



Universidad Nacional Autónoma de México.

Maestría en Ciencias (Neurobiología)

Facultad de Psicología / Facultad de Medicina, UNAM.

Modulación de la expresión de la proteína conexina 36 (Cx36) en ganglios de la raíz dorsal inducida por dolor neuropático.

Tesis que para optar por el grado de Maestro en Ciencias

Presenta:

Médico Cirujano Elías Ríos Muñiz.

Tutor Responsable.

Dra. Elia Martha Pérez Armendáriz. Departamento de Biología Celular y Tisular y Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina, UNAM.

Miembros de Comité Tutor:

Dr. Miguel Condes Lara. Departamento de Neurobiología del desarrollo y Neurofisiología del Instituto de Neurobiología, UNAM.

Dr. Rodolfo Delgado Lezama. Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, del CINVESTAV, IPN.

Ciudad Universitaria. CD. MX, 2021.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Elías Ríos Muñoz, cuyo título es: “Modulación de la expresión de la proteína conexina 36 (Cx36) en ganglios de la raíz dorsal inducida por dolor neuropático” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. José Gerardo Rojas Piloni.

\_\_\_\_\_

Secretario (Tutor)

Dra. Elía Martha Pérez Armendáriz.

\_\_\_\_\_

Vocal

Dr. Francisco Salvador Mercado Aca.

\_\_\_\_\_

Suplente

Dr. Rodolfo Delgado Lezama.

\_\_\_\_\_

Suplente

Dra. Graciela Agar Cárdenas Hernández.

\_\_\_\_\_

Aprobado por el Comité Académico

\_\_\_\_\_

Dra. Maricela Luna Muñoz.

Coordinadora del Programa.

## **Agradecimientos.**

Quiero dedicar esta sección para agradecer de manera muy sincera el apoyo para el desarrollo de este trabajo:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Becario No. 718782.

A la **Dra. E. Martha Pérez Armendáriz**, jefa del Laboratorio de sinapsis eléctricas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por proveer las ideas, asesoría, financiamiento, recursos y espacio para la realización de los experimentos. Al personal de este, en particular al **Dr. Israel Morales Reyes** por la asesoría general y estadística a este trabajo.

A la **Dra. Cristina Coronel Cruz** por su valiosa asesoría técnica para el aprendizaje y realización de metodologías para el desarrollo del proyecto. A **Lourdes Cruz Miguel** por su apoyo para la captura de experimentos de inmunofluorescencia, así como el manejo del equipo de laboratorio.

Al **Dr. Rodolfo Delgado Lezama**, del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, por la asesoría científica y asesoría técnica directa para montar un modelo experimental de dolor neuropático en rata inducido por ligamiento de nervios espinales. Por la aportación de los animales utilizados en este estudio y el equipo necesario para evaluar su sensibilidad al dolor. Finalmente: por sus valiosos comentarios y el seguimiento de resultados a lo largo del desarrollo de este proyecto.

Al **Dr. Miguel Condes Lara**, del Departamento Neurobiología del desarrollo y Neurofisiología del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Por su asesoría científica y valiosos comentarios al modelo experimental de dolor utilizado en este proyecto, a los resultados obtenidos, así como a su análisis e interpretación teórica.

A la **Mtra. Daniela Rodríguez Montaña** de la Unidad de Histología del Instituto de Fisiología, UNAM. por los servicios histológicos para el manejo y corte de muestras incluidas en parafina.

A la **Ing. Abigail Ortega Valdivia** por su colaboración para el desarrollo del programa para la pseudo cuantificación en forma automática el número e intensidad de partículas fluorescentes de las imágenes obtenidas por microscopia confocal en las muestras experimentales y controles.

A la **Dra. Karina Jiménez** de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI), unidad de Microscopia. Facultad de Química. UNAM por el apoyo en el uso del servicio de adquisición de imágenes utilizando la microscopia confocal para adquisición de las imágenes.

Al **Dr. Vadim Pérez Koldenkova** del Laboratorio Nacional de Microscopía avanzada. Centro Médico Nacional. Siglo XXI, IMSS. Por el uso del servicio de adquisición de imágenes utilizando la microscopia confocal.

Al **Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela** y **Lic. Teresita de Jesús Pérez Cruz** del Servicio Biblioteca. UNAM, Juriquilla y al Lic. Javier Diaz, de la Facultad de Medicina, UNAM. por el apoyo en la consulta de material bibliográfico.

A los ingenieros **Ma. De Lourdes Lara Anaya** y **Gustavo Barradas Culebro**, por su apoyo en el servicio de videoconferencia que permitieron la realización de reuniones y planeación de exámenes a distancia.

Compañeros, profesores, amigos y familiares por su constante apoyo y motivación para continuar mi desarrollo profesional y académico.

## **Dedicatoria.**

A cada nueva experiencia, con cada aprendizaje y cada paso que doy solo hace más difícil el encontrar las palabras para agradecer la compañía que he tenido a lo largo de mi vida. Sin embargo, cada día son más necesarias.

Mis padres, hermanos, amigos y cada integrante de mi familia quienes han sido testigos de los procesos que hoy me tienen aquí. Este trabajo y cada uno de los aspectos de mi vida tienen una dedicatoria especial para ustedes.

A mi madre. Gracias por demostrarme la fuerza, la valentía y el amor con el que se debe afrontar la vida. Solo puedo admirar e intentar replicar la determinación con la que has concretado todos tus logros.

A mi padre. Gracias por demostrarme la importancia del cariño y de una compañía sincera en los momentos más difíciles, el afrontar con fe y madurez cada día.

A mis hermanos, quienes con su ejemplo y compañía me han ayudado a encontrar motivación en momentos complicados. A pesar de nuestras diferencias, a su lado no encuentro soledad.

Mis amigos, quienes han estado conmigo compartiendo grandes momentos, gracias por los consejos, las experiencias y seguir acompañándome a lo largo de los años que hemos mantenido esta amistad, cada una de las personas aquí mencionadas me han ayudado y permitido ser quien soy el día de hoy. Cada uno de mis profesores con quienes tuve la dicha de compartir conocimientos, experiencias, momentos y motivaciones. Gran parte de este camino ha sido gracias a su empeño, enseñanzas y consejos. Puedo ver que la educación nos brinda esa capacidad de entender que el ser mejor cada día no parte de una obligación si no de una maravillosa oportunidad.

Hoy más que nunca me siento como fruto de todas esas enseñanzas y solo puedo agradecer y valorar la importancia de haber crecido con el cobijo y el amor que me brindaron en cada momento.

Somos lo que hacemos con lo que han hecho de nosotros.

## **RESUMEN.**

Las proteínas conexas forman canales intercelulares que permiten el intercambio directo de iones y metabolitos de bajo peso molecular entre células adyacentes. Los ganglios de la raíz dorsal (GRD) están formados principalmente por neuronas y células gliales satélites (CGS). El dolor neuropático, inducido por un daño mecánico a las fibras aferentes incrementa la comunicación intercelular dentro del GRD. Previamente identificamos que la proteína conexina 36 (Cx36) se expresa en neuronas y CGS de los GRD lumbares. Aquí, evaluamos el impacto de la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 en la expresión y distribución celular de la Cx36 en células de GRDL4 y GRDL5 tanto experimental como los GRD4 y GRD5 de ratas con cirugía simulada o sham. **MÉTODOS:** Se generaron dos grupos de ratas: un grupo de animales sham (n=10) y otro con dolor neuropático (n=12) inducido por la ligadura de los nervios espinales L5 y L6. En ambos se evaluó el umbral de retiro de pata con filamentos de Von Frey por 21 días. Posteriormente los DRG fueron disecados, fijados en paraformaldehído e incluidos en parafina. Los cortes del DRG lumbares ya referidos se incubaron con anticuerpo anti-Cx36 y se analizaron por estudios de inmunofluorescencia (IF) analizándose por microscopía confocal y cuantificando la fluorescencia total (FT) del corte utilizando un software desarrollado a través de la plataforma de programación de MATLAB. **RESULTADOS:** Se encontró una reducción significativa en el umbral de retiro de la pata en las ratas con ligadura de los nervios espinales, pero no en el grupo sham o de cirugía simulada ( $p < 0.001$ ). En ambos grupos la marca Cx36-IF se localizó en las neuronas, fibras y CGS de todos los GRL estudiados. Asimismo se encontró un incremento significativo en la densidad de puntos Cx36-IF positivos/ $\mu\text{m}^2$  (media y la SD) en secciones de los GRD5 experimentales ( $0.447 \pm 0.19$ ; n=4) con respecto a la de los ganglios control, que incluyeron a los GRDL4 de las ratas experimentales ( $p=0.126 \pm 0.04$ , n=3), así como a los GRDL5 ( $p=0.028 \pm 0.01$ , n=3) y GRDL4 ( $p=0.027 \pm 0.002$ , n=3) de los animales sham. **CONCLUSIÓN:** El daño producido por la ligadura de los nervios espinales induce un aumento en la expresión de Cx36 en las neuronas sensoriales y posiblemente en las CGS del GRD.

## **SUMMARY.**

Connexin proteins form intercellular channels that enable the direct exchange of ions and low molecular weight metabolites between adjacent cells. Dorsal root ganglia (DRG) are mainly formed of neurons and glial satellite cells (GSC). Neuropathic pain, by mechanical damage to the afferent fibers, increase intercellular communication in GSC. Previously we identified that connexin 36 (Cx36) protein is expressed in lumbar DRGL neurons and GSC. Here, we evaluate the impact of spinal nerve ligation on the expression and cellular distribution of Cx36 in DRGL cells. **METHODS:** Two groups of rats were generated: a control (n=10) and an experimental group with neuropathic pain (n=12) secondary to the ligation of L5 and L6 spinal nerves. Both groups were measured their paw withdrawal threshold at twenty-one days after the surgical procedure. The DRGs L4 and L5 were micro dissected and fixed in paraformaldehyde. Then, the sections of DRG were incubated with an anti-Cx36 antibody for immunofluorescence (IF) studies. IF was analyzed by confocal microscopy and total fluorescence (FT) was quantified using a software developed in the programming platform MATLAB. **RESULTS:** A sustained and significant increase in pain mechanic allodynia in experimental group with a decrease of their paw withdrawal threshold. This change was not observed in sham group ( $p < 0.001$ ). Cx36-IF labeling was localized to DRG neurons, fibers and SGC in both groups. A significant increase was found in the density of Cx36-IF dots /  $\mu\text{m}^2$  (mean and SD) recorded in the total section of GRDL5 experimental ( $0.447 \pm 0.19$ , n=4) sections than in control ganglia: GRDL4 experimental ( $0.126 \pm 0.04$ , n=3) and in GRDL5 ( $0.028 \pm 0.01$ , n=3) y GRDL4 ( $p=0.027 \pm 0.002$ , n=3) of the sham groups ( $p= 0.0119$ ). **CONCLUSION:** An increased expression of Cx36 in DRGL neurons was induced by damaging afferents fibers. The possible implications of this finding are discussed.



## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	3
DEDICATORIA.....	5
<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>7</b>
LISTA DE TABLAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIACIONES.....	11
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
1.1. DEFINICIÓN DE DOLOR Y SU IMPORTANCIA EN SALUD.....	13
1.2 ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	14
1.3. DESCRIPCIÓN DE LAS VÍAS SENSORIALES.....	15
1.4 DOLOR AGUDO, CRÓNICO Y CLASIFICACIÓN.....	23
1.5. DOLOR NEUROPÁTICO.....	24
1.6. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DEL DOLOR NEUROPÁTICO.....	24
1.7. MECANISMOS FISIOLÓGICOS Y MOLECULARES QUE INTERVIENEN EN LA GENERACIÓN DE DOLOR NEUROPÁTICO.....	25
1.7.1. <i>Actividad ectópica espontánea</i> .....	27
1.7.2. <i>Sensibilización Periférica</i> .....	27
1.8.3. <i>Mecanismos espinales que facilitan la actividad eléctrica neuronal</i> .....	29
1.7.4. <i>Modificaciones en los mecanismos inhibitorios de las neuronas de proyección</i> .....	31
1.7.5. <i>Participación de Células Gliales en la nocicepción</i> .....	32
1.7.6. <i>Remodelación de Circuitos Espinales</i> .....	36
1.8. MORFOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA DEL GRD.....	37
1.9. UNIONES COMUNICANTES (UC).....	40
1.9.1. <i>Conexina 36</i> .....	42
<b>2. ANTECEDENTES INMEDIATOS.....</b>	<b>44</b>
2.1. SINCRONIZACIÓN PARACRINA POR K <sup>+</sup> ; DESPOLARIZACIÓN CRUZADA DENTRO DE GRD.....	44
2.2. LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR DIRECTA ES MEDIADA POR UC EN EL GRD.....	45

2.3 CAMBIOS EN LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR ASOCIADA A PROCESOS DE DOLOR. ....	45
<b>3. JUSTIFICACIÓN. ....</b>	<b>47</b>
<b>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN. ....</b>	<b>48</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>48</b>
<b>6. OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
6.1 OBJETIVO GENERAL. ....	48
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	49
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
7.1 SUJETOS. ....	49
7.2 MODELO DE DOLOR NEUROPÁTICO. ....	50
7.3 VALORACIÓN CLÍNICA DE LA GENERACIÓN DE DOLOR. ....	50
7.4 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS. ....	54
7.5 ESTUDIOS INMUNOFLUORESCENCIA (IF).....	54
7.6 ADQUISICIÓN DE IMÁGENES CON MICROSCOPIA CONFOCAL. ....	55
7.7. PSEUDO CUANTIFICACIÓN DE FLUORESCENCIA. ....	56
7.8 MEDICIÓN DE FLUORESCENCIA INDIVIDUAL EN NEURONAS. ....	58
7.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	59
<b>8. RESULTADOS. ....</b>	<b>59</b>
8.1 SE DESARROLLÓ ALODINIA MECÁNICA EN LOS ANIMALES EXPERIMENTALES. ....	59
8.2 CAMBIOS EN LA DISTRIBUCIÓN DE LA MARCA DE LA CX36 EN LOS GRD CON LIGAMIENTO DE LOS NERVIOS ESPINALES. ....	60
8.3 INCREMENTO EN LA FLUORESCENCIA TOTAL REGISTRADA EN SECCIONES DE GRDL5 DE LOS ANIMALES CON LIGACIÓN DE LOS NERVIOS ESPINALES L5 Y L6. ....	73
<b>9. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>77</b>
9.1 MODELO DE DOLOR Y MANIFESTACIONES CONDUCTUALES. ....	77
9.2 DISTRIBUCIÓN DE LA MARCA INMUNOFLUORESCENTE CONTRA LA PROTEÍNA CX36 EN LOS COMPONENTES CELULARES DE GRD. ....	78
9.2.1 Somas neuronales.....	78
9.2.2 Fibras nerviosas. ....	79

9.2.3 Células gliales satélite.....	80
9.2.3 Núcleos celulares.....	82
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>83</b>
<b>11. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.....</b>	<b>84</b>
<b>12. REFERENCIAS.....</b>	<b>85</b>

**LISTA DE TABLAS.**

---

Tabla I. ....	Pág. 26
Tabla II. ....	Pág. 43
Tabla III. ....	Pág. 61
Tabla IV. ....	Pág. 74
Tabla V. ....	Pág. 76

---

**LISTA DE FIGURAS.**

---

Figura 1. ....	Pág. 18
Figura 2. ....	Pág. 19
Figura 3. ....	Pág. 22
Figura 4. ....	Pág. 28
Figura 5. ....	Pág. 29
Figura 6. ....	Pág. 30
Figura 7. ....	Pág. 32
Figura 8. ....	Pág. 35
Figura 9. ....	Pág. 36
Figura 10. ....	Pág. 37
Figura 11. ....	Pág. 38
Figura 12. ....	Pág. 43
Figura 13. ....	Pág. 43
Figura 14. ....	Pág. 52
Figura 15. ....	Pág. 52
Figura 16. ....	Pág. 53
Figura 17. ....	Pág. 53
Figura 18. ....	Pág. 55
Figura 19. ....	Pág. 58
Figura 20. ....	Pág. 61

---

---

Figura 21. ....	Pág. 62
Figura 22. ....	Pág. 67
Figura 23. ....	Pág. 68
Figura 24. ....	Pág. 69
Figura 25. ....	Pág. 70
Figura 26. ....	Pág. 71
Figura 27. ....	Pág. 72
Figura 28. ....	Pág. 73
Figura 29. ....	Pág. 76

---

**LISTA DE ABREVIACIONES.**

Abreviación	Significado
USAI	Unidad de Servicio y Apoyo a la Investigación.
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social.
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México.
CINVESTAV	Centro de investigación y estudios avanzados.
IPN	Instituto Politécnico Nacional.
IASP	International Association for the Study of Pain
ONU	Organización de las Naciones Unidas.
Cx36	Conexina 36.
Anti-Cx36	Anticuerpo vs Conexina 36.
Anti-Pan N	Anticuerpo Pan Neuronal Marker
UC	Unión comunicante.
GRD	Ganglio de raíz dorsal.
CGS	Células gliales satélite.
IF	Inmunofluorescencia.
IHC	Inmunohistoquímica.
FT	Fluorescencia total.
FB	Fluorescencia basal.
Fmax	Fluorescencia máxima.
AL	Amarillo Lucifer.
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1.
COX	Ciclo Oxigenasa.
LTP	Potenciación a largo plazo.
NMDA	N-metil D aspartato.
AMPA	3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico.
TTXr	Tetradotoxin resistente.

ATP	Adenosin trifosfato.
CCL2	Quimiocina atrayente de neutrófilos.
BDNF	Brain derived nerve factor / Factor neurotrófico derivado de cerebro.
KCC2	Cotransportador K <sup>+</sup> / Cl <sup>+</sup> .
IPSC	Inhibitory postsynaptic currents / Corriente postsináptica inhibitoria.
GABA	Ácido γ-aminobutírico.
Kda	Kilodaltons.
cDNA	ADN complementario.
CFA	Adyuvante Freund Completo.
LPS	Lipopolisacarido de E. Coli.
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial.
PSNL	Ligadura parcial del nervio ciático.
PFA	Para formaldehido.
SD	Desviación estándar.
ANOVA	Análisis de varianzas.

## **1. Introducción**

### **1.1. Definición de dolor y su importancia en salud.**

La definición de dolor más aceptada es la propuesta por la Asociación Internacional para el Estudios del Dolor (IASP, International Association for the Study of Pain por sus siglas en inglés), expresándola como una “experiencia sensorial y emocional desagradable, asociado o semejante al asociado con el daño tisular, real o potencial” (Raja, S.N., Carr, D.B., et al. 2020) la cual se manifiesta a través de reacciones fisiológicas y conductuales.

El dolor forma parte de un sistema de protección para el organismo, al señalar la presencia de daño o la posibilidad de desarrollarse. Su función primordial es la preservación de la integridad del sujeto (Basbaum, A.I., Bautista, D.M. 2009; Velazco, M. 2014). Siendo, además, una de las señales que advierte sobre la presencia de una enfermedad (López, J.R., Rivera-Largacha, S. 2018; Osterweis, M., Kleiman, A. 1987).

Sin embargo, cuando el estímulo que indujo el dolor agudo se torna persistente, tanto el sistema nervioso central como el periférico presentan cambios plásticos que potencian las señales de dolor, llevando a un estado de hipersensibilidad tanto periférica como central, lo que produce la condición de dolor crónico (Basbaum, A.I., Bautista, D.M. 2009). Afectando la calidad de vida de las personas que lo padecen, impactando negativamente en ámbitos sociales, físicos y psicológicos e interfiriendo con las capacidades del individuo para sus actividades diarias; tales como movilidad, aseo, alimentación, descanso e interacciones sociales (Brennan, F. 2007; Lohman, D., Schleifer, R. 2010).

La alta prevalencia del dolor crónico muestra la relevancia de su atención y comprensión. Ya que, del total de las visitas que buscan atención clínica primaria, ~ el 40% corresponden a la atención del dolor (Mäntyselkä, P. 2001). En materia económica, el costo de la atención del dolor asciende a \$560 - \$635 billones de dólares en Estados Unidos durante el año 2010, siendo este gasto mayor que el generados por otras enfermedades como cáncer, diabetes y padecimientos cardiacos (Gaskin, D.J. 2012). Lo anterior, subraya la importancia de ahondar en la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que lo determinan. Mientras que en el ámbito humanitario el acceso a los servicios de

salud es reconocido como un Derecho Fundamental de los Seres humanos dentro de la declaración universal de los derechos humanos (ONU, 1948). El estado se debe adherir a los compromisos legales relacionados al tratamiento de este problema de salud. Su incumplimiento constituye un acto de violación a los derechos humanos (Goldberg, D.S., McGee, S.J. 2011).

## **1.2 Estudios epidemiológicos.**

Dada su alta prevalencia, el dolor crónico tiene implicaciones fuertes en los costos de un sistema de atención a la salud. A nivel mundial, la prevalencia mundial de este problema está cercana a 25-29% (Harstall, C., Ospina, M. 2003; Goldberg, D.S., McGee, S.J. 2011). Mientras estudios europeos estimaron una prevalencia que oscila entre 19 y 31% (Breivik, H. Collett, B. 2006).

En México se carece de estudios epidemiológicos actualizados que documenten el impacto del dolor crónico dentro de la población. Si tomamos la información actual sobre la prevalencia mundial del padecimiento y la consideramos en la población mexicana (120 millones de mexicanos) (INEGI. 2015), es posible estimar que este padecimiento tendría una prevalencia del 25% en nuestra población y estaría presente en cerca de 30 millones de habitantes. Por datos del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), se estima que al menos 5% de los pacientes que acuden a atención médica en el primer nivel de atención pública, cuentan con el diagnóstico de dolor crónico (Covarrubias-Gómez, A., Guevara-López, U. 2010).

En cuanto al sexo, el dolor crónico es mayormente referido por las mujeres. A nivel internacional en un estudio con poblaciones con diferentes edades (15 a 85 años) se encontró que el dolor tiene una mayor presencia en población femenina, con un 39% (13.4 – 55.5%) comparado contra la población masculina en 31% (rango 9.1 – 54%) (Harstall, C., Ospina, M. 2003). Coincidentemente, un estudio nacional mostró que, la población femenina resultó más afectada con 48.3% contra 33.6% de la masculina (Gordillo-Álvarez, V., Ramírez-Bermejo, A. 2004).

En cuanto a la edad, los estudios realizados en clínicas nacionales de atención al dolor mostraron que el dolor tiene mayor prevalencia en los adultos mayores de 60 años. Siendo de 58 años el promedio de edad de la población que recibió atención para el dolor, pero existiendo diferencias significativas

en la prevalencia entre el grupo mayor de 60 años (53%), con el menor de 60 años (47%) (Barragán-Berlanga, J.A. et al. 2007; Covarrubias-Gómez, A. et al. 2008). Coincidiendo con un estudio internacional el cual señala que la prevalencia del dolor crónico en la población adulta mayor de 65 años es de 71.5 % (Brochet, B. 1998).

Respecto a la calidad de vida, además de la incapacidad y la carga económica que conlleva el presentar un dolor crónico. Éste tiene un impacto negativo sobre la calidad de vida del paciente, mermando sus actividades diarias y relaciones interpersonales (McCarberg, G.H., Nicholson, B.D. 2008). Los individuos que viven con dolor crónico son cuatro veces más susceptibles de desarrollar complicaciones neuropsiquiátricas que incluyen insomnio, depresión y/o ansiedad (Rosenfeld, B. 1996). Así como un impacto negativo dentro de procesos cognitivos como la atención y memoria, así como repercusiones en la calidad de sueño y alteraciones cardiovasculares (Fine, P.G. 2011).

Estos datos nos muestran la gran importancia que implica su atención a nivel mundial y la necesidad de mejorar la documentación disponible dentro del país con el fin de adecuar mejores estrategias en su atención.

### **1.3. Descripción de las vías sensoriales.**

La medida para que un estímulo se perciba como doloroso proviene de la actividad neuronal dentro del sistema somatosensorial. Dentro del proceso para la generación de dolor, participan distintos procesos fisiológicos, los cuales incluyen: la transducción, la conducción, la modulación y la integración. Estos procesos ocurren a diferente nivel de la vía nociceptiva.

La transducción es la transformación de energía (térmica, mecánica o química) por parte de un receptor específico a un potencial eléctrico despolarizante (Brooks, J., Tracey, I. 2005).

La nocicepción es el proceso mediante el cual los nociceptores, una subpoblación de fibras nerviosas periféricas, perciben un estímulo nocivo. Los nociceptores poseen propiedades biofísicas y moleculares que les permiten responder a estímulos de manera selectiva; ya sean mecánicos, térmicos o químicos cuando la intensidad del estímulo alcanza un rango nocivo (Basbaum, A.I., Bautista, D.M. 2009; Basbaum, A.I., Jessell, 2000).



Existen dos clases principales de nociceptores: Los primeros son aquellos que transmiten su información a través de aferentes mielinizados  $A\delta$  que median el dolor agudo, localizado y rápido. Responden ante estímulos mecánicos y térmicos de alto umbral, principalmente con temperaturas  $>50^\circ$  y menores a  $5^\circ\text{C}$  (Tominaga, M., Caterina, M.J. 2004) estas fibras rápidas conducen información que se propagan a una velocidad de 5-30m/s.

