



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD AUXILIAR β DEL
RECEPTOR DE GLICINA CON EL DOLOR CRÓNICO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA
MÉDICA**

AUTORA: VERONIQUE ROJAS TORRES

PROFESORA GUÍA: BQ. DRA. TRINIDAD MARIQUEO CANCINO

TALCA-CHILE

2021

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022

Dedicatoria

A mi abuela Eufemia Bättig, Ragnar y Sol.

Los amo por siempre.

Agradecimientos

Agradecimientos al FONDECYT N°3170690 por el apoyo monetario en el desarrollo de estos estudios.

Agradecimiento también a mi profesora guía BQ. Dra. Trinidad Mariqueo por su colaboración y ayuda para encausarme en este proceso.

Un agradecimiento especial a mis compañeros y alumnos de quinto año de la carrera de Tecnología Médica de la Universidad de Talca, Gabriela Améstica, Jorge García y Fernanda Parra, Claudia Carranza Ingeniera en Biotecnología de la Universidad Católica del Maule y a Diego Castillo Licenciado en Física de la Universidad de Santiago de Chile quienes me brindaron su tiempo y apoyo en los momentos más difíciles en el desarrollo de esta memoria de grado, de quienes me siento profundamente agradecida y mostraron su compañerismo a pesar de que la sociedad nos incita al individualismo.

Finalmente, un agradecimiento a Dios a mis padres, abuelos, tía y a mi novio por su apoyo y contención emocional en todo el proceso de memoria de grado y años de universidad.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| 1. RESUMEN | 7 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 8 |
| 3. MARCO TEÓRICO | 10 |
| 3.1 Resumen anatómico:..... | 10 |
| 3.2 Fisiopatología del dolor crónico | 11 |
| 3.2 Caracterización de la composición y estructura del receptor de glicina | 15 |
| 3.2.1 Estructura del receptor de glicina | 17 |
| 3.3 Inputs sinápticos inhibitorios mediados por GABA y glicina | 18 |
| 3.4 Daño local de las fibras nerviosas | 19 |
| 3.6 Cambio en la expresión de los diferentes canales iónicos y receptores involucrados en la nocicepción..... | 20 |
| 3.5 Dolor mantenido por el sistema nervioso simpático: inervación anómala y sensibilización de nociceptor, posterior a lesión. | 21 |
| 3.6 Formación de efapses: interacción cruzada entre axones por campos eléctricos, interacción no-sináptica..... | 23 |
| 3.7 Activación glial..... | 24 |
| 3.8 Déficit de las vías centrales inhibitorias y transformación de sinapsis inhibitorias en excitatorias..... | 27 |
| 3.11 Reorganización de fibras A δ en el asta dorsal | 29 |
| 3.12 Reorganización de los circuitos en la corteza somatosensorial | 30 |
| 3.13 Cambios de expresión y modulación de los diferentes núcleos involucrados en la percepción del dolor | 31 |
| 3.14 Fenómeno MOH: Medication Overuse Headache, tolerancia y dependencia a fármacos analgésicos | 32 |
| 3.15 Alimentación (inflammation Pro-resolution)..... | 33 |
| 3.16 Estrés y factores ambientales que gatillan el dolor | 34 |
| 3.17 Déficit en Educación de los profesionales de la salud en el manejo del dolor crónico y la realización de un diagnóstico eficaz y oportuno | 35 |
| 4. HIPOTESIS..... | 37 |
| 5. OBJETIVOS | 37 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 38 |
| 6.1 Elección del modelo animal | 38 |
| 6.2 Lesión por contricción crónica | 38 |
| 6.3 PCR cuantitativa..... | 39 |
| 6.4 Umbral de estimulación mecánica: filamentos de Von Frey | 39 |
| 6.5 Análisis de datos | 41 |
| 6. RESULTADOS | 42 |

| | |
|-------------------------------|----|
| 8. DISCUSIÓN | 45 |
| 9. CONCLUSIÓN | 49 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA | 50 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Vías del dolor en dolor crónico:..... | 13 |
| Figura 2. Mecanismos de sensibilización del dolor..... | 15 |
| Figura 3. Estructura del receptor de glicina | 17 |
| Figura 4. Células de la glía activadas por células inmunes..... | 26 |
| Figura 5. Cambios en la expresión de la subunidad β del receptor de glicina en modelo de dolor neuropático. | 42 |
| Figura 6: sIPSCs glicinérgicas en ratas Sprague Dawley bajo dolor neuropático en neuronas de la amígdala central | 44 |

1. RESUMEN

El dolor es una reacción del sistema nervioso que cumple el papel de alertarnos frente a una posible lesión. Cuando una lesión ocurre, la señal de dolor viaja desde el sitio del daño hacia la médula espinal y luego al cerebro. Este usualmente va disminuyendo a medida que la lesión es reparada o termina el estímulo doloroso. Sin embargo, en el dolor crónico el organismo continúa enviando la señal de dolor hacia el cerebro, incluso cuando el daño ha sido reparado. En el dolor crónico se ve afectada la estructura y funcionamiento de las áreas del cerebro que procesan el dolor, donde por medio de la plasticidad neuronal ocurren cambios en las fibras nociceptivas que incrementan a la activación de receptores de dolor y disminuye la inhibición de estos, manteniendo la sensación de dolor en el tiempo. Siendo dolor crónico cualquiera que tenga más de 3 meses de duración. En la médula espinal la glicina es uno de los principales mediadores de la sinapsis inhibitoria, cuyos receptores está compuesto principalmente por un heterodímero de subunidades $\alpha 1$ y β . Estudios recientes han mostrado que este receptor cumple un papel fundamental en el dolor crónico. En este estudio se plantea si la subunidad β del receptor de glicina cumple un rol importante en el dolor crónico. Teniendo como objetivo principal evaluar la expresión de la subunidad β del receptor de glicina en médula espinal y asociarla con el dolor crónico. Se evaluó la expresión de la subunidad β del receptor de glicina, en ratas Sprague Dawley con constricción crónica del nervio ciático, mediante la utilización de la técnica qPCR y se relacionó además con los resultados del estudio electrofisiológico del receptor de glicina en amígdala de el mismo tipo de rata y modelo de dolor. De lo cual se obtuvo que aumenta la expresión de las subunidad β en el dolor crónico y se concluye que esta podría estar implicada en este proceso.

Palabras claves: dolor crónico, receptor de glicina, subunidad β , médula espinal, amígdala.

2. INTRODUCCIÓN

El dolor cumple el papel de alertarnos frente un daño ocurrido en nuestro organismo, esta reacción es ejercida por el sistema nervioso central. Sin embargo, este también es una experiencia subjetiva y personal que comprende diversas dimensiones, sensitiva, cognitiva y emocional.

Según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (AIED), el dolor se define como una experiencia sensitiva y emocional desagradable asociada a una lesión tisular real o potencial o descrita en términos de tal daño.

Una vez ocurrida la lesión, una señal de dolor es enviada desde el sitio en que ocurrió el daño hasta la medula espinal y luego al cerebro donde se procesa el estímulo. Se espera que con el paso del tiempo y a medida que la lesión es reparada, el dolor vaya disminuyendo. Sin embargo, a veces, a pesar de que el daño ha sido reparado, el dolor persiste largamente. Cuando este dolor tiene una duración de más de 3 meses y sin una causa claramente identificable, este es considerado como dolor crónico (1).

El dolor crónico es parte de los grandes problemas de salud hoy en día, afectado a miles de personas en Chile y millones a nivel mundial. Se estima que un 20,5% de la población mundial sufre de dolor crónico, y se calcula que la prevalencia en Chile es de un 32%, siendo aproximadamente un 40 % de las personas que lo padecen, tratadas inadecuadamente (2).

Cuando una persona sufre un dolor crónico o agudo, se tiene una oportunidad excelente para estudiar los mecanismos de la analgesia y dolor. De esta manera la medición del dolor es esencial para determinar la intensidad, la percepción y su curso temporal, de tal manera que sea posible investigar y valorar las diferencias entre los distintos factores asociados al dolor. Además, ayudar en el diagnóstico diferencial de la causa del dolor sirve también para determinar cuál puede ser el tratamiento más eficaz.

Existe evidencia creciente que indica que los cambios en la excitabilidad de las vías nociceptivas centrales y periféricas juegan un papel importante en la mayoría de los tipos de dolor crónico (3). El daño en la neurotransmisión inhibitoria realizada por Glicina y GABA

se cree que tienen una relación importante con la desinhibición y mantenimiento de la hipersensibilidad del dolor (4). La glicina es de hecho uno de los más importantes neurotransmisores inhibitorios en la medula espinal y el tronco encefálico y juega un rol importante en la sensibilización del dolor y el control respiratorio (5).

Como parte de los componentes que están involucrados en la nocicepción, existen diferentes receptores que modulan el dolor, uno de ellos es el canal de cloruro receptor de glicina (GlyR), un miembro de la familia de receptores de canales iónicos pentaméricos Cys-loop que regula la sinapsis inhibitoria en la médula espinal, el tronco encefálico y la retina. También se encuentran presinápticamente, donde modulan la liberación de neurotransmisores. Los GlyR funcionales se forman a partir de un total de cinco subunidades, estos pueden conformarse como homopentámeros de 4 tipos de subunidades α (subunidades GlyR $\alpha(1-4)$) o como hetero pentámeros que forman un complejo con la subunidad auxiliar β (β GlyR) en una disposición $3\alpha 2\beta$ o $2\alpha 3\beta$. La subunidad β no puede formar canales homopentaméricos y siempre debe ir unida a subunidades α , sin embargo, está es capaz de afectar el funcionamiento del canal de sinapsis inhibitoria al interactuar con la proteína Gefirina intracelularmente.

El desarrollo de distintos fármacos que pueden discriminar fuertemente entre diferentes isoformas de GlyR que contienen subunidades β ayudará a proporcionar información importante sobre una variedad de funciones del sistema nervioso central, incluido el procesamiento los mecanismos de dolor espinal (6). Es por ello, que este estudio pretende encontrar como la subunidad β del receptor de glicina se expresa en procesos de dolor crónico, por medio de la medición de su expresión en Ratas Sprague Dawley como de dolor crónico utilizando la técnica de qPCR, para así establecer una relación entre esta y el resultado del estudio electrofisiológico del receptor de glicina en amígdala en proceso patológico de dolor crónico.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Resumen anatómico:

El dolor es una experiencia subjetiva y es percibida de manera diferente en cada individuo, muchas veces no existe una lesión en el tejido que sea real, por lo que no es necesaria la presencia de una lesión morfológica que justifique el dolor percibido (7). La nocicepción es el proceso en el cual una subpoblación de fibras nerviosas periféricas, denominadas nociceptores, detecta diferentes tipos de estímulos, los cuales pueden ser pueden ser térmicos, mecánicos o químicos intensos (3).

Dentro de la nocicepción existen cuatro procesos principales: la transducción, la transmisión, la modulación y la percepción. El proceso se inicia con la transducción de una señal estimuladora, proceso llamado transducción, en que el estímulo nociceptivo es convertido en señal eléctrica por los nociceptores, los cuales solo responden a estímulos nociceptivos (8). Esta señal es transmitida desde la periferia al sistema nervioso central a través de los axones, de los cuales existen 2 tipos: mecanorreceptores de alto umbral (HTM), que responden a la deformación mecánica y los nociceptores polimodales (PMN), que responden a una variedad de insumos que dañan los tejidos. Los nociceptores son, por tanto, las terminaciones nerviosas libres de las fibras nerviosas. Existen dos principales tipos de fibras: fibras A δ y C. Estas fibras nerviosas aferentes primarias tienen sus cuerpos celulares en los ganglios de la raíz dorsal de la médula o en el ganglio trigeminal y terminan en el asta dorsal de la médula espinal. Si bien todas las fibras del dolor terminan en el asta dorsal, su camino hacia este varía, pues la mayoría de estas ingresa al asta dorsal en el haz ventrolateral de la raíz dorsal. Estas viajan lateralmente a las fibras A β mielinizadas de mayor diámetro, que responden a estímulos no dolorosos como al tacto ligero y las vibraciones. Un 30 % de las fibras C ingresan a la médula espinal por medio de la raíz ventral. Una vez que ingresan a la médula espinal, las raíces nerviosas pueden bifurcarse en ramas ascendentes y descendentes, que pueden ingresar al asta dorsal uno o dos segmentos por encima o por debajo del segmento de origen (9).

En cuanto al asta dorsal, este está dividido en laminas. Entre estas láminas existen muchas conexiones nerviosas. La lamina II se conoce como sustancia gelatinosa y se extiende desde el núcleo trigeminal en la medula hasta el filum terminale en extremo inferior de la medula espinal. Las fibras C terminan en la lámina II y las fibras A δ terminan en las láminas I y V. Las fibras que transmiten señales de tacto suave y vibración son las A β , estas entran al cordón medial del hasta dorsal y pasan sin hacer sinapsis hacia las columnas dorsales. Se desprenden ramas colaterales al asta dorsal que terminan en diversas laminas, de la III a V. Estas fibras también realizan sinapsis con fibras C terminales amielínicas en la lámina II. Las áreas II y V son muy importantes para realizar la modulación del dolor (10).

3.2 Fisiopatología del dolor crónico

Existen dos tipos básicos de dolor: dolor neuropático, producto de un daño en el nervio, y dolor nociceptivo, daño en el tejido. El dolor neuropático es causado por un daño disfunción en el sistema nervioso. Se puede subdividir en periférico y central, esto depende de dónde se encuentre la lesión. El dolor neuropático periférico puede ocurrir a causa de una enfermedad, mientras que el dolor neuropático central es causado por daño a la médula espinal o al cerebro. El dolor neuropático dura mucho tiempo después de que se han sanado aparentemente los tejidos dañados y con frecuencia es dolor crónico que tiene poco o ningún efecto protector. El dolor neuropático en realidad interfiere con la contribución de los canales iónicos en la sensación de dolor y la restauración de la función normal después de ocurrida una lesión o enfermedad (11).

El dolor crónico normalmente puede tener un origen inflamatorio o neuropático. Este es caracterizado por un incremento en la percepción de un estímulo nociceptivo (hiperalgesia) y una percepción anormal en la que un estímulo que es comúnmente inocuo se vuelve doloroso (alodinia).

Se sabe que los estados de dolor crónico en parte dependen de la sensibilización de la medula espinal, la activación de rutas nociceptivas que se proyectan a partes de la medula y

el mesencéfalo y la activación de los sistemas facilitadores del dolor descendente. Este último sistema parece ser esencial en el mantenimiento del estado de sensibilización de la medula espinal (12).

Las vías del dolor son un sistema sensorial muy complejo, este se activa para entregar una respuesta de protección frente a estímulos nocivos. Esta información relacionada con los estímulos nocivos es transmitida desde los nociceptores por medio de las vías aferentes primarias las fibras A δ y fibras C. Estas fibras poseen su soma celular en el ganglio de la raíz dorsal y realizan sinapsis con las neuronas del asta dorsal de la medula espinal. Diversos neurotransmisores como la sustancia P, el glutamato y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, se liberan en la transducción de señales (13–15). Las aferencias nociceptivas primarias hacen sinapsis con neuronas de la lámina Rexed I y II y además interactúan con las neuronas ubicadas profundamente en el asta dorsal, las cuales tienen la función de transmitir señales que informan la presencia, intensidad y lugar del dolor (16).

