186 (1995) 184-188.
56. Kar, S., Rees, R.G. and Quirion, R., Altered calcitonin gene-related peptide, substance P and enkephalin immunoreactivities and receptor binding sites in the dorsal spinal cord of the polyarthritic rat, *Eur J Neurosci*, 6 (1994) 345-354.
57. Kim, S. and Chung, J.M., An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat, *Pain*, 50 (1992) 355-363.
58. Kresse, A., Jacobowitz, D.M. and Skofitsch, G., Detailed mapping of CGRP mRNA expression in the rat central nervous system: comparison with previous immunocytochemical findings, *Brain Res Bull*, 36 (1995) 261-274.
59. Kuraishi, Y., Nanayama, T., Ohno, H., Fujii, N., Otaka, A., Yajima, H. and Satoh, M., Calcitonin gene-related peptide increases in the dorsal root ganglia of adjuvant arthritic rat, *Peptides*, 10 (1989) 447-452.
60. Lai, J., Gold, M.S., Kim, C.S., Bian, D., Ossipov, M.H., Hunter, J.C. and Porreca, F., Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na_v1.8, *Pain*, (2002) 143-152.
61. Lai, J., Hunter, J.C., Ossipov, M.H. and Porreca, F., Blockade of neuropathic pain by antisense targeting of tetrodotoxin-resistant sodium channels in sensory neurons, *Methods Enzymol*, 314 (2000) 201-213.
62. Lawson, S.N., McCarthy, P.W., and Prabhakar, E., Electrophysiological properties of neurones with CGRP-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglia, *J Comp Neurol*, 365 (1996) 355-366.

63. LeBars, D., Gozariu, M., and Cadden, S.W., Animal models of nociception, *Pharmacol Rev*, 53 (2001) 597-652.
64. Levi-Montalcini, R., The nerve growth factor: thirty-five years later, *EMBO J*, 6 (1987) 1145-1154.
65. Levi-Montalcini, R., Meyer, H., and Hamburger, V., In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo, *Cancer Res*, 14 (1954) 49-57.
66. Lewin, G.R. and Mendell, L.M., Nerve growth factor and nociception, *Trends Neurosci*, 16 (1993) 353-359.
67. Lewin, G.R., Ritter, A.M. and Mendell, L.M., Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat, *J Neurosci*, 13 (1993) 2136-2148.
68. Lewin, G.R., Rueff, A. and Mendell, L.M., Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia, *Eur J Neurosci*, 6 (1994) 1903-1912.
69. Li, L., Xian, C.J., Zhong, J.-H. and Zhou, X.-F., Lumbar 5 ventral root transection-induced upregulation of nerve growth factor in sensory neurons and their target tissues: a mechanism in neuropathic pain, *Mol Cell Neurosci*, 23 (2003) 232-250.
70. Li, Y., Dorsi, M.J., Meyer, R.A. and Belzberg, A.J., Mechanical hyperalgesia after an L5 spinal nerve lesion in the rat is not dependent on input from injured nerve fibers, *Pain*, 85 (2000) 493-502.
71. Lindsay, R.M. and Harmor, A.J., Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons, *Nature*, 337 (1989) 362-364.
72. Liu, C.N., Michaelis, M., Amir, R. and Devor, M., Spinal nerve injury enhances subthreshold membrane potential oscillations in DRG neurons: relation to neuropathic pain, *J Neurophysiol*, 84 (2000) 205-215.
73. Liu, C.N., Wall, P.D., Ben-Dor, E., Michaelis, M., Amir, R. and Devor, M., Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury, *Pain*, 85 (2000) 503-521.
74. López-Sánchez, N. and Frade, J.M., Control of the cell cycle by neurotrophins: lessons from the p75 neurotrophin receptor, *Histol Histopatol*, 17 (2002).
75. Ma, Q.P. and Woolf, C.J., Noxious stimuli induce an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent hypersensitivity of the flexion withdrawal reflex to touch: implications for the treatment of allodynia, *Pain*, 61 (1995) 383-390.