La segunda clase de nociceptores conducen a través de las fibras C amielínicas que tienen una conducción lenta (velocidad menor a 1 m/s) y median el dolor lento y mal localizado (Basbaum, A.I., Jessell, T.M. 2013). La mayoría de las neuronas tipo C son polimodales. Esto es que incluyen una población sensible al calor, a la estimulación química y mecánica (Perl. 2007). No todas las fibras tipo C son nociceptivas, algunas responden a la estimulación mecánica de baja intensidad (inocua) relacionándose con estimulación agradable al tacto (Olausson, H., Lamarre, Y. 2008; Vrontou, S. Wong, A.M. 2013).

Las fibras aferentes nociceptivas difieren de las fibras de mayor diámetro, las fibras  $A\beta$  mielinizadas. Estos poseen un bajo umbral al estímulo mecánico y transmiten información sensitiva no dolorosa, además de información propioceptiva hacia la médula espinal, estas conducen con una velocidad mayor (100m/s) (Basbaum, A.I., Jessell, T.M. 2013).

Las aferencias nociceptivas también pueden subdividirse de acuerdo con sus características neuroquímicas en una subpoblación peptidérgica y una población no peptidérgica (Julius, D., Basbaum, A.I. 2001; Snider, W.D., McMahon, S.B., 1998). La población peptidérgica consta de neuronas con fibras C y  $A\delta$ . Estas son capaces de liberar sustancia P y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), así como expresar el receptor de capsaicina: TRPV1 (Receptor de potencial transitorio V1), confiriéndoles actividad sensitiva frente al calor (Braz, J., Solorzano, C. 2014). Mientras que la población no peptidérgica consiste únicamente en neuronas con fibras tipo C, se distingue por su unión con Isolectina B4, (glicoproteína aislada de la legumbre *Griffonia simplicifolia*), expresión de los receptores RET (receptor tyrosine kinase) receptores acoplados a proteínas G relacionados con Mas-1, permitiendo identificar al menos 3 subgrupos de estas neuronas:

MrgprA1, MrgprC11, MrgprB4 (Dong, X., Han, S. 2001).

La información proveniente del estímulo nocivo se conducirá a través de axones aferentes hacia los somas de las neuronas del GRD para su procesamiento o bien, pueden dirigirse directamente hacia la medula espinal sin pasar por los somas neuronales para hacer sinapsis con neuronas de proyección localizadas en la asta dorsal de la medula espinal (Devor, M., 1999). Ésta se encuentra organizada en forma de láminas, que tienen distinciones anatómicas y electrofisiológicas (Basbaum A.I., Jessell. I. 2000) (Fig.1).

### 1.3.1. Circuitos neuronales dentro de la asta dorsal.

La asta dorsal es un sitio de integración de la información donde la actividad se verá sometida a una regulación tanto excitatoria como inhibitoria por parte de las interneuronas dentro de ella además de los somas neuronales de las neuronas de proyección.

Las aferentes A $\beta$  de bajo umbral responden a tacto ligero se proyectan hacia láminas profundas (III, IV y V). La información nociceptiva conducida por las fibras aferentes A $\delta$  tienen proyecciones dirigidas hacia la lámina I, así como a la lámina más profunda de la asta dorsal (lámina V). Las fibras tipo C se proyectan de manera superficial (láminas I y II) (Basbaum, A.I., Bautista, D.M. 2009). Las aferencias peptidérgicas tienen proyecciones hacia las láminas más superficiales de la asta dorsal (lámina I y región dorsal externa de lámina II [IIo]) (Fig.1); mientras que las aferencias no peptidérgicas tienen proyecciones hacia la lámina II en su región dorsal interna (IIi) (Fig.1), sugiriendo que existen diferencias funcionales entre estos grupos (Basbaum, A.I., Bautista, D.M. 2009; Braz, J., Solorzano, C. 2014). La región más ventral de la lámina II se caracteriza por la presencia de interneuronas excitatorias que expresan la isoforma gamma de la proteína quinasa C (PKC $\gamma$ ). Hacia esta región se dirigen predominantemente las aferencias mielinizadas no nociceptivos A $\delta$  (Fig.1) (Neumann, S., Braz, J.M. 2008).

Las neuronas de proyección que se encuentran dentro de la lámina I tienen especificidad hacia la actividad nociceptiva (Braz, J., Solorzano, C. 2014). Mientras que las neuronas de láminas III y IV

responden a estímulos inocuos (provenientes de fibras A $\beta$ ) y las que se encuentran en láminas profundas (lámina V) son conocidas como neuronas de amplio rango dinámico (ARD) quienes reciben información a través de aferentes A $\delta$  y A $\beta$  además de fibras C, siendo capaces de responder tanto a estímulos nociceptivos como inocuos (Braz, J., Solorzano, C. 2014; Basbaum, A.I., Bautista, D.M. 2009) (Fig.2).

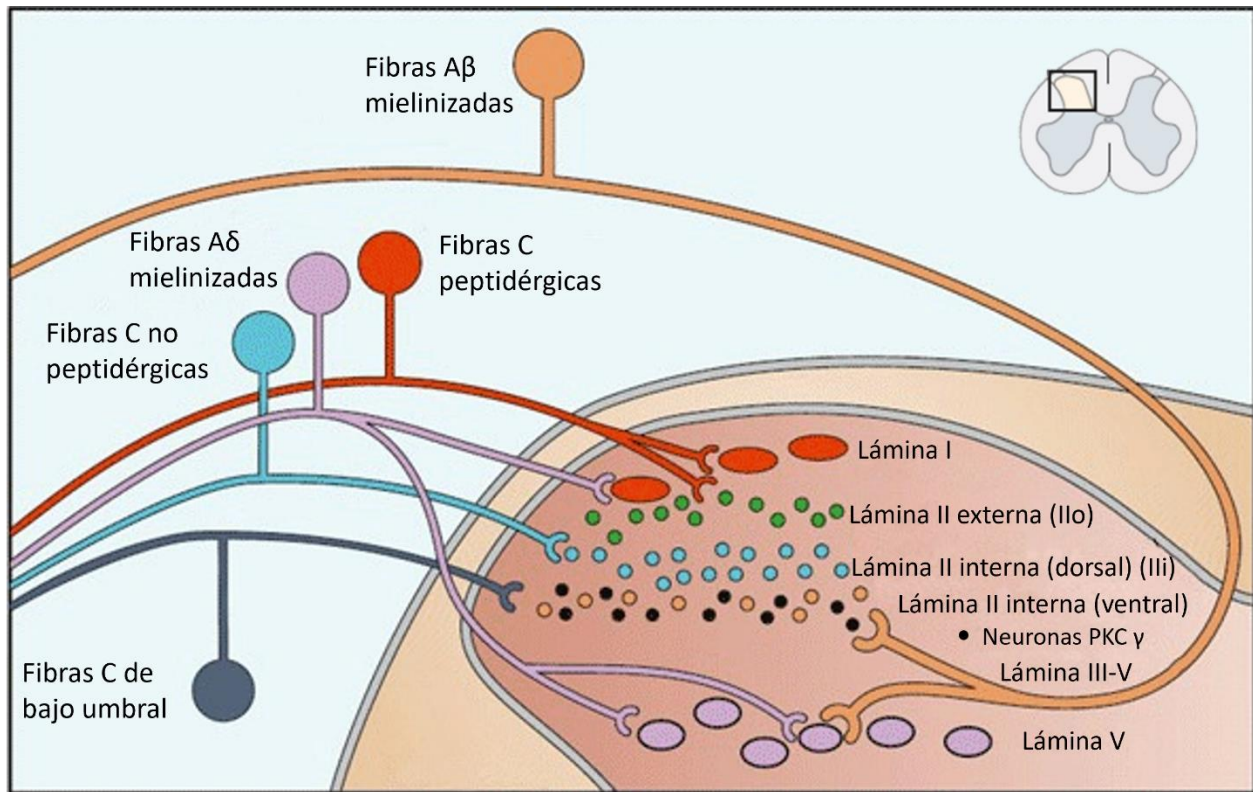


Fig. 1. **Esquema de la localización anatómica de fibras nociceptivas dentro de la asta dorsal de la médula espinal.** Las diferentes poblaciones de fibras aferentes primarias se dirigen a distintas regiones de la asta dorsal. La información nociceptiva proveniente de los nociceptores tipo C se concentra en las láminas superficiales (I y II). El subconjunto peptidérgico de los nociceptores amielínicos se dirige a las láminas I y II externa, mientras que el subconjunto no peptidérgico lo hará hacia la parte dorsal de la lámina II interna. Las aferencias A $\delta$  nociceptivas se dirigen a las láminas I y V, mientras que los mecanorreceptores C de bajo umbral se dirigen a las neuronas en la parte ventral de la lámina II interna, donde se encuentra la población interneuronal que expresan PKC $\gamma$  estos últimos implicados en la alodinia mecánica secundario a la lesión, tras la estimulación de aferentes A $\beta$  cuyas terminales se concentran en las láminas III-V. Modificado de: Braz, J., Solorzano, C. (2014). Transmitting pain and itch messages: A compemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control.

Dentro de la asta dorsal se encuentran interneuronas de actividad excitatoria como inhibitoria que modulan la información nociceptiva (Braz, J., Solorzano, C. 2014). Se han descrito cuatro tipos de interneuronas morfológicamente distinguibles: Interneuronas de tipo islote (I), centrales (C), radiales y verticales (V) (Grudt, T.J., Perl, E.R. 2002). La Fig. 2 ilustra su distribución en las láminas de la asta dorsal de la médula espinal, así como sus interacciones y circuitos de activación. Las interneuronas tipo islote (I color rojo) son en su mayoría GABAérgicas con un subconjunto que expresa glicina, presumiblemente esta clase de interneuronas son de tipo inhibitorio (Proudlock, F., Spike, R.C. 1993; Todd, A.J., McKenzie, J. 1989). Las interneuronas radiales y verticales (V color negro) son predominantemente glutamatérgicas, las interneuronas centrales (C color negro) incluyen subconjuntos tanto excitatorios como inhibitorios (Maxwell, D.J., Belle, M.D. 2007; Yasaka, T., Tiong, S. 2010).

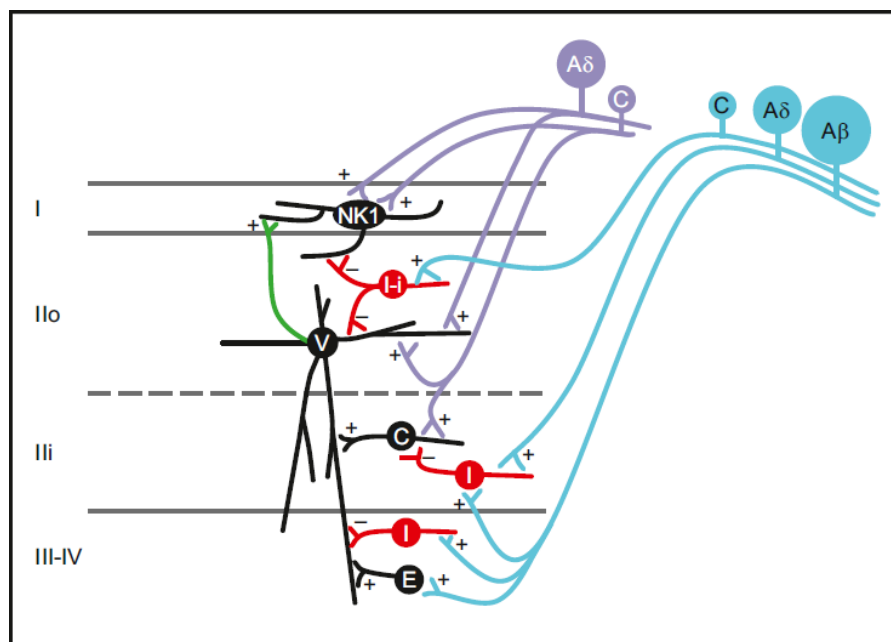


Fig. 2. **Circuitos de activación ventral-dorsal dentro de la asta dorsal de la médula espinal.** Diagrama de interacción que muestra las conexiones dadas por los diferentes tipos de fibras aferentes (azul y morado) con las interneuronas localizadas dentro de las distintas porciones de la asta dorsal (color negro y rojo) y con neuronas de proyección. Las fibras nociceptivas C-Aδ (morado) activan las interneuronas verticales (V) dentro de la lámina IIo y a su vez activan neuronas de proyección que expresan NK1 (negro) de la lámina I (axón verde). Las fibras C activan neuronas de proyección que expresan NK1 (negro) de la lámina I (axón verde). Las fibras Aδ activan neuronas de proyección que expresan NK1 (negro) de la lámina I (axón verde). Las fibras Aβ activan neuronas de proyección que expresan NK1 (negro) de la lámina I (axón verde).

nociceptivas activan a las interneuronas centrales (C) de la lámina Iii, y estas contactan directamente a las interneuronas verticales de la lámina Iio. Las fibras A $\beta$  no nociceptivas (azul claro) se proyectan hacia láminas más profundas (III-IV) donde establecen conexiones monosinápticas con interneuronas excitadoras locales (E). Estas últimas activarán directamente las interneuronas verticales (V) generando un circuito dorsal el cual será la ruta por la que una entrada aferente nociceptiva como inocua puedan comprometer la actividad de neuronas de proyección de la lámina I. Modificado de: Braz, J., Solorzano, C. (2014). Transmitting pain and itch messages: A contemporaty view of the spinal cord circuits that generate gate control. NK1= Neuronas de proyección NK1, Iio= lámina II porción externa, Iii= lámina II porción interna.

En cuanto a los contactos que establecen en la asta dorsal. Las interneuronas de tipo islote (lámina Iio) y centrales (lámina Iii) tienen proyecciones dendríticas que se extienden de forma limitada hacia la lámina donde se localiza su cuerpo neuronal, mientras que las interneuronas verticales (V negro) se encuentran en la lámina Iio y cuenta con proyecciones en dirección ventral que permite la integración de distintas aferencias de las interneuronas locales. (Fig.2).

Con respecto a los circuitos de activación dentro de la asta dorsal. Las interneuronas centrales (C) dentro de la lámina II reciben aferencias de fibras tipo C, y a su vez son capaces de excitar las interneuronas verticales (V) de la lámina Iio. Las interneuronas verticales reciben información por parte de las aferencias tipo C y A $\delta$  nociceptivas, a su vez establecen conexiones con neuronas de proyección e interneuronas de la lámina I. Por tanto, para la conducción de estímulos nocivos se ven involucradas las neuronas de proyección de manera directa, pero, a través de un circuito con dirección dorsal se encuentra un impulso adicional que contribuye a su activación de manera indirecta (Fig. 2). Las aferencias de fibras A $\beta$  no nociceptivas se dirigen hacia laminas profundas (III y IV) y también pueden involucrar la actividad de neuronas de protección de la lámina I a través de circuitos dorsales con la actividad de interneuronas excitatorias (E) e interneuronas verticales (V). Posiblemente, la entrada de las aferencias A $\beta$  contribuye a la actividad de las neuronas de ARD presentes dentro de la lámina I, y con ello, a la generación de alodinia mecánica posterior a la lesión tisular o nerviosa (Hylden, J.L., Nahin, R.L. 1987).

### 1.3.2. Vías de conducción ascendentes y procesamiento de dolor.

Las neuronas de proyección de las láminas I y V constituyen la principal vía de salida de la asta dorsal formando vías ascendentes que se dirigirán hacia estructuras cerebrales que integran la información sensitiva. La información no nociceptiva se conducirá a través del sistema de columnas dorsales, y la información nociceptiva a través del sistema anterolateral.

El sistema anterolateral está conformado por distintas vías ascendentes: a) la vía espinotalámica, b) la vía espino-mesencefálica, c) la vía espino-reticular, d) la vía espinotalámica, f) la vía espino-hipotalámica.

- La vía espinotalámica es la que cuenta con mayor número de fibras aferentes dentro del sistema, su funcionamiento es relevante para los aspectos sensoriales y discriminativos. Estas fibras ingresan a la medula espinal realizando su primera conexión sináptica en las neuronas de las láminas de la asta dorsal, posteriormente decusa hacia el lado contralateral de la médula espinal y ascienden como el cordón anterolateral, dirigiéndose hacia núcleos talámicos y sustancia reticular. La participación del tálamo en el procesamiento de dolor se concentra en núcleos pertenecientes a grupos mediales y laterales. Específicamente los núcleos ventral postero medial (VPM), ventral postero lateral (VPL) (Basbaum, A.I., Jessell, T.M. 2013), cuyo papel está dirigido hacia obtener una localización precisa del origen de la información nociceptiva, posteriormente la información finaliza en diferentes regiones corticales sin ser una estructura cerebral única la responsable de la integración del dolor (Mason, P. 2001; Apkarian, A.V., Bushnell, M.C. 2005) (Fig. 2). La percepción del dolor resulta de la activación de distintas estructuras, algunas con mayor asociación a las propiedades sensoriales discriminatorias (corteza somatosensorial) y otras que integran aspectos emocionales (circunvolución cingulada anterior y corteza insular) (Price, D.D. 2004).

- La vía espino-mesencefálica, cuya información contribuye al componente afectivo del dolor, las neuronas de proyección se dirigirán hacia el núcleo parabraquial (PB) en el tallo cerebral. (Fig.3) El PB tendrá comunicación hacia estructuras cerebrales del sistema límbico asociadas con el componente emocional del dolor (Price, D.D. 2004; Duquette, M., Roy, M. 2007).

- La vía espino-reticular se dirige hacia la sustancia gris periacueductal (SGA) dentro del mesencéfalo, además de hipotálamo y formación reticular (Bernard, J.F., Dallel, R 1995; Burstein, R., Cliffer, K.D. 1990).
- La vía espino-hipotalámica se encuentra implicada en las respuestas autonómicas, neuroendocrinas y cardiovasculares, responsables de las manifestaciones sistémicas que acompañan al dolor (Willis, W.D. 1985; Brooks, J., Tracey, I. 2005).

La Fig. 3, muestra un diagrama de las regiones cerebrales donde hacen relevo la sensopercepción del dolor

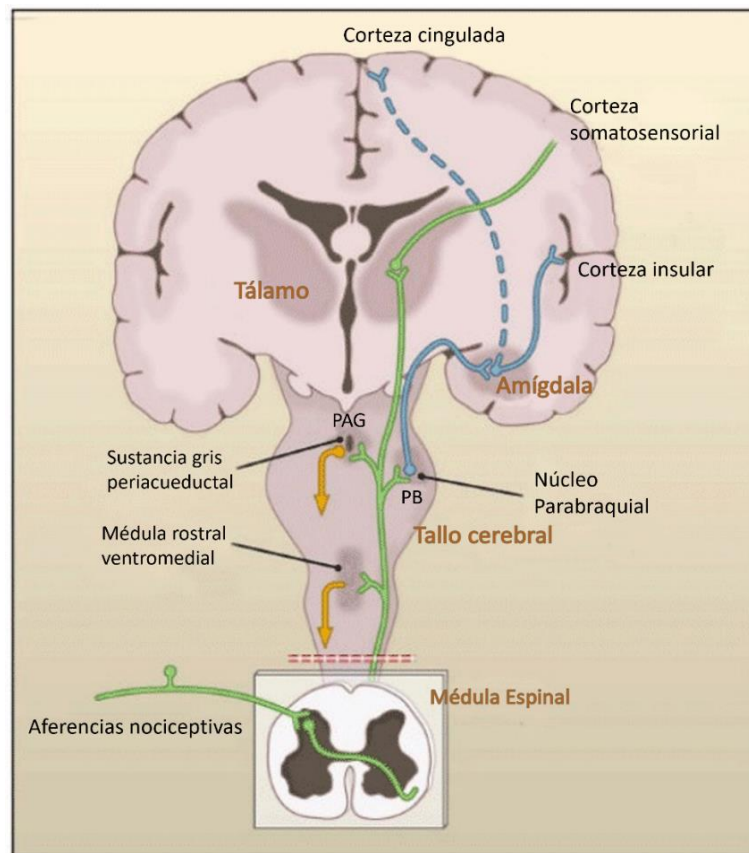


Fig. 3. **Esquema de vía espinotalámica ascendente y relevos sinápticos.** Conductora de información nociceptiva. Mostrando las vías ascendentes derivadas de la asta dorsal de la médula espinal. Conduciendo información hacia núcleos parabraquiales, activando circuitos dentro del sistema límbico contribuyendo al componente afectivo/emocional de la experiencia del dolor. Modificado de Basbaum, A.I., 2009.

#### **1.4 Dolor agudo, crónico y clasificación.**

El dolor puede clasificarse acorde a la temporalidad de su presentación, siendo agudo aquel que se presenta de forma inmediata tras la activación de los nociceptores en el sistema somatosensorial. Ocurre tras la presencia de una lesión y su duración es cercana al proceso de restauración y sanación del tejido comprometido (Bonica, J.J. 1990; Coda, B.A., Bonica, J.J. 2001).

Por otra parte, el dolor crónico es aquel que persiste más allá del tiempo necesario para la curación de la lesión que lo originó (Bonica, J.J. 1953) y que permanece por un periodo continuo o intermitente mayor a 3 meses de su inicio (seres humanos) (Gilron, I. 2015; Gierthmühlen, J., Baron, R. 2016).

La IASP en conjunto con la OMS establecieron una clasificación de dolor crónico con la participación de expertos en el tema alrededor del mundo. El objetivo era crear un sistema para ser utilizado tanto en la atención primaria como en entornos clínicos más especializados (Treede, R-D. et al. 2015). Esta clasificación se centra primordialmente en la etiología del padecimiento, seguido por el mecanismo fisiopatológico involucrado y el sitio anatómico de origen.

Englobando al dolor crónico en diferentes apartados, tales como:

- Dolor crónico primario. Aquel que cursa con afección en una o más regiones anatómicas el cual no puede ser explicado por alguna otra condición de dolor crónico.
- Dolor crónico oncológico. Es secundario a una condición oncológica (tumor primario o metástasis) o secundario a su tratamiento.
- Dolor crónico postraumático o posquirúrgico. Secundario a procedimiento quirúrgico o antecedente traumático, la sintomatología continua posterior a la recuperación del daño tisular ocurrido en el evento.
- Dolor crónico en cabeza u orofacial. Aquel que ocurre en estas regiones por un periodo igual o superior al 50% del día.
- Dolor crónico visceral. Originado a partir de estructuras internas de cabeza, cuello, cavidades torácica, abdominal o pélvica.
- Dolor crónico musculoesquelético. Dolor que surge directamente en estructuras como huesos, articulaciones, músculos o tejidos blandos. Predominantemente patologías con inflamación crónica.



- Dolor crónico neuropático. Aquel presente debido a una lesión o enfermedad que afecta de forma directa o indirecta al sistema somatosensorial (Scholz, J. et al. 2019).

### **1.5. Dolor neuropático.**

Fisiológicamente el dolor surge a una activación del sistema somatosensorial (Bonica, J.J. 1990). Por otra parte, el dolor neuropático se origina por la presencia constante de una lesión en los receptores periféricos, vías de conducción dentro de la médula espinal o en la corteza somatosensorial. Sin ser necesaria, en estos últimos, la activación de los nociceptores para su generación (Velazco, M. 2014). El dolor neuropático se caracteriza por su cronicidad, severidad, manifestaciones clínicas poco precisas y la dificultad en su manejo terapéutico (Gilron, I. 2006 y Gilron, I. 2015).

La prevalencia de este padecimiento se estima alrededor de 6.9 – 10%, a través de una revisión de estudios epidemiológicos (van Hecke, O., Austin S.K. 2014). Mientras que en una encuesta realizada en cinco países de América Latina se estimó que el dolor neuropático está presente en 2% de la población y que del total de pacientes que acuden a consulta por dolor, el 15% lo hace por un dolor de tipo neuropático (Acevedo, J.C. 2008). Existen diferentes causas de daño neurológico capaces de comprometer al sistema somatosensorial, dentro de las que tenemos: causas genéticas, inmunológicas, metabólicas / endócrinas, traumáticas, isquémico / vasculares, neoplásicas, tóxicas e infecciosas (Gary, W., Jay, M.D. 2014). Cabe recalcar al dolor neuropático como una descripción clínica que requiere la identificación de su causalidad y no como un diagnóstico.

### **1.6. Características clínicas del dolor neuropático.**

Las manifestaciones clínicas del dolor neuropático son variables, de acuerdo con el mecanismo que origine dicha sintomatología (Gilron, I. 2006). Los pacientes suelen tener percepciones paradójicas con el dolor, siendo el dolor el síntoma dominante dentro del cuadro, pero combinado con distintas afecciones en el sistema somatosensorial, tales como: cambios dentro de la percepción de la temperatura o estímulos mecánicos.

Dentro de su cuadro sintomatológico pueden diferenciarse síntomas “positivos y negativos”. Los

síntomas positivos son los que se presentan con una ganancia funcional de forma espontánea o dadas por un estímulo. Por ejemplo; la sumación temporal, síntoma que se caracteriza por un incremento progresivo en la intensidad de dolor ante estímulos dolorosos repetitivos.