Las neuronas de proyección del asta dorsal se cruzan en la comisura ventral y ascienden en el haz espinotalámico lateral hasta llegar a los núcleos posterolaterales ventrales del tálamo. Finalmente la información llega a la corteza somatosensorial y la materia gris periacueductal (SGP) (17). Luego la información nociceptiva se transmite hacia las áreas del cerebro que están involucradas en la memoria y los aspectos afectivos del dolor, como la amígdala, el hipotálamo, el SGP y el núcleo accumbens (NAc) a través de los tractos espinoreticular y espinomesencefálico (18). Estas regiones del cerebro, incluida la corteza somatosensorial, SGP, amígdala, hipotálamo y NAc, se relacionan con respuestas supraespinales de las vías del dolor (19–21). Los sistemas descendentes de modulación del dolor involucran el PAG y la médula ventral rostral (MRV), esta es el principal punto de salida en la modulación descendente de la nocicepción. Recibe información de la SGP y envía proyecciones bilaterales difusas al asta dorsal la cual termina en múltiples niveles (22). La **figura 1** ilustra los principales componentes de los sistemas cerebrales involucrados en el procesamiento de la información relacionada con el dolor.

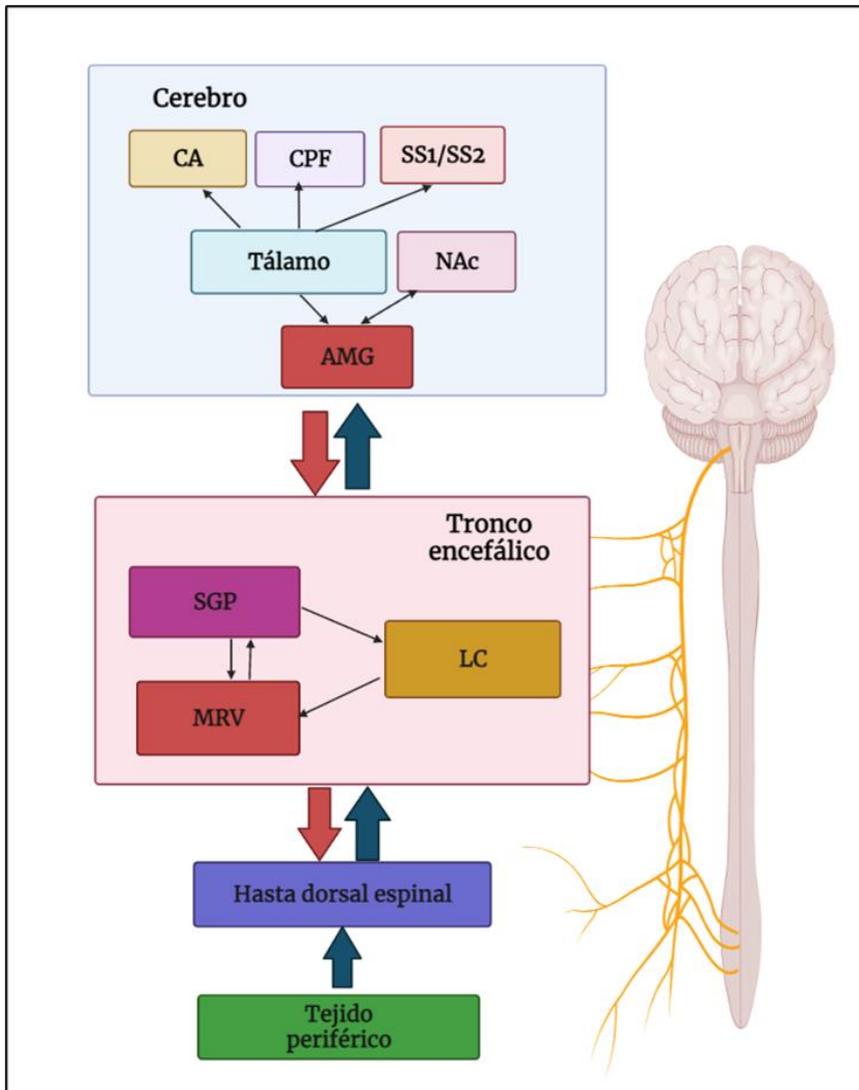


Figura 1. Vías del dolor en dolor crónico: Flecha azul hacia arriba (vía ascendente): vía nerviosa que inicia en los tejidos periféricos, llega a la médula espinal, pasa por la médula rostral ventral (MRV) y la sustancia gris periacueductal (SGP), asciende hasta el cerebro, pasa previamente por el tálamo estas, las señales son enviadas a los centros cerebrales superiores como la corteza somatosensorial primaria y secundaria (SS1/SS2), corteza anterior (CA), corteza prefrontal (CPF), amígdala (AMG), y el núcleo accumbens (NAc). Línea azul, vía nerviosa descendente: en ella están involucradas áreas del tronco cerebral como la MRV y el locus coeruleus. Tomada y adaptada de Chronic Pain: Structural and Functional Changes in Brain Structures and Associated Negative Affective States. (Yang, S. 2019 (23)).

El dolor persistente asociado con lesiones o enfermedades (como diabetes, artritis o crecimiento de tumores) puede resultar de alteraciones en las propiedades de los nervios periféricos. Esto puede ocurrir como consecuencia del daño de las fibras nerviosas, lo que lleva a un aumento de la descarga espontánea o alteraciones en su conducción o propiedades neurotransmisoras (3).

Se cree que la sensibilización de la medula espinal es un resultado directo del aumento de descargas aferentes primarias en la médula, la cual mantiene un estado de excitación. Los nervios dañados muestran descargas externas espontáneas de neuromas inducidos por lesiones, y es la estimulación mecánica de los neuromas la que provoca sensaciones que van desde la disestesia leve hasta un dolor intenso (24). Los cambios plásticos que ocurren en las alteran la excitabilidad de las vías nociceptivas centrales y periféricas, lo que explicaría el desarrollo de la sensibilización en el dolor crónico.

Estudios muestran que las descargas iniciales inician un estado de sensibilización central, pero son los cambios neuroplásticos dentro del sistema nervioso central, que mantienen de forma prolongada el estado alterado del asta dorsal de la medula espinal (25). Los cambios plásticos que ocurren en las neuronas alteran la excitabilidad de las vías nociceptivas centrales y periféricas, lo que explicaría el desarrollo de la sensibilización en el dolor crónico (Figura 2).

El dolor crónico es una condición patológica que frecuentemente dura más que la presencia de una lesión periférica, las modificaciones epigenéticas en sitios supraespinales relacionadas con la percepción del dolor, el aprendizaje, la motivación y la regulación del estado de ánimo, también son un excelente punto de investigación sobre los cambios a largo plazo involucrados en el dolor crónico (26).

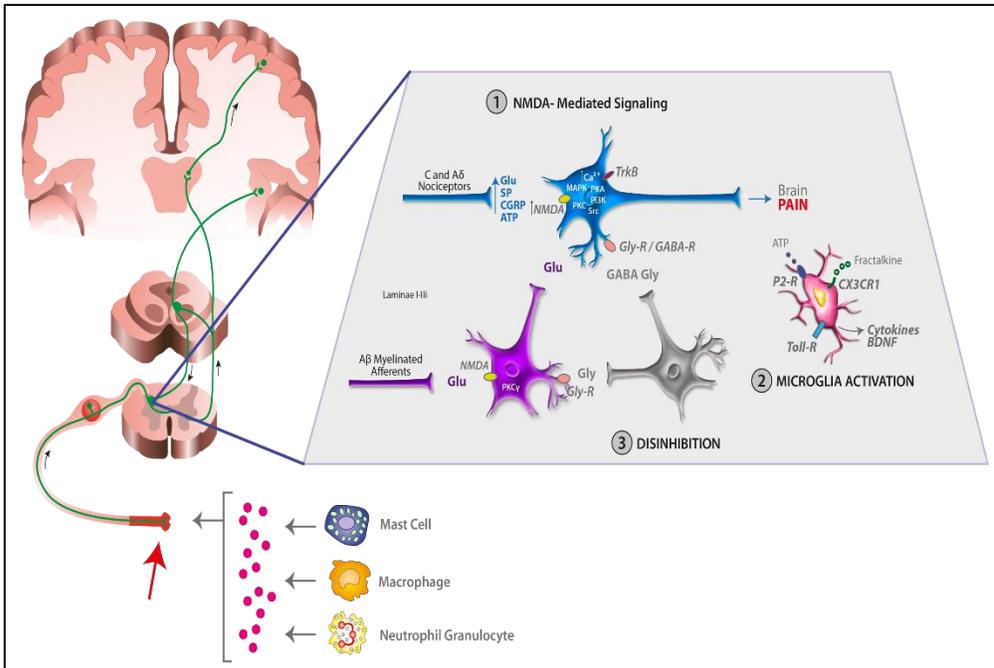


Figura 2. Mecanismos de sensibilización del dolor. La sensibilización central es generada por plasticidad erróneamente adaptada de (1) la señalización mediada por NMDA y (2) la activación de la microglía en la que resulta en (3) circuitos de desinhibición. Tomada de Glycine Receptor β Subunit: A Critical Target for Pain Sensitization (Mariqueo, T y otros. Trabajo en proceso (27)).

Estudios de neuroimagen en humanos apoyan cambios a largo plazo en la actividad dentro de áreas de la matriz del dolor asociadas al dolor crónico. Además, algunos hallazgos sugieren que el dolor crónico severo podría considerarse un trastorno neurodegenerativo que afecta especialmente a la corteza prefrontal. Lo que a su vez podría tener los diversos efectos negativos sobre el sistema inhibitorio descendente y contribuir a su estado de dolor crónico (28).

3.2 Caracterización de la composición y estructura del receptor de glicina

El sistema nervioso realiza su función por medio de señales eléctricas transmitidas por las células neuronales. Cuando ocurre una sinapsis química estas señales eléctricas son

transmitidas a través de a la liberación de neurotransmisores desde una neurona presináptica hacia los receptores que se encuentran en la neuro postsináptica (29).

El receptor de glicina (GlyR) es un canal pentamérico de cloruro que media la neurotransmisión inhibitoria rápida en el sistema nervioso de mamíferos, mediante la activación de los receptores de glicina sensibles a estriquina en las sinapsis inhibitorias (30,31). El receptor de glicina es una proteína que atraviesa toda la membrana plasmática de la neurona y contiene poro integral selectivo de cloruro (Cl⁻). Cuando la glicina se une a su sitio de unión en la superficie externa del receptor, el poro se abre y permite el ingreso del cloruro por difusión pasiva a través de la membrana.

Los receptores de glicina se expresan tanto en sistema nervioso central como periférico, su acción es más comúnmente realizada en la médula espinal y el tronco encefálico, aunque también hay evidencia de que pueda ejercer su función como la neurotransmisión excitatoria en neuronas embrionarias además se han encontrado estos receptores en el sistema visual específicamente en la retina (32) y se postulan como posibles blancos para fármacos neuroactivos relacionados con el dolor (33,34). Se ha encontrado que defectos en este receptor de glicina está relacionado con distintos trastornos neurológicos como la hiperkeplexia y trastornos del espectro autista (21,22).

Estos receptores son miembro de la gran familia de receptores ionotrópicos pentamérico Cys-loop. Dentro de estos encontramos dos tipos de GlyR, los homopentámeros que están compuestos únicamente por subunidades α y los heteropentámeros compuestos por subunidades α y β como se muestra en la figura 3. Se han identificado cuatro subunidades alfa (alfa 1 a alfa 4) y una subunidad beta. (35,36).

Los GlyR homoméricos se expresan principalmente en la etapa de desarrollo temprano en mamíferos, mientras que los GlyR heteroméricos predominan mayoritariamente en animales ya adultos (37,38).

Los GlyR heteroméricos poseen propiedades eléctricas fisiológicas muy distintas a las de los GlyR homoméricos, estas son proporcionadas gracias a la subunidad β que está presentes en ellos (6,39). Los receptores de glicina heteroméricos se organizan en grupos de alta densidad ubicados en la membrana de la neurona postsináptica y median la transmisión

sináptica en cambio los GlyR homoméricos no realizan sinapsis ya que estos no contienen la subunidad β la cual es la que se une directamente a la Gefirina. (40,41).

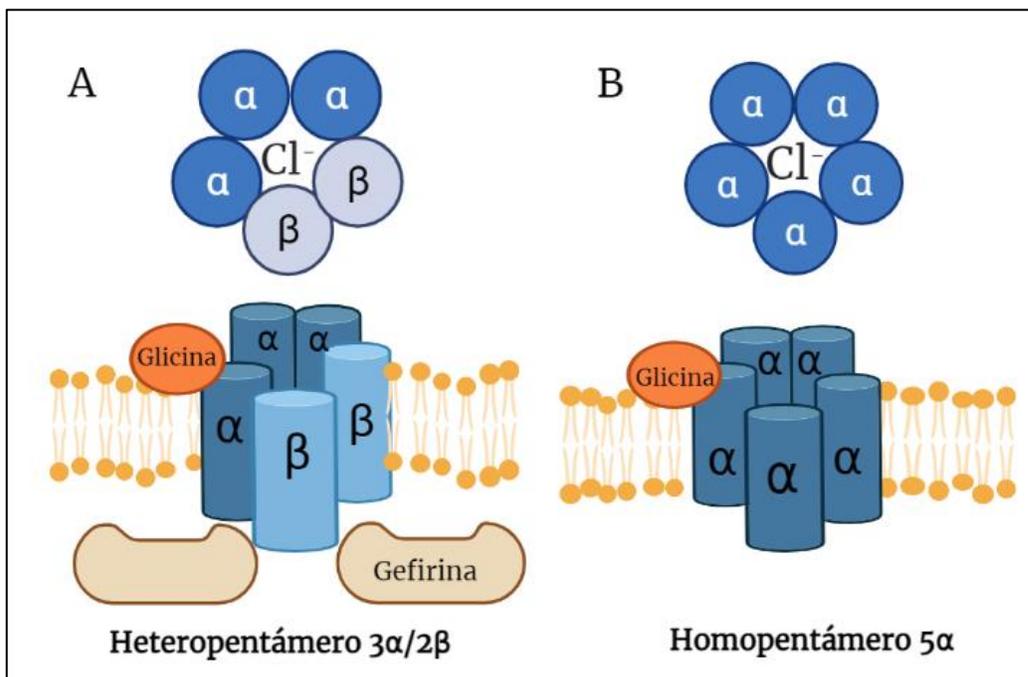


Figura 3. Estructura del receptor de glicina: Figura A muestra en la parte inferior el receptor de glicina con sus 5 subunidades heteroméricas ($3\alpha/2\beta$) unidos a la proteína Gefirina, en la parte superior se ve la vista aérea del receptor junto al ion cloruro. Figura B muestra en la parte inferior al receptor de glicina homoméricos con 5 unidades α sin unión a Gefirina y en la parte superior la vista aérea del receptor.

3.2.1 Estructura del receptor de glicina

Pose un gran dominio terminal extracelular de NH_2 - en el que se encuentra un sitio de unión para agonistas, en sus subunidades se encuentra un loop de cisteína bien conservado que además lo tienen los otros receptores de la familia de canales iónicos compuerta-ligando pentaméricos (CICL). Además todas subunidades del receptor de glicina poseen un segundo loop de cisteína el cual alberga al dominio principal de unión con glicina (42).