76. Ma, W. and Bisby, M.A., Increase of preprotachykinin mRNA and substance P immunoreactivity in spared dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injury, *Eur J Neurosci*, 10 (1998) 2388-2399.
77. Ma, W., Ramer, M.S. and Bisby, M.A., Increased calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in gracile nucleus after partial sciatic nerve injury: Age-dependent and originating from spared sensory neurons, *Exp Neurol*, 159 (1999) 459-473.
78. Malcangio, M., Garrett, N.E. and Tomlinson, D.R., Nerve growth factor treatment increases stimulus-evoked release of sensory neuropeptides in the rat spinal cord, *Eur J Neurosci*, 9 (1997) 1101-1104.
79. Malmberg, A. and Basbaum, A.I., Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates, *Pain*, 16 (1998) 215-222.

80. Marchand, J.E., Wurm, W.H., Kato, T. and Kream, R.M., Altered tachykinin expression by dorsal root ganglion neurons in a rat model of neuropathic pain, *Pain*, 58 (1994) 219-231.
81. McCarthy, P.W. and Lawson, S.N., Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity, *Neuroscience*, 34 (1990) 623-632.
82. McNeill, D.L., Carlton, S.M. and Hulsebosch, C.E., Intrasprouting of calcitonin gene-related peptide containing primary afferents after deafferentation in the rat, *Exp Neurol*, 114 (1991) 321-329.
83. Mearow, K.M., The effects of NGF and sensory nerve stimulation on collateral sprouting and gene expression in adult sensory neurons, *Exp Neurol*, 151 (1998) 14-25.
84. Mearow, K., Kril, Y.A. and Diamond, J., Increase NGF mRNA expression in denervated skin rats, *Neuroreport*, 4 (1993) 351-354.
85. Merskey, H., Claryfing definition of neuropathic pain, *Pain*, 96 (2002) 408-409.
86. Miki, K., Fukuoka, T., Tokunaga, A. and Noguchi, K., Calcitonin gene-related peptide increase in the rat spinal dorsal horn and dorsal column nucleus following peripheral nerve injury: up-regulation in a subpopulation of primary afferent sensory neurons, *Neuroscience*, 82 (1998) 1243-1252.
87. Mitchel, S.W., *Injuries to nerves and their consequences*, B. Lippincott Co., Philadelphia, 1872.
88. Molliver, D.C. and Snider, W.D., Nerve growth factor receptor TrkA is down-regulated during postnatal development by a subset of dorsal root ganglion neurons, *J Comp Neurol*, 381 (1997) 428-438.
89. Morton, D.B. and Griffith, P.H., Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment, *Vet Rec*, 116 (1985) 431-436.
90. Mosconi, T. and Kruger, L., Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations, *Pain*, 64 (1996) 37-57.
91. Munglani, R., Bond, A., Smith, G.D., Harrison, S.M., Elliot, P.J., Birch, P.J. and Hunt, S.P., Changes in neuronal markers in a mononeuropathic rat model: relationship between neuropeptide Y, pre-emptive drug treatment and long-term mechanical hyperalgesia, *Pain*, 63 (1995) 21-31.
92. Na, H.S., Kim, H.J., Sung, B., Back, S.K., Kim, D.Y., Kim, J.S. and Hong, S.K., Decreased in spinal CGRP and substance P in not related to neuropathic pain in a rat model, *Neuroreport*, 12 (2000) 175-178.
93. Nahin, R.L., Ren, K., De León, M., and Ruda, M., Primary sensory neurons exhibit altered gene expression in a rat model of neuropathic pain, *Pain*, 58 (1994) 95-108.
94. Neumann, S., Doubell, T.P., Leslie, T. and Woolf, C.J., Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons, *Nature*, 384 (1996) 360-364.
95. Noguchi, K., De León, M., Nahin, R.L., Senba, E. and Ruda, M.A., Quantification of axotomy-induced alteration of neuropeptide mRNAs with special reference to neuropeptide Y mRNA and the effects of neonatal capsaicin treatment, *J Neurosci Res*, 35 (1993) 54-66.