Los síntomas negativos son manifestaciones dadas por una pérdida de la funcionalidad, presentadas como: debilidad, hiporreflexia o disminución en la sensibilidad (hipoestesia), referido como “adormecimiento (Gierthmühlen, J., Baron, R. 2016; Baron, R. 2006) los cuales se describen en la Tabla I.

Estos síntomas pueden presentarse como una manifestación única o en distintas combinaciones dentro de las regiones corporales comprometidas. Así mismo, pueden presentar distintos patrones temporales, siendo intermitentes o continuos de acuerdo con el mecanismo mediante el cual son generados. Por tanto, no pueden considerarse como manifestaciones específicas para alguna enfermedad. (Baron, R., Binder, A. 2010).

### **1.7. Mecanismos fisiológicos y moleculares que intervienen en la generación de dolor neuropático.**

Ante la lesión tisular el dolor actúa como un mecanismo de protección que evita propagación de daño hasta la recuperación. Sin embargo, el dolor neuropático no parece tener alguna función benéfica o protectora y es resultante de disturbios en la actividad neuronal, a nivel de circuitos o en las células gliales dentro del sistema somatosensorial (Prescott, S.A., Ma, Q., De Koninck, Y. 2014). La transición hacia la cronicidad surge tras la persistencia de estos cambios, mismos que dan lugar a las manifestaciones clínicas características del padecimiento (Zeilhofer et al. 2012).

Durante la generación de dolor neuropático, existe la presencia de cambios mal adaptativos e irreversibles por parte de las neuronas sensitivas. Estos cambios incluyen mecanismos moleculares, celulares y a nivel de las vías sensoriales tanto centrales como periféricas, conduciendo a la generación de actividad espontánea y una hiper excitabilidad del sistema somatosensorial (Campbell, J.N., Meyer, R.A. 2006; von Hehn, C.A., Baron, R. 2012). Estos mecanismos se describen a continuación.

<b><u>Síntomas</u></b>	<b>Definición</b>	<b>Respuesta a la valoración.</b>	<b>Mecanismo.</b>
<u>Hipoestesia mecánica</u>	Menor sensibilidad ante estímulos no dolorosos y /o vibratorios.	Menor percepción de estímulo, sensación de “adormecimiento”	Lesión o disfunción de fibras A $\beta$ aferentes.
<u>Hipoestesia térmica</u>	Menor sensibilidad ante estímulos fríos o calientes no dolorosos.	Menor percepción a temperaturas.	Lesión o disfunción de fibras A $\delta$ o fibras C aferentes.
<u>Hipoalgesia mecánica</u>	Menor sensibilidad ante un estímulo doloroso	Menor percepción de estímulo o sensación de “adormecimiento”	Lesión o disfunción de fibras A $\delta$ o fibras C aferentes.
<u>Hipoalgesia térmica</u>	Sensación disminuida ante estímulos dolorosos fríos o calientes.	Menor percepción de estímulo “adormecimiento”	Lesión o disfunción de fibras A o fibras C aferentes.
<b><u>Positivos “Evocados”</u></b>			
<u>Alodinia mecánica</u>	Sensación dolorosa producido por un estímulo no doloroso	Presente dentro de área afectada (zona primaria). Puede extenderse más allá de zonas primarias.	- Sensibilización central de sistema somatosensorial. - Disfunción de sistema modulador de dolor.
<u>Hiperalgia mecánica / térmica.</u>	Sensación dolorosa exagerada ocasionada a partir de un estímulo doloroso. (mecánico o térmico)	Dolor sordo, dificultad en su localización. Respuesta exagerada en área afectada (zona primaria)	- Sensibilización de fibras aferentes. - Sensibilización central de sistema somatosensorial. - Disfunción de sistema modulador de dolor.
<u>Sumación temporal.</u>	Incremento gradual en intensidad de dolor al producir estímulos dolorosos idénticos de forma repetitiva.	Dolor agudo y superficial que incrementa de intensidad en cada estímulo.	- Incremento de la excitabilidad de las neuronas espinales.
<b><u>Positivos “Espontáneos”</u></b>			
<u>Parestesia</u>	Cambio en la percepción sensorial sin llegar a ser dolorosa (hormigueo)	-	-Irritación del sistema somatosensorial.
<u>Dolor paroxístico</u>	Sensación dolorosa en ausencia de estímulo. (similar a descarga eléctrica)	-	-Sensibilización de sistema somatosensorial. -Actividad ectópica en sistema somatosensorial.
<u>Dolor continuo.</u>	Sensación dolorosa continua, (descrita como ardorosa)	-	-Sensibilización central y periférico del sistema somatosensorial.

Tabla 1. Sintomatología clínica presente en dolor neuropático. (modificado de Baron, R. 2006 y Gierthmulhen 2016).

### 1.7.1. Actividad ectópica espontánea.

En la lesión neuropática la generación de dolor puede ocurrir de manera espontánea, a partir de focos de actividad ectópica dentro del sistema somatosensorial, tanto a nivel periférico como central (Amir R., Kocsis, J.D. 2005). La actividad ectópica a nivel periférico se genera por un incremento de la expresión de canales iónicos y metabotrópicos en los axones de neuronas sensitivas primarias, llevando a una disminución en el umbral de activación y culminando en la generación de actividad ectópica (Lai, J., Hunter, J.C. 2003).

Experimentalmente se ha observado un incremento en los niveles de RNAm para canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Siqueira, S.R.T.D., Alves, B. 2009). Siendo los canales Nav 1.3, Nav 1.6, Nav 1.9 los involucrados de manera principal en el proceso (Eijkelkamp, N., Linley, J. E. 2012). Adicionalmente también existe evidencia de la participación de canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje (k2p18.1 y k2010.1), cuya disminución en su expresión a partir de una lesión, lleva a una despolarización constante del potencial de membrana (Tulleuda, A.E. et al., 2011) y de canales catiónicos activados por voltaje y por nucleótido (HCN) (Chaplan, S.R., Guo, H-Q. 2012), cuyos cambios modifican la excitabilidad de la membrana (Bahia, P.K., Suzuki, R. 2005).

### 1.7.2. Sensibilización Periférica.

El proceso de sensibilización periférica se describe como la disminución del umbral de activación, así como un incremento en la frecuencia de disparo neuronal (Yam, M.F. et al. 2018). Ésta se genera a partir de la liberación periférica de múltiples factores proinflamatorios y neurotróficos por parte del tejido dañado (Basmaun, A.I., Wolf, C.J. 1999).

En este proceso participan moléculas como protones (H<sup>+</sup>), purinas (ATP), factor crecimiento nervioso (NGF), citocinas como (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), bradicinina, histamina, serotonina (5HT), factor activador de plaquetas (PAF) y endotelina. Estos mediadores actuarán de forma directa para modificar la sensibilidad de los nociceptores periféricos o indirectamente acoplándose a receptores de membrana, entre ellos: Transient receptor potential termosensibles (TRP), acid-sensitive ion channel (ASICs), receptores purinérgicos (P2x), receptores acoplados a

segundos mensajeros: acoplados a proteínas G (GPCR) y activadores de cinasas como tirosina cinasa A y C (PKA y PKC), que inducen cascadas de fosforilación de proteínas (Fig. 4) (Heppenstall, P.A., Lewin, G.R. 2000; Pezet, S., McMahon, S.B. 2006).

Estas moléculas fosforiladas se conducen hacia el núcleo neuronal mediante un transporte retrogrado, generando cambios transcripcionales que llevarán a la modificación en la expresión de neuropéptidos (ej. Sustancia P), canales iónicos y receptores (ej., TRPV1). Lo anterior, modifica las propiedades funcionales de la neurona (Woolf, J.C., Costigan, M. 1999; Wieseler, F.J., Maier, S.F. 2005) (Fig. 5). El metabolismo y liberación de prostaglandinas se lleva a cabo partir de ácido araquidónico y el funcionamiento de la enzima ciclo oxigenasa (COX). La expresión de COX2 en condiciones inflamatorias, contribuye a la generación de la sensibilidad periférica. La disminución de la inflamación por los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos es producto de la inhibición de actividad enzimática de COX2 llevando a una disminución de la inflamación. (Bingham, S. et al. 2006; Zeilhofer, H.U., Benke, D. 2012).

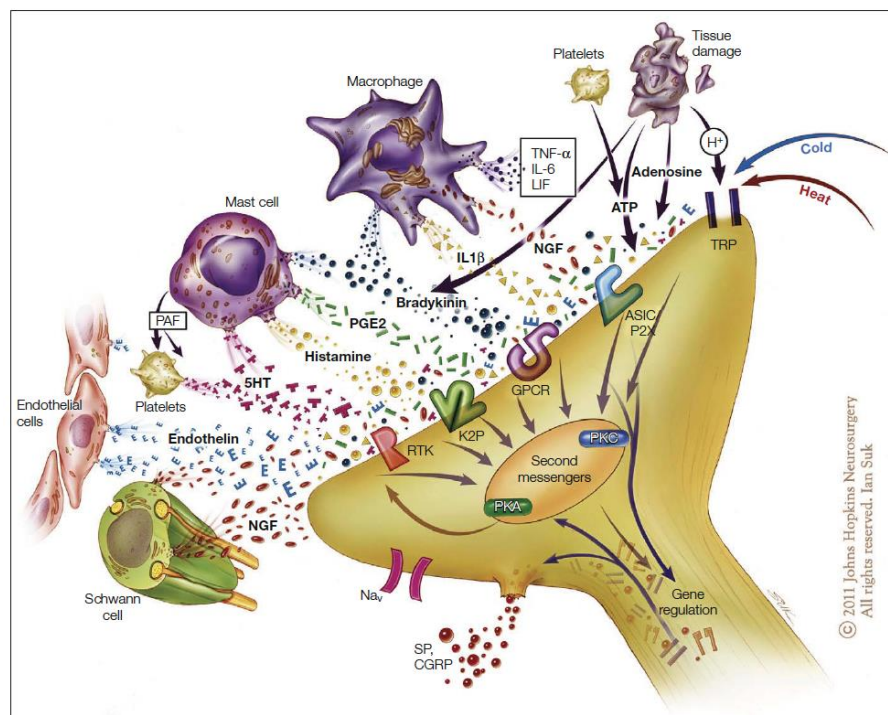


Fig. 4. **Impacto en la sensibilización periférica de los factores proinflamatorios liberados tras lesión tisular.** Esquema de un nociceptor y la liberación de factores que participan en su sensibilización a través del acople hacia sus receptores produciendo cascadas de señalización y regulación génica. (Tomada de: Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN, Raja SN “Peripheral Mechanisms of Cutaneous Nociception,” In Textbook of Pain, Fifth edition, S. McMahon, M. Koltzenburg (Eds.), Elsevier.

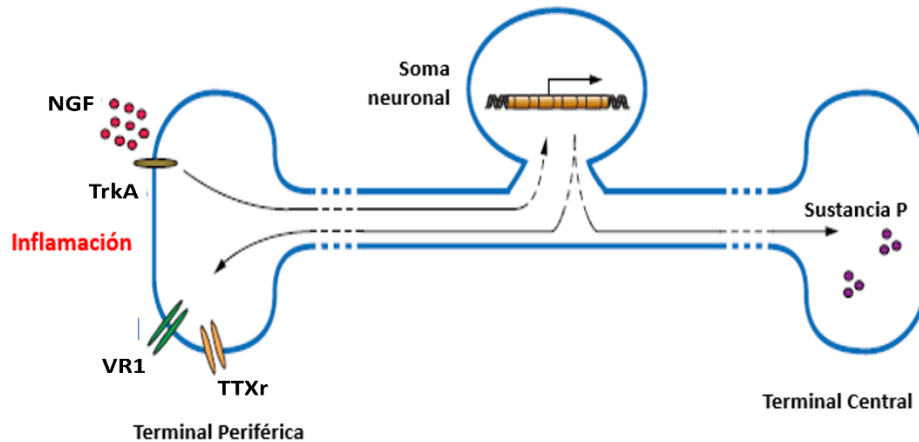


Fig. 5. **Factores tróficos e inflamatorios generan cambios en la actividad neuronal posterior una lesión.** Éstos surgen a través de cambios transcripcionales en el soma neuronal. NGF= Nerve Growth Factor. TRPV1 = Receptor de potencial transitorio V1, TTXr= Tetrodotoxin resistant. Modificada de: Bassmaun AI, Wolf CJ. 1999).

### 1.8.3. Mecanismos espinales que facilitan la actividad eléctrica neuronal.

#### Sensibilización central.

Se define como un incremento sostenido pero reversible de la excitabilidad y eficacia sináptica en las neuronas localizadas en la vía nociceptiva central, incluyendo tanto a las neuronas espinales como las supra espinales (Gilron, I. 2015). Las manifestaciones clínicas de alodinia, hiperalgesia y sumación temporal en el dolor neuropático pueden atribuírsele a la sensibilización central (Wolf, C.J. 2011). Tras la presencia de una lesión en el sistema somatosensorial se genera un incremento en la excitabilidad de las neuronas de proyección en laminas superficiales de asta dorsal en médula espinal (Kohn, T., Moore, K. A. 2003).

El “*Wind-up*” es un fenómeno fisiológico progresivo ocurrido en neuronas de las astas dorsales de la médula espinal. Descrito en el año 1965 por Mendel y se caracteriza por generar una facilitación

progresiva en la excitabilidad neuronal a nivel espinal. Su observación se dio tras la aplicación de estímulos repetitivos de intensidad constante (30mV y 0.5 mseg de duración) en vías aferentes de neuronas tipo C. (Mendell, L.M., Wall, P.D. 1965).

Molecularmente el fenómeno de “wind up” se ha explicado como el resultado de un aumento en la frecuencia de disparo en las fibras C, éste lleva a un incremento en la probabilidad de liberación de glutamato, así como de un aumento de las proteínas que forman las zonas activas de las membranas posinápticas (Luo, C. et al. 2012; Herrero, J.F., Laird, J.M. 2000) (Fig.6-A). Lo anterior, generará cambios en la actividad sináptica similares a los de la potenciación a largo plazo (LTP) que ocurren en otros circuitos cerebrales, atribuidos a un incremento en la densidad de receptores glutamatérgicos N-metil D aspartato (NMDA) y AMPA en terminales postsinápticas (Fig.6-B) (Ultenus, C. Linderoth, B. 2006).

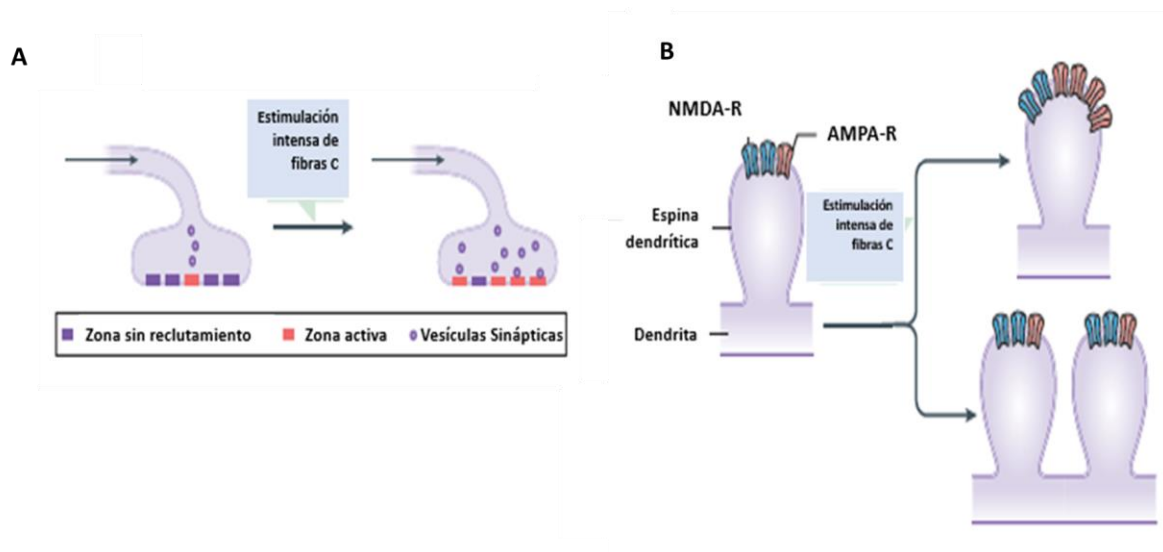


Fig. 6. **Cambios en la expresión de receptores glutamatérgicos en las dendritas inducidos por el aumento en la sensibilización central** A). Posterior a la estimulación intensa de las fibras C (ej. lesión) hay mayor probabilidad de liberación de neurotransmisores por incremento de su presencia de las zonas activas de reclutamiento y su interacción con vesículas neurosecretoras. B) Imagen de receptores glutamatérgicos en una espina dendrítica posináptica, que ante una estimulación persistente de las fibras C puede llevar a un incremento en su expresión. Modificada de: Kuner R, Flor H. 2016.

Los antagonistas de receptores glutamatérgicos (ketamina) son capaces de revertir el “wind-up” en neuronas de la médula espinal (Chizh, B.A., Cumberbatch, M.J. 1997). Clínicamente la administración de estos antagonistas alivia la sintomatología presente en el dolor neuropático (alodinia, hiperalgesia y dolor continuo) (Jorum, E., Warncke, T. 2003).

#### 1.7.4. Modificaciones en los mecanismos inhibitorios de las neuronas de proyección.

Los primeros intentos por explicar la sintomatología que acompaña al dolor fueron por parte de Livingston en los años 40s, proponiendo que posterior a una lesión se llevaría a cabo la activación de circuitos reverberantes dentro de la médula espinal. En este escenario, los estímulos de naturaleza no nociceptiva pasarían a generar actividad interpretada como dolorosa (Livingston, W.K. 1943).

Posteriormente, Melzack en 1965 planteó una hipótesis de interconectividad neuronal acerca del como ocurre este fenómeno. Siendo este resultado de la pérdida de las capacidades inhibitorias de las interneuronas de la médula espinal (Melzack, R. Wall, P.D. 1965). Este fenómeno se fundamenta en la actividad sináptica de las interneuronas dentro de la sustancia gelatinosa en las astas dorsales de la médula espinal, que por su capacidad inhibitoria son capaces de modular la actividad sensorial a través de un mecanismo de retroalimentación negativa para las aferencias no nociceptivas y una retroalimentación positiva para las aferencias nociceptivas.

En la Fig. 7, se muestra un diagrama de como la activación de las fibras no nociceptivas (L) inhibe la actividad de las neuronas de proyección (T) a través de favorecer la actividad de las interneuronas inhibitorias en la sustancia gelatinosa (SG) cuya acción permite la disminución de la liberación y consecuentemente la disminución de la transmisión sináptica hacia la neurona posináptica o de proyección. En contraste, la actividad de neuronas nociceptivas (S) aumenta el disparo de las neuronas T, ya que una mayor actividad de S reducirá la actividad inhibitoria de las interneuronas en SG permitiendo una mayor actividad por parte de las neuronas de proyección nociceptivas.

En tal forma que en condiciones de dolor neuropático se disminuye la retroalimentación negativa para las aferencias nociceptivas, potenciándose así el disparo neuronal (Melzack, R. Wall, P.D. 1965).



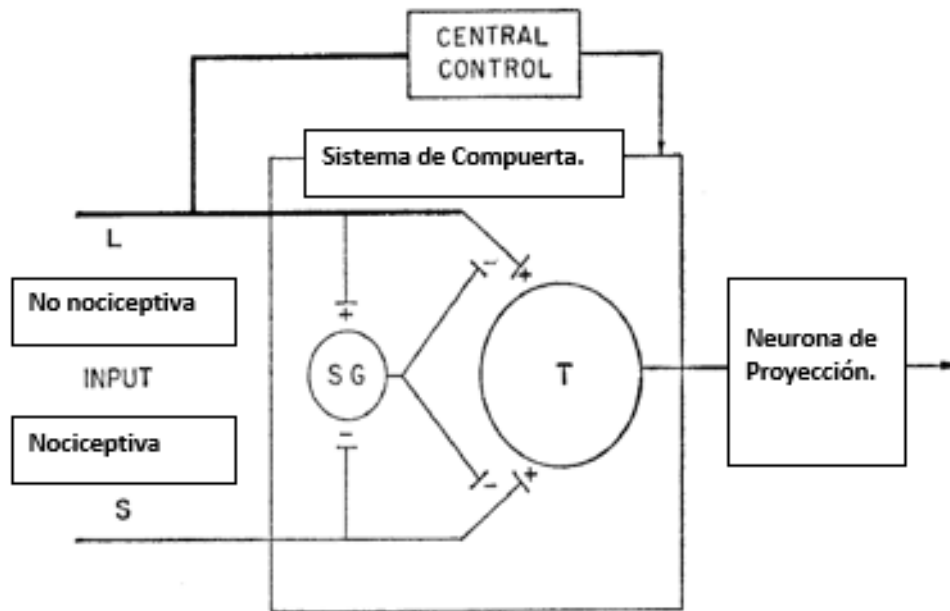


Fig. 7. **Regulación de la frecuencia de disparo de las neuronas de proyección por interneuronas.** La activación de fibras no nociceptivas (L) inhibe la actividad de las neuronas de proyección (T) a través de estimular la actividad de las interneuronas inhibitorias en la sustancia gelatinosa (SG). En contraste, la actividad de neuronas nociceptivas (S) aumenta el disparo de las neuronas de proyección, ya que éstas inhiben la actividad de interneuronas SG permitiendo una mayor la actividad sináptica de S y fibras L hacia las neuronas de proyección T. L= fibras no nociceptivas. S= fibra nociceptiva. SG= interneuronas de la sustancia gelatinosa. T= neurona de proyección. Modificada de Melzack R, Wall PD. 1965.

### 1.7.5. Participación de Células Gliales en la nocicepción

Además de los cambios neuronales ya descritos, la interacción entre las neuronas y las células gliales también se modifica durante el dolor neuropático. Estos cambios involucran la producción de mediadores provenientes de las neuronas aferentes primarias que inducen cambios estructurales y proliferativos de las células gliales, llevando al reclutamiento de células de la microglía.

La participación de los siguientes mediadores se ha involucrado en este proceso:

a) Papel de la quimiocina atrayente de neutrófilos (CCL2).

La quimiocina CCL2 es crítica en el proceso de reclutamiento (Zhang, J., De Koninck, Y. 2006). Esta es liberada en conjunto con glutamato y citocinas proinflamatorias por las aferentes primarias. Su

participación en el dolor se sustenta por la generación de alodinia e hiperalgesia aún en ausencia de lesión neuropática, después de la adición de la quimiocina CCL2 de forma intratecal. Esta acción se realiza a través de la activación de la microglía, ya que, en animales a los cuales se les bloqueó la actividad y expresión del receptor para quimiocinas CCL2r en las células de la microglía la lesión neuropática no llevó al desarrollo de alodinia mecánica (Abbadie C, Lindia, J.A. 2003; Dansereau, M.A., Gosselin, R.D. 2008; Thacker, M.A. et al. 2009).

b) Papel de los receptores purinérgicos en la inducción de hiper excitabilidad de las neuronas de proyección y liberación del Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

La actividad de las neuronas aferentes en conjunto por el tejido lesionado lleva a la liberación de ATP, esta molécula tiene una participación en la nocicepción a través de la actividad de los receptores purinérgicos expresados en las células de la microglía y neuronas de proyección en la médula espinal. Dicha activación induce la producción del factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF- Brain Derived Nerve Factor) el cual actúa en las neuronas de proyección de la médula espinal facilitando su excitación (Zeilhofer et al. 2012; Burnstock G. 2000).

La participación de los receptores purinérgicos activados por el ATP en la nocicepción se ha documentado a través de la inyección intratecal de antagonistas de receptores purinérgicos (P2X4), lo cual llevó a la reversión clínica de la alodinia en animales con lesión neuropática (Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y. et al. 2003). Asimismo, estudios en animales con deficiencia específica del receptor P2X4 no presentaban hipersensibilidad mecánica posterior a la ligación de nervio ciático, confirmando la importancia de este receptor para el desarrollo de la sintomatología (Tsuda, M., Kuboyama, K. 2009).

La activación de microglía a través de estos receptores purinérgicos lleva a la síntesis y liberación de BDNF (Zeilhofet et al. 2012) (Fig. 8). El BDNF actuará sobre receptores TrkB expresados en las neuronas de la lámina I y II de la asta dorsal en la médula espinal regulando a la baja la expresión del cotransportador  $K^+ / Cl^-$  (KCC2). En las neuronas adultas la concentración intracelular de  $Cl^-$  está

determinada por este cotransportador KCC2, el cual cotransporta  $K^+$  y  $Cl^-$  hacia el exterior de la célula manteniendo la concentración intracelular de  $Cl^-$  baja (Fig. 9) (Bonin, R.P., De Koninck, Y. 2013).

c) Cambio en el potencial de equilibrio de Ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA).

El GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) es el principal neurotransmisor inhibitorio del SN en mamíferos adultos. Su unión con receptores ionotrópicos GABAA (GABA tipo A) genera corrientes inhibitorias (IPSC-Inhibitory postsynaptic currents) que resultan de la activación de canales permeables a cloruro ( $Cl^-$ ) y bicarbonato ( $HCO_3^+$ ) dependientes de neurotransmisor, conduciendo al incremento intracelular de este anión y permitiendo la salida de  $HCO_3^+$ , generando una respuesta postsináptica hiperpolarizante que inhibirá la generación de potenciales de acción (Farrant, M., Nusser, Z. 2005; Bonin, R.P., De Konink, Y. 2013).

La liberación de BDNF por parte de la microglía activa, inhibe la expresión del cotransportador KCC2 en la membrana celular, produciendo un incremento en la concentración intracelular de  $Cl^-$  en las neuronas de proyección, colapsando su gradiente, en tal forma que se despolariza su potencial de equilibrio, por lo tanto, el GABA que normalmente induce corrientes inhibitorias en las neuronas ahora generará corrientes excitatorias que contribuyen a su hiper excitabilidad (Doyon, N., Prescott, S. 2011). Las figuras 7 y 8 ilustran estos procesos.

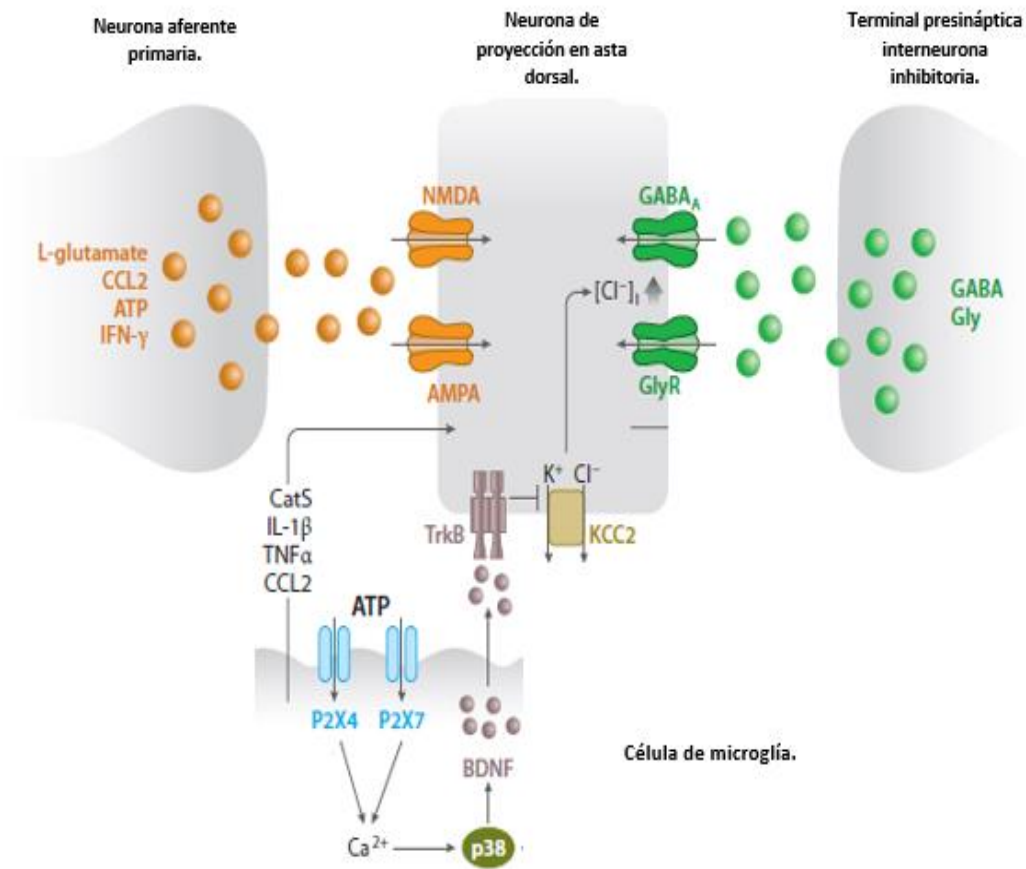


Fig. 8. **La activación de la microglía es un mecanismo asociado al dolor neuropático.** La liberación de CCL2, ATP, IFN- llevará a la activación de microglía secundario a la estimulación de receptores purinérgicos (P2X4/P2X7), promoviendo la síntesis y liberación de BDNF que inhibirá la expresión del cotransportador de  $K^+/Cl^-$ , KCC2 en las neuronas, alterando el potencial de equilibrio del cloro. Cuando el GABA liberado por las interneuronas activa el receptor GABA<sub>A</sub> en las neuronas de proyección, este generará una despolarización en lugar de hiperpolarización y de esta forma favorecerá a su hiper excitabilidad. Abreviaciones. AMPA, BDNF, factor neurotrófico derivado de cerebro, GABA- ácido- $\gamma$ -aminobutírico. IL-1, interleucina 1, MAPK, Proteína cinasa activada por mitógeno, ATP, adenosin trifosfato. IFN- $\gamma$ , interferón  $\gamma$ . Modificado de: Zeilhofer HU, Benke D. Chronic Pain States: Pharmacological Strategies to Restore Diminished Inhibitory Spinal Pain Control. 2012.

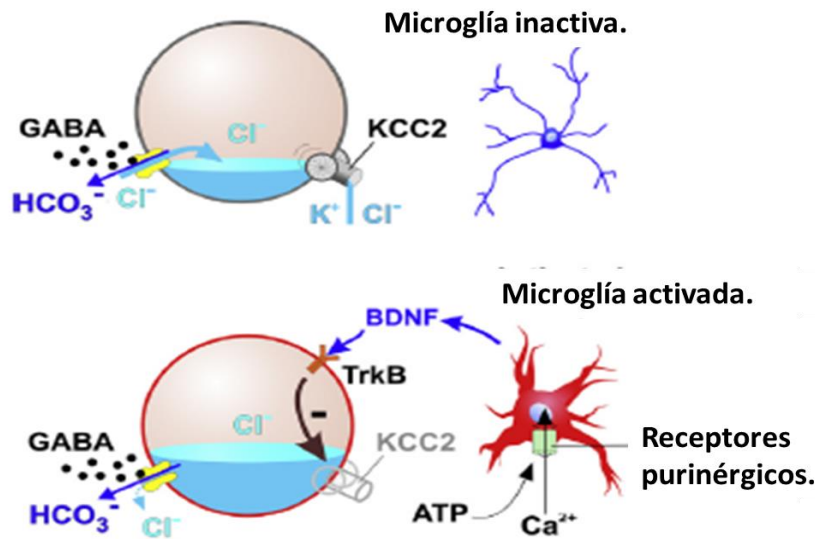


Fig. 9. **Cambio en la dirección del flujo del cloro inducida por la acción de BDNF.** La dirección del flujo de Cl durante la activación del receptor a GABA está determinado por la expresión del KCC2. La dirección del flujo cambiará de acuerdo con el potencial de equilibrio del Cl. Tomada de Bonin RP, DeKoninck Y. 2013.

#### 1.7.6. Remodelación de Circuitos Espinales.

Entre las hipótesis que buscan explicar la cronicidad del dolor, se ha propuesto una plasticidad mal adaptativa generando una hiper excitabilidad inducida por los estímulos nociceptivos mediante los siguientes mecanismos: a) pérdida de la segregación de la información sensitiva; b) pérdida de la actividad inhibitoria, ya sea por disminución de interneuronas inhibitorias espinales o modificación en la actividad inhibitoria y c) enlace de conexiones previamente inexistentes (Coull, J.A. et al. 2003). La plasticidad mal adaptativa se refiere a una remodelación estructural de los circuitos que permiten la comunicación entre estímulos aferentes no nociceptivos con neuronas nociceptivas, llevando a la pérdida de segregación de información entre estímulos táctiles que discurren a través de láminas internas con los nociceptivos que lo hacen a través de láminas externas en las astas dorsales de la médula espinal (Kuner R, Flor H. 2016) permitiendo la formación de enlaces anómalos como se muestra en Fig. 10.

Las fibras no nociceptivas ingresan a la médula espinal en las láminas III-V, se encuentran

interconectadas con aferentes nociceptivos de las láminas I y II, sin embargo, estas conexiones están sujetos a una fuerte inhibición por parte de las interneuronas espinales (Torsney, C., MacDermott, A.B. 2006). Experimentalmente se ha observado que, en modelos de dolor, ocurre apoptosis de interneuronas GABAérgicas espinales (Scholz, J. Broom, D.C. 2005). La pérdida de los mecanismos inhibitorios llevará a un desequilibrio en circuitos espinales, permitiendo una hiper excitabilidad de la vía nociceptiva.

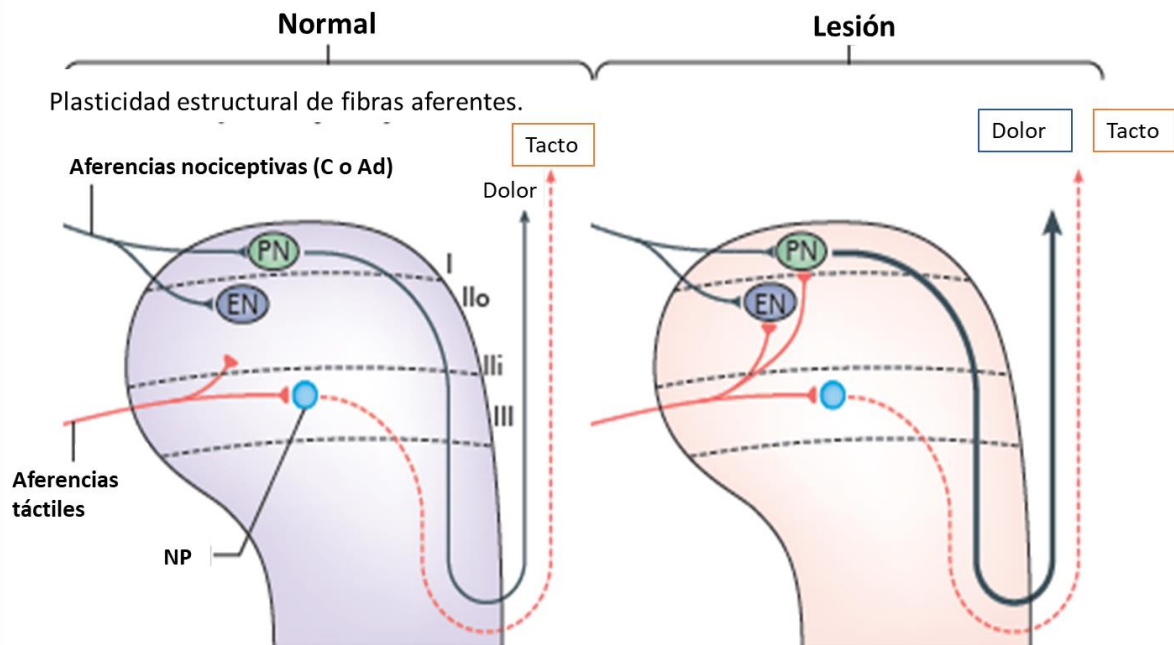


Fig.10. **Plasticidad entre vías mecano sensitivas aferentes y nociceptivas en condiciones normales y patológicas.** Panel izquierdo. En condiciones fisiológicas las fibras  $A\beta$  no excitan a las neuronas nociceptivas. Posterior a la lesión neuropática aparecen interconexiones entre vías superficiales y profundas resultando en mayor actividad de las vías nociceptivas. (marcado con línea gruesa negra en panel derecho). Abreviaciones: PN; neurona de Proyección. EN; interneurona excitatoria. Tomado de: Kuner R, Flor H. 2016.

### 1.8. Morfología y fisiología del GRD.

Los GRD son conglomerados celulares que poseen los somas de las neuronas sensitivas primarias que conducen la información sensitiva desde receptores sensoriales periféricos hacia el SNC a través de los nervios espinales (Devor, M. 1999). En conjunto con los nociceptores periféricos, constituyen

los primeros sitios de regulación de la percepción de la información somática.

En el ser humano existen 31 pares de nervios espinales formados por axones aferentes sensoriales y fibras motoras eferentes con su respectivo GRD, a través del cual se lleva información motora, sensitiva y autonómica (Krames, E.S. 2014). Las ratas poseen 31 pares, con una distribución de 8 cervicales, 13, torácicos, 6 lumbares y 4 sacros (Gelderby, J.B., Chopin, S.F. 1976).

Las neuronas sensoriales presentan una morfología pseudounipolar, emitiendo un axón desde un polo de la célula, donde a unos cientos de micrómetros posteriores se divide en dos ramas axonales, quedando un sistema en forma de T o Y. Una rama partirá hacia la periferia rumbo al órgano terminal y la otra lo hará hacia la médula espinal, formando la raíz dorsal (Devor M. 1999; Krames, E.S. 2014) (Fig. 11).

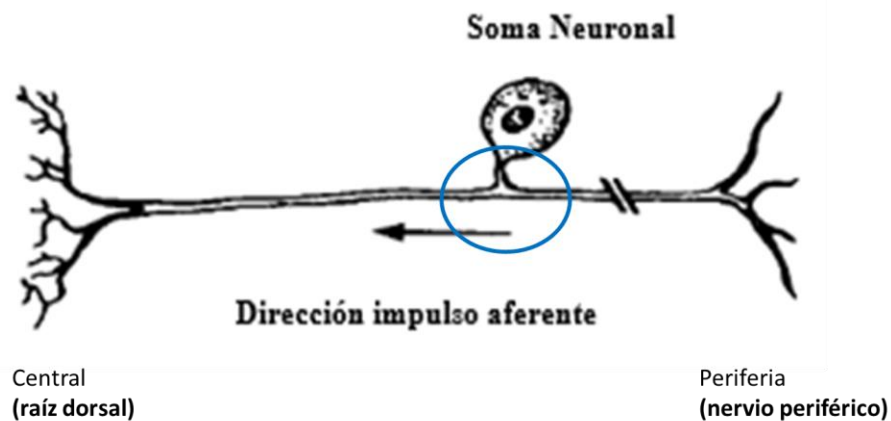


Fig.11. **Esquema que ejemplifica la morfología de una neurona sensorial.** La rama axonal periférica (derecha) llevando el impulso hacia rama con proyección central (izquierda) Círculo azul indica unión en T. Modificada de Devor M. 1999.

Esquemáticamente pareciera que la mayor parte del citoplasma se concentra en el soma, sin embargo, solo representa el 2% del total de la célula, mientras que el 98% restante corresponde al axón. (Devor, M. 1999). De acuerdo con estimaciones experimentales, los GRDs pueden contener hasta más de 30,000 neuronas (Groves, M.J., Christopherson, T. 1997). Éstas son heterogéneas tanto en tamaño,

función y expresión de los péptidos que sintetizan y liberan (Martínez, M. et al., 2000). Los somas varían de tamaño, entre 20 a 150 $\mu$ m de diámetro en humanos. Sus fibras de conducción también son heterogéneas y pueden diferenciarse por su composición química, la presencia o ausencia de una envoltura de mielina rodeando al axón conductor, provista por células de Schwann (Devor, M. 1999), su modalidad sensitiva (tacto o dolor) así como por sus características funcionales como diámetro de fibras neuronales y velocidad de conducción. Lo anterior, ha permitido clasificarlas como como fibras A, B, y C (Yam, M.F. et al. 2018).

La información sensorial proveniente de la periferia se conduce a través de la unión en T y puede continuar hacia la raíz dorsal de la medula espinal sin necesidad de invadir el soma neuronal. Sin embargo, esta información también puede ingresar al ganglio e invadir los somas neuronales (Devor, M. 1999). Esta información provee de una retroalimentación que permite empalmar el metabolismo celular con los requerimientos funcionales sensoriales, manteniendo el nivel óptimo de receptores, canales iónicos y otras moléculas necesarias para mantener sus propiedades funcionales, regulando así su actividad (Amir, R. Devor, M. 2003). Estas moléculas son sintetizadas en el soma neuronal dentro de GRD y se transportan hacia sus terminales mediante flujo axoplásmico (Devor, M. 1999).

Los somas de las neuronas sensoriales no forman conexiones sinápticas con otras neuronas del ganglio, cada una se encuentra rodeada por una o más capas de CGS. Estos somas también están separados por tejido conectivo compacto que regula su interacción (Pannese, E., 1981; Hanani, M. 2005). No obstante, se han identificado somas neuronales que están en estrecha aposición directa (Shinder et al., 1998; Pannese, E. 2010).

A pesar de no haber comunicación a través de sinapsis químicas en las células del GRD se sabe que existe una estrecha comunicación paracrina entre glía y neurona, que modula la actividad en ambos tipos celulares (Huang, L.Y., Gu, Y. 2013).



Se sabe que los somas neuronales del GRD liberan sustancia P posterior a la despolarización de la membrana (Huang, L.Y. Neher, E., 1996). Se ha observado la liberación de glutamato y ATP dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la estimulación del soma neuronal (Gu, Y. et al. 2010). La liberación de ATP es mucho más abundante que el glutamato, por lo que existe la idea de que ATP es el mayor transmisor utilizado dentro de esta interacción glía-neurona en el GRD (Zhang, X. Chen, Y. 2007). La liberación de ATP activa receptores purinérgicos P2X ionotrópicos y P2Y metabotrópicos, acoplados a proteínas G que se encuentran tanto en CGS como en los somas neuronales. Siendo el receptor P2X3R el más abundante en las neuronas nociceptivas (Dunn et al., 2001), mientras que en las CGS existe una mayor expresión del P2X7R (Chen, Y. Zhang, X. et al. 2008). En cuanto a los metabotrópicos, P2Y1R y P2Y2R son los más abundantes dentro de las neuronas del GRD. (Huang, L.Y., Gu, Y. 2013). Ha sido documentada la interacción paracrina entre las neuronas y las CGS, mediada por ATP. Esto mediante estudios del registro de la fluorescencia de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el soma neuronal y en las CGS que los rodean. La estimulación eléctrica de los somas neuronales cultivados generó un incremento en el flujo de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en los somas estimulados, seguido de un incremento en las CGS. En contraste, cuando se perfundió con la enzima apirasa en el medio, la cual degrada ATP y ADP. La estimulación continuaba generando el incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el soma neuronal, más no así en las CGS. Lo anterior indicó que la comunicación paracrina de ATP extracelular es la que generó el incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en las CGSs (Zhang, X. Chen, Y. 2007).

También, existe la evidencia de que las células del GRD se intercomunican en forma directa a través de canales de unión comunicante (UC) (Huang. et al., 2006; Pannese E., 2010), las cuales se abordarán en el siguiente parrafo.

### **1.9. Uniones Comunicantes (UC).**

Las UC, también conocidas como uniones en hendidura o “gap junctions” en inglés, son regiones de la membrana plasmática entre dos células adyacentes donde se localizan conglomerados de canales intercelulares (Goodenough, D.A, Paul, D.L. 2009; Herve, J.C., Derangeon, M. 2012). En esta región

el espacio intercelular se reduce en un orden de magnitud siendo de sólo 2-3 nm. Los canales intercelulares interconectan directamente el citoplasma de dos células adyacentes, permitiendo el paso de iones, segundos mensajeros y metabolitos de bajo peso molecular (> 1kDa). Por ejemplo:  $\text{Ca}^{2+}$ , glucosa, ADP, ATP. Permitiendo su acople eléctrico y metabólico (Nielsen, M.S. et al. 2012; Moczydlowski., E.G. 2017).

Las UC son un sustrato anatómico que permite el acople eléctrico entre células. Por lo anterior se les denomino “sinapsis eléctricas” dentro del SNC (Söhl, G. 2005; Nielsen, M.S. et al. 2012).

Los canales intercelulares o de UC están formados por la aposición de dos conexones. Los conexones o hemicanales son aportados por una de las células adyacentes y están formados por una familia de proteínas homologas que en los organismos vertebrados se conocen como conexinas. Cada hemicanal está formado por 6 de estas (Fig. 12).

Las conexinas conforman una familia de proteínas especializadas con un peso molecular de entre 26 y 46 Kilodaltons (kDa) (Moczydlowski., E.G. 2017). Poseen 4 dominios transmembranales (M1-M4) separados por dos asas extracelulares y una intracelular. Sus regiones amino y carboxilo se encuentran en el citosol (Nielsen MS. et al. 2012). Por estudios de genoma, se conocen 20 subtipos en mamíferos y 21 en el ser humano. Las conexinas se expresan de manera diferencial en todos los tejidos del organismo, exceptuando músculo esquelético, eritrocitos y espermatozoides adultos (Nielsen, M. S. et al. 2012).

La nomenclatura establecida más común es la que utiliza la abreviación de la palabra conexina (Cx), seguida de un número, el cual corresponde al peso molecular predicho por su secuencia de DNA complementario (cDNA). Los canales intercelulares pueden estar formados por dos hexámeros constituidos por un solo tipo de conexina, conociéndose como *canales homoméricos*. A su vez, cada conexón puede estar formado por una mezcla de conexinas distintas, formando *canales heteroméricos*, También hay canales *heterotípicos*, en los cuales cada conexón está formado por conexinas distintas. Lo anterior, aumenta la diversidad en las propiedades funcionales de estos canales (Maeda, S., Tsukihara, T. 2011).

Dentro de la familia de conexinas, once han sido identificadas en el sistema nervioso (Söhl, G.,

Maxeiner, S. et al. 2005; Belousov, A.D., Fontes, J.D. 2013) expresadas de forma diferencial entre los diferentes tipos celulares (Rash, J.E., Yasumura, T. 2007; Condorelli, D.F. 2000) (Tabla II). La expresión de Cx36 se limita a neuronas y recientemente se encontró su expresión en las CGS del GRD (Pérez-Armendáriz, E.M. et al. 2018).

La estructura del canal se ha visualizado mediante la técnica cristalográfica de rayos X por parte de Makoski en 1985, el cual esquematiza la estructura que forma el canal a través de dos membranas celulares (Fig.13).

### 1.9.1. Conexina 36.

Diferentes estudios han mostrado la expresión preferencial de la conexina 36 (Cx36) dentro de las neuronas del sistema nervioso en sitios como retina, oliva inferior (bulbo raquídeo) bulbo olfatorio, cerebelo, médula espinal, corteza cerebral, GRD, entre otros (Condorelli, D.F. 2000; Rash, J.E., Yasumura, T. 2007). La Cx36 forma canales homotípicos dendro-somaticos o dendro-dendriticos (Belousov, A.D., Fontes, J.D. 2013; Ubaidi M.R., White, T.W. 2000).

Por estudios de doble fijación de voltaje en pares aislados de células acopladas en forma eléctrica y transfectadas con la Cx36, mostraron que las corrientes formadas por esta conexina están constituidas por la apertura y cierre de canales intercelulares de reducida conductancia unitaria (10-15 pS). Además, estos canales tienen poca sensibilidad al voltaje y una mínima permeabilidad al paso de marcadores fluorescentes como amarillo lucifer (AL) (Srinivas et al. 1999; Pérez Armendáriz, E.M. et al., 1991) caracterizado en las células beta pancreáticas recién dissociadas, las cuales también se encontró que expresan la Cx36 (6.5 pS) (Pérez Armendáriz, E.M. 2013). Estas propiedades les permiten regular el acople eléctrico de células excitables de forma fina.

Fig. 12

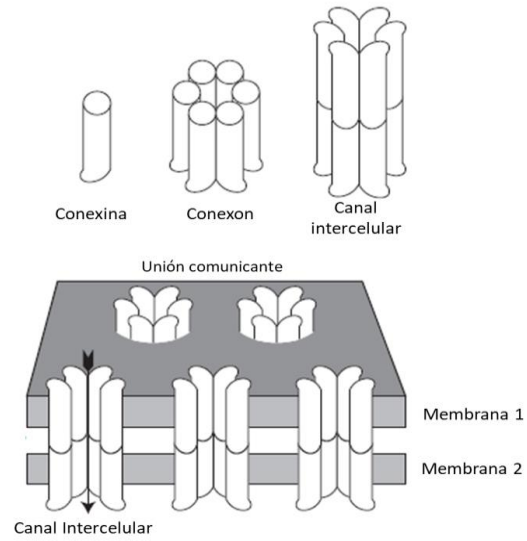
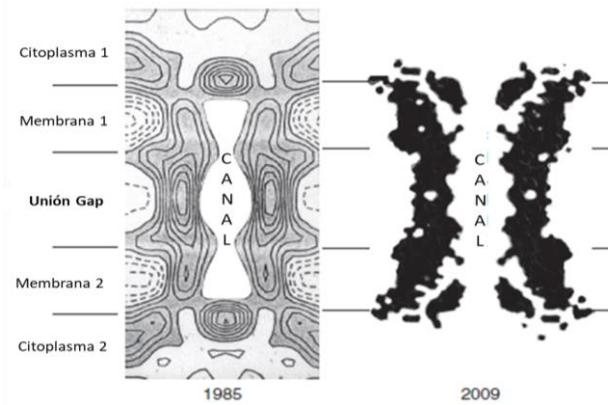


Fig. 13



Células del SN	Cx expresada.
Astrocito	Cx 43, Cx 40, Cx45
Oligodendrocito	Cx 32, Cx43
Célula Glial Satélite (CGS)	Cx 43, Cx36
Neurona.	Cx 36.