Cada subunidad posee cuatro dominios transmembrana alfa-hélice (TM1-TM4) y una inclusión lamina beta las regiones TM (43). Los dominios TM3 y TM4 están unidos por un dominio intracelular grande y poco conservado. Este posee sitios de fosforilación y otros sitios que interactúan con factores citoplasmáticos (44). La función principal de los dominios TM es funcionar como una barrera o sello para separar la vía por la que pasa el ion cloruro de la región apolar de la bicapa lipídica de la neurona (45).

3.3 Inputs sinápticos inhibitorios mediados por GABA y glicina

Diversos estudios sustentan la idea de que existe un gran grupo de neuronas ubicadas en la parte rostral ventral de la medula espinal de diversas especies, que incluye ratas, gatos y ratones. Se supone que estas están involucradas en la transmisión de la vía descendente, y contribuyen a al aumento de una conducción tónica excitatoria en las neuronas preganglionares simpáticas de la medula espinal (46,47).

Estudios que se han llevado a cabo en ratas neonatales sobre los potenciales postsinápticos inhibidores en neuronas de la médula ventrolateral rostral realizados in vitro obtuvieron resultados que sugieren que los potenciales sinápticos inhibidores en las neuronas medulares están mediados ya sea por GABA y/o glicina que abren mayoritariamente los canales de cloruro. La existencia de potenciales sinápticos inhibidores en neuronas de la médula muestran que tienen un papel bastante importante en la transmisión inhibitoria en el control de la relación de la señalización de entrada y salida de estas neuronas (48).

Las corrientes excitatorias e inhibitorias son muy importantes para definir el perfil de la forma en que entra y sale la señal en cada célula excitable y este depende del tiempo en que ocurren estas corrientes y por lo tanto muestra el comportamiento de las redes neuronales (49). Un estudio realizado con muestras de cerebelo en ratas Sprague Dawley a los 12 días de nacidas, mostró que el tiempo de finalización de las corrientes sinápticas GABAérgicas inhibitorias ocurre bastante más rápido cuando se existen con concentraciones fisiológicas

intracelulares de cloruro que cuando se agregaban soluciones simétricas de cloruro. Este efecto del cloruro intracelular es una modulación ejercida directamente por el receptor $GABA_A$ que a su vez es independiente de la dirección total del flujo eléctrico que pasa a través del canal iónico, siendo fisiológicamente la ventana de tiempo durante la cual la inhibición GABAérgica puede contrarrestar los inputs excitatorios es mucho más corta que cuando el cloruro intracelular es administrado usando grandes concentraciones. Esto se espera que tenga implicancia en el funcionamiento, desarrollo y la excitabilidad de las redes neuronales y como estos resultados pueden servir para el entendimiento de condiciones neuronales patológicas como lo son el dolor cónico y la epilepsia las cuales son patologías en que las concentraciones de cloruro intracelular se encuentra alterado (50).

En las neuronas de la lámina superficial y profunda del hasta dorsal de la medula espinal pueden recibir información sensorial proveniente de la piel, articulaciones viseras y músculos. En ambas regiones sus neuronas poseen receptores de $GABA_A$ ($GABA_{AR}$) y receptores de glicina (GlyR) los cuales realizan sinapsis inhibitoria rápida (51).

Estudios en ratas han demostrado que coexisten varios tipos de $GABA_{AR}$ en regiones diferentes y estos generan diferentes contribuciones a la sinapsis inhibitoria. Esto es debido a que se encontró que los mecanismos de procesamiento sináptico es distinto en la lámina superficial y lámina profunda de la medula espinal y hay una diferencia entre la transmisión sináptica inhibitoria rápida mediada por $GABA_{AR}$ y GlyR (33).

3.4 Daño local de las fibras nerviosas

Las lesiones de los nervios periféricos son un gran problema para las personas que las padecen, estas pueden ir desde una molestia leve hasta un deterioro para toda la vida. Las lesiones nerviosas se pueden clasificar en tres categorías, según la presencia de desmielinización, la extensión del daño a los axones y los tejidos conectivos del nervio (52). La forma más leve de lesión es la neuropraxia, la cual es desmielinización focal sin daño a los axones o los tejidos conectivos. Esta ocurre normalmente por una compresión o tracción

leve del nervio lo que resulta en una disminución en la velocidad de conducción. Según la gravedad de la desmielinización, los efectos pueden variar desde la conducción asincrónica hasta el bloqueo de la conducción, lo desencadena una debilidad muscular. La siguiente forma se llama axonotmesis, la cual implica un daño directo a los axones además de una desmielinización focal manteniendo la continuidad de los tejidos conectivos del nervio. La forma más grave de lesión es la neurotmesis, la cual es una sección completa de los axones y las capas de tejido conectivo en la que se observa una discontinuidad completa del nervio (53).

Además, una lesión en un nervio periférico induce algunos efectos transinápticos sorprendentes. Uno de ellos es la apoptosis la cual parece afectar preferentemente a las células inhibitoras de GABA (ácido γ -aminobutírico). Varias investigaciones muestran que los mecanismos inmunitarios están implicados tanto de manera periférica como central. Una activación de las células microgliales se produce en el asta dorsal y esta activación puede desempeñar un papel fundamental en el inicio de la sensibilización central. (54).

3.6 Cambio en la expresión de los diferentes canales iónicos y receptores involucrados en la nocicepción

Dentro de los canales iónicos se incluye miembros de diferentes familias de genes, que pueden atender a diversos estímulos. La mayoría de los canales iónicos se encuentran en la terminal periférica del nociceptor, afectando la excitabilidad de la neurona después de la lesión, generando como resultado una alteración en la sensación de dolor (55). Los canales de Na^+ y Ca^{2+} activados por voltaje, TRP, ASIC, canales iónicos activados por ligando, P2X, NMDA, AMPA y receptores de Kainato son algunos de los canales iónicos implicados en la patogenia del dolor (11).

Las señales de dolor son detectadas por neuronas sensoriales especializadas, para así después emitir un impulso nervioso con el mensaje de dolor en respuesta al estímulo nociceptivo (56). Muchas de las neuronas nociceptivas poseen con un gran número de canales

iónicos específicos que funcionan como transductores de señales de dolor. Estos canales iónicos se encuentran en las terminales periféricas de la raíz dorsal o neuronas del ganglio trigémino y también en las neuronas sensitivas de los órganos viscerales. Los transductores de dolor, los cuales incluyen al canal ionotrópico compuerta de ATP P2X3, el clásico calor/capsaicina TRPV1, sensible a frío/redox, canales TRPA1, canales sensibles a ácido (ASICs) y el mecanosensitivo Piezo, reaccionan frente a una variedad de estímulos que pueden ser físicos o químicos, por medio de la apertura de sus canales iónicos y de la inducción de la despolarización neuronal conocido como el potencial generador (57).

Una importante característica de los nociceptores es la sensibilización o el aumento de la respuesta a los desencadenantes de dolor. Este fenómeno es un tipo de plasticidad neuronal y puede ser mediada por una gran cantidad de receptores metabotrópicos y para distintos tipos de moduladores de dolor como la neurofinas, citoquinas, mediadores clásicos u otras moléculas activas relacionadas. Normalmente la mayoría de los transductores de dolor se encuentran en estado de latencia o en modo de baja actividad, sin embargo, estos pueden volverse muy activos producto de los moduladores endógenos, desencadenando la sensibilización neuronal (56).

La aplicación de técnicas de genómica moderna en dolor crónico es un gran reto debido a la complejidad de la fenotipificación y al gran número de datos necesarios. Los primeros hallazgos sugieren que las variantes de canales iónicos modulan la severidad y persistencia del dolor después de la lesión (58).

3.5 Dolor mantenido por el sistema nervioso simpático: inervación anómala y sensibilización de nociceptor, posterior a lesión.

En condiciones fisiológicas, no existe casi una influencia de la actividad simpática en las neuronas sensoriales que se proyectan los tejidos somáticos profundos y la piel en los mamíferos (59). El sistema nervioso parasimpático tampoco está involucrado en la generación de dolor. Sin embargo, puede servir en la protección de tejidos corporales

internos. Las aferencias vagales están involucradas en aspectos integradores del dolor, hiperalgesia e inflamación (60).

Existen distintos mecanismos por los cuales las neuronas noradrenérgicas simpáticas puede estar acopladas directa o indirectamente a neuronas aferentes primarias periféricas, llevándolas a la excitación o a un cambio en su excitabilidad. El acoplamiento simpático-aferentes depende de la actividad de las neuronas simpáticas, pero no necesariamente de un aumento de esta actividad generada centralmente, este también puede ser totalmente independiente de la actividad y liberación de noradrenalina, este último no se relaciona con la función de transmitir impulsos a las células blanco (61).

El dolor que es dependiente de la actividad de neuronas simpáticas es llamado dolor simpático mantenido (DSM). Este es un síntoma que incluye dolor espontáneo y dolor provocado por estímulos mecánicos o térmicos. Es considerado como un fenómeno variable asociado con una variedad de trastornos (62).

Los nociceptores son excitados y sensibilizados probablemente por la acción de la noradrenalina liberada por las fibras simpáticas. Estos también pueden haber expresado adrenoceptores y su efecto excitatorio es generado indirectamente, por ejemplo, a través de cambios en el flujo sanguíneo. La actividad simpática mantenida en neuronas nociceptivas puede generar un estado de sensibilización o hiperexcitabilidad central, el cual provoca dolor espontáneo y dolor evocado secundario (alodinia mecánica y alodinia provocada por estímulos fríos (61)).

El acoplamiento entre las neuronas postganglionares simpáticas y las neuronas aferentes primarias después de un trauma con lesión nerviosa asociado al DSM, este puede ocurrir de distintas maneras: en el sitio de la lesión, a lo largo del nervio y en el ganglio de la raíz dorsal. La activación aferente está mediada por la noradrenalina la cual es liberada por los axones postganglionares y por α -adrenoceptores expresados por neuronas aferentes. Las neuronas nociceptivas aferentes primarias y no nociceptivas pueden verse afectadas. El acoplamiento en ganglios de la raíz dorsal generalmente ocurre solo en cuerpos celulares aferentes de gran diámetro. Los mecanismos detrás de esto son el cambio del flujo sanguíneo y probablemente un efecto directo producto de la liberación de noradrenalina (61).

3.6 Formación de efapses: interacción cruzada entre axones por campos eléctricos, interacción no-sináptica

Desde el punto de vista eléctrico, la señal fundamental en los axones es el conocido potencial de acción. La efapsis es el punto de contacto lateral entre las fibras nerviosas a través del cual los impulsos pueden transmitirse directamente por medio de las membranas celulares en vez de la sinapsis (63). Cuando dos o más axones se ubican adyacentes entre sí, los potenciales de membrana de estos comienzan a interactuar entre ellos a través del espacio extracelular, esto se conoce como interacción efáptica. Esta lleva a la sincronización de los potenciales de acción que se propagan por diferentes fibras, fibras que poseen diferentes velocidades de conducción. En otras palabras, un grupo de células cambian su entorno eléctrico local, que a su vez retroalimenta la actividad eléctrica de todos sus miembros. Es posible que los pulsos de dos fibras se acoplen y se propaguen con una velocidad que puede ser diferente a la de las velocidades desacopladas. Si los impulsos se lanzan aproximadamente al mismo tiempo en dos fibras paralelas con velocidades de impulso independientes que no difieren en más un 10 por ciento aproximadamente, estos impulsos se pueden bloquear o sincronizar y se puede apreciar que se mueven exactamente a la misma velocidad (64).

Las efapses pueden ser interacciones anormales entre fibras nerviosas, en estas zonas se produce una transmisión no fisiológica de señales eléctricas entre fibras que no tienen vainas de mielina, dando lugar a verdaderos cortocircuitos entre fibras de gran o pequeño calibre. Estas pueden ocurrir en la formación de neuromas , el cual ocurre cuando se forma una cicatriz en un tejido conectivo entre el extremo final del axón y las vainas vacías de tejido conectivo, el extremo proximal del axón detiene su avance y forma un engrosamiento nodular (65).

3.7 Activación glial

En el dolor, la sensación, percepción y modulación son clásicamente considerados mediados únicamente por neuronas. Se presume que las glías en el sistema nervioso central (SNC) no tienen ningún papel puesto que no poseen axones y por lo tanto no se asocian con la señalización de célula a célula. Sin embargo, esta visión está cambiando dramáticamente.

Las células de la glía son aproximadamente el 70% de las células que componen el sistema nervioso central, la microglía en estado de reposo corresponde solo entre el 5 a 20% de estas células (66). El sistema nervioso central está compuesto por dos principales tipos de células: la macroglía y la microglía, estos son los oligodendrocitos, los astrocitos, células radiales, células de Müller y células de Bergmann. Algunos estudios indican que la glía tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis dentro del sistema nervioso central (67,68). Es importante considerar también que las células gliales son el segundo factor principal en el tejido neuronal, estas no transmiten señales nerviosas, pero cumplen un papel fundamental en la síntesis, liberación y la captación de los neurotransmisores. Estas células además realizan una función de protección ya que son parte de la barrera hematoencefálica, la formación de la vaina de mielina, la nutrición de las neuronas y mecanismos de defensa (66).

Hasta hace algún tiempo se creía que el dolor crónico surgía principalmente por una disfunción neuronal dentro de las vías nociceptivas que integran el sistema nervioso (69). Sin embargo, en este último tiempo se ha producido un cambio respecto a la neurobiología del dolor. Diversos estudios en animales han demostrado claramente que la microglía, los astrocitos en el sistema nervioso central y las interacciones neurogliales, realizan un papel fundamental en el mantenimiento y mantenimiento del dolor persistente (66,70). Se ha encontrado que la microglía y astrocitos responden a situaciones patológicas en el sistema nervioso central, como traumatismos, enfermedades neurodegenerativas, accidentes cerebrovasculares, experimentando diversas respuestas celulares conocidas como activación glial (71). Esta activación implica proliferación, cambios morfológicos y producción de mediadores inflamatorios. Este mecanismo generalmente es de tipo defensivo-adaptativo y

contribuye para manejar el estrés agudo, disminuir el daño tisular y restablecer la homeostasis. Sin embargo, cuando este funciona incorrectamente por ejemplo cuando el daño no se resolvió en el periodo adecuado después de la lesión, esta activación glial puede tener efectos nocivos y convertirse en evento patológico (72,73)

Algunas investigaciones asocian a la glía de la médula espinal (microglía y astrocitos) como componentes claves en la creación y el mantenimiento del dolor patológico. Está aumentando la evidencia de que la glía podría ser clave para crear estados de dolor exagerados en diversas etiologías. Lo que sugiere que podría estar ampliamente involucrada en la creación de dolor patológico y tal vez otros fenómenos sensoriales (74).

Los primeros resultados que relacionan a las células de la glía relacionadas con el dolor neuropático se publicaron en la década del noventa, sin embargo no hace mucho tiempo se logró demostrar la relación de la glía activada con este (75).

Los estudios muestran que cuando ocurre un daño de un nervio periférico este va seguido de la activación de la microglía en el asta dorsal de la médula espinal aproximadamente 24 horas después de ocurrido el daño, mientras que la activación de los astrocitos ocurre 3 días después del daño. Esta activación glial suele durar hasta tres meses y se detiene. Según los últimos estudios se asocia esta activación glial con la presencia de alodinia e hiperalgesia (76,77).