96. Noguchi, K., Dubner, R., De León, M., Senba, E. and Ruda, M.A., Axotomy induces preprotachykinin gene expression in a subpopulation of dorsal root ganglion neurons, *J Neurosci Res*, 37 (1994) 596-603.
97. Noguchi, K., Kawai, Y., Fukuoka, T., Senba, E. and Miki, K., Substance P induced by peripheral nerve injury in primary afferent sensory neurons and its effect on dorsal column nucleus neurons, *J Neurosci*, 15 (1995) 7633-7643.
98. Nothias, F., Tessler, A. and Murray, M., Restoration of substance P and calcitonin gene-related peptide in dorsal root ganglia and dorsal horn after neonatal sciatic nerve lesion, *J Comp Neurol*, 334 (1993) 370-384.
99. Obata, K., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Yi, D., Tokunaga, A., Hashimoto, N., Yoshikawa, H. and Noguchi, K., Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats, *Pain*, 101 (2003) 65-77.
100. Oh, E.-J., Yoon, Y., Lee, S., and Hong, S., Changes in nerve growth factor levels in dorsal root ganglia and spinal nerves in a rat neuropathic pain model, *Exp Brain Res*, 130 (2000) 93-99.
101. Pezet, S., Onténiente, B., Jullien, J., Junier, M.P., Grannec, G., Rudkin, B.B., and Calvino, B., Differential regulation of NGF receptors in primary sensory neurons by adjuvant-induced arthritis in the rat, *Pain*, 90 (2001) 113-125.
102. Pitcher, G.M. and Henry, J.L., Second phase of formalin induced excitation of spinal dorsal horn neurons in spinalized rats is reversed by sciatic nerve block, *Eur J Neurosci*, 15 (2002) 1509-1515.
103. Porreca, F., Ossipov, M.H. and Gebhart, G.F., Chronic pain and medullary descending facilitation, *Trends Neurosci*, 25 (2002) 319-325.
104. Priestley, J.V., Michael, G.J., Averill, S., Liu, M. and Willmott, N., Regulation of nociceptive neurons by nerve growth factor and glial cell line derived neurotrophic factor, *Can J Physiol Pharmacol*, 80 (2002) 494-505.
105. Ramer, M.S. and Bisby, M.A., Adrenergic innervation of rat sensory ganglia following proximal or distal painful sciatic neuropathy: distinct mechanisms revealed by anti-NGF treatment, *Eur J Neurosci*, 11 (1999) 837-846.
106. Ramer, M.S., Bradbury, E.J. and McMahon, S.B., Nerve growth factor induces P2X₃ expression in sensory neurons, *J Neurochem*, 77 (2001) 864-875.
107. Ramer, M.S., Bradbury, E.J., Michael, G.J., Lever, I.J. and McMahon, S.B., Glial cell line-derived neurotrophic factor increases calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in sensory and motoneurons *in vivo*, *Eur J Neurosci*, 18 (2003) 2713-2721.
108. Ramer, M.S., French, G.D. and Bisby, M.A., Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sympathetic sprouting into the DRG, *Pain*, 72 (1997) 71-78.
109. Ramer, M.S., Kawaja, M.D., Henderson, J.T., Roder, J.C. and Bisby, M.A., Glial overexpression of NGF enhances neuropathic pain and adrenergic sprouting into DRG following chronic sciatic constriction in mice, *Neurosci Lett*, 251 (1998) 53-56.
110. Ramer, M.S., Thompson, S.W.N. and McMahon, S.B., Causes and consequences of sympathetic basket formation in dorsal root ganglia, *Pain*, Supplement 6 (1999) S111-S120.
111. Richardson, P.M. and Riopelle, R.J., Uptake of nerve growth factor along peripheral and spinal axons of primary sensory neurons, *J Neurosci*, 4 (1984) 1683-1689.

112. Richardson, P.M., Verge, V.M.K. and Riopelle, R.J., Distribution of neuronal receptors for nerve growth factor in the rat, *J Neurosci*, 4 (1986) 1683-1689.