Tabla II. Expresión de conexinas en diferentes células del sistema nervioso.

Fig.12. **Diagrama que muestra la representación esquemática de una unión comunicante.** Panel superior, las conexinas se ensamblan formando conexones (seis subunidades). Un canal intracelular está formado por dos conexones aportados por cada una de las células adyacentes. Panel inferior, un conglomerado de canales intercelulares forma una placa de unión comunicante (UC). Modificado de: Goodenough, D.A., Paul, D.L. 2009.

Fig. 13. **Modelo de la estructura de un canal intercelular.** Panel izquierdo, mapas de electrodensidad de un canal intercelular construidos a partir de estudios de difracción de rayos X, propuesta de Makowski en 1985. Utilizando preparaciones enriquecidas en placas de UC de hígado de ratón y congeladas y cristalizadas. Panel derecho, modelo de una canal intercelular obtenida por Maeda en 2009 adquirida a través de una preparación enriquecida de UC formada por la expresión de la Cx29 en un sistema de expresión in vitro que fueron cristalizadas. Modificado de: Goodenough, D.A., Paul, D.L. 2009.

## **2. Antecedentes Inmediatos.**

La comunicación intercelular tanto paracrina como directa se ha documentado entre las células del GRD tanto en condiciones fisiológicas como en procesos de dolor y su participación dentro del mismo.

### **2.1. Sincronización paracrina por $K^+$ ; despolarización cruzada dentro de GRD.**

Wall y Devor en 1990 registraron disparos de potenciales de acción de forma espontánea en las neuronas del GRD. Más aún, observaron que posterior a la generación de una lesión en el nervio ciático, la frecuencia de este disparo se veía incrementada (Devor, M., Wall, P.D., 1990; Amir, R., Devor, M. 1996).

Posteriormente, Amir y Devor, en 1999 demostraron la existencia de una interacción eléctrica entre fibras aferentes de diferentes tipos neuronales que comparten el mismo ganglio. Tras la estimulación tetánica de fibras aferentes tipo A, es capaz de originarse una despolarización transitoria de varios milivoltios en las neuronas vecinas tipo C sin ser estimuladas directamente (Amir, R., Devor, M. 1999). Dicha despolarización fue sub-umbral, sin embargo, generó una facilitación para la generación de potenciales de acción o espigas cuando la neurona se acerca a su umbral de disparo. Este fenómeno se le llamó “despolarización cruzada” y “excitación cruzada” respectivamente. Este efecto, parece ser mediado por la liberación de moléculas transmisoras en el ganglio que se difunden en el espacio extracelular actuando en células vecinas. Concretamente la acumulación de  $K^+$  intersticial generado por la actividad eléctrica (Amir, R., Devor, M. 1996).

En condiciones de lesión de fibras aferentes, en las neuronas sensitivas primarias por el fenómeno antes descrito se genera una hiperactividad eléctrica que contribuye a la generación de dolor a través de descargas ectópicas, que producen la alodinia mecánica (Wall, P.D., Devor, M. 1983). En principio, esta despolarización podría proporcionar una señal de retroalimentación permitiendo la regulación de la sensibilidad de las terminaciones nerviosas. Siendo útil para regular la excitabilidad y permitiendo un correcto funcionamiento del sistema (Devor, M. 1999).

## **2.2. La comunicación intercelular directa es mediada por UC en el GRD.**

Las CGS están intercomunicadas en forma directa por UC, permitiéndoles regular el microambiente iónico y la excitabilidad entre las células GRD (Ohara. P.T., Vit, J.P. et al. 2008; Huang, M.L., Gu, Y. 2013). La presencia de UC entre CGS se ha documentado por estudios de microscopia electrónica y transferencia del colorante fluorescente amarillo de Lucifer (AL) entre células vecinas (Blum, E., Procacci, P. 2014; Ledda, M. Blum, E. 2009). También se ha descrito que estas están intercomunicadas por la Cx43, proteína que se localiza en las zonas de aposición membranal posiblemente formando uniones comunicantes (Neuman, E., Hermanns, H. 2015, Pérez Armendáriz, E.M. et al., 2018). Interesantemente, en condiciones de dolor se han encontrado cambios en la comunicación intercelular directa, mediada por las UC como se describe a continuación.

## **2.3 Cambios en la comunicación intercelular asociada a procesos de dolor.**

La comunicación intercelular directa entre las células de los GRD se ha estudiado en modelos de neuropatía secundaria a la inducción de inflamación local del nervio ciático con aplicación de un parche conteniendo Adjuvante Freund Completo (CFA) en el nervio ciático (Ledda, M., Blum, E. 2009) así como por inflamación sistémica, inducido por la inyección intraperitoneal de lipopolisacárido de E. Coli (LPS) (Blum, E. Procacci, P. 2014), en los cuales se corroboró la presencia de dolor mediante la estimulación mecánica con filamentos de Von Frey. En estos estudios se analizó la transferencia intercelular micro inyectando el trazador fluorescente AL a una CGS y encontrando que dicha transferencia se encuentra limitada a las otras CGS que rodean una sola neurona en animales

control, mientras que, en condiciones de dolor, la transferencia intracelular de AL llega a las CGSs que rodean a otras neuronas vecinas (Ledda, M., Blum E. 2009; Blum, E. Procacci, P. 2014).

También, se observó que en los animales control no hubo transferencia de AL entre neuronas del GRD estudiado, sin embargo, tras la inyección de AL en las neuronas de animales con dolor neuropático hubo transferencia de material fluorescente hacia neuronas vecinas, así como un incremento en la incidencia del acople entre las CGS (Blum, E. Procacci, P. 2014). En un estudio donde se realizó una axotomización del nervio ciático y safeno en rata, se encontró un incremento en la transferencia intercelular del colorante fluorescente AL, así como también un aumento en el número de UC, observadas a través de microscopia electrónica en las CGS de los GRD L4 y GRD L5 del lado lesionado (Pannese, E., Ledda, M. 2003).

Huang y colaboradores en 2010, analizaron el efecto de agentes bloqueadores de canales intercelulares en la comunicación intercelular del GRD S1, en un modelo de *dolor visceral* por inflamación colónica, generado por la aplicación intraperitoneal de dinitro benzoato sulfonado (BNDS), tras 12 días de su administración, indujo los siguientes cambios: a) incremento en la sensibilidad mecánica evaluado con filamentos de Von Frey en la región inferior de abdomen, b) aumento en el acople intercelular con AL en las CGS del GRDS1 y c) aumento en la actividad eléctrica espontánea. Mismos efectos disminuyeron con la administración de agentes desacoplantes de canales intercelulares tales como la carbenoxolona, el ácido meclofenámico y el ácido palmitoleico inyectados intra peritonealmente. Lo anterior, sugirió la participación de los canales de UC en la generación de dolor e hiper excitabilidad neuronal a través de la actividad eléctrica ectópica (Huang, T-Y., Belzer, V. et al. 2010). No obstante, hay que recordar que los desacoplantes utilizados son poco selectivos y pueden actuar en otros tipos de canales iónicos.

En un modelo de lesión por la compresión del GRDL4 mediante la realización de una estenosis foraminal intervertebral durante 21 días (Hu, S.J., Xing, J.L. 1998), se indujo la activación de las CGS del GRD manipulado, monitorizado por estudios de inmunofluorescencia (IF) con un anticuerpo contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) 7 días posteriores a la generación de lesión. En estas condiciones, también se encontró un incremento en la incidencia del acople de colorantes

fluorescentes entre las CGS, el cual fue mayor a los 7 días posteriores a lesión en comparación con el grupo control (Zhang, H. et al. 2009). En cuanto a las neuronas, y específicamente, dentro del GRD, se conoce menos como el dolor es capaz de impactar su intercomunicación.

En particular, recientemente el grupo de la Dra. Pérez Armendáriz identificó por primera vez el subtipo de conexina que expresan las neuronas del GRD (Pérez Armendáriz, E.M. et al. 2018) y, como se explica en la siguiente sección, son hallazgos que han motivado el desarrollo de la presente tesis.

### **3. Justificación.**

La Cx36 es la conexina con mayor distribución en las células neuronales del sistema nervioso (Condorelli, D.F. 2000; Pérez Armendáriz, E.M. et al. 2018).

En la médula espinal se sabe que las neuronas de las raíces dorsales expresan la Cx36 y que la ligadura parcial del nervio ciático (PSNL) induce una disminución de su expresión al día 21 después de la lesión en los segmentos L4-L6, mediante estudios de inmunofluorescencia y Western blot. Posiblemente por una disminución en terminales aferentes (Nakamura, Y., et al., 2015). Estos estudios sugirieron también que las fibras aferentes del GRD expresan la Cx36. Lo anterior, es consistente con estudios de hibridación *in situ* mostraron que los GRD expresan el RNAm de la Cx36 (Condorelli, D.F. 2000).

Recientemente la Dra. Martha Pérez Armendáriz y colaboradores, demostraron que todos los GRD de la región lumbar expresan proteína Cx36. Realizándolo mediante estudios de PCR en tiempo real, así como inmunohistoquímica (IHC) y doble IF. En los estudios, las neuronas se identificaron por su positividad al marcador anti  $\beta$ -III tubulina y las CGS, identificadas por la detección de la marca positiva con un anticuerpo contra la anti-glutamin sintetasa de los GRD lumbares. También, encontraron que el RNAm de la Cx36 en el GRD L4 ipsilateral, decae significativamente con respecto al de los ganglios L4 de ratas control al día 84 posterior a la ligadura del nervio sural, modelo que genera alodinia de forma sostenida. No así cuando la lesión se realizaba en nervio tibial, modelo que



no genera dicha sintomatología (Pérez Armendáriz, E.M. et al. 2018). Lo anterior ha sugerido la asociación del dolor a la posible disminución de la expresión de la proteína Cx36. No obstante, se ignora a la fecha si la expresión de la proteína Cx36 también disminuye en las células de GRD, y de hacerlo, en que subtipo celular ocurre este cambio.

La presente tesis pretende contestar las preguntas anteriores, utilizando un modelo de dolor neuropático irreversible, secundario a la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 antes de su entrada al GRD en ratas adultas (Kim, S.H., Chung, J.M. 1992). Este modelo tiene la ventaja de la selectividad de fibras que se busca lesionar y la sintomatología clínica se presenta de manera rápida (3 días), alcanzando un máximo sostenido a los 15 días posteriores a la ligación.

#### **4. Pregunta de investigación.**

¿Existe un cambio en la expresión de la proteína Cx36 en los GRD L4 y L5 en condiciones de dolor neuropático inducido por ligadura de los nervios espinales correspondientes?

#### **5. Hipótesis.**

La lesión del sistema nervioso se ha observado asociado a incrementos en la expresión de la conexina 36 (Cx36). Se ha identificado que las neuronas y CGS del GRD expresan la proteína Cx36. De lo anterior es posible que la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 incrementen la expresión de la Cx36 en las neuronas y/o células gliales del GRD como un mecanismo compensatorio al incremento en la excitabilidad neuronal.

#### **6. Objetivos.**

##### **6.1 Objetivo general.**

Investigar la existencia de cambios en la expresión de la proteína Cx36 en la población neuronal y en las CGS tras el desarrollo de una lesión neuropática por ligamiento de los nervios espinales L5 y L6.

## **6.2 Objetivos específicos.**

1. Desarrollar un modelo de dolor neuropático experimental mediante el ligamiento de nervios espinales L5 y L6 del lado izquierdo del animal como grupo experimental y de un grupo control con cirugía simulada o “sham”
2. Validar el desarrollo del modelo neuropático evaluando el umbral de retiro de la pata trasera ipsilateral a la lesión mediante su estimulación mecánica utilizando filamentos de Von Frey a seis diferentes tiempos (días 0, 3, 7, 14, 17 y 21 posteriores a ligamiento) en ambos grupos.
3. Investigar la expresión de la proteína Cx36 en cortes de GRD5 y GRD4 experimentales, así como GRD4 y GRD5 de animales sham mediante su incubación con un anticuerpo dirigido contra la Cx36 y revelados por inmunofluorescencia indirecta.
4. Desarrollar un programa que permita la pseudo cuantificación automática de las marcas fluorescentes positivas para la Cx36, buscando identificar posibles cambios de expresión de la proteína Cx36 en los GRD de animales que se realizó la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 y el grupo sham.

## **7. Materiales y Métodos.**

### **7.1 Sujetos.**

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas de una edad de 8 semanas. Con un peso entre 150-170gr, distribuidas en dos grupos: un grupo Sham (n=10) y grupo experimental (n=12). Éstas se distribuirán individualmente en jaulas de acrílico, con agua y alimento a libre demanda con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Las ratas se habituaron a dichas condiciones previamente a la realización del procedimiento. Se siguieron los protocolos de ética de la Facultad de Medicina, UNAM y del CINVESTAV, IPN. Los cuales están apegados a la normatividad internacional para el uso de animales, siguiendo las pautas éticas para investigación de dolor experimental en animales conscientes (Zimmerman, M., 1983), se minimizó en lo posible la manipulación de los animales a fin

de ocasionar la menor evocación de dolor fuera de las evaluaciones planteadas y utilizando el menor número posible de animales para obtener resultados significativos en la investigación.

### **7.2 Modelo de dolor neuropático.**

Se realizó la ligación periférica de nervio espinal L5 y L6 izquierdo al grupo experimental (n=12), siguiendo el protocolo previamente descrito (Kim, S.H., Chung, J.M. 1992). Para realizarlo se anestesió al roedor con Ketamina 70 mg/kg y Xilazina 8 mg/kg, administrándose vía intraperitoneal. La rata se posicionó en prono y se localizaron las espinas ciáticas, que corresponden a la vértebra L6 (Fig.14). A este nivel se realizó una incisión longitudinal de 2-3 cm en el eje dorso-vertebral. Se separaron los músculos para-espinales de los procesos espinosos buscando exponer la apófisis lateral de L5, la cual se retiró cuidadosamente con una gubia pequeña exponiendo el nervio periférico correspondiente a L5. Se colocó una ligadura a 0.5 cm posteriores al inicio del nervio espinal de L5 y L6 realizando 2 nudos firmes con hilo de seda del número 5-0 (Fig. 15). Procediendo a realizar hemostasia por presión, y cierre de los planos anatómicos intervenidos mediante puntos simples con seda 2-0. El cuidado de la herida se realizó con aplicación de antiséptico tópico.

Para el grupo sham (n=10), se realizó el mismo procedimiento que al grupo experimental exceptuando la ligación de los nervios L5 y L6. La vigilancia de los animales se realizó diariamente a la misma hora (medio día). Manteniéndose en cajas separadas bajo condiciones semejantes de humedad, temperatura y alimentación a fin de prevenir infecciones.

### **7.3 Valoración clínica de la generación de dolor.**

Para la valoración de la sensibilidad mecánica de la pata se colocó a los animales en jaulas de observación, las cuales consisten en un espacio de 18 cm x 18 cm x 27 cm con paredes de acrílico transparente y piso con malla de alambre, permitiendo una estimulación mecánica en la superficie plantar con filamentos de Von Frey de diferente grosor (Fig.16). Tras un periodo de adaptación a las condiciones del área de evaluación durante 30 minutos, se estimuló con filamentos de Von Frey de diferente calibre que generan distintas presiones para determinar el umbral de retiro de la extremidad posterior empleando el método “up and down” (Dixon, 1980; Chaplan et al. 1994). La valoración

inició con el filamento de 0.6 g, con incrementos logarítmico de rigidez del filamento, ascendiendo o descendiendo en función de respuesta del animal. El umbral de retiro de la extremidad se midió tomando en cuenta dos tipos de respuestas, siendo positiva el retiro de la extremidad ante una estimulación con un lapso de 10 s, y como respuesta negativa ante la ausencia de este movimiento. Posterior a la primera respuesta positiva, se estimuló 4 veces más, tomando un patrón de 6 respuestas tanto positivas como negativas y el valor del último filamento utilizado.

El 50% del umbral de retiro se calculó utilizando la formula siguiente:

$$50\% \text{ umbral (g)} = (10^{[X_f + k\delta]}) / 10,000.$$

Donde:  $X_f$  es el valor del último filamento utilizado (en unidades logarítmicas);  $k$  es el factor de corrección basado en los patrones de respuesta de la tabla de calibración y el valor tabulado con base en el patrón de respuestas positivas y negativas, y  $\delta$  se refiere a las diferencias de promedio entre estímulos (en unidades logarítmicas) (Dixon, 1980; Chaplan et al. 1994). La presencia de alodinia se considera cuando el 50% umbral de retiro de la extremidad es  $< 4$  g (Fig.16 y 17).

Las evaluaciones se realizaron en distintos momentos: previo a procedimiento y los días 3, 7, 14, 17 y 21 posteriores a la intervención de la pata izquierda.

En este se coloca el valor del último filamento utilizado (4.56) y el de las 6 respuestas previas a su uso. Registrándose: La primera respuesta positiva (retiro de pata) ante estímulo mecánico, la última respuesta negativa previa a la primer positiva y las cuatro respuestas siguientes a la primera respuesta al dolor. A partir de esta información se calcula la presión necesaria (expresada en gramos) para generar el 50% de retiro de la pata ante estímulo mecánico. Para el ejemplo mostrado, el valor de la evaluación fue de 4.39 g. Si el valor resultante de la evaluación es menor a 4 g se considera que hay alodinia.

Fig.14

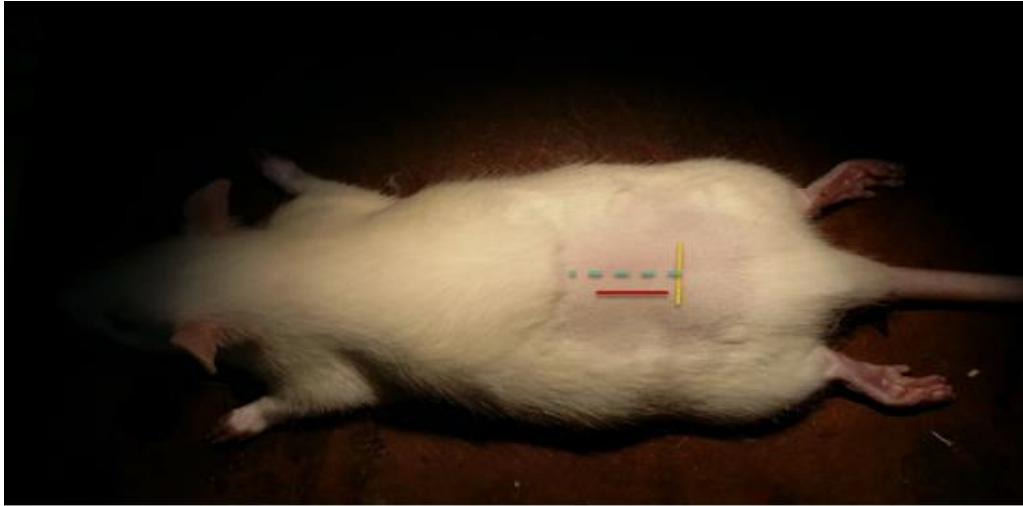


Fig. 15

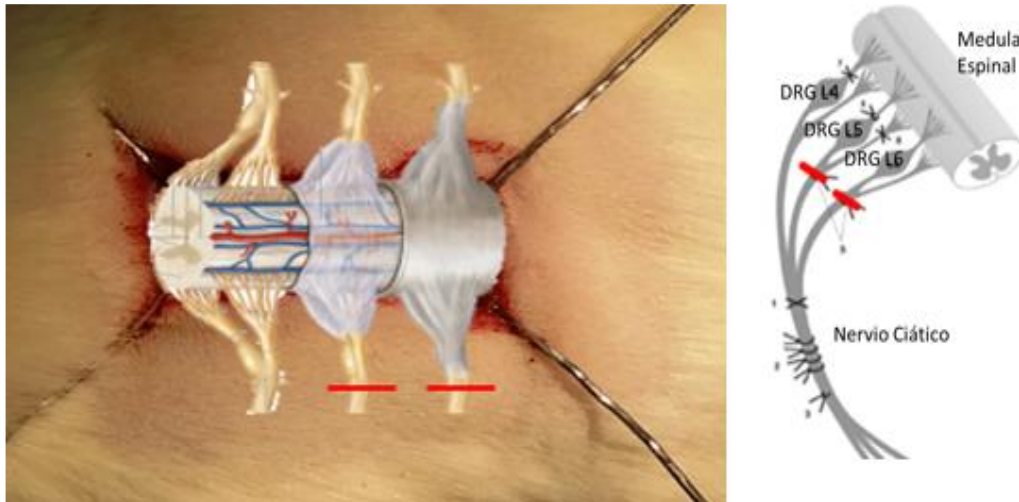


Fig. 14. Posición inicial para intervención de animal. Línea amarilla muestra el nivel de espinas ciáticas. Línea verde discontinua representa la línea media corporal. Línea roja representa sitio de incisión.

Fig. 15. Representación esquemática del modelo de generación de dolor. Se representa el sitio donde se realizó la ligación de nervios espinales L5 y L6. Lado contralateral se mantuvo intacto.

Fig.16

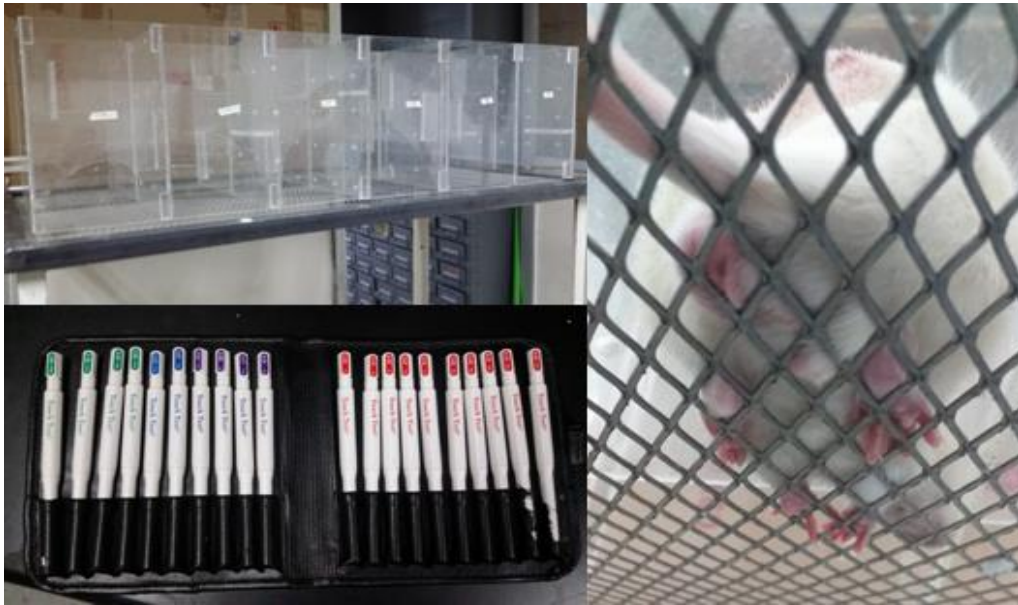


Fig. 17

<b>ENTER Xf :</b>	<b>4.56</b>	<b>ENTER Xf</b>			Fecha: _____	Grupo: _____
<b>ENTER XO SERIES :</b>	<b>0X00X0</b>	<b>ENTER XO SERIES</b>			Días de lesión: _____	Tiempo: _____
<b>ANSWER: --&gt;</b>	<b>4.3987</b>	<b>&lt;--ANSWER</b>			Rata: _____	
					4.39g	
					3.84	<input type="radio"/>
					4.08	<input type="radio"/>
					4.17	<input type="radio"/>
					4.31	<input type="radio"/> <input type="radio"/>
					4.56	<input checked="" type="radio"/> <input type="radio"/> <input type="radio"/>
					4.74	<input type="radio"/> <input checked="" type="radio"/>
					4.93	<input type="radio"/>
					5.07	<input type="radio"/>
					5.18	<input type="radio"/>
					5.46	<input type="radio"/>
					5.88	<input type="radio"/>
					6.10	<input type="radio"/>

Instrucciones :

- 1.- Introducir en el xf el número del último filamento utilizado .
- 2.- Introducir en la celda inferior los últimos 6 valores obtenidos en la evaluación

En donde: x= RESPUESTAS POSITIVAS  
o= RESPUESTAS NEGATIVAS

Fig. 16. **Superior Izquierda.** Espacios para la valoración de animales. **Inferior izquierda.** Filamentos de Von Frey utilizados. **Derecha.** Vista inferior del espacio de evaluación.

Fig. 17. **Formato para registro de evaluaciones (up&down).** En la imagen se ejemplifica un formato de evaluación.