En el último tiempo se han descubierto nuevas características del papel de las células gliales en la transmisión sináptica, estos basados en la presencia de receptores, transportadores, canales iónicos y vías de señalización intracelulares muy parecidas a las que hay en la superficie de las neuronas. Las células gliales también tienen la capacidad de comunicarse y hacer sinapsis con las neuronas cercanas activamente por medio de uniones directas entre ellas (78–80). Hoy en día, es sabido que el daño espinal y el daño de los nervios periféricos llevan a la activación fisiológica y morfológica de las células de la glía, particularmente a los astrocitos y la microglía.

Diversos estudios de expresión génica y la espectrometría de masas indican que el dolor crónico está asociado con una fuerte activación de ciertos genes neuronales, así también

genes asociados con las respuestas de las células inmunes (figura 3), incluida la activación glial (81,82).

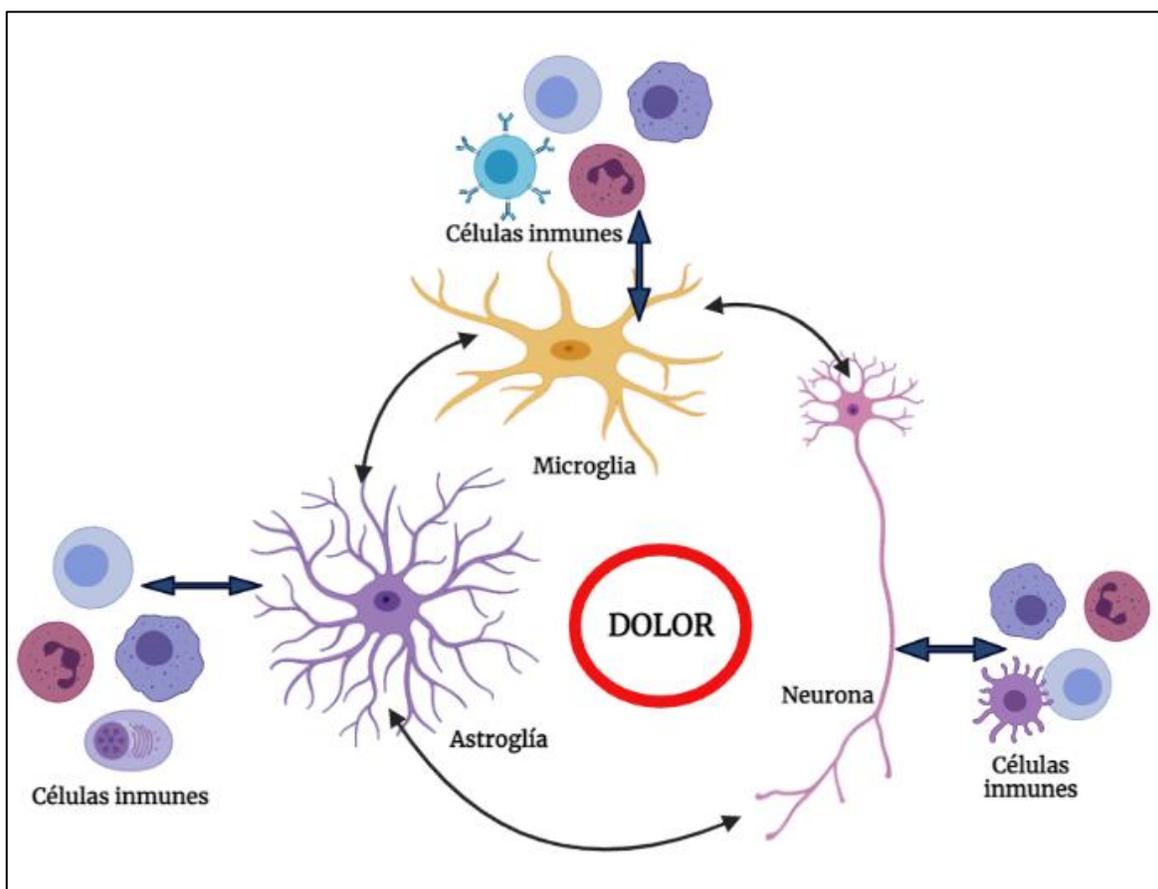


Figura 4. Células de la glía activadas por células inmunes. Las distintas células inmunes pueden activar a células gliales que se comunican entre ellas generando dolor crónico.

Se ha visto durante mucho tiempo a la glía como componentes estáticos del SNC, con una función de apoyo principalmente. Sin embargo, las sinapsis del SNC están encapsuladas por glías, y esta expresa receptores, muchos neurotransmisores y neuromoduladores, sintetizan y liberan numerosos transmisores, y producen transportadores de absorción o liberación de transmisores desde los espacios extracelulares y sinápticos, respectivamente. De esta manera, las glías tienen algunas de las mismas características y expresan muchos de los mismos receptores que las neuronas, por lo que son adecuadas para regular el funcionamiento neuronal (66).

Existen distintas situaciones donde la glía puede contribuir al desarrollo del dolor. Por ejemplo, en enfermedades infecciosas, como el SIDA, más del 90% de los pacientes sufren de dolor crónico, a pesar de ello, no se conoce la fuente corporal del dolor en casi la mitad de estos casos (83). Además, podemos encontrar que en una lesión aparece dolor que se percibe o surge no solo del sitio de la lesión sino también de los tejidos sanos que la rodean. Este tipo de dolor no puede ser explicado por mediadores inflamatorios u otras sustancias en la piel que se difunden a las áreas circundantes (84). También en el dolor patológico que proviene de nervios periféricos (dolor neuropático) no es percibido que proviene de la piel que es inervada por el nervio dañado (llamado dolor territorial ya que el dolor surge del territorio de la piel inervado por el nervio afectado) (85). El último caso es el dolor espejo. Donde el trauma de una región del cuerpo (por ejemplo, el pie izquierdo) de hecho resulta en dolor de ese sitio. Sin embargo, también podría percibirse como un dolor que proviene de la parte del cuerpo de imagen especular que esta sana (86).

Este nuevo papel de la glía como moduladores del dolor podría además tener importantes implicaciones en la formulación de fármacos para controlar el dolor clínico. Dirigir la glía de la médula espinal es una visión nueva del control del dolor y genera nuevos enfoques para los tratamientos farmacológicos del dolor patológico (87).

3.8 Déficit de las vías centrales inhibitorias y transformación de sinapsis inhibitorias en excitatorias.

Se cree que los sistemas inhibidores y facilitadores del dolor descendentes funcionan en conjunto, manteniendo así un estado inicial de procesamiento sensorial (26). En la desinhibición los mediadores inflamatorios modulan la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria los cuales representa los cambios plásticos involucrados en la hipersensibilidad nociceptiva. Los mediadores inflamatorios modulan la excitabilidad de los circuitos

sensoriales activando la neurotransmisión excitatoria y reduciendo la neurotransmisión inhibitoria, resultando en hiperalgesia asociada a la sensibilización central (88).

En el dolor neuropático ocurre un procesamiento anormal de la información somatosensorial. La inhibición sináptica en el asta dorsal espinal juega un papel clave en ese procesamiento. La inhibición principalmente es debida a la desregulación del cloruro causada por la hipofunción del cotransportador de cloruro de potasio KCC2. En estudios con ratas, que las neuronas excitadoras se ven afectadas de manera exagerada. Esto no se debe a que el cloruro esté desregulado en las neuronas excitadoras e inhibitorias, sino, a que las neuronas excitadoras dependen más de la inhibición para contrarrestar la excitación fuerte. Los campos receptivos en ambos tipos de células tienen una organización circundante al centro, pero la desinhibición desenmascara una entrada más excitadora a las neuronas excitadoras. Las diferencias en la excitabilidad intrínseca también afectan la forma en que la desregulación del cloruro afecta los picos. Estos resultados muestran cómo la excitación y la inhibición se equilibran normalmente en el asta dorsal espinal y cómo su desequilibrio desregula el procesamiento somatosensorial (89).

Una estructura clave en la vía ascendente del dolor es el tálamo es un nodo clave en la vía ascendente del dolor, este transmite información nociceptiva que accede a la corteza somatosensorial por medio de proyecciones espinotalámicas(90,91). Estudios realizados con resonancia magnética han mostrado que en personas con dolor neuropático el volumen del tálamo disminuyó, también se encontró que había actividad talámica basal disminuida o una respuesta talámica disminuida(92). Otro estudio se muestra que al realizar una lesión en un nervio periférico o administrar en la medula espinal ATP estimulante de la microglía o fármacos que inhiben el transporte de cloruro, ocurre un cambio morfológico y electrofisiológicos en las neuronas espinales de salida de la lámina I. Esto provoca tres efectos 1) Aumenta la respuesta nociceptiva 2) genera transmisión de transmisión mecánica inocua y 3) produce ráfagas de actividad espontánea. Estos cambios fenotípicos que ocurren en la lámina I pueden explicar 3 componentes importantes del dolor de tipo neuropático, la hiperalgesia, la alodinia mecánica y el dolor espontáneo respectivamente.

Estudios con ratones han mostrado que en enfermedades como la esclerosis múltiple ocurre un cambio en el balance excitación-inhibición en la corteza somatosensorial y que lleva a un cambio en la plasticidad de la corteza somatosensorial (93).

3.11 Reorganización de fibras A δ en el asta dorsal

El primer paso de la integración de la información nociceptiva primaria ocurre en el asta dorsal superficial, donde las señales del estímulo hacen sinapsis las neuronas de proyección y con las interneuronas. La sustancia gelatinosa (SG) está específicamente implicada en el procesamiento nociceptivo, ya que pequeñas aferencias primarias mielinizadas, fibras A δ , y amielínicas, fibras C, que transmiten preferentemente información nociceptiva hacen contactos sinápticos con las neuronas de la SG (94). Los distintos sistemas inhibidores descendentes actúan tanto en sitios presinápticos como postsinápticos para controlar la ganancia de excitabilidad en la transmisión de la nocicepción(95).

En trabajos con ratas se ha demostrado que la estimulación de la raíz dorsal evoca potenciales excitatorios postsinápticos rápidos y en las neuronas del asta dorsal son lentos. Las neuronas del asta dorsal superficial (lamina I-II) reciben principalmente inputs monosinápticos de fibras A δ y C, mientras que las neuronas del asta dorsal profundo (lamina III-V) reciben inputs monosinápticos y polisinápticos de las fibras A β , resultando en una respuesta compleja a la estimulación aferente primaria supramaximal (96).

Una lesión del nervio periférico da como resultado la pérdida de sitios sinápticos dentro de la sustancia gelatinosa del asta dorsal superficial de la médula espinal debido a que ocurre una degeneración transganglionar (97). Tras alguna lesión en alguno de estos nervios, se produce una reorganización anatómica por la que brotan las fibras A en la lámina II en el asta dorsal de la médula espinal, que originalmente recibe la entrada del nociceptor de las fibras C (98). También ocurre una reorganización de los inputs aferentes periféricos al asta dorsal, caracterizadas por una reducción en los inputs de conducción lenta de alto umbral a la lámina II y un aumento en los inputs de conducción rápida de bajo umbral características

de las fibras A β a la lámina II, sin observarse de cambios en la transmisión sináptica en láminas más profundas (III y IV) (34).

Un estudio en que se examinó la reorganización funcional de las vías sensoriales en el asta dorsal de ratas con disección del nervio ciático a las que se les transmitía información nociceptiva, reveló que la estimulación de la raíz dorsal es suficiente para activar las fibras aferentes A δ provocando una corriente excitatoria post sináptica (EPSC) monosináptica, polisináptica o ambas juntas, en la mayoría de las neuronas estudiadas. Esta reorganización funcional de los circuitos sensoriales puede formar parte de un mecanismo subyacente, o parte de un mecanismo más complejo, para las anomalías sensoriales que siguen producto de las lesiones en los nervios periféricos(100).

3.12 Reorganización de los circuitos en la corteza somatosensorial

Los mapas motores corticales son plásticos y se reorganizan en respuesta al aprendizaje, la experiencia sensorial alterada, la amputación, las lesiones de nervios periféricos y de la médula espinal, así como las lesiones corticales como el accidente cerebrovascular (101). Por ejemplo, una denervación periférica puede causar cambios rápidos y sostenidos en la organización cortical en la región desaferente de la corteza somatosensorial(102). También se sabe que los cambios en la organización cortical están detrás de una variedad de fenómenos neurológicos importantes, incluido el dolor, la sensación "fantasma" referida después de la amputación y la recuperación de la función después de una lesión cerebral o nerviosa periférica (103,104).

Aunque en el adulto la corteza es menos plástica que en el recién nacido, las lesiones aún pueden alterar considerablemente los mapas corticales motores y sensoriales. Las lesiones de nervios periféricos y la amputación en el adulto pueden silenciar grandes secciones de la corteza aferente y dar lugar a la generación de nuevas representaciones topográficas de las regiones del cuerpo que no han sufrido lesiones (105). Aunque en muchas áreas de la corteza

adulta, las neuronas tienen la capacidad de recuperar la capacidad de respuesta funcional después de una pérdida de su información sensorial (106,107)

Lesiones en la médula espinal en modelos humanos y animales muestran como resultado distintos niveles de reorganización cortical durante un tiempo que puede variar desde semanas hasta años. La rehabilitación después de una lesión modifica aún más a la reorganización cortical, muy posiblemente aprovechando los mismos mecanismos de circuito que se utilizan durante el aprendizaje motor, aunque ahora sobre una estructura neuronal alterada (108).

3.13 Cambios de expresión y modulación de los diferentes núcleos involucrados en la percepción del dolor

Los ganglios basales (GB) están compuestos por varios núcleos implicados en los procesos neurales que se relacionan con la ejecución de actividades motoras, emocionales y cognitivas. Estudios de imágenes funcionales del dolor han mostrado cambios claros y consistentes en los ganglios basales en condiciones de dolor. Los primeros estudios del dolor mediante fMRI mostraron patrones de activación en los ganglios basales, incluidos el putamen y el globo pálido(109). Datos preclínicos y clínicos indican que estas estructuras poseen un papel en el procesamiento del dolor. Los conocimientos actuales sobre las alteraciones en las regiones corticales y subcorticales en el dolor sugieren que los GB están involucrados de manera única en los ejes tálamo-cortico-GB para la integración de muchos aspectos del dolor. Estos incluyen la integración de respuestas motoras, emocionales, autónomas y cognitivas al dolor.

Los ejes cortico-GB-tálamo disfuncionales pueden contribuir al mantenimiento del dolor crónico y la evolución del procesamiento neural. Ya sea que el procesamiento cerebral del dolor dependa de un impulso neuronal externo (entradas periféricas) o un impulso neuronal interno (impulso, retroalimentación subcortical o cortical), los GB son procesadores

centrales que pueden desempeñar un papel en la integración de inputs divergentes que pueden modificar el dolor con el tiempo (109,110).

La comprensión actual de estas regiones del cerebro, en procesos de dolor, indican que los GB desempeñan un papel fundamental en las manifestaciones conductuales del dolor crónico. Además estudios de imágenes funcionales del dolor han mostrado cambios claros y consistentes en los ganglios basales en condiciones de dolor (110).