113. Ritter, A.M., The somal membrane properties of physiological identified sensory neurons in the rat: effects of nerve growth factor, *J Neurophysiol*, 68 (1992) 2033-2041.
114. Ritter, A.M., Lewin, G.R., Kremer, N.E. and Mendell, L.M., Requirement for nerve growth factor in the development of myelinated nociceptors *in vivo*, *Nature*, 350 (1991) 500-502.
115. Romero, M.I., Rangappa, N., Li, L., Lightfoot, E., Garry, M.G. and Smith, G.M., Extensive sprouting of sensory afferents and hyperalgesia induced by conditional expression of nerve growth factor in the adult spinal cord, *J Neurosci*, 20 (2000) 4435-4445.
116. Ruit, K.G., Elliot, J.L., Osborne, P.A., Yan, Q., and Snider, W.D., Selective dependence of mammalian dorsal root ganglion neurons on nerve growth factor in the development of myelinated nociceptors *in vivo*, *Neuron*, 8 (1992) 573-587.
117. Ruiz, G. and Baños, J.-E., Fármacos utilizados en el tratamiento del dolor neurogénico. In: de la Barrera, S., Ferreiro, M., Montoto, A., Rodríguez, S. (Eds.), *Dolor neurogénico en rehabilitación*, Entheos, Madrid, 2002, pp. 41-58.
118. Ruiz, G., Ceballos, D. and Baños, J.-E., Behavioral and histological effects of endoneurial administration of nerve growth factor: possible implications in neuropathic pain, *Brain Res*, 1011 (2004) 1-6.
119. Sah, D.W., Ossipov, M.H. and Porreca, F., Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain, *Nature Rev*, 2 (2003) 460-472.
120. Schmalbruch, H., Fiber composition of the rat sciatic nerve, *Anat Rec*, 215 (1986) 71-81.
121. Scholz, J. and Woolf, C.J., Can we conquer pain?, *Nat Neurosci*, 5 (2002) 1062-1067.
122. Schuligoi, R. and Amann, R., Differential effects of treatment with nerve growth factor on thermal nociception and on calcitonin gene-related peptide content of primary afferent neurons in the rat, *Neurosci Lett*, 252 (1998) 147-149.
123. Seltzer, Z., Dubner, R. and Shir, Y., A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injuries, *Pain*, 43 (1990) 205-218.
124. Shadiack, A.M., Sun, Y. and Zigmond, R.E., Nerve growth factor antiserum induces axotomy-like changes in neuropeptide expression in intact and sympathetic and sensory neurons, *J Neurosci*, 21 (2001) 363-371.
125. Shamash, S., Reichert, F. and Rotshenker, S., The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and interleukin-1 β , *J Neurosci*, 22 (2002) 3052-3060.
126. Shehab, S. and Atkinsons, M.E., Vasoactive intestinal polypeptide increases in areas of the dorsal horn of the spinal cord from which other neuropeptides are depleted following peripheral axotomy, *Exp Brain Res*, 62 (1986) 422-430.
127. Shu, X. and Mendell, L.M., Neurotrophins and hyperalgesia, *PNAS*, 96 (1999) 7693-7696.
128. Sima, A., Studies on fibre size in developing sciatic nerve and spinal roots in normal, undernourished and rehabilitated rats, *Acta Physiol Scand Suppl*, 406 (1974) 1-55.
129. Sluka, K.A. and Westlund, K.N., Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthritis model in rats, *Pain*, 55 (1993) 367-377.

130. Sommer, C., Galbraith, J.A., Heckman, H.M. and Myers, R.R., Pathology of experimental compression neuropathy producing hyperesthesia, *J Neuropathol Exp Neurol*, 52 (1993) 223-233.
131. Sommer, C., Lalonde, A., Heckman, H.M., Rodríguez, M. and Myers, R.R., Quantitative neuropathology of a focal nerve injury causing hyperalgesia, *J Neuropathol Exp Neurol*, 54 (1995) 635-643.