#### **7.4 Obtención y procesamiento de muestras biológicas.**

Posterior a la última evaluación del animal se procedió a anestesiarlo con la combinación de Ketamina 70 mg/kg y Xilazina 8 mg/kg, administrándose vía intraperitoneal, procediendo a la apertura de caja torácica para acceder al área mediastinal y realizar una perfusión intracardiaca para la fijación de tejidos con paraformaldehído (PFA) al 4%. Iniciando la perfusión con 250 ml de solución PBS a un flujo de 8 ml/min. Una vez terminado se continuó con 250 ml de PFA al 4% a un flujo de 8 ml/min; procedimiento previamente estandarizado en el laboratorio del Dr. Rodolfo Delgado. Posterior al paso de ambas soluciones se procedió al retiro de los ganglios de interés. (GRDL4, GRDL5 y GRDL6) del lado intervenido y los del lado contralateral.

Los ganglios se mantuvieron sumergidos en PFA al 4% hasta su procesamiento e inclusión en bloques de parafina. Se procedió a la realización de cortes seriados de 4 µm de grosor dispuestos en portaobjetos cargados positivamente permitiendo mayor adhesión del tejido. Dada la situación sanitaria originada por la pandemia solo fue posible procesar los GRD L4 y GRD L5, pero no los del GRD L6. Inicialmente los tejidos se trabajaron en portaobjetos convencionales, sin embargo, los cortes se despegaron y sufrieron daño, haciendo imposible su correcta evaluación. Por lo que se requirió de portaobjetos cargados. Varios de estos cortes se utilizaron para hacer diversas calibraciones de los anticuerpos estudiados, Por lo anterior, la “n” experimental se redujo de 12 a 6 en el GRD L4, y de 12 a 6 en el GRD L5 para las ratas del grupo experimental. Por otra parte, la “n” correspondiente al grupo sham pasó de 10 a 5 en el GRD L4, y de 10 a 5 en el GRD L5.

#### **7.5 Estudios Inmunofluorescencia (IF).**

En los cortes de 4 µm de los GRD se realizaron estudios de IF para los tejidos de los cuatro grupos estudiados en cada laminilla, hubo dos cortes incubados con anticuerpos primarios y un corte incubado solo con anticuerpos secundarios, utilizado como control negativo.

Se uso un anticuerpo primario, anti-Cx36 policlonal de conejo (Invitrogen Thermofisher Scientific – Catalogo #51-6300), se calibraron las diluciones y se utilizó a una dilución final óptima de 1:50.

El segundo anticuerpo primario fue anti-Pan Neuronal Marker (anti-PanN) (Milli-Mark Sigma

Aldrich– MAB2300), monoclonal de ratón, capaz de detectar un coctel de proteínas neuronales. Utilizado para la localización de somas neuronales y sus fibras. Se calibraron diluciones, utilizando la dilución óptima de 1:1000. Se probaron diferentes anticuerpos secundarios unidos a un fluoro foro rojo a fin de que no hubiese sobreposición con la fluorescencia de FITC ( $E_m = 517 \text{ nm}$ ) para poder realizar estudios de dobles marcajes con fluoresceína. Esto se logró utilizando un anticuerpo policlonal de burro anti-conejo acoplado a Alexa 594 (Invitrogen Thermofisher Scientific – Catalogo # A-21207) ( $E_x = 594 \text{ nm}$ ,  $E_m = 617 \text{ nm}$ ) a una dilución óptima de 1:200. El segundo anticuerpo secundario utilizado fue un policlonal de cabra anti-ratón acoplado a FITC (Invitrogen Thermofisher Scientific Catalogo #62-6511) ( $E_x = 498 \text{ nm}$ ,  $E_m = 517 \text{ nm}$ ). Adicionalmente los núcleos fueron contrateñidos con el marcador nuclear DAPI (0.001 $\mu\text{l/ml}$ ) Invitrogen Thermofisher Scientific Catalogo #D1306 ( $E_x = 355 \text{ nm}$ ,  $E_m = 460\text{nm}$ ) (Fig.18).

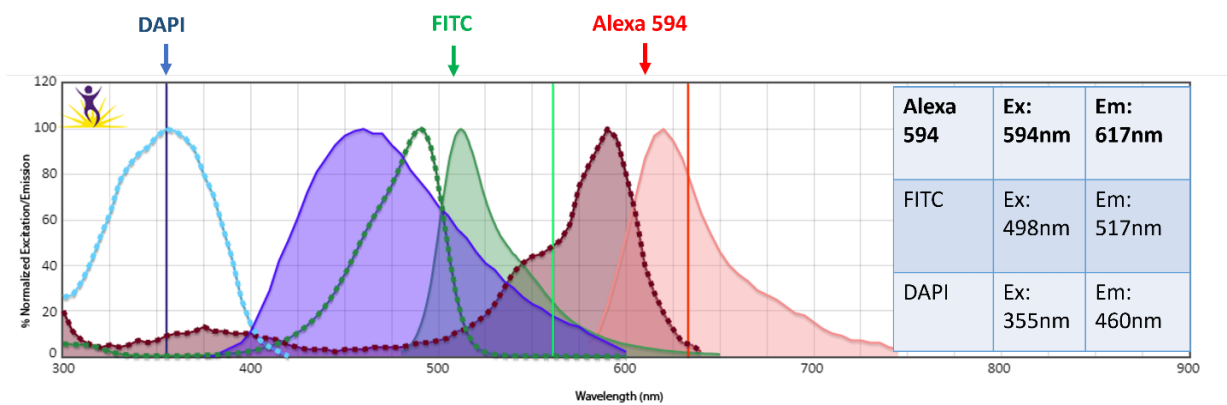


Fig. 18. **Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de anticuerpos utilizados.** Estos se encuentran en diferentes valores del espectro de longitud de onda, evitando que las señales fluorescentes se traslapen entre ellas.  $E_x$  = frecuencia para la excitación,  $E_m$  = frecuencia de emisión.

## 7.6 Adquisición de imágenes con microscopía confocal.

Se utilizaron dos microscopios confocales. El primero el de la USAI de la Facultad de Química, UNAM y el segundo dentro del Laboratorio nacional de microscopía avanzada, IMSS. El microscopio confocal de la Facultad de química, UNAM se usó para identificar las titulaciones óptimas para cada



anticuerpo y el segundo en el Laboratorio nacional de microscopía avanzada de IMSS, en el Centro Médico Nacionl, para la captura de las imágenes experimentales, ya que éste sí estuvo abierto durante la pandemia. Se eligió el corte incubado con anti-Cx36 que tuvo la mayor definición en la distribución espacial de la fluorescencia para cada ganglio analizado. Debido a las medidas restrictivas por la situación sanitaria derivada de la pandemia COVID-19, para cada ganglio de los diferentes grupos estudiados sólo se tomaron 2 imágenes de cada corte incubado con anti-Cx36, así como de su respectivo control negativo. Las imágenes fueron obtenidas con un objetivo de 20X en cortes ópticos de 0.5  $\mu\text{m}$  de espesor. En éstas, se seleccionaron dos regiones de interés, a las cuales se les realizaron ampliaciones digitales adicionales de 3.5X que son las que se muestran. El total de ganglios estudiados fueron: experimental GRD L4 = 6, experimental GRDL5 = 6, y sham GRD L4 = 5, sham GRD L5= 5. La intensidad y resolución espacial o definición de la marca de todas las imágenes fue heterogénea, por lo que para su pseudo cuantificación se seleccionaron las imágenes con la mayor resolución espacial de la marca fluorescente. Para ello se utilizó un total de tres imágenes adquiridas para cada uno de los diferentes grupos de ganglios estudiados, a excepción del grupo GRD5L experimental, que contó con cuatro imágenes confocales para su análisis.

### **7.7. Pseudo cuantificación de fluorescencia.**

Una vez seleccionadas las imágenes más representativas de todos los grupos se procedió al análisis pseudo cuantitativo de las marcas fluorescentes. Esto se realizó en colaboración con la Ingeniera en computación Abigail Ortega Valdivia el software FT-Cx36, desarrollado a través de la plataforma de programación MATLAB-R2020a (Licencia: 40816183) a fin de cuantificar la fluorescencia total (FT) en el área del corte adquirido, basado en la teoría de intersección de conjuntos (Stoll, R.R., 1963) (Fig.19).

Este programa cuantificó la densidad de puntos Cx36-IF positivos que estuvieron en un rango de intensidad definido por los siguientes parámetros:

- Límite inferior o fluorescencia basal (Fb). Utilizando imágenes de IF de todos los cortes incubados sólo con anticuerpo secundario de los diferentes GRD estudiados (n=12) se estimó el rango de fluorescencias que éstos tuvieron, así como se consideró el de mayor intensidad como el límite inferior de fluorescencia o basal. Las marcas fluorescentes cuyas intensidades se encuentren por arriba a este límite se considerarán positivas para su pseudo cuantificación.
- Fluorescencia máxima o superior (Fmax). A cada imagen se le hizo un histograma de frecuencias con los valores de fluorescencia y se identificó el rango de variación de la intensidad de fluorescencia de la marca Cx36-IF positiva con respecto a la de los artefactos, cuya fluorescencia fue mucho mayor. Una vez suprimida la anterior, se cuantificó la fluorescencia en cada imagen que se encontró entre la Fb y la Fms en forma automática. El programa cuantificó automáticamente el resto de la fluorescencia que se encontró entre Fb y Fmax.
- Resolución espacial de la fluorescencia. La fluorescencia se cuantificó automáticamente con un límite espacial de un píxel dentro de la imagen, siendo de  $0.032 \mu\text{m}^2$ . Esto es un punto fluorescente que de estas dimensiones se consideró dentro de la cuantificación.
- Determinación del área del corte. La intensidad de la fluorescencia de la imagen se llevó a su máxima intensidad hasta verse homogénea a fin de lograr un contraste con el fondo sin tejido, lo cual definió la periferia y el área presente con tejido. Posteriormente se dividió el número total de pixeles positivos en la imagen entre  $0.1785 \mu\text{m}/\text{pix}$ . Relación espacial obtenida de la barra de calibración de cada imagen que imprime el equipo confocal en forma automática. Permittiéndonos obtener el área correspondiente al tejido dentro de la imagen en  $\mu\text{m}^2$ .
- La densidad de la marca Cx36. La densidad de la marca para los diferentes grupos de ganglios fue considerada como el cociente del total de puntos Cx36-IF positivos/área de tejido. El programa, hizo estos cálculos en forma automática y nos aportó una base datos con la siguiente información: área analizada, conteo de puntos positivos, cálculo de la densidad del puntillado Cx36-IF positivo por área analizada. Expresado en puntos fluorescentes /  $\mu\text{m}^2$ .

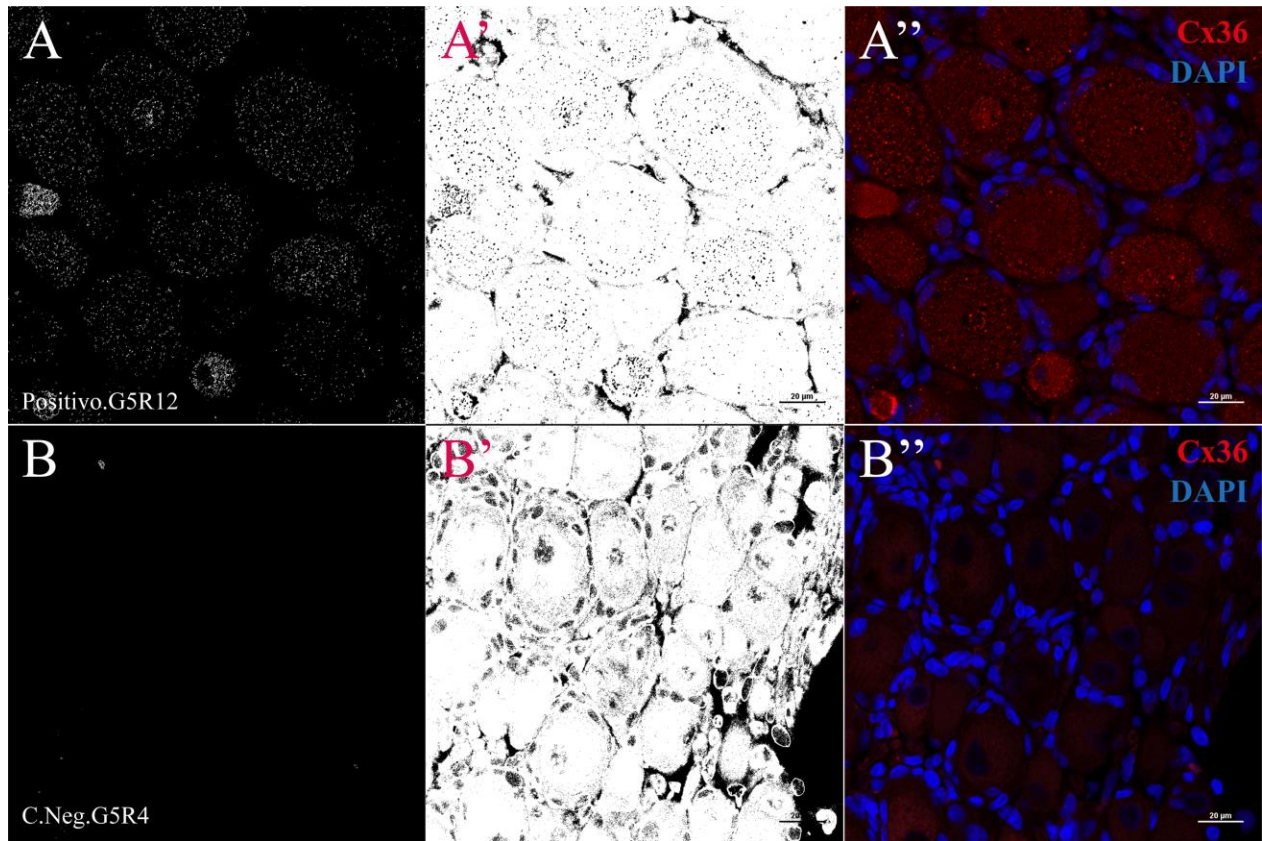


Fig. 19. Imágenes ejemplificando el proceso de la pseudo cuantificación automática de la marca Cx36-IF positiva y del área en imágenes confocales de cortes de GRDL5 tanto experimental como sham. (A, A' y A'') imágenes de un corte incubado con anti-Cx36. Izquierda. A) imagen en la cual se aplicaron los filtros de fluorescencia basal (Fb) y fluorescencia máxima (Fmax) donde pueden claramente verse los puntos Cx36-IF positivos que son utilizados para cálculo de densidad por área. Centro A') Cálculo de área identificada a través del aumento de la saturación de la fluorescencia en la imagen permitiendo diferenciar las zonas con tejido. Derecha. A'') Imagen pseudo-coloreada en donde la marca anti-Cx36 (rojo) y núcleos teñidos con DAPI (azul). B, B' y B'') imagen equivalente, pero de un corte en donde sólo se incubó con anticuerpo secundario.

### 7.8 Medición de fluorescencia individual en neuronas.

Para la medición de la intensidad en la fluorescencia se utilizó el software FIJI / Image J. Dentro de la imagen se localizaron las células de interés y se definió un trazo que cruzara de forma horizontal la célula, pasando a través de la región correspondiente a su membrana, citoplasma y núcleo celular. Estas regiones se identificaron con la letra 1 y 2 para la región membranal y con la letra N para la región correspondiente al núcleo. Posterior a la realización del trazo, se utilizó la herramienta

“análisis de partículas” con el que se despliega un registro continuo de la intensidad de la fluorescencia registradas a lo largo de la línea definida. Permittiéndonos observar los cambios en los niveles de intensidad en una misma célula. Este análisis apoya el que la densidad de la marca Cx36-IFpositiva es mayor cerca de la zona

## **7.9 Análisis Estadístico.**

Alodinia mecánica. Se analizaron los valores promedio y desviación estándar (SD) para el umbral de retiro de pata al 50%. Una vez que encontramos que estos valores tuvieron una distribución normal mediante el uso de la prueba de D’Agostino, se decidió utilizar realizar la comparativa entre grupos mediante un análisis de varianzas (ANOVA) de dos vías analizando los cambios en el umbral de retiro de la pata en ambos grupos con respecto al tiempo. Tomándose como significancia estadística a los valores con  $p < 0.05$ . El análisis estadístico del área bajo la curva se realizó mediante una prueba “t” de student con una corrección de Welch. Toándose como significancia estadística los valores con una  $p < 0.05$ .

Fluorescencia de Cx36. La cantidad de puntos, su densidad promedio por área y su SD fueron calculados para cada imagen de los GRD estudiados. A dichos valores se les realizó la prueba de normalidad D’Agostino y se valoró la diferencia entre grupos mediante un ANOVA de una vía, considerando los valores con  $p < 0.05$  como estadísticamente significativos. Para esto se utilizó la paquetería Graphpad Prism versión 7.

## **8. Resultados.**

### **8.1 Se desarrolló alodinia mecánica en los animales experimentales.**

La Fig. 20 muestra los resultados de la evaluación clínica del dolor en los grupos de animales experimentales y sham. Sección A muestra la tabla con los valores promedio y SD del umbral al 50% para el retiro de la pata de ambos grupos utilizando los filamentos de Von frey hasta el día 21 posterior a la lesión. Por otra parte, en 20-B muestra la gráfica correspondiente del promedio y la SD del valor

umbral al 50% para el retiro de la pata tanto al grupo experimental (verde) como de sham (olivo). Como se observa, este umbral disminuyó importantemente desde la primera evaluación al día 3 para el grupo experimental y se sostiene así hasta el final del periodo de evaluación. Por otra parte, el grupo sham no mostró cambios significativos en su umbral. El análisis estadístico obtenido con la realización de ANOVA de dos vías mostro diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) Valor de  $F = 31$ .

La figura 19C, se presenta una gráfica de barras con los valores obtenidos mediante la determinación del área bajo la curva (AUC) de ambos grupos, obtenida utilizando el método de trapecios. Estas presentan diferencias significativas, calculadas con la prueba “t” de Student con un valor de  $p < 0.001$ .

## **8.2 Cambios en la distribución de la marca de la Cx36 en los GRD con ligamiento de los nervios espinales.**

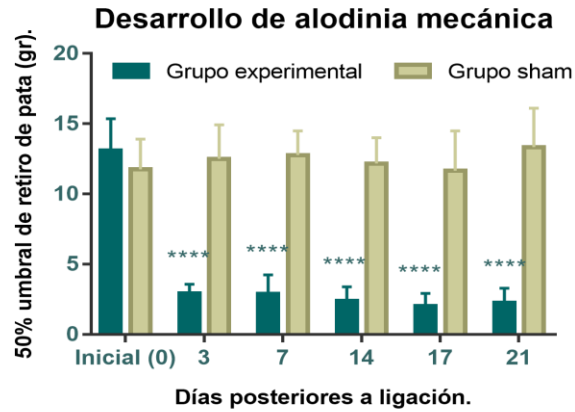
Inicialmente, a fin de familiarizarse mejor con la histología del GRD, la Fig. 21 muestra una imagen de contraste de fase (izquierda) de un GRD, así como otra adquirida utilizando el filtro de fluorescencia a DAPI a fin de marcar los núcleos (centro). Puede observarse como los núcleos pequeños densos forman rosetas ya que corresponden a las células gliales satélites (CGS) que rodean a las neuronas. En un estudio previo nuestro grupo ha documentado que todos los ganglios de la región lumbar de la rata expresan la proteína Cx36 y que sus niveles relativos son semejantes, considerando resultados de estudios de inmunohistoquímica (IHC), e inmunofluorescencia (IF), así como de PCR en tiempo real (Pérez Armendáriz, E.M. et al. 2018).

A fin de identificar si en nuestras condiciones experimentales detectamos la expresión de la Cx36 se incubaron cortes control y experimentales con un anticuerpo anti-Cx36 policlonal previamente caracterizado. Los grupos estudiados fueron: los controles negativos GRDL4 sham, GRDL5 sham, y GRDL4 ipsilateral a la lesión de L5 y L6. El grupo experimental consistió en cortes de GRDL5 de ratas con ligación de nervios espinales L5 y L6.

A)

Grupos		Inicial (día 0)	Día 3	Día 7	Día 14	Día 17	Día 21
<b>Experimental</b>							
Promedios (gr)		13.01	2.86	2.84	2.44	2.02	2.24
SD		2.34	0.66	1.44	0.91	0.86	1.00
<b>Sham</b>							
Promedios (gr)		11.75	12.51	12.77	12.18	11.66	13.34
SD		2.05	2.29	1.63	1.73	2.68	2.63

B)



C)

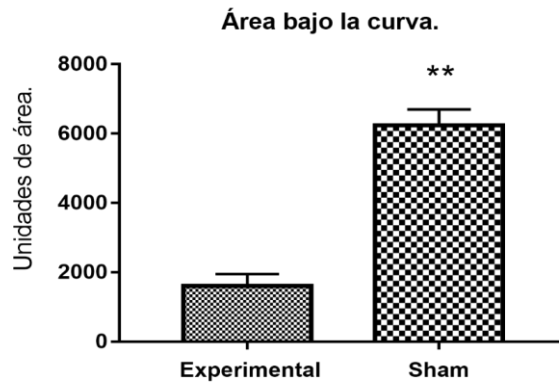


Figura 20. **Cambios en el umbral al dolor en animales con ligadura en los nervios espinales L5 y L6 con respecto a los animales control.** A) La tabla III, muestra los valores de promedio del umbral al 50% para el retiro de la pata (azul) y su SD (rosa) de las ratas experimentales (superior) y control (inferior) registrados ante la estimulación mecánica con filamentos Von Frey, obtenidos a diferentes fechas a partir de la ligadura de los nervios espinales L5 y L6, hasta el día 21; gramos= gr. B) Histograma del desarrollo de alodinia mecánica posterior a ligación de L5 y L6.

Grafica porcentual obtenida a partir de graficar los valores presentados en la tabla III en el inciso A. Puede observarse que en el grupo experimental el umbral al 50% para el retiro de la pata tuvo una disminución significativa desde la primera evaluación (3er día), y que ésta se mantuvo baja hasta el día 21 post ligadura, pero esto no ocurrió en el grupo sham. Los valores promedio para este umbral fueron estadísticamente significativos desde el 3er día (ANOVA de dos vías) (\*\*\*\*  $p < 0.001$ ). El número de ratas en el grupo experimental fue de  $n=12$  y en el grupo sham su número fue semejante ( $n=10$ ). C) Gráfica de la integral bajo la curva Puede observarse que el valor de ésta fue significativamente menor para el grupo experimental (1,603) que para el sham (6,234) de acuerdo con el análisis con la prueba T de Student (\*\*  $p < 0.001$ ).

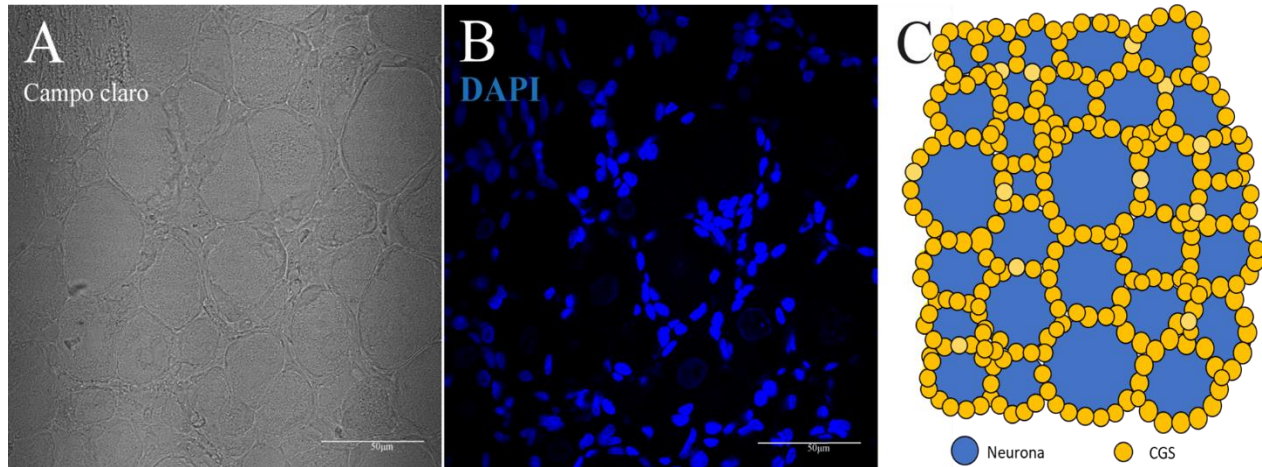


Fig. 21. **Histología de un corte de GRD lumbar.** Imágenes de un corte de un GRD L5 de grupo experimental a un objetivo 20X obtenido A) por microscopia de campo claro como B) fluorescencia para DAPI que marca los núcleos celulares, principalmente de las CGS, que rodean a las neuronas (figuras color amarillo en el diagrama de la derecha). C) Esquema del GRD, busca representar el cuerpo principal del ganglio, compuesto por unidades de neuronas de diferentes tamaños, cada una rodeada de CGS. Objetivo 40X. Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ .

En la Fig. 22 y Fig. 23 se muestran imágenes adquiridas mediante microscopía confocal de cortes de GRDL sham adquiridos después de su incubación con el anti-Cx36.