En cuanto a la clínica encontramos dos tipos de enfermedad que ejemplifican el papel de los núcleos de los ganglios basales en el dolor: la enfermedad de Parkinson (EP) y el síndrome de dolor regional complejo (CRPS). En la EP, la patología inicial implica una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra en los ganglios basales que da lugar a trastornos del movimiento y las personas afectadas con frecuencia presentan dolor crónico (111,112).

3.14 Fenómeno MOH: Medication Overuse Headache, tolerancia y dependencia a fármacos analgésicos

La cefalea por uso excesivo de medicación (MOH) es uno de los más comunes trastornos de cefalea crónica y un problema de salud pública con una prevalencia mundial del 1-2%. Esta condición es caracterizada por dolor de cabeza crónico producida paradójicamente por uso excesivo de diferentes medicamentos para el dolor de cabeza, siendo el retiro del medicamento usado en exceso el tratamiento predilecto (113). Los pacientes con cefalea crónica son una gran población dentro de la atención primaria y en entornos neurológicos (114). El dolor de cabeza es tratado a menudo con analgésicos y es la razón más común para el uso de analgésicos en la población general (115). Los pacientes propensos a los dolores de cabeza que toman analgésicos para otras afecciones también pueden desarrollar MOH. Los principales medicamentos que se asocian a MOH son: tranquilizantes, aspirina, ibuprofeno, analgésicos combinados y opioides (116). En los pacientes que presentan MOH, el comportamiento similar a la dependencia se presentó con mayor frecuencia en aquellos que

abusan de los opioides y triptanos que la aspirina o el ibuprofeno. MOH se puede asociar con el espectro de trastornos relacionados con uso sustancias, ya que se cree que comparten vías neurobiológicas comunes (117). Un comportamiento similar al de la dependencia es considerado un problema a la hora de prescribir medicamentos a pacientes en los que se sospecha que tienen un problema de abuso de sustancias o que están en riesgo de tener dicho comportamiento. El uso de medicamentos de venta libre desconocidos para el médico tratante puede complicar las cosas. Los médicos que no suelen trabajar en el campo de la adicción a veces pueden optar por ignorar cualquier sugerencia de comportamiento similar a la dependencia, ya que esto puede complicar las cosas a la hora de recetar un medicamento(118).

La fisiopatología del MOH no es bien comprendida aun, pero los estudios han demostrado que la sensibilización central probablemente juega un papel importante (119). Esta condición muestra cambios funcionales y estructurales en el sistema nervioso central (SNC) especialmente en el área gris periacueductal del hipocampo, el tálamo de la corteza cingulada posterior, el cerebelo, la corteza orbitofrontal (OFC) y el sistema de recompensa mesocorticolímbico (120).

3.15 Alimentación (inflammation Pro-resolution)

La inflamación es un componente común de muchas enfermedades que afectan a las civilizaciones occidentales. La terapia nutricional y, especialmente, la suplementación con ácidos grasos esenciales (AGE) es uno de los enfoques que se están utilizando hoy en día para el tratamiento y manejo de muchas afecciones inflamatorias. Se estudia como el cuerpo convierte los ácidos grasos esenciales en un género nuevo de mediadores lipídicos, denominados mediadores pro-resolución especializados (SPM; (121)). Estos consisten en lipoxinas, resolvinas, proteínas y maresinas derivadas de ácidos grasos esenciales (EFA). Estas moléculas son producidas enzimáticamente en diversos órganos del cuerpo humano a niveles proporcionales a sus acciones biológicas (122).

Las acciones biológicas de estos nuevos mediadores en el control de la inflamación son diferentes a las terapias actuales. Los fármacos en uso clínico están diseñados para inhibir la inflamación y bloquear el reclutamiento de leucocitos, mientras que los SPM actúan contrarregulando la producción de mediadores proinflamatorios (citocinas, quimiocinas y eicosanoides inflamatorios), limitando la infiltración leucocítica y promoviendo el cambio del fenotipo leucocitario (123). Por lo que, estas moléculas no evitan la inflamación, más bien evitan que se des controle y favorecen así la desaparición de esta. Además, estudios recientes demuestran que promueven activamente la reparación y regeneración de tejidos en el contexto de una infección(124).

El dolor es un síntoma muy importante de la artritis y enfermedades relacionadas que pueden afectar significativamente la calidad de vida de una persona. En estudios con ratas, la suplementación con aceite de pescado, que contiene ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, redujo significativamente el dolor inflamatorio subcrónico inducido por la inyección intraplantar de adyuvante completo de Freund en las patas traseras de estas. Esta protección se asoció con una disminución del factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) y un aumento de los niveles de resolvina D1 en los grupos suplementados, lo cual indica que la suplementación con ácidos grasos esenciales puede regular el dolor mediante la producción de SPM (125).

3.16 Estrés y factores ambientales que gatillan el dolor

La evidencia de pacientes con dolor y modelos animales muestra que el dolor crónico no existe de manera aislada, sino que posee una composición variada y consecuencias de gran alcance. Los pacientes con dolor prolongado en muchos casos desarrollan ansiedad y depresión y pueden manifestar cambios en el funcionamiento cognitivo (126). Estudios longitudinales con modelos de roedores también muestran el desarrollo de un comportamiento similar a la ansiedad y cambios cognitivos semanas o meses después de una lesión que causa dolor a largo plazo (127). Sin embargo, los estudios en humanos revelan

que las distintas opciones de estilo de vida, como la práctica de la meditación o el yoga, pueden disminuir la percepción del dolor y tener el efecto opuesto en el cerebro que el dolor crónico (128). El dolor crónico a veces acelera la pérdida de materia gris y puede alterar la integridad de la materia blanca. Otros estudios realizados con modelos de roedores, muestran que la actividad física y un entorno socialmente enriquecido reducen el comportamiento del dolor y normalizan la función cerebral (129). Todos estos estudios en conjunto sugieren que la carga del dolor crónico puede ser disminuida mediante una intervención no farmacológicas.

Para ejemplificar, en 1984 se realizó un estudio comparando la recuperación de la cirugía de colecistectomía en pacientes cuyas ventanas de las habitaciones del hospital poseían una vista del paisaje natural versus una vista con pared de ladrillos. Los pacientes con vistas a un paisaje natural tenían recuperaciones más cortas, tomaban menos analgésicos y tenían menos notas con tonos negativos en sus historias clínicas (130). En otro estudio se probó el efecto de la combinación imágenes y sonidos de la naturaleza para reducir el dolor en pacientes sometidos a broncoscopia flexible. Durante el procedimiento, los pacientes estuvieron expuestos a escenas y sonidos de la naturaleza o recibieron el tratamiento habitual. Los pacientes que estuvieron expuestos a vistas y sonidos de la naturaleza informaron niveles significativamente más altos de control percibido sobre el dolor (131).

3.17 Déficit en Educación de los profesionales de la salud en el manejo del dolor crónico y la realización de un diagnóstico eficaz y oportuno

Aunque con el paso de los años la atención del dolor se ha vuelto más sofisticada, la atención más eficaz aún no está ampliamente disponible. En algunos casos de dolor agudo se pueden tratar con éxito, sin embargo, la mayoría de las personas con dolor severo y persistente aún no reciben exitoso, y con frecuencia no se les ofrece un alivio sistemático o la evaluación y el tratamiento completos, integrados y basados en la evidencia científica sobre el dolor (132).

La demanda de atención al dolor muestra una creciente tendencia relacionada con la oferta de servicios específicos y el desarrollo de nuevos y más eficaces tratamientos. En la literatura científica se observa un aumento en la prevalencia de dolor entre la población general en los últimos años. Algunos estudios con un seguimiento superior a 40 años, muestran un aumento entre 2 y 4 veces en el dolor de espalda, dolor en el hombro y dolor generalizado (133).

En países desarrollados gran cantidad de los pacientes puede recibir terapia efectiva para el dolor, pero desafortunadamente en América Latina, un porcentaje muy bajo se beneficia de las opciones terapéuticas disponibles. Una de las causas del tratamiento insuficiente de dolor es la falta de educación de los profesionales de la salud sobre el uso adecuado de los analgésicos, principalmente los opioides. Además, se cuenta con muy poca literatura en español que permita la educación y consulta reiterada de material de referencia de calidad para los profesionales. Distintos líderes de la región en los distintos países han trabajado desde hace mucho tiempo en mejorar esta situación. Durante mucho tiempo, los esfuerzos se focalizaron en la educación de profesionales sanitarios como parte de un programa de especialización y postgrado. Gran parte de esta labor fue hecha a través del esfuerzo de los capítulos de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP por sus siglas en inglés la cual se focalizó en la educación clínica y en el reconocimiento de la disciplina del tratamiento del dolor como especialización. A través de otras organizaciones, en los últimos años se han logrado avances en el tema de disponibilidad, legislaciones (134).

4. HIPOTESIS:

La expresión aumentada de la subunidad β en el receptor de glicina interfiere en el funcionamiento del receptor y contribuye en el desarrollo del dolor crónico.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la expresión de la subunidad β del receptor de glicina en modelo de rata con dolor neuropático para establecer una relación entre esta y el proceso de dolor crónico.

Objetivos específicos:

1. Medir la expresión de la subunidad β del receptor de glicina en medula espinal, en procesos de dolor crónico.
2. Comparar el registro electrofisiológico del receptor de glicina de una rata sin tratamiento y una con dolor crónico.
3. Relacionar la actividad electrofisiológica del receptor de glicina con la expresión de su subunidad β , ambos en proceso de dolor crónico.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Elección del modelo animal

Se utilizó un modelo de dolor neuropático de ratas con un método ampliamente usado y validado, este es la lesión por constricción crónica del nervio ciático (CCI) en ratas Sprague Dawley (SD) (33,135). Las ratas utilizadas, con un peso entre 230-250 g, se obtuvieron de la instalación animal de la Universidad de Chile y se criaron durante aproximadamente 4 semanas. De estas se utilizaron preferentemente animales machos adultos ya que se informó que existen diferencias entre sexos, en la modulación y expresión de los diferentes tipos de canales involucrados en el procesamiento nociceptivo (136,137). Todos los procedimientos se ajustaron a la normativa especificada por el Comité Institucional de Uso Animal de la Universidad de Chile (n°17027-MED-UCH) (138) y se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos éticos establecidos por el Instituto Nacional de Salud, MD, de Estados Unidos y la Asociación internacional para el estudio de dolor en animales conscientes. Se hizo todo esfuerzo posible para minimizar el sufrimiento de los animales. Los animales fueron criados y mantenidos en condiciones de laboratorio controladas, recibieron una dieta estándar para ratas y agua *ad libitum*, un ciclo de luz/ oscuridad de 12 horas a una temperatura constante de 23°C.

6.2 Lesión por contricción crónica

La lesión por constricción del nervios ciático (CCI) en las ratas Sprague Dawley es un modelo validado para el estudio de dolor crónico (139). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina/xilazina (100/10 mg/kg). Se realizó una disección en el bíceps femoral derecho para exponer el nervio ciático. Se ataron cuatro ligaduras (chromic catgut 4-0) y luego la incisión fue cerrada por capas. En la condición control todos los procedimientos fueron los mismos que en CCI, pero sin el ligamiento del nervio (Sham). Se utilizó técnica aséptica. Los animales fueron mantenidos a una temperatura controlada hasta la recuperación de la anestesia y fueron monitoreados siguiendo los lineamientos de Morton y Griffiths (140).

6.3 PCR cuantitativa

La qPCR de tejidos espinales de ratas CCI se realizó a los 3 días posteriores a la cirugía y se comparó con los datos obtenidos de Sham (control: cirugía de rata sin ligadura). El ARN total se aisló de la médula espinal (segmento lumbar L3-L5) mediante el método de extracción de tiocianato de Guanidinio-fenol cloroformo (Trizol, Life Technologies, USA). Tras la preparación total de ARN a partir de estos tejidos y la síntesis de cDNA, se realizó qPCR de la subunidad β utilizando 0,5 ng/uL de cDNA y SYBR green Master mix (Sigma) en un volumen de reacción final de 20 uL en equipos Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA). Los ciclos de amplificación de PCR fueron: 1 a 95°C/5min, 40 a 95°C/30s, 56°C/30s y 72°C/45s. Todas las reacciones se ejecutaron por triplicado. La expresión relativa de cada gen se calculó utilizando el Método Pfaffle (141,142) y se normalizó contra la expresión de GAPDH.

6.4 Umbral de estimulación mecánica: filamentos de Von Frey

Las ratas fueron ubicadas en espacios individuales con piso de malla de alambre y cubierta transparente. Después de 15 minutos de habituación, su umbral mecánico fue evaluado usando manualmente filamentos de Von Frey. Se aplicó una fuerza perpendicular en la zona intraplantar de cada pata usando filamentos con una fuerza predeterminada constante (32-512 mN) de lo más suave hasta la más potente hasta que hubiera una respuesta de retirada. El umbral mecánico de retirada fue determinado usando el método Up-Down con 3 ciclos Up-Down por medición (143).

Se usaron dos grupos de ratones macho, ambos grupos sometidos a dos condiciones de procedimiento quirúrgico 10 días antes: con CCI y cirugía de control. Cada día un animal fue anestesiado con isoflurano y luego decapitado. El cerebro fue removido rápidamente y ubicado en un recipiente con solución artificial de líquido cerebro espinal frío de ACSF modificado con sucrosa. Compuesta por: 85 mM de NaCl, 75 mM de sucrosa, 3 mM de KCl, 1.25 mM de NaH₂PO₄, 25 mM de NaHCO₃, 10 mM de dextrosa, 3.5 mM de MgSO₄, 0.5

mM de CaCl₂, 3 mM de piruvato de sodio, 0.5 mM de sodio L-ascorbato y 3 mM de myo-inositol (305 mOsm, pH 7.4 con 95% O₂/5% CO₂). Se cortaron rebanadas coronales de 300 µm con un vibrátomo. Después de 1 hora a 36°C se cambió a solución de registro, compuesta por: 126 mM de NaCl, 3.5 mM de KCl, 1.25 mM de NaH₂PO₄, 25 mM de NaHCO₃, 10 mM de dextrosa, 1 mM de MgSO₄, 2 mM de CaCl₂, 3 mM de piruvato de sodio, 0.5 mM de L-ascorbato de sodio y 3 mM de myo-inositol (305 mOsm, pH 7.4 con 95% O₂/5% CO₂) a temperatura ambiente (22°C).