132. Sommer, C., Petrasch, S., Lindenlaub, T., and Toyka, K.V., Neutralizing antibodies to interleukin 1-receptor reduce pain associated behavior in mice with experimental neuropathy, *Neurosci Lett*, 270 (1999) 25-28.
133. Sommer, C., Schmidt, C. and George, A., Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1, *Exp Neurol*, 151 (1998) 138-142.
134. Sorkin, L.S. and Doom, C.M., Epineural application of TNF elicits an acute mechanical hyperalgesia in the awake rat, *J Periph Nerv Syst*, 5 (2000) 96-100.
135. Stoeckel, K., Schwab, M.E. and Thoenen, H., Specificity of retrograde transport of nerve growth factor (NGF) in sensory neurons: a biochemical and morphological study, *Brain Res*, 89 (1975) 1-14.
136. Tal, M. and Bennett, G.J., Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve, *Pain*, 57 (1994) 375-382.
137. Tessler, A., Himes, B.T., Krieger, N.R., Murray, M. and Goldberger, M.E., Sciatic nerve transection produces death of dorsal root ganglion cells and reversible loss of SP in spinal cord, *Brain Res*, 332 (1985) 209-218.
138. Theodosiou, M., Rush, R.A., Zhou, X.-F., Du, H., Walker, J.S. and Tracey, D.J., Hyperalgesia due to nerve damage: role of nerve growth factor, *Pain*, 81 (1999) 245-255.
139. Tjølsen, A., Berge, O.-G., Hunskaar, S., Rosland, J.H. and Hole, K., The formalin test: an evaluation of the method, *Pain*, 51 (1992) 5-17.
140. Valder, C.R., Liu, J.J., Song, Y.H. and Luo, Z.D., Coupling gene chip analyses and rat genetic variances in identifying potential target genes that may contribute to neuropathic allodynia development, *J Neurochem*, 87 (2003) 560-573.
141. Vega, J.A., Vazquez, E., Naves, F.J., del Valle, M.E., Calzada, B. and Represa, J.J., Immunohistochemical localization of the high-affinity NGF receptor (gp 140-*trkA*) in the adult human dorsal root and sympathetic ganglia and in the nerves and sensory corpuscles supplying digital skin, *Anat Rec*, 240 (1994) 579-588.
142. Verge, V.M.K., Richardson, P.M., Benoit, R. and Riopelle, R.J., Histochemical characterization of sensory neurons with high-affinity receptors for nerve growth factor, *J Neurocytol*, 18 (1989) 583-591.
143. Verge, V.M.K., Richardson, P.M., Wiesenfeld-Hallin, Z. and Hökfelt, T., Differential influence of nerve growth factor on neuropeptide expression *in vivo*: A novel role in peptide suppression in adult sensory neurons, *J Neurosci*, 15 (1995) 2081-2096.
144. Verge, V.M.K., Riopelle, R.J. and Richardson, P.M., Nerve growth factor receptors on normal and injured sensory neurons, *J Neurosci*, 9 (1989) 914-922.
145. Verge, V.M.K., Merlio, J.-P., Grondin, J., Ernfors, P., Persson, H., Riopelle, R.J., Hökfelt, T. and Richardson, P.M., Colocalization of NGF binding sites, *trk* mRNA, and low-affinity NGF receptor mRNA in primary sensory neurons: response to injury and infusion of NGF, *J Neurosci*, 12 (1992) 4011-4022.

146. Vissers, K., Adriansen, H., De Coster, R., De Deyne, C. and Meert, T.F., A chronic constriction injury of the sciatic nerve reduces bilaterally the responsiveness to formalin in rats: a behavioral and hormonal evaluation, *Anesth Analg*, 97 (2003) 520-525.
147. Wagner, R. and Myers, R.R., Endoneurial injection of TNF- α produces neuropathic pain behaviors, *Neuroreport*, 7 (1996) 2897-2901.
148. Wall, P.D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J.W., Schonfeld, D., Seltzer, Z., and Tomkiewicz, M.M., Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anesthesia dolorosa, *Pain*, 7 (1979) 103-113.