En la Fig. 22 se muestran cortes de GRD L4 de una rata sham (A) y el GRD L4 de una experimental (B) ipsilateral a la ligadura de L5 y L6, adquiridas después de su incubación con el Anti-Cx36. En estas la marca Cx36-IF positiva se muestra en rojo y los núcleos teñidos con DAPI con azul. Así mismo, las imágenes en A y B muestran una fluorescencia difusa correspondiente a la marca anti-Cx36-IF punteada en el soma de la mayoría de las neuronas del ganglio, señal que no es detectada en

los cortes incubados sólo con el atb-secundario (C y D). Lo anterior, documenta la especificidad de la reacción obtenida con el anti-Cx36. Así mismo, la densidad de la marca anti-Cx36 no es homogénea entre las neuronas de un mismo GRD. Estos resultados muestran además que la marca anti-Cx36-IF positiva, no es diferente entre los GRDL4 de una rata sham y el de una experimental con lesión ipsilateral de los nervios espinales L5 y L6.

Para realizar una comparación de las observaciones anteriores, la Fig. 23 se muestra, imágenes adquiridas con microscopia confocal de cortes de GRDL5 de dos ratas sham incubados con anti-Cx36. Estas muestran la marca anti-Cx36 punteada ya descrita (Ay B), las cuales no se observan en los cortes incubados solo con anticuerpo secundario (C. D). Coincidiendo la heterogeneidad de la intensidad de la marca entre las neuronas de un mismo GRDL5 como la encontrada en los cortes GRDL5 de diferentes ratas sham.

Una vez corroborada la expresión dentro de GRD de animales sham, se analizaron los cortes de GRD de animales expuestos a ligadura de los nervios espinales L5 y L6. Se realizaron estudios en los tejidos correspondientes de los animales lesionados, con la intención de corroborar si existen cambios en la expresión de la Cx36 con respecto a la presentada en los animales sham.

La Fig. 24 muestra imágenes confocales de cortes de DRGL5 de dos ratas diferentes a las cuales se les ligó los nervios espinales L5 y L6. Estas muestran el máximo (A) y el mínimo (B) de la marca anti-Cx36-IF positiva. La marca anti-Cx36-IF punteada positiva en ambos cortes parecen ser mayores a los observados para las imágenes de los ganglios control: tanto del GRDL4 (sham e ipsilateral) como del GRDL5 sham. Del mismo modo, esta marca no se observó en las imágenes correspondientes a los cortes incubados únicamente con el anticuerpo secundario (C y D). Lo anterior, sugiere que la lesión de las aferentes del GRDL5 incrementa la expresión de la Cx36-IF punteada positiva. Debido a la emergencia sanitaria COVID-19, sólo fue posible estudiar los cortes del GRDL5 ipsilaterales a la lesión y no los contralaterales, así como tampoco los GRDL6 lesionados y sus respectivos controles contralaterales.



La Cx36 también se ha localizado en fibras nerviosas (Pérez Armendáriz, E.M. et al. 2018). A fin de investigar este aspecto en nuestras condiciones experimentales, analizamos cortes de GRD de los diferentes grupos. La Fig. 25 muestra la imagen por microscopia confocal de un corte de DRGL4 de un animal experimental, adquirida después de su incubación con el anti-Cx36. El recuadro indicado con la letra “F” marca una zona donde pasa un paquete de fibras neuronales que es amplificado digitalmente a la derecha para su mejor visualización. Puede observarse que en las fibras existe una marca Cx36-IF punteada positiva, aunque estos puntos son mucho más pequeños que los identificados en las neuronas. Esto nos da un indicio que la expresión de la Cx36 se encuentra en las fibras nerviosas de GRD sin exposición a la lesión.

Con el resultado anterior se propuso investigar si la ligadura en L5 y L6 impide o cambia la detección de la marca anti-Cx36 IF- positiva en las fibras nerviosas, para ello analizamos cortes co-incubados con la anti-Cx36 y con anti-PanN, anticuerpo dirigido a un coctel de proteínas neuronales. La Fig. 26, muestra las imágenes obtenidas de cortes de GRDL5 de dos ratas que fueron expuestas a ligamiento de los nervios espinales L5 y L6 (A y B). En estas puede observarse la colocalización de la marca anti-Cx36 (roja) en las fibras nerviosas positivas al anti- PanN (verde). Los paneles A’ y B’ muestran las imágenes de estos tejidos, pero en las cuales sólo se expuso el láser rojo con el fin de mostrar con más claridad la distribución de la marca anti Cx36-IF punteada. Puede verse sin ambigüedad que la marca está presente en las fibras estudiadas. En éstas el punteado Cx36-IF positivo es más fino, aspecto que también se había observado en el GRDL4 sham (Fig. 25) como en estudios previos (Pérez Armendáriz, E.M. et al. 2018). Los resultados anteriores, nos permiten demostrar que la ligadura en los nervios espinales L5 y L6 aparentemente no impide la expresión de la Cx36 en las fibras nerviosas. No obstante, dado que esta marca fluorescente fue más tenue no podemos aseverar si altera sus niveles de expresión.

Además de las neuronas, la Cx36 también se ha descrito entre las CGS de los GRD lumbares (Pérez Armendáriz, E.M. et al. 2018). Intentando corroborar este aspecto, la Fig. 27 muestra una imagen adquirida con microscopia confocal de un corte de GRDL4 donde las neuronas presentan una marca positiva al anti-PanN (verde), y colocalizando con esta se observa la marca al anti-Cx36 (rojo). En

los recuadros 1 y 2 puede observarse que hay células negativas al anti-PanN, señalizadas con un asterisco (\*). Estas son células pequeñas que se encuentran rodeando a los somas neuronales y tienen núcleos densamente teñidos con DAPI (azul) característicos de las CGS. Mostrándose con mayor claridad en las ampliaciones a la derecha marcadas con los números respectivos 1 y 2. Aquí la marca Cx36-IF positiva punteada está presente en las zonas de aposición membranal entre las CGS (flechas delgadas). Lo anterior muestra que en nuestras condiciones experimentales también es posible ver la expresión de la conexina 36 en las CGS cercano a las zonas de contacto entre las CGS con células vecinas.

Aunado a lo antes descrito, en el presente trabajo encontramos por primera vez en forma consistente que la marca anti-Cx36 también se localiza en el núcleo de algunas neuronas. Esto lo observamos tanto en tejidos de ganglios sham (Fig. 22-A, Fig.23, Fig.25), así como en ganglios expuestos a ligadura de L5 y L6 como lo muestra la Fig. 22-B, Fig.24, Fig.28.

A partir de una observación cualitativa en imágenes convencionales su incidencia en el grupo experimental y sham es semejante (tabla IV). Esta marca nuclear solo se observó en las neuronas y no se encontró en los núcleos de las CGS, ni en los núcleos de las células Schwann que rodean a algunos nervios ganglionares. También como mencioné antes y ha sido descrito previamente, la marca Cx36-IF positiva se localiza en mayor densidad hacia la periferia de la membrana neuronal, dependiendo el plano de corte (Pérez Armendáriz, E.M. et al. 2018).

A fin de investigar si esta distribución se conserva en los ganglios cuyos nervios espinales fueron ligados, se analizaron algunos somas neuronales con la herramienta de “análisis de partículas” del software de Image J (ver métodos). La Fig. 28-A, muestra una imagen confocal de un GRD L5 de una rata expuesta a ligadura de nervios espinales y donde la marca anti-Cx36- IF positiva se muestra en rojo. Midiendo la intensidad de fluorescencia de forma lineal a lo largo del diámetro celular. En B y C se muestra el registro de fluorescencia para ambas neuronas en sus espacios subcelulares. Puede observarse que la fluorescencia relativa para anti-Cx36 tiene una distribución mayor hacia la periferia celular (regiones 1 y 2; 1´ y 2´) que corresponde a la membrana celular donde se establece el

contacto con las CGS y en la región correspondiente al núcleo (región N y N') la cual es 4-5 veces mayor con respecto a las regiones que corresponden al citoplasma. Lo anterior apoya la hipótesis de que la Cx36 puede estar localizada de forma predominante en regiones donde existe aposición membranal. También, revela una localización nuclear en las neuronas del GRD.

Buscando evaluar la frecuencia relativa de expresión de la Cx36 en los compartimientos celulares de los GRD, se analizaron diferentes imágenes adquiridas (total: 44 imágenes) con un microscopio convencional de fluorescencia (Olympus Ix70) de cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espesor. La tabla IV lista la frecuencia de detección de la marca Cx36-IF positiva de acuerdo con su localización celular y subcelular. En la parte superior de la tabla se listan los resultados de los cortes de los animales control y en la parte inferior los resultados para los cortes de los animales experimentales. La detección positiva se escribe en verde y la negativa en rojo, para su rápida identificación. En las filas amarillas se marca el porcentaje relativo de positividad encontrado para cada caso de la marca Cx36 IF positiva. Esta tabla muestra que la distribución porcentual es semejante entre el grupo control y experimentales fue semejante para las diferentes células y distribuciones subcelulares. Lo anterior, apoya la idea de que el ligamiento de los nervios espinales al día 21 no imposibilita la expresión de la Cx36 en alguna de estas distribuciones celulares y /o subcelulares en particular. No obstante, los resultados anteriores no descartan que no pueda haber cambios en su densidad relativa.

Dado que ya no fue posible el hacer los experimentos de doble marcaje, por la pandemia COVID-19, decidimos evaluar si el ligamiento de los nervios espinales induce un cambio en la expresión de la marca de la proteína Cx36 se comparó en forma semi-automática la fluorescencia total (FT) de cada corte, como se describe a continuación.

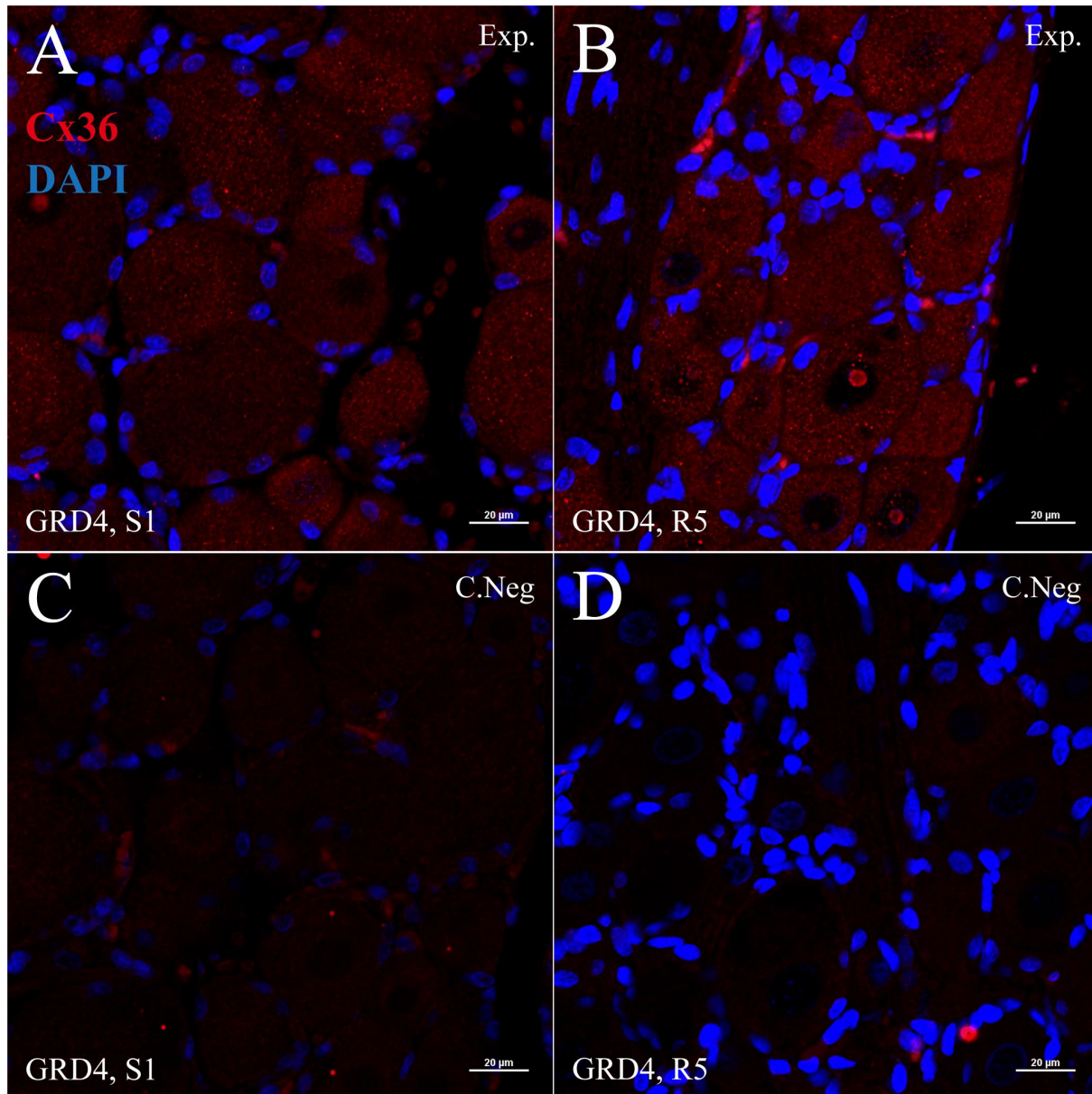


Fig. 22. **La distribución de la Cx36 en el GRDL4 es semejante en el grupo sham y experimental.** Imágenes de fluorescencia confocales de cortes del GRDL4 de una rata sham (A y C) y de una rata experimental (B y D) adquiridos después de su incubación con un anti-Cx36. A y B) Puede observarse que la marca de la Cx36-IF punteada y basal son semejantes en los cortes de los GRDL4 del animal experimental como sham. (C y D) imágenes de cortes incubados únicamente con el anticuerpo secundario. En todos los paneles los núcleos fueron teñidos con DAPI. Objetivo 20X. Zoom digital 3.5X. Barra de calibración 20 µm.

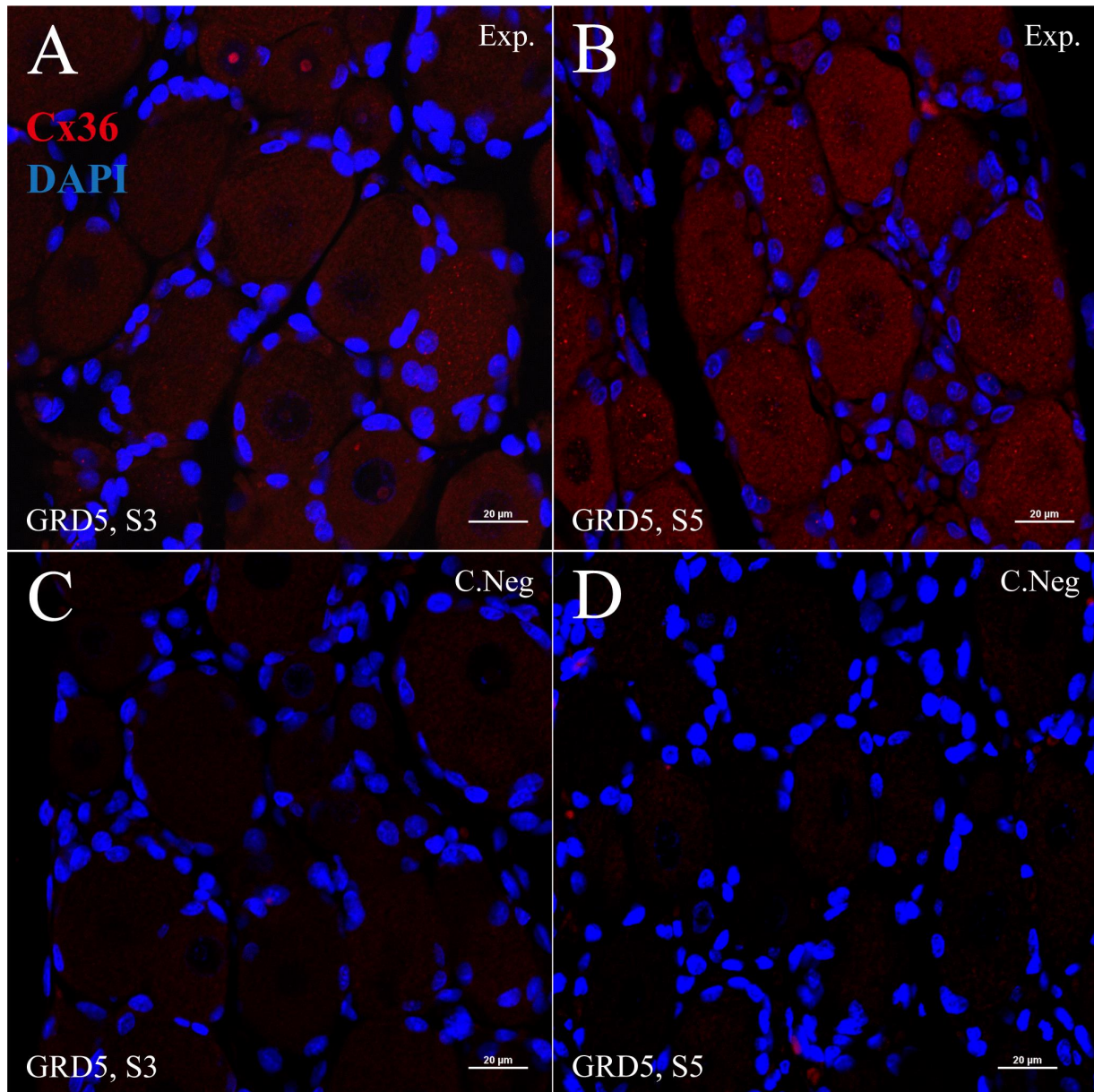


Fig. 23. **Variación de la expresión de la marca Cx36-IF positiva en los cortes del GRDL5 de ratas sham.** Imágenes de fluorescencia adquiridas con microscopia confocal en cortes del GRDL5 de dos ratas sham incubados con anti-Cx36. A y B) Puede observarse la distribución característica Cx36-IF positiva en los somas neuronales. También la heterogeneidad en la intensidad de la marca, entre los cortes de dos ratas distintas. C y D) La marca anti Cx36-IF puntea está presente en las imágenes de los cortes que fueron incubados sólo con anticuerpo-secundario. La fluorescencia basal también es más baja con respecto a los ganglios incubados con anti-Cx36. Objetivo 20x. Zoom digital 3.5x. Barra de calibración 20 µm.

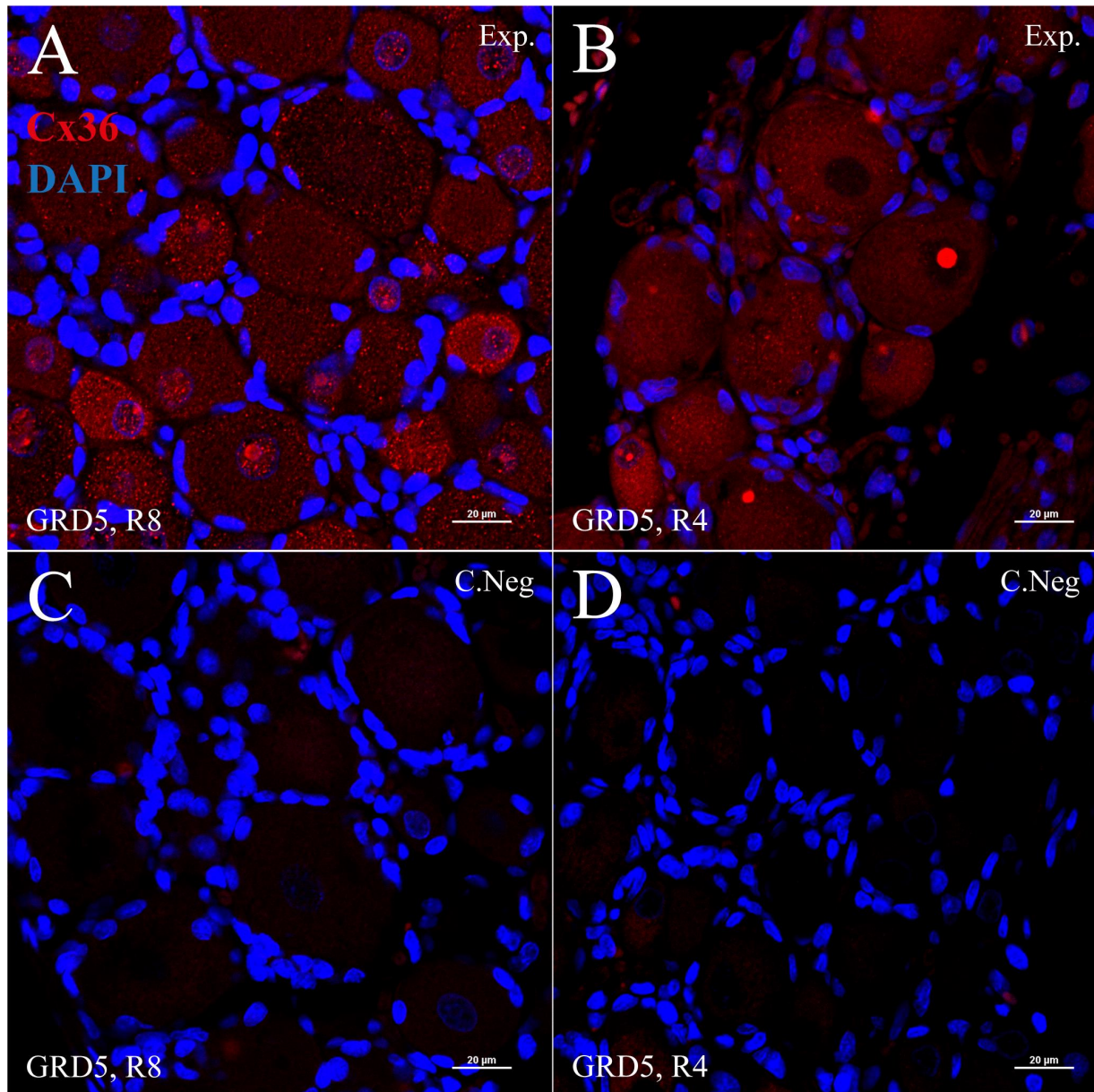


Fig. 24. **El ligamiento de los nervios espinales L5 y L6 no impide la expresión de la Cx36 en los somas neuronales del GRDL5.** Imágenes confocales de cortes de GRDL5 experimentales. A y B) La marca anti-Cx36 puede observarse claramente en los somas neuronales de los cortes del GRDL5 de ambas ratas. Su expresión relativa parece ser mayor a la registrada en los cortes control. No obstante, lo anterior, puede observarse que la intensidad de la marca es mayor en uno (A) de los dos ganglios, confirmando que existe heterogeneidad en la detección de la marca en los diferentes cortes de los GRDL5 analizados. C y D) Imágenes de cortes sólo incubados con anticuerpo secundario, en donde la marca anti-Cx36 -IF positiva punteada está ausente y la basal difusa es mínima. Objetivo 20x. Zoom adicional 3.5x. Barra de calibración 20 µm.