Las láminas fueron registradas en una solución para cámara sumergida con ACSF a 30-32°C, bajo un microscopio de fluorescencia (Eclipse FNI, Nikon) con contraste de interferencia diferencial infrarroja vertical (IR-DIC), equipado con un objetivo de inmersión en agua de 40X. Se ubicó una pinza de voltaje en el soma de todas las neuronas identificadas visualmente que se encontraban en la amígdala central (CeA). Se usó un electrodo de vidrio de borosilicato, (Instrumentos de precisión mundial, Sarasota, FL, USA), colocada en una Micropipeta Puller P-97 Flaming/Brown (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). La pipeta de vidrio que va desde los 3.5 a los 2.4 MΩ, fue llenada con solución intracelular que contenía: 130 mM de Cs-gluconato, 3.5 mM de CsCl, 4 mM de ATP-Mg, 0.3 mM de GTP-Na, 10 mM de Na-phosphocreatina, 1 mM de EGTA, 10 mM de HEPES y 0.4% de Biotina (286 mOsm, pH 7.4 ajustada con CsOH). Después de la formación del sello y la exitosa transición a la configuración de la todas las células, la resistencia de acceso usualmente entre 4 y 15 MΩ fue monitoreada continuamente. Esta resistencia en serie fue monitoreada y compensada entre el 75-80%. Se aislaron las corrientes mediadas por glicina en presencia de bloqueadores sinápticos CNQX (10 µM), APV (50 µM) y bicuculina (10 µM) para bloquear a los receptores de NMDAR, AMPAR y GABA_AR respectivamente. Se registraron las corrientes postsinápticas espontáneas inhibitorias (sIPSCs) obtenidas como corrientes de salida en los potenciales de retención de +20 mV. Las sIPSCs restantes obtenidas después de aplicar más bicuculina (10 µM) fueron consideradas sIPSCs a base de glicina. Al final del registro se aplicó estricnina para bloquear corrientes glicinérgicas. Se usó eventos de detección PClamp para elegir eventos individuales de aproximadamente 3 a 10 pA y que eran mayores que el ruido entre peak y peak, para analizar el área y la constante de decaimiento. Eventos sinápticos espontáneos fueron detectados sobre los 100 segundos de registro continuo, dos veces después de aplicar IL-1β. Las señales para ambas pinzas de voltaje se

adquirieron utilizando un amplificador MultiClamp 700B (Axon CNS, Molecular Devices LLC), un filtro de paso lento a 10 kHz, muestreado digital a 30 kHz y grabado a través de una interfaz Digidata-1440^a (Axon CNS, Molecular Devices) y un software PClamp 10.3.

6.5 Análisis de datos

Análisis de datos para qPCR: Se realizó prueba de t de Student pareado y se consideró un $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Análisis de datos electrofisiológicos: Los resultados se expresaron como la media \pm errores estándar (SEM). Se utilizó análisis de varianza unidireccional y bidireccional (ANOVA) para determinar los efectos de los tratamientos con IL-1 β , los animales y la interacción entre ambos factores, seguido de la prueba post hoc de Tukey o Bonferroni para examinar el efecto principal individual de tratamientos y animales. El umbral de significación estadística fue $p < 0,05$, con intervalo de confianza (IC) del 95%. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Prism (GraphPad, Estados Unidos).

6. RESULTADOS

La sub unidades β del receptor de glicina aumenta su expresión en modelo de ratas CCI

Con la finalidad de conocer el papel de la subunidad auxiliar β del receptor de glicina en procesos de dolor crónico neuropático, se llevó a cabo una cirugía para realizar una constricción crónica del nervio ciático en ratas Sprague Dawley (CCI) macho adultas. Se evaluó la expresión de subunidad β del receptor de glicina a los tres días de presentado el dolor por medio de la técnica molecular de PCR cuantitativa con SYBR green Master mix (Sigma). Se obtiene que la expresión de la subunidad β de los cortes de médula espinal en las ratas CCI fue mayor en comparación con las ratas Sham (Figura 4).

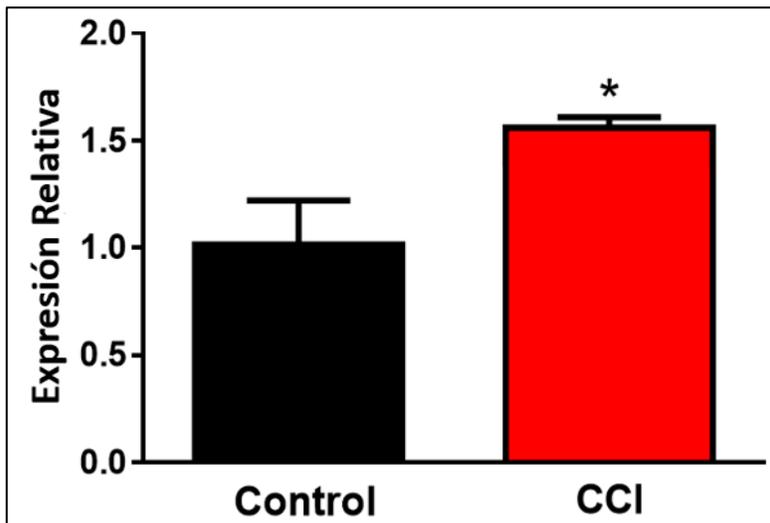


Figura 5. Cambios en la expresión de la subunidad β del receptor de glicina en modelo de dolor neuropático. Datos de la qPCR con la expresión relativa de la subunidad β del receptor de glicina a los 3 días del desarrollo del dolor (n=3). t-Student pareado considerando resultados estadísticamente significativos con $P < 0.05$

Disminución en la amplitud de la actividad glicinérgica en ratas CCI

Los registros electrofisiológicos de las células con pinzas conectadas a una fuente de potencial de voltaje +20mV en las neuronas de cortes de amígdala central de ratas con constricción del nervio ciático (CCI) como modelos de dolor neuropático, comparadas con el modelo Sham o modelo sin constricción del nervio ciático, mostraron que en ratas CCI tienen una distribución bimodal en la amplitud de corriente durante las actividad espontanea (Figura 6A). Al comparar las características de las corrientes principales estas mostraron que las corrientes glicinérgicas espontaneas presentan una diferencia en la amplitud de corriente entre las ratas de tipo Sham y las ratas de modelo CCI para dolor neuropático. Se aprecia que la amplitud en ratas Sham esta incrementada y en ratas que se encontraban bajo dolor neuropático la amplitud de corriente estaba disminuida (Figura 6B). Otro aspecto encontrado es que la frecuencia de la señal es mayor en el grupo de ratas CCI, sin embargo, esta no es significativamente diferente a la frecuencia que presentó el grupo de ratas Sham (sham: 0.15 ± 0.01 Hz; CCI: 0.18 ± 0.01 Hz). En el grupo de ratas CCI no hay mayor efecto en la constante de decaimiento (sham: 7.2 ± 0.72 ms, CCI: 6.2 ± 0.37 ms) (Figura 6C).

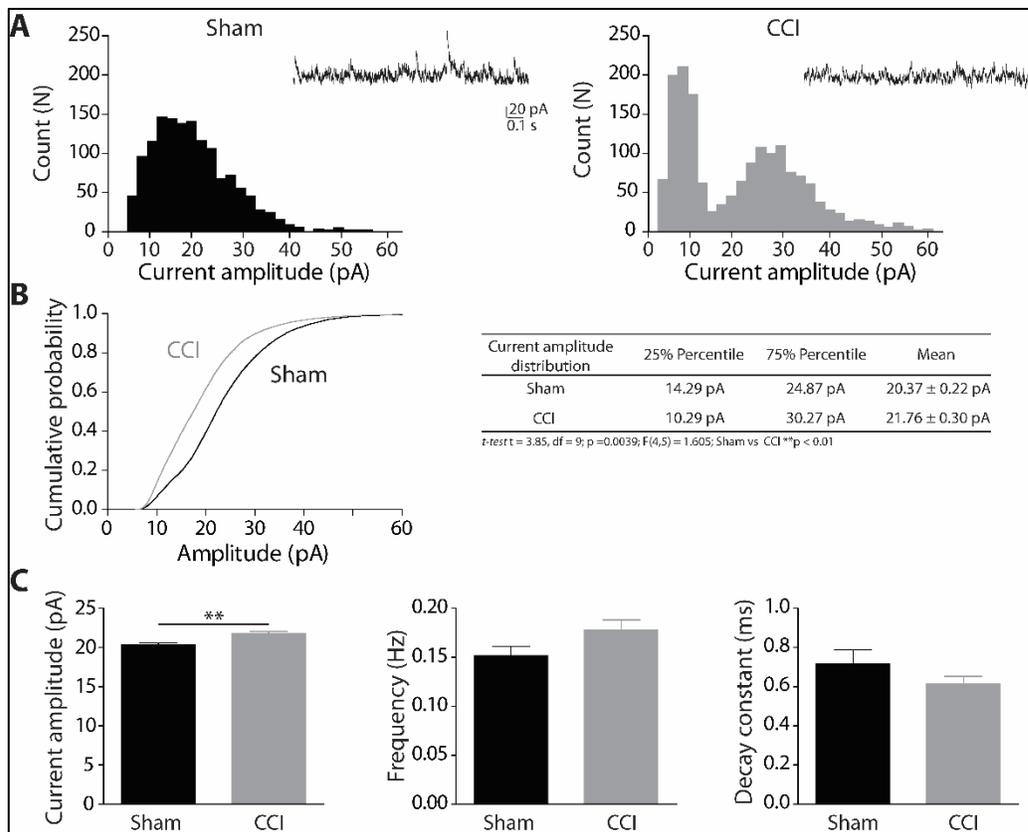


Figura 6: sIPSCs glicinérgicas en ratas Sprague Dawley bajo dolor neuropático en neuronas de la amígdala central. (A) Representación de las sIPSC de las corrientes glicinérgicas en presencia de CNQX (10 μ M), APV (50 μ M), bicuculina (10 μ M) con pinzas conectadas a una fuente de potencial +20mV e histogramas de distribución de eventos de las amplitudes de las sIPSCs en ratas Sham y CCI. (B) Histograma de Probabilidad acumulada de amplitud en neuronas de la amígdala central en ratas Sham y CCI. (C) Cuantificación de la amplitud de corriente, frecuencia del evento y constante de decaimiento.

En resumen, los animales que tenían dolor por constricción crónica en el nervio ciático mostraron un incremento en la expresión de la subunidad β auxiliar del receptor de glicina y una disminución en la amplitud de la actividad glicinérgica, junto con una actividad bifásica espontánea.

8. DISCUSIÓN

Para entender la contribución de la subunidad auxiliar β del receptor de glicina en procesos de dolor crónico, se analizó la expresión de la subunidad β en tejidos de medula espinal en modelos de ratas Sprague Dawley para dolor neuropático y registros electrofisiológicos en cortes de neuronas de ratas en amígdala central. Se evaluó la expresión de la subunidad 3 días después de la cirugía de constricción del nervio ciático para inducir dolor crónico ya que fue reportado que después de estos 3 días hay un cambio significativo en el umbral de nocicepción. El modelo animal utilizado para el estudio de dolor neuropático ha sido bastante utilizado con anterioridad (144).

Los receptores de glicina son uno de los canales de cloruro inhibitorios más importantes, que controlan la excitabilidad a nivel de la médula espinal. Los cambios plásticos que puedan ocurrir a este nivel pueden alterar la excitabilidad de las vías nociceptivas a nivel periférico y central, lo que podría explicar en parte el desarrollo de la sensibilización en el dolor neuropático (145,146). Aquí mostramos que la expresión de la subunidad β auxiliar del receptor de glicina aumenta en las ratas que presentaban dolor crónico (Figura 5), sin embargo, existen una cantidad bastante limitada de estudios que investiguen a cerca de la modulación alostérica de la subunidad β auxiliar en los receptores de glicina $\alpha\beta$ heteropentaméricos relacionados con el dolor crónico. A diferencia de esto sí hay estudios previos han mostrado que las subunidades α_3 homoméricas del receptor de glicina tienen importancia en la sensibilización del dolor inducida por inflamación producto de la PGE_2 espinal (33). Estudios recientes han mostrado que los receptores de glicina homoméricos, los cuales poseen únicamente subunidades α , son más sensibles a los efectos del etanol y la proteína G que los receptores heteroméricos, los cuales tienen dentro de su pentámero alguna subunidad β , es por eso que se postula que la subunidad auxiliar β puede ejercer efecto modulador negativo en el perfil farmacológico de receptores de glicina $\alpha_1\beta$ (147), lo cual implica que el receptor de glicina no ejerza su función de modulación inhibitoria del dolor .

Según muestra la figura 6B, la amplitud de la señal en las ratas sin constricción del nervio ciático para inducir dolor crónico es mayor a la amplitud medida en ratas CCI, esto se reafirma con estudios que indican que en algunas regiones del sistema nerviosos central como

lo es la amígdala central, se muestra un incremento en la excitabilidad neuronal asociada a una reducción en el control inhibitorio durante el establecimiento del dolor neuropático (148,149). De hecho, en procesos de dolor crónico, la excitabilidad de neuronas espinales y supraespinales ha sido asociada con una disminución de la actividad inhibitoria realizada por los receptores GABA y receptores de glicina (GlyR). Una disminución en la transmisión glicinérgica a nivel de medula espinal ha sido reportada en varios modelos de dolor crónico, pero hasta la fecha no hay estudios que evalúen la actividad glicinérgica en regiones supraespinales en dolor neuropático especialmente en el núcleo central de la amígdala, el cual está asociado con la integración emocional y cognitiva de las señales de dolor nociceptivas periféricas (150). Por lo que hace más complejo reafirmar o comparar nuestros resultados con otros estudios de actividad del receptor de glicina en amígdala.

Otro aspecto encontrado es que a pesar de que la frecuencia de la señal neuronal es mayor en el grupo de ratas CCI, esta no es significativamente diferente a la frecuencia que presentaron las neuronas en el grupo de ratas Sham (sham: 0.15 ± 0.01 Hz; CCI: 0.18 ± 0.01 Hz) (Figura 6C), por lo que no se considera una comparación relevante.

Al relacionar el resultado de la expresión de la subunidad β en medula espinal por medio de qPCR con el estudio electrofisiológico de receptores de glicina en neuronas de la amígdala central, en donde tenemos como resultado primeramente que la subunidad β aumenta su expresión respecto a la expresión de esta subunidad en los ratones no tratados con cirugía para inducir dolor neuropático (figura 5) y segundo el hallazgo más importante del estudio electrofisiológico es que la amplitud de la señal de las neuronas de ratas con dolor neuropático es menor a las de las ratas Sham. Respecto a estos resultados se puede deducir que al producirse un aumento de la subunidad auxiliar β del receptor de glicina en el dolor neuropático, este genera un efecto de desregulación de la función sináptica inhibitoria del receptor de glicina por lo que se aprecia como resultado la disminución de la amplitud de su señal ya mencionado anteriormente. Esta deducción puede ser explicada (figura 6B) al relacionarla con estudios realizados con receptores de glicina a nivel de medula espinal, los cuales indican que la reducción de la amplitud de los eventos glicinérgicos en condiciones de dolor neuropático puede estar asociada con la pérdida del control inhibitorio en condiciones de dolor crónico así también su consecuente reducción del umbral de

nocicepción (151). Esta pérdida de control sería producto del aumento de la subunidad β . Un estudio reciente también demuestra que la subunidad auxiliar β del receptor de glicina juega un papel fundamental en la sensibilización central del dolor mediada por la acción de la IL-1 β , este muestra que aumenta la expresión de la subunidad β después del dolor neuropático inducido por la constricción crónica del nervio ciático y se propone que este incremento de la expresión de esta subunidad está asociado con mecanismos compensatorios para balancear la reducción en la agrupación de sinapsis glicinérgicas inhibitorias espinales (151). Estudios anteriores a este ya había mostrado una reducción en la agrupación de receptores de glicina heteropentaméricos después de aplicar IL-1 β en las neuronas de la medula espinal (152), proceso el cual es regulado por la subunidad auxiliar β al interactuar con la proteína de andamio Gefirina (153). Además se ha reportado que la expresión de la subunidad β de los GlyR en regiones supraespinales, como las neuronas ubicadas en la amígdala central, es mayor que la expresión de otras subunidades (154), lo que sugiere que esta subunidad auxiliar juega rol importante en el procesamiento de la nocicepción. De esta manera se puede asociar que, en algunas condiciones patológicas como el dolor de miembro fantasma, se pierde la transmisión nociceptiva periférica pero la percepción del dolor se mantiene.