149. Wall, P.D. and Gutnick, M., Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma, *Exp Neurol*, 43 (1974) 580-593.
150. Wang, H., Sun, H., DellaPenna, K., Benz, R.J., Xu, J., Gerhold, D.L., Holder, D.J., and Koblan, K.S., Chronic neuropathic pain is accompanied by global changes in gene expression and shares pathobiology with neurodegenerative diseases, *Neuroscience*, 114 (2002) 529-546.
151. Wang, Z., Gardell, L.R., Ossipov, M.H., Vanderah, T.W., Brennan, M.B., Hochgeschwender, U., Hruby, V.J., Malan Jr, T.P., Lai, J. and Porreca, F., Pronociceptive actions of dynorphin maintain chronic neuropathic pain, *J Neurosci*, 21 (2001) 1779-1786.
152. Wasner, G., Schattschneider, J., Binder, A. and Baron, R., Complex regional pain syndrome-diagnostic, mechanisms, CNS involvement and therapy, *Spinal Cord*, 41 (2003) 61-75.
153. Watson, G.S., Sufka, K.J. andCoderre, T.J., Optimal scoring strategies and weights for the formalin test in rats, *Pain*, 70 (1997) 53-58.
154. Weber, M., Birklein, F., Neundörf, B. and Schmelz, M., Facilitated neurogenic inflammation in complex regional pain syndrome, *Pain*, (2001) 251-257.
155. Weskamp, G. and Otten, U., An enzyme-linked immunoassay for nerve growth factor (NGF): a tool for studying regulatory mechanisms involved in NGF production in brain and peripheral tissues, *J Neurochem*, 48 (1987) 1779-1786.
156. Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., Lundberg, J.M., Forssmann, W.G., Reinecke, M., Tschopp, F.A., and Fischer, J.A., Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat, *Neurosci Lett*, 52 (1984) 199-204.
157. Woolf, C. and Wiesenfeld-Hallin, Z., Substance P and calcitonin gene-related peptide synergistically modulate the gain of the nociceptive flexor withdrawal reflex in the rat, *Neurosci Lett*, 66 (1986) 226-230.
158. Woolf, C.J., Safieh-Garabedian, B., Ma, Q.P., Crilly, P. and Winter, J., Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity, *Neuroscience*, 62 (1994) 327-331.
159. Woolf, C.J. and Mannion, R.J., Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management, *Lancet*, 353 (1999) 1959-1964.
160. Woolf, C.J. and Thompson, S.W.N., The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states, *Pain*, 44 (1991) 293-299.
161. Wuarin-Bierman, L., Zahnd, G.R., Kauffmann, F., Burcklen, L., and Adler, J., Hyperalgesia in spontaneous and experimental animal models of diabetic neuropathy, *Diabetologia*, 30 (1987) 653-658.

162. Yoon, Y., Na, H. and Chung, J.M., Contributions of injured and intact afferents to neuropathic pain in an experimental rat model, *Pain*, 64 (1996) 27-36.
163. Zeltser, R. and Seltzer, Z., A practical guide for the use of animal models in the study of neuropathic pain. In: Boivie, J., Hansson, P., Lindblom, U. (Eds.), *Touch, temperature, and pain in health disease: mechanisms and assesments*, IASP Press, Seattle, 1994, pp. 295-338.
164. Zhou, X.-F., Deng, Y.-S., Chie, E., Xue, Q., Zhong, J.-H., McLachlan, E., Rush, R. and Xian, C., Satellite-cell-derived nerve growth factor and neurotrophin-3 are involved in noradrenergic sprouting in the dorsal root ganglia following peripheral nerve injury in the rat, *Eur J Neurosci*, 11 (1999) 1711-1722.
165. Zimmermann, M.M., Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals, *Pain*, 16 (1983) 109-110.
166. Zimmermann, M.M., Pathobiology of neuropathic pain, *Eur J Pharmacol*, 429 (2001) 23-37.

VIII. ANEXO: PUBLICACIONES