La manera en que se comporta el receptor de glicina en procesos de dolor crónico podría ser principalmente relacionada con el aumento de receptores de glicina con subunidad β auxiliar. Ya que las subunidades α estarían ligadas mayoritariamente a dolor agudo, pues estudios electrofisiológicos han demostrado que la fosforilación del receptor de glicina homomérico $\alpha 3$ GlyRs determina consistentemente la sensibilización el dolor de tipo inflamatorio (155). De acuerdo con esto, otro estudio señala que el receptor de glicina $\alpha 3$ incrementa su expresión solo en contexto de dolor inflamatorio, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos especializados que regulan y modulan la expresión de los distintos tipos de receptores de glicina en los diferentes tipos de condiciones de dolor (156). Para resaltar aún más que los GlyR $\alpha 3$ no desarrollan un papel importante en el dolor crónico, otra publicación mostró que al utilizar ratones Knockout *Gla3*^{-/-} no había diferencias en el comportamiento doloroso entre estos y los ratones control después de la cirugía para inducir dolor neuropático (157). Además de los receptores de glicina que poseen la subunidad auxiliar β , otro tipo de GlyRs se han relacionado con el establecimiento del dolor neuropático. Es el caso del receptor de glicina homoméricos de subunidades $\alpha 2$ ($\alpha 2$ GlyR) en el cual se ha

visto un aumento de su expresión en el asta dorsal de la medula espinal en modelo de ratas después del dolor neuropático (144). Lo que indica que la subunidad β no es la única implicada en el proceso del dolor crónico neuropático.

Los hallazgos de este trabajo por sí solos, no logran establecer una relación directa y concreta entre la expresión de la subunidad β del receptor de glicina y el dolor crónico, sin embargo, si se pueden establecer una conexión entre ellos. Cabe destacar que esta relación no es necesariamente la que propone la hipótesis en cuestión. En parte, producto a la pandemia que está ocurriendo actualmente, no se ha podido obtener la cantidad de mediciones necesarias especialmente en el análisis de qPCR, ya que la condición ideal era medir la subunidad en amígdala central, sin embargo, los datos obtenidos aún son válidos y concuerdan con otros estudios realizados a pesar de que la medición de la expresión de la subunidad β , la principal razón del estudio, es más bien reciente y no se tienen muchos antecedentes. Debido a ello creo que estudios complementarios futuros son requeridos para conocer más acerca de la relación de la subunidad β auxiliar del receptor de glicina con el establecimiento y prolongación del dolor crónico. Es necesario también poder medir la proteína de la subunidad formada propiamente tal, por medio de un Western blot, en los distintos lugares en que se exprese el receptor de glicina y generar asociaciones más completas. Para en un futuro poder utilizar tal vez esta subunidad auxiliar como diana terapéutica alternativa para el manejo del dolor crónico.

9. CONCLUSIÓN

De acuerdo al resultado del estudio molecular se puede concluir que la subunidad β auxiliar del receptor de glicina aumenta su expresión después inducir dolor neuropático en ratas Sprague Dawley por medio de la cirugía con constricción del nervio ciático.

Por medio del enfoque de biología molecular y además los registros electrofisiológicos, los resultados de los experimentos de esta tesis sugieren que la subunidad β auxiliar del receptor de glicina posee un rol en el establecimiento del dolor crónico de tipo neuropático. Esto ya que la expresión de la subunidad β aumenta en dolor neuropático y a su vez disminuye la amplitud de la corriente neuronal del receptor de glicina en las muestras de amígdala en este tipo de dolor. Sin embargo, no se comprueba que la hipótesis sea correcta, debido a las distintas variables involucradas y los distintos tipos de muestra en la que se realizaron los estudios.

Los resultados sugieren que esta subunidad juega un rol en la sensibilización central del dolor. Sin embargo, aún faltan estudios que comprueben aun en más detalle como interacciona esta subunidad con el resto del receptor y otras moléculas.

Con una mirada hacia al futuro se puede postular a esta proteína como una posibilidad de desarrollar fármacos que la utilicen de diana farmacológica como un potencial analgésico al intervenir con su acción y así tratar el dolor crónico y sus patologías asociadas. Sin embargo, se recalca la importancia de realizar estudios futuros que comprueben aun en más detalle la interacción esta subunidad con el resto del receptor de glicina y las moléculas con las que interacciona.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Harold Merskey D, Robert G. Addison M, Aleksandar Beric, MD Ds, Helmut Blumberg M, Nikolai Bogduk, MD P, Jorgen Boivie M, et al. Classification of Chronic Pain, Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms. 2nd Edition. Vol. 23, Anaesthesia and Intensive Care. 1995. 527–527 p.
2. Bilbeny N. Revista médica clínica las condes. 2019;30(6):397–406.
3. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*. 2009;139(2):267–84.
4. Zeilhofer HU. Cellular and Molecular Life Sciences The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:2027–35.
5. Legendre P. The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(5–6):760–93.
6. Lynch JW. Neuropharmacology Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*. 2009;56(1):303–9.
7. Melzack R, Katz J. Plasticidad y dolor: papel del asta posterior. Wall y Melzack Tratado del dolor. 2007;296–304.
8. Zegarra Piérola JW. Bases fisiopatológicas del dolor. 2007;24(2).
9. Steeds CE. The anatomy and physiology of pain. *Surg (United Kingdom)*. 2016;34(2):55–9.
10. Argoff C. Mechanisms of pain transmission and pharmacologic management. *Curr Med Res Opin*. 2011;27(10):2019–31.
11. Gohar O, Ph D. Contribution of Ion Channels in Pain Sensation. 2005;(19):9–13.
12. Vanderah TW. Pathophysiology of Pain. *Med Clin North Am*. 2007;91(1):1–12.
13. Das V. An introduction to pain pathways and pain “targets.” *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;131(12):1–30.
14. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: The sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*. 2010;120(11):3760–72.
15. Zhuo M. Cortical excitation and chronic pain. *Trends Neurosci*. 2008;31(4):199–207.
16. Cata JP, Weng HR, Chen JH, Dougherty PM. Altered discharges of spinal wide dynamic range neurons and down-regulation of glutamate transporter expression in rats with paclitaxel-induced hyperalgesia. *Neuroscience*. 2006;138(1):329–38.
17. McCarberg B, Peppin J. Pain Pathways and Nervous System Plasticity: Learning and Memory in Pain. *Pain Med (United States)*. 2019;20(12):2421–37.

18. Price DD. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. *Science* (80-). 2000;288(5472):1769–72.
19. Bushnell MC, Čeko M, Low LA. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(7):502–11.
20. Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain*. 2005;9(4):463.
21. Liang M, Mouraux A, Hu L, Iannetti GD. Primary sensory cortices contain distinguishable spatial patterns of activity for each sense. *Nat Commun*. 2013;4(May).
22. Chen QL, Heinricher MM. Descending Control Mechanisms and Chronic Pain. *Curr Rheumatol Rep*. 2019;21(5):1–7.
23. Yang S, Chang MC. Chronic pain: Structural and functional changes in brain structures and associated negative affective states. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13).
24. Wall PD, Gutnick M. Properties of afferent nerve impulses originating from a neuroma. *Nature*. 1974;248:740.
25. Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. NIH Public Access Author Manuscript. 2010;214–25.
26. Descalzi G, Ikegami D, Ushijima T, Nestler E, Zachariou V, Narita M. Epigenetic Mechanisms of Chronic Pain Chronic pain: a major clinical and socioeconomic problem. HHS Author Manuscripts. 2015;38(4):237–46.
27. Pablo Galaz, Nicole Cespedes, Manuel Jorquera, Adriana Treuer, María José Ponce JU, Mariqueo, Cesar Coronado TT. Glycine Receptor β Subunit: A Critical Target for Pain Sensitization.
28. Tracey I, Mantyh PW. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. *Neuron*. 2007;55(3):377–91.
29. Eccles JC. THE SYNAPSE : From Electrical to Chemical Transmission. 1982;(1879):325–39.
30. Moss SJ, Smart TG. CONSTRUCTING INHIBITORY SYNAPSES. 2001;2(April):240–50.
31. Lynch JW. Molecular Structure and Function of the Glycine Receptor Chloride Channel. 2021;1051–95.
32. Wässle H, Heinze L, Ivanova E, Majumdar S, Weiss J, Harvey RJ. Glycinergic transmission in the mammalian retina. 2009;2(July):1–12.
33. Harvey R, Depner U, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, et al. GlyR $\alpha 3$: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* (80-). 2004;304:884–7.

34. Lynch JW, Zhang Y, Talwar S. Glycine Receptor Drug Discovery [Internet]. 1st ed. Ion Channels DownUnder. Elsevier Inc.; 2018. 1–29 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apha.2017.01.003>
35. Wu S, Cheng Y, Gouaux E. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. 2015;
36. Kumar A, Basak S, Chakrapani S, Rao S, Gicheru Y, Mayer ML, et al. full-length glycine receptor in lipid nanodiscs. *Nat Commun* [Internet]. (2020):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17364-5>
37. Weltzien F, Puller C, Sullivan GAO, Paarmann I, Betz H. Distribution of the Glycine Receptor β -Subunit in the Mouse CNS as Revealed by a Novel Monoclonal Antibody. 2012;3981:3962–81.
38. Malosio M, Marqueze- B, Pouey A, Kuhse J, Betz H. mRNAs in the adult and developing rat brain. 1991;10(9):2401–9.
39. Bormann J, Rundstrom N. Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and. 1993;12(10):3729–37.
40. Specht CG, Izeddin I, Rodriguez PC, Beheiry M El, Rostaing P, Darzacq X, et al. Article Quantitative Nanoscopy of Inhibitory Synapses : Counting Gephyrin Molecules and Receptor Binding Sites. *Neuron* [Internet]. 2013;79(2):308–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.013>
41. Meyer G, Kirsch J, Betz H, Langosch D. Identification of a Gephyrin Binding Motif on the Glycine Receptor ρ Subunit. 1995;15:563–72.
42. Rajendra S, Vandenberg RJ, Pierce KD, Cunningham AM, French PW, Barry PH, et al. The unique extracellular disulfide loop of the glycine receptor is a principal ligand binding element. *EMBO J*. 1995;14(13):2987–98.
43. Görne-Tschelnokow U, Strecker A, Kaduk C, Naumann D, Hucho F. The transmembrane domains of the nicotinic acetylcholine receptor contain α -helical and β structures. *EMBO J*. 1994;13(2):338–41.
44. Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*. 2003;423(6943):949–55.
45. Spencer RH, Rees DC. The α -helix and the organization and gating of channels. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2002;31(74):207–33.
46. Baer K, Waldvogel HJ, Faull RLM, Rees MI. Localization of glycine receptors in the human forebrain, brainstem, and cervical spinal cord: An immunohistochemical review. *Front Mol Neurosci*. 2011;2(NOV):1–11.
47. Coote JH. The organisation of cardiovascular neurons in the spinal cord. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1988;110:147–285.
48. Lin HH, Wu SY, Lai CC, Dun NJ. GABA- and glycine-mediated inhibitory postsynaptic potentials in neonatal rat rostral ventrolateral medulla neurons in vitro. *Neuroscience*. 1997;82(2):429–42.

49. Overstreet LS, Westbrook GL. Synapse density regulates independence at unitary inhibitory synapses. *J Neurosci*. 2003;23(7):2618–26.
50. Houston CM, Bright DP, Sivilotti LG, Beato M, Smart TG. Intracellular chloride ions regulate the time course of GABA-mediated inhibitory synaptic transmission. *J Neurosci*. 2009;29(33):10416–23.
51. Brown AG. Review Article the Dorsal Horn of the Spinal Cord. *Q J Exp Physiol*. 1982;67(2):193–212.
52. Chhabra A, Ahlawat S, Belzberg A, Andreseik G. Peripheral nerve injury grading simplified on MR neurography: As referenced to Seddon and Sunderland classifications. *Indian J Radiol Imaging*. 2014;24(3):217–24.
53. Menorca RMG, Fussell TS, Elfar JC. Peripheral Nerve Trauma: Mechanisms of Injury and Recovery. *Hand Clin*. 2013;29(3):317–30.
54. Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*. 2006;52(1):77–92.
55. Eglen RM. 4 Muscarinic Receptor Subtype Pharmacology and Physiology. 2005;43(1):105–36.
56. Giniatullin R. Ion Channels of Nociception. 2020;(Figure 1):1–6.
57. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. 2001;413(September):203–10.
58. Stevens CEB, Park G, Abington G, Cb C. Recent advances in targeting ion channels to treat chronic pain. 2018;2133–7.
59. Jänig W. Autonomic Nervous System and Pain. In: *SCIENCE OF PAIN*. 2008. p. 193–225.
60. Jänig W, Levine JD. Autonomic–endocrine–immune interactions in acute and chronic pain. In: *Wall and Melzack’s Textbook of Pain*. 2006. p. 205–18.
61. Jaenig W, Baron R. Sympathetic Nervous System and Pain. *Encyclopedia of Pain*. 2013.
62. Stanton-Hicks M, Jänig W, Hassenbusch S, Haddock JD, Boas R, Wilson P. Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy. *Pain*. 1995;63(1):127–33.
63. Mosby. *Diccionario Mosby Pocket de Medicina, Enfermería y Ciencias de la Salud*. 1999.
64. Chawla A. On Axon-Axon Interaction via Currents and Fields. 2017;(July).
65. Gatt MT. Chronic Postsurgical Pain. Vol. 35, *Annual Review of Nursing Research*. 2014. 143–148 p.
66. Watkins LR, Hutchinson MR, Ledebor A, Wieseler-Frank J, Milligan ED, Maier SF. Glia as the “bad guys”: Implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain Behav Immun*. 2007;21(2):131–46.

67. Watkins LR, Hutchinson MR, Johnston IN, Maier SF. Glia: Novel counter-regulators of opioid analgesia. *Trends Neurosci.* 2005;28(12):661–9.
68. Stollg G, Jander S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol.* 1999;58(3):233–47.
69. Hains BC, Waxman SG. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2006;26(16):4308–17.
70. Calvo M, Bennett DLH. The mechanisms of microgliosis and pain following peripheral nerve injury. *Exp Neurol* [Internet]. 2012;234(2):271–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.08.018>
71. Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett* [Internet]. 2014;565:30–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.071>
72. Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: Costs and benefits. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1077–98.
73. Rolls A, Shechter R, Schwartz M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(3):235–41.
74. Vernadakis A. Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol.* 1996;49(3):185–214.
75. Colburn RW, DeLeo JA. The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Brain Res Bull.* 1999;49(6):419–27.
76. Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain.* 2005;114(1–2):149–59.
77. Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain.* 2005;115(1–2):71–83.
78. Oliet SHR, Panatier A, Piet R, Mothet JP, Poulain DA, Theodosis DT. Neuron-glia interactions in the rat supraoptic nucleus. *Prog Brain Res.* 2008;170(08):109–17.
79. Roh DH, Yoon SY, Seo HS, Kang SY, Han HJ, Beitz AJ, et al. Intrathecal injection of carbenoxolone, a gap junction decoupler, attenuates the induction of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* [Internet]. 2010;224(1):123–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.03.002>
80. Zündorf G, Kahlert S, Reiser G. Gap-junction blocker carbenoxolone differentially enhances NMDA-induced cell death in hippocampal neurons and astrocytes in co-culture. *J Neurochem.* 2007;102(2):508–21.
81. Mika J, Osikowicz M, Rojewska E, Korostynski M, Wawrzczak-Bargiela A, Przewlocki R, et al. Differential activation of spinal microglial and astroglial cells in

- a mouse model of peripheral neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2009;623(1–3):65–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.09.030>
82. Mika J, Rojewska E, Makuch W, Przewlocka B. Minocycline reduces the injury-induced expression of prodynorphin and pronociceptin in the dorsal root ganglion in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* [Internet]. 2010;165(4):1420–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.064>
 83. Parente F, Cernuschi M, Antinori S, Lazzarin A, Moroni M, Fasan M. Severe Abdominal Pain in Patients with AIDS : Frequency , Clinical Aspects , Causes , and Outcome. 1994;1985(June 1985).
 84. SANDKÜHLER J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. 2009;707–58.
 85. Devor M. Response of nerves to injury in relation to neuropathic pain. In: Wall, P.D. and Melzack, R. E, editor. *Textbook of pain*. p. 905–27.
 86. Koltzenburg M, Wall PD, McMahon SB. Does the right side know what the left is doing? *Trends Neurosci*. 1999;22(3):122–7.
 87. Hatton GI. Astroglial modulation of neurotransmitter/peptide release from the neurohypophysis: Present status. *J Chem Neuroanat*. 1999;16(3):203–21.
 88. Zeilhofer HU, Wildner H, Yévenes GE. Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev*. 2012;92(1):193–235.
 89. Lee KY, Ratté S, Prescott SA. Las neuronas excitadoras están más desinhibidas que las neuronas inhibitoras por la desregulación del cloruro en el asta dorsal espinal. No Title. 2019.
 90. Li H, Li X, Feng Y, Gao F, Kong Y, Hu L. Deficits in ascending and descending pain modulation pathways in patients with postherpetic neuralgia. *Neuroimage*. 2020;221(May).
 91. Monconduit L, Villanueva L. The lateral ventromedial thalamic nucleus spreads nociceptive signals from the whole body surface to layer I of the frontal cortex. *Eur J Neurosci*. 2005;21(12):3395–402.
 92. Gustin SM, Peck CC, Wilcox SL, Nash PG, Murray GM, Henderson LA. Different Pain , Different Brain : Thalamic Anatomy in Neuropathic and Non-Neuropathic Chronic Pain Syndromes. 2011;31(16):5956–64.
 93. Potter LE, Paylor JW, Suh JS, Tenorio G, Caliaiperumal J, Colbourne F, et al. Altered excitatory-inhibitory balance within somatosensory cortex is associated with enhanced plasticity and pain sensitivity in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2016;13(1):1–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-016-0609-4>
 94. Kumazawa T, Perl ER. Excitation of marginal and substantia gelatinosa neurons in the primate spinal cord: Indications of their place in dorsal horn functional

- organization. *J Comp Neurol*. 1978;177(3):417–34.
95. Hori Y, Endo K, Takahashi T. Long-lasting synaptic facilitation induced by serotonin in superficial dorsal horn neurones of the rat spinal cord. *J Physiol*. 1996;492(3):867–76.
 96. Todd AJ. Cells in laminae III and IV of rat spinal dorsal horn receive monosynaptic primary afferent input in lamina II. *J Comp Neurol*. 1989;289(4):676–86.
 97. Arvidsson J, Ygge J, Grant G. Cell loss in lumbar dorsal root ganglia and transganglionic degeneration after sciatic nerve resection in the rat. *Brain Res*. 1986;
 98. Boyce-Rustay JM, Honore P, Jarvis MF. *Animal Models of Acute and Chronic Inflammatory and Nociceptive Pain*. *Emerg Strateg Treat neuropathic pain* [Internet]. 2010;617(2):41–55. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-60327-323-7>
 99. Kohama I, Ishikawa K, Kocsis JD. Synaptic reorganization in the substantia gelatinosa after peripheral nerve neuroma formation: Aberrant innervation of lamina II neurons by A β afferents. *J Neurosci*. 2000;20(4):1538–49.
 100. Okamoto M, Baba H, Goldstein PA, Higashi H, Shimoji K, Yoshimura M. Functional reorganization of sensory pathways in the rat spinal dorsal horn following peripheral nerve injury. *J Physiol*. 2001;532(1):241–50.
 101. Kleim JA, Barbay S, Nudo RJ. Functional reorganization of the rat motor cortex following motor skill learning. *J Neurophysiol*. 1998;80(6):3321–5.
 102. Calford MB, Tweedale R. Immediate and chronic changes in responses of somatosensory cortex in adult flying-fox after digit amputation. Vol. 332, *Nature*. 1988. p. 446–8.
 103. Borsook D, Becerra L, Fishman S, Edwards A, Jennings CL, Stojanovic M, et al. Acute plasticity in the human somatosensory cortex following amputation. *Neuroreport*. 1998;9(6):1013–7.
 104. Friel KM, Nudo RJ. Recovery of motor function after focal cortical injury in primates: Compensatory movement patterns used during rehabilitative training. *Somatosens Mot Res*. 1998;15(3):173–89.
 105. Sanes JN, Suner S, Donoghue JP. Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats II. Rapid reorganization following motor nerve lesions. *Exp Brain Res*. 1990;79(3):492–503.
 106. Merzenich MM, Kaas JH, Wall J, Nelson RJ, Sur M, Felleman D. Topographic reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 in adult monkeys following restricted deafferentation. *Neuroscience*. 1983;8(1):33–55.
 107. Florence SL, Taub HB, Kaas JH. Large-scale sprouting of cortical connections after peripheral injury in adult Macaque monkeys. *Science* (80-). 1998;282(5391):1117–21.
 108. Mohammed H, Hollis ER. Cortical Reorganization of Sensorimotor Systems and the

- Role of Intracortical Circuits After Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics*. 2018;15(3):588–603.
109. Bingel U, Quante M, Knab R, Bromm B, Weiller C, Büchel C. Subcortical structures involved in pain processing: Evidence from single-trial fMRI. *Pain*. 2002;99(1–2):313–21.
 110. Borsook D, Upadhyay J, Chudler EH, Becerra L. A key role of the basal ganglia in pain and analgesia - insights gained through human functional imaging. *Mol Pain*. 2010;6.
 111. Djaldetti R, Shifrin A, Rogowski Z, Sprecher E, Melamed E, Yarnitsky D. Quantitative measurement of pain sensation in patients with Parkinson disease. *Neurology*. 2004;62(12):2171–5.
 112. Cheon SM, Park MJ, Kim WJ, Kim JW. Non-motor off symptoms in parkinson's disease. *J Korean Med Sci*. 2009;24(2):311–4.
 113. Kristoffersen ES, Lundqvist C. Medication-overuse headache: Epidemiology, diagnosis and treatment. *Ther Adv Drug Saf*. 2014;5(2):87–99.
 114. Patterson V, Esmonde T. Comparison of the handling of neurological outpatient referrals by general physicians and a neurologist. 1993;154–8.
 115. Eggen AE. The Tromsø study: Frequency and predicting factors of analgesic drug use in a free-living population (12–56 years). *J Clin Epidemiol*. 1993;46(11):1297–304.
 116. Scher AI, Lipton RB, Stewart WF, Bigal M. Patterns of medication use by chronic and episodic headache sufferers in the general population: Results from the frequent headache epidemiology study. *Cephalalgia*. 2009;30(3):321–8.
 117. Radat F, Lanteri-Minet M. What is the role of dependence-related behavior in medication-overuse headache? *Headache*. 2010;50(10):1597–611.
 118. Scher AI, Rizzoli PB, Loder EW. Medication overuse headache An entrenched idea in need of scrutiny. *Neurology*. 2017;89:1296–304.
 119. Clifford J. Woolf, Zusman M. Central Sensitisation - a puntes. *Pain*. 2012;152(3 Supplemental):1–31.
 120. Schwedt TJ, Chong CD. Medication Overuse Headache: Pathophysiological Insights from Structural and Functional Brain MRI Research. *Headache*. 2017;57(7):1173–8.
 121. Norling L V., Ly L, Dalli J. Resolving inflammation by using nutrition therapy: Roles for specialized proresolving mediators. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2017;20(2):145–52.
 122. Serhan CN, Dalli J, Colas RA, Winkler JW, Chiang N. Protectins and Maresins: New Pro-Resolving Families of Mediators in Acute Inflammation and Resolution Bioactive Metabolome. *Bone* [Internet]. 2008;23(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>

123. Serhan CN, Chiang N, Dalli J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Semin Immunol* [Internet]. 2015;27(3):200–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.004>
124. Dalli J, Chiang N, Serhan CN. Identification of 14-series sulfido-conjugated mediators that promote resolution of infection and organ protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(44):E4753–61.
125. Lobo BWP, Lima CKF, Teixeira MS, Silva NLC, Takiya CM, Ramos MFS, et al. Fish oil attenuates persistent inflammatory pain in rats through modulation of TNF- α and resolvins. *Life Sci*. 2016;152:30–7.
126. Miller LR, Cano A. Comorbid Chronic Pain and Depression: Who Is at Risk? *J Pain* [Internet]. 2009;10(6):619–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2008.12.007>
127. Low LA. The impact of pain upon cognition: What have rodent studies told us? *Pain* [Internet]. 2013;154(12):2603–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2013.06.012>
128. Villemure C, Āeko M, Cotton VA, Bushnell MC. Insular cortex mediates increased pain tolerance in yoga practitioners. *Cereb Cortex*. 2014;24(10):2732–40.
129. Gabriel AF, Paoletti G, Seta D Della, Panelli R, Marcus MAE, Farabollini F, et al. Enriched environment and the recovery from inflammatory pain: Social versus physical aspects and their interaction. *Behav Brain Res* [Internet]. 2010;208(1):90–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.015>
130. Ulrich RS. View through a window may influence recovery from surgery. *Science* (80-). 1984;224(4647):420–1.
131. Diette GB, Lechtzin N, Haponik E, Devrotes A, Rubin HR. Distraction therapy with nature sights and sounds reduces pain during flexible bronchoscopy: A complementary approach to routine analgesia. *Chest* [Internet]. 2003;123(3):941–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.123.3.941>
132. Institute of Medicine (US) Committee on Advancing Pain Research, Care and E. *Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Research*. 2011;
133. Ministerio de Sanidad PS e I de E. *Unidad de tratamiento del dolor*. 2011;(July):115.
134. Asociación Latinoamericana de Cuidados Paliativos. *Uso de opioides en el tratamiento del dolor. Manual para Latinoamérica*. 2009. p. 1–112.
135. Hösl K, Reinold H, Harvey RJ, Müller U, Narumiya S, Zeilhofer HU. Spinal prostaglandin E receptors of the EP2 subtype and the glycine receptor $\alpha 3$ subunit, which mediate central inflammatory hyperalgesia, do not contribute to pain after peripheral nerve injury or formalin injection. *Pain*. 2006;126(1–3):46–53.
136. Payrits M, SÁghy É, Cseko K, Pohóczy K, Bölcskei K, Ernst D, et al. Estradiol sensitizes the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in pain responses.

- Endocrinology. 2017;158(10):3249–58.
137. Mariqueo TA, Amestica G, Pino J, Barra R, Stehberg J, Gonzalez W, et al. Sex differences in central inflammatory pain sensitization are associated with differential expression of glycine receptors and GLP-1 at the spinal cord. 2020;
 138. Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA). Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales. 2019 p. 1–59.
 139. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces d... [Pain. 1988] - PubMed result. Pain [Internet]. 1988;33:87–107. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6)
 140. Morton D, Griffiths P. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. Vet Rec. 1985 Apr;116(16):431–6.
 141. Pfaffl MW. The ongoing evolution of qPCR. Methods [Internet]. 2010;50(4):215–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.02.005>
 142. Pfaffl MW. Pfaffl-Nar-2001.Pdf. 2001;29(9):16–21.
 143. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J Neurosci Methods. 1994;53(1):55–63.
 144. Imlach WL, Bholra RF, Mohammadi SA, Christie MJ. Glycinergic dysfunction in a subpopulation of dorsal horn interneurons in a rat model of neuropathic pain. Sci Rep [Internet]. 2016;6(July):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep37104>
 145. Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. Eur J Pharmacol. 2001;429(1–3):23–37.
 146. Sandkühler J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. Physiol Rev. 2009;89(2):707–58.
 147. Mariqueo TA, Agurto A, Muñoz B, Martín LS, Fernández-pérez EJ, Murath P, et al. Effects of ethanol on glycinergic synaptic currents in mouse spinal cord neurons Effects of ethanol on glycinergic synaptic currents in mouse spinal cord neurons. 2014;(February):1940–8.
 148. Ikeda R. NMDA receptor-independent synaptic plasticity in the central amygdala in the rat model of neuropathic pain. 2007;127:161–72.
 149. Jiang H, Fang D, Kong L-Y, Jin Z-R, Cai J, Kang X-J, et al. Sensitization of neurons in the central nucleus of the amygdala via the decreased GABAergic inhibition contributes to the development of neuropathic pain-related anxiety-like behaviors in rats. Mol Brain. 2014 Dec;7(1):72.
 150. Cai YQ, Wang W, Paulucci-Holthausen A, Pan ZZ. Brain circuits mediating opposing effects on emotion and pain. J Neurosci. 2018;38(28):6340–9.
 151. Solorza J, Oliva CA, Castillo K, Amestica G, Maldifassi MC, Lopez X, et al. The

hyperalgesic effect of Interleukin-1 α is mediated by interaction with Auxiliary Glycine Receptor α subunit at the Central Nervous System.

152. Patrizio A, Renner M, Pizzarelli R, Triller A, Specht CG. Alpha subunit-dependent glycine receptor clustering and regulation of synaptic receptor numbers. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-11264-3>
153. Meier J, Meunier-durmort C, Forest C, Triller A VC. Formation of glycine receptor clusters and their accumulation at synapses. *Cell Sci.* 2000;
154. Delaney AJ, Esmaili A, Sedlak PL, Lynch JW, Sah P. Differential expression of glycine receptor subunits in the rat basolateral and central amygdala. *Neurosci Lett.* 2010;469(2):237–42.
155. Acuña MA, Yévenes GE, Ralvenius WT, Benke D, Di Lio A, Lara CO, et al. Phosphorylation state-dependent modulation of spinal glycine receptors alleviates inflammatory pain. *J Clin Invest.* 2016;126(7):2547–60.
156. TA M. The Expression of Glycine Receptor α 3 Subunit is Differentially Regulated in Different Types of Pain. *J Neurol Neurobiol.* 2020;6(2):8–11.
157. Harvey VL, Caley A, Müller UC, Harvey RJ, Dickenson AH. A selective role for α 3 subunit glycine receptors in inflammatory pain. *Front Mol Neurosci.* 2009;2(NOV):1–7.