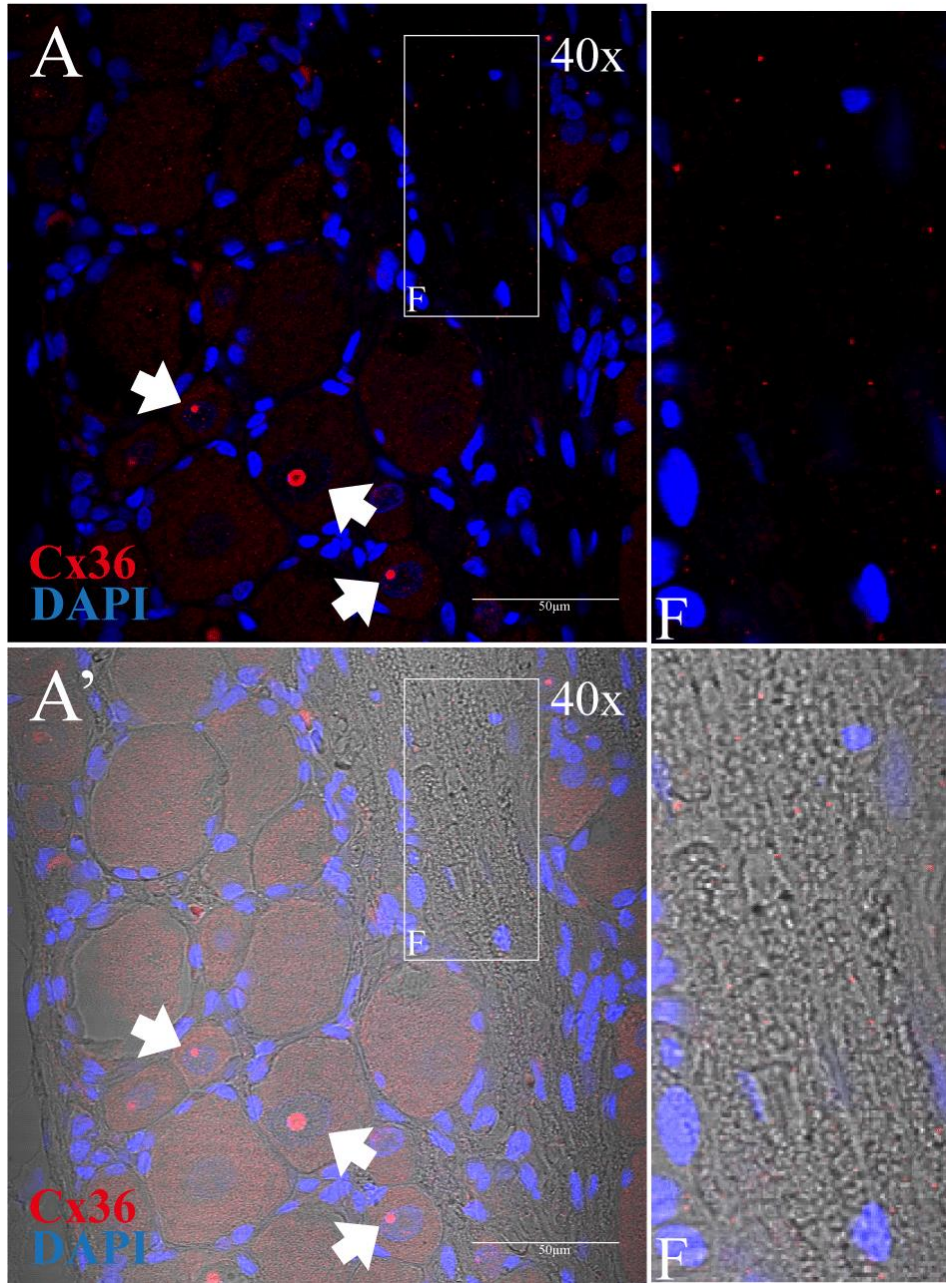


Fig. 25. **Expresión de la Cx36 en fibras nerviosas de un GRDL4 de una rata experimental.** A) Imagen confocal de corte incubado con anti-Cx36 (izquierda). La región de la imagen enmarcada en el recuadro (F) es presentada a la derecha a una mayor amplificación. A') Misma imagen de fluorescencia a la cual se le sobrepuso la imagen de contraste de fase correspondiente, a fin de visualizar mejor la región donde corren las fibras del ganglio a ambos aumentos. Objetivo 40X. Barra de escala: 50  $\mu$ m

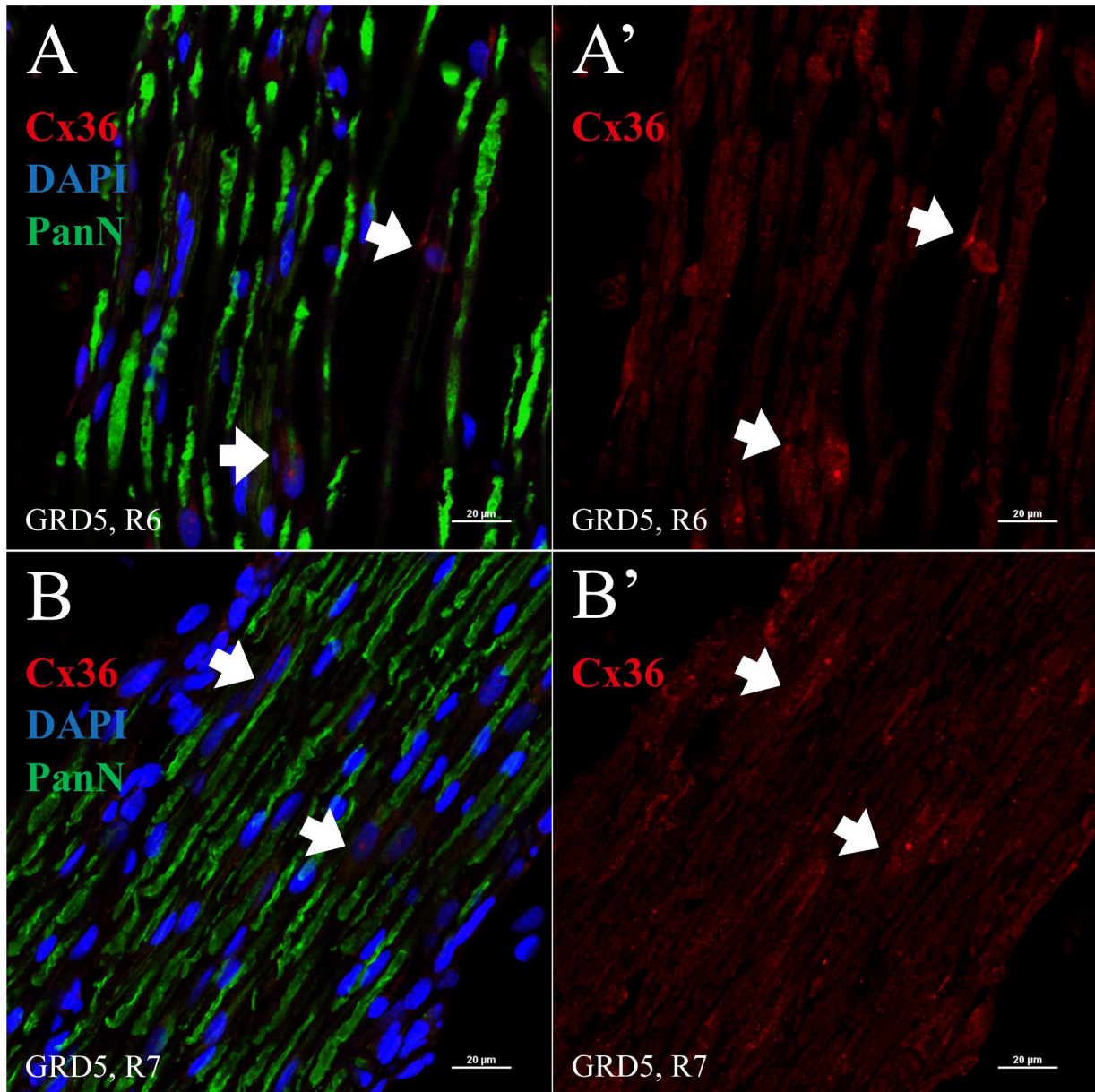


Fig. 26. La marca de la anti-Cx36 es visible en fibras neuronales en cortes de GRDL5 de ratas expuestas a ligadura de los nervios espinales L5 y L6. Imágenes confocales de cortes de GRDL5 de dos ratas expuestas a ligadura de nervios espinales co-incubados con anti-Cx36 y anti PanN. A y B). La marca anti-Cx36 IF positiva (roja) se colocizó en las fibras anti-PanN positivas (verde), demostrando su expresión en fibras neuronales. A' y B') muestran sólo las imágenes de la fluorescencia de la marca anti-Cx36 (rojo), para ambos cortes a fin de analizar en mayor detalle la marca. Los núcleos teñidos con DAPI (azul). Objetivo 20X, Zoom digital 3.5X. Barra de escala: 20 µm.



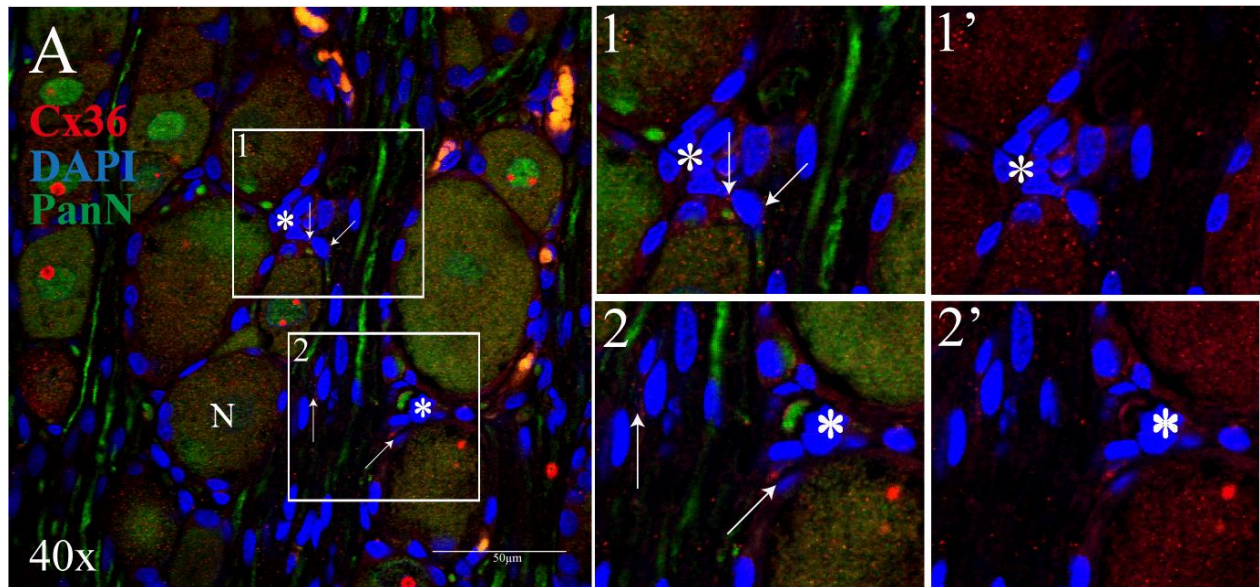


Fig. 27. **La Cx36 se expresa en las células gliales satélites (CGC) del GRD5 experimental.** Izquierda) Imagen adquirida con microscopia confocal. El corte óptico fue de 0.5  $\mu\text{m}$ . Se muestra la marca Cx36-IF, marcas positivas dentro del tejido neuronal, marcado con Pan neuronal marker (PanN) (verde). También pueden observarse conglomerados de células pequeñas con núcleos densos que rodean a las neuronas que son negativas al atb-PanN lo que indica que son células gliales satélites (CGS). En las zonas de aposición membrana de las CGS es posible ver puntos muy finos Cx36-IF positivos (flechas blancas finas). Lo anterior, muestra que en los GRD5 obtenidos de ratas expuestas a ligadura de L5 y L6, las CGS aún expresan la Cx36. Objetivo 40x, Barra de calibración 50  $\mu\text{m}$ .

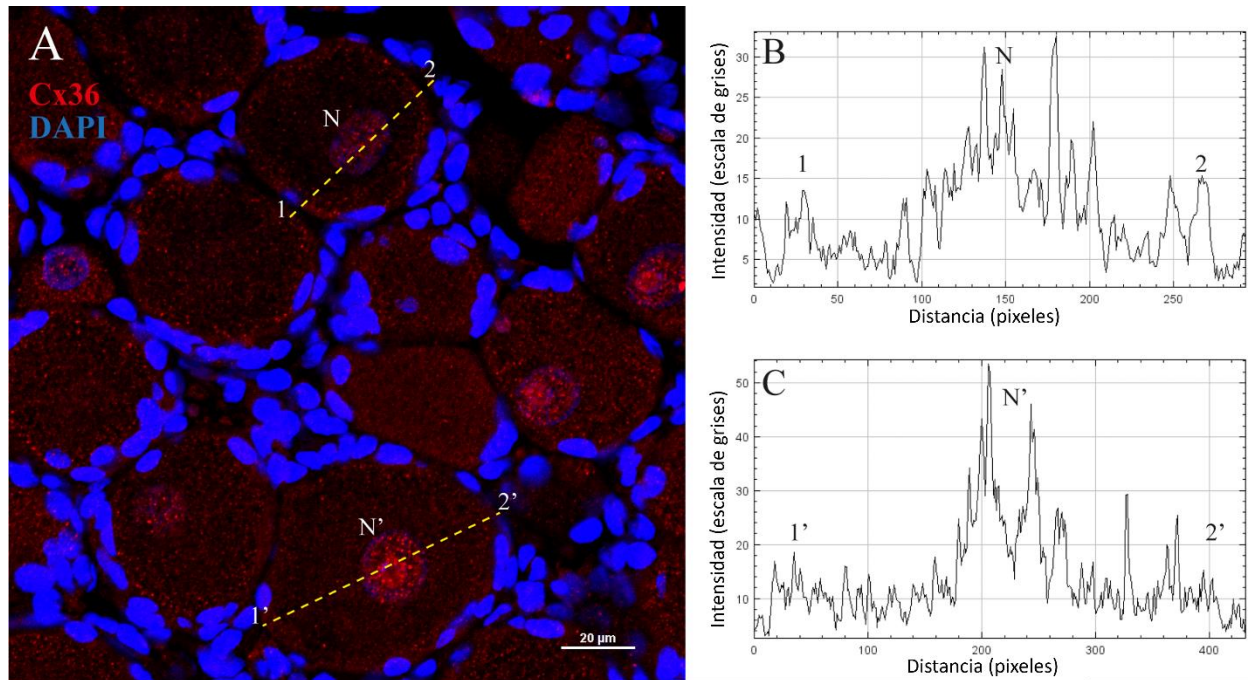


Fig. 28. **Existen cambios en la intensidad de la marca Cx36-IF con respecto a la región celular analizada.** A) Imagen de un GRD L5 de un animal experimental incubado con Cx36. Se observa la distribución heterogénea de la marca anti-Cx36 entre las neuronas. Utilizando la herramienta de análisis de partículas del programa Image J se obtuvo el registro de la intensidad de la fluorescencia en un soma neuronal. B y C) Muestran este análisis para los dos somas neuronales indicados. En estas puede verse que en la región cercana a la membrana (1, 1' y 2, 2') la intensidad es de alrededor del doble con respecto a la fluorescencia basal en el citoplasma. También que en la región del núcleo (N y N') la intensidad de la marca anti-Cx36-IF positiva aumenta de 4 a 5 veces la basal. Objetivo 20 X, Zoom adicional 3.5 X, Barra de calibración: 20 µm.

### 8.3 Incremento en la fluorescencia total registrada en secciones de GRDL5 de los animales con ligación de los nervios espinales L5 y L6.

A fin de registrar la fluorescencia total de cada corte y poder así compararla entre los grupos, desarrolle en colaboración con la Ing. Abigail Ortega Valdivia, un software que permitiera cuantificar el número de puntos fluorescentes y el área del corte estudiado.

Grupo Sham.	Tejido Neuronal			Tejido glial
GRDL4	Marca de Cx36 en Soma.	Marca de Cx36 en fibras	Marca de Cx36 en núcleos.	Marca de Cx36 en CGS.
GRDL4 - S1 (n=4)	Positivo (4/4)	Negativo (0/2)	56 neuronas / 15 núcleos (26.7%)	Positiva (3/4)
GRDL4 - S3 (n=4)	Positivo (4/4)	Negativo (0/2)	61 neuronas / 6 núcleos (9.8%)	Negativo (0/4)
GRDL4 - S5 (n=3)	Positivo (3/3)	Positivo (1/2)	20 neuronas / 3 núcleos (15%)	Positiva (3/3)
Porcentaje de positividad	3/3 (100%)	1/3 (33%)	3/3 (100%) (24 núcleos)	2/3 (66%)
GRDL5				
GRDL5 - S3 (n=3)	Positivo (3/3)	Negativo (1/1)	24 neuronas / 5 núcleos (20.8%)	Positivo (2/2)
GRDL5 - S4 (n=4)	Positivo (4/4)	Positivo (2/2)	34 neuronas / 4 núcleos (11.7%)	Negativo (3/3)
GRDL5 - S5 (n=3)	Positivo (3/3)	Negativo (0/2)	22 neuronas / 3 núcleos (13.6%)	Positivo (2/3)
Porcentaje de positividad	3/3 (100%)	1/3 (33%)	3/3 (100%) (12 núcleos)	2/3 (66%)
Grupo experimental.	Tejido Neuronal			Tejido glial
GRDL4	Marca de Cx36 en Soma.	Marca de Cx36 en fibras	Marca de Cx36 en núcleos.	Marca de Cx36 en CGS.
GRDL 4 - R4 (n=6)	Positivo (6/6)	Positivo (5/5)	78 neuronas / 15 núcleos (19.2%)	Positivo (6/6)
GRDL4 - R5 (n=2)	Positivo (2/2)	Negativo (0/2)	16 neuronas / 6 núcleos (37.5%)	Positiva (1/2)
GRDL4 - R6 (n=2)	Positivo (2/2)	Sin fibras	36 neuronas / 5 núcleos (13.8%)	Positiva (1/2)
Porcentaje de positividad	3/3 (100%)	1/2 (50%)	3/3 (100%) (26 núcleos)	3/3 (100%)
GRDL5				
GRDL5 - R4 (n=3)	Positivo (3/3)	Positivo (1/1)	16 neuronas / 4 núcleos (25%)	Positivo (3/3)
GRDL5 - R8 (n=3)	Positivo (3/3)	Sin fibras	34 neuronas / 1 núcleo (3%)	Positivo (3/3)
GRDL5 - R11 (n=3)	Positivo (3/3)	Positivo (1/1)	41 neuronas / 4 núcleos (9.7%)	Positivo (2/2)
GRDL5 - R12 (n=4)	Positivo (4/4)	Sin fibras	138 neuronas / 29 núcleos (21%)	Positivo (4/4)
Porcentaje de positividad	3/3 (100%)	2/2 (100%)	4/4 (100%) (38 núcleos)	4/4 (100%)

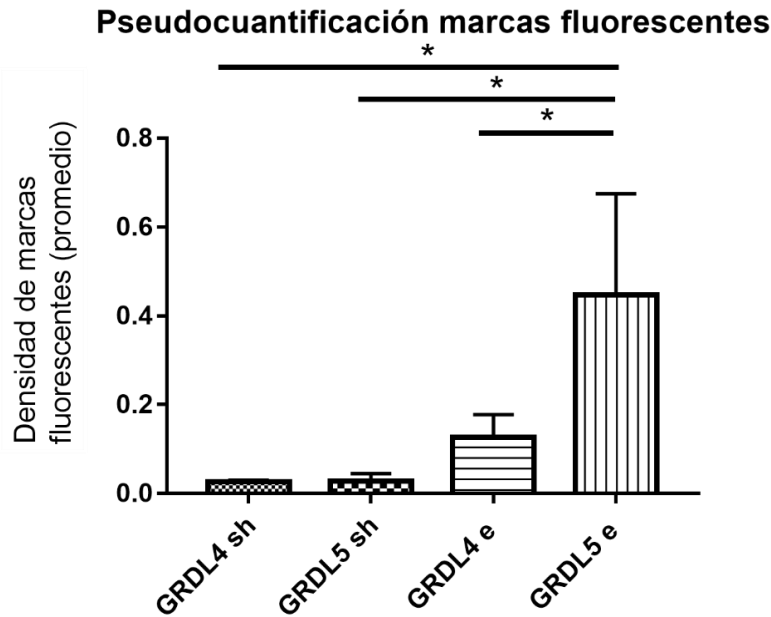
Tabla IV. Análisis cualitativo de la prevalencia de la marca anti-Cx36-IF positiva en las diferentes células de los ganglios GRDL experimentales y control. La presencia o ausencia de la marca Cx36 fue evaluada en las imágenes de fluorescencia por microscopía convencional adquiridas para los GRD analizados. La parte superior muestra los ganglios sham analizados tanto en el GRDL4 como en el GRDL5. La parte inferior muestra la tabla correspondiente para los GRDL4 y GRDL5 con ligación de nervios espinales. En todos se analizó en forma cualitativa (positivo o negativo) la detección de la marca Cx36-IF positiva en los somas neuronales, el núcleo, fibras nerviosas y células gliales satélite (SGC). (Sham GRDL4: 3 animales, Sham GRDL5: 3 animales, Experimental GRDL4: 3 animales, Experimental GRDL5: 4 animales).

Los puntos Cx36-IF positivos cuantificados estuvieron dentro de un rango de intensidad que fue acotado por una Fb, definida a partir del rango encontrado en los controles negativos, y una Fmax que suprimió artefactos con una resolución espacial de un pixel<sup>2</sup>. También, se calculó el área del corte mediante la saturación de la fluorescencia y considerando el cociente entre el número de puntos fluorescentes y el área, se calculó la densidad de la marca en cada imagen de los GRD analizados (ver métodos).

La Fig. 29 muestra en A) La gráfica 2 y en B) la tabla V que resumen estas observaciones. En esta, las barras muestran la densidad promedio y SD registrada de puntos Cx36-IF positivos/ $\mu\text{m}^2$  en la sección total analizada para cada grupo.

La grafica muestra (A) un incremento significativo en la densidad de puntos Cx36-IF positivos/  $\mu\text{m}^2$  (media y la SD) en secciones de los GRD5 experimentales ( $0.447 \pm 0.19$ ;  $n=4$ ) con respecto a la de los ganglios control, que incluyeron a los GRDL4 de las ratas experimentales ( $0.126 \pm 0.04$ ,  $n=3$ ), así como a los GRDL5 ( $p=0.028 \pm 0.01$ ,  $n=3$ ) y GRDL4 ( $p=0.027 \pm 0.002$ ,  $n=3$ ) de los animales sham. Estos valores y en el número de puntos Cx36-IF positivos totales registrados de toda el área de corte analizada se muestran en la tabla B. El incremento en la densidad media de puntos Cx36-IF positivos, fue significativos, considerando la prueba de ANOVA de una vía fue posible determinar que existe diferencia significativa entre los diferentes grupos ( $p = 0.0065$ ) con un valor de  $F = 8.032$ . Analizando la diferencia directa entre grupos se encontró diferencia significativa entre los valores de GRDL5 sham con el GRDL5 experimental ( $p=0.0119$ ) y GRDL4 experimental (ipsilateral a la ligación) con GRDL5 experimental ( $p=0.0492$ ).

A)



B)

Grupos	Puntos totales (promedio)	Área medida (promedio) ( $\mu\text{m}^2$ )	Densidad de puntos (promedio) (puntos fluorescentes / $\mu\text{m}^2$ )	Densidad de puntos (SD)
GRDL4 Sham.	732	26,941	0.027	0.0026
GRDL5 Sham.	695	23,646	0.028	0.0139
GRDL4 Experimental.	3,459	27,620	0.126	0.0421
GRDL5 Experimental.	11,853	24,579	0.447	0.1974

Fig. 29, La densidad relativa de puntos Cx36 positivos es mayor en el grupo de GRDL5 expuesto a ligamiento de los nervios L5 y L6 que la de los grupos control. A) Media y SD de la densidad total registrada de la marca anti Cx36-IF en imágenes confocales de cortes de GRD de los siguientes grupos estudiados: Sham GRDL4 y GRDL5, y experimental GRDL4 y GRDL5. La densidad se calculó utilizando un programa de elaboración propia realizado en Matlab (ver métodos). Utilizando la prueba de ANOVA de una vía es posible observar que existe diferencia significativa entre los diferentes grupos ( $p=0.0065$ ). Analizando la diferencia directa entre grupos se encontraron diferencias significativas entre los valores de GRDL5 sham con GRDL5 experimental ( $p=0.0119$ ) y GRDL4 experimental con GRDL5 experimental ( $p=0.0492$ ). El número de ganglios analizados para cada grupo fue: GRDL4 sham N= 3, GRDL5 sham N=3, GRDL4 experimental N=3 y GRDL5 experimental N=4). B) Tabla V. Valores de la pseudo cuantificación automática de la marca antiCx36-IF positiva. Pseudo cuantificación realizada utilizando un programa de elaboración propia en Matlab (ver métodos). Obtenidos tras el análisis de los GRDL 4 y GRDL5 sham, así como GRDL4 y GRL5 posterior a la ligación de nervios espinales L5 y L6.

## **9. Discusión.**

Los resultados de la presente tesis confirman que la proteína Cx36 se expresa en las neuronas, fibras y en las SGC de los GRD de acuerdo con un estudio previo de nuestro grupo (Pérez Armendáriz, E.M. et al. 2018). Más aún, utilizando un modelo de neuropatía inducido por cirugía de los nervios espinales L5 y L6 se corrobora que la proteína Cx36 se expresa en tanto en el soma neuronal como en las CGS que lo rodean y en las fibras nerviosas a 21 días después de la lesión, cuando el animal presenta alodinia mecánica. Asimismo, el análisis pseudo cuantitativo de las imágenes confocales mediante un algoritmo de elaboración propia diseñado para este fin muestra que los niveles relativos de la fluorescencia total de la Cx36 registrada en los GRDL5 experimentales es significativamente mayor a la de los tres controles utilizados que incluyeron al GRDL4 ipsilateral a la ligación de los nervios espinales L5 y L6, así como a los GRDL4 y GRDL5 de ratas sham. Lo anterior, permite proponer que la lesión por ligadura de L5 y L6 y la alodinia mecánica asociada a esta ocurren en paralelo a un incremento de la proteína Cx36 en las neuronas.

### **9.1 Modelo de dolor y manifestaciones conductuales.**

Existen diversos modelos de dolor con características fisiológicas particulares (Challa, S.R., 2015). En este trabajo utilizamos el modelo de Kim & Chung, el cual ofrece la ventaja de segmentar en forma individual cada nervio espinal, y en este estudio fueron los L5 y L6. Tras la lesión, encontramos que el grupo experimental (n=12) con modificaciones conductuales características de alodinia y una disminución del umbral para el retiro de la pata cercano al 75% del valor inicial desde la primera evaluación. Alcanzando su mínimo al día 14 y manteniéndose hasta el día 21. En contraste, esta reducción no se registró en grupo sham (N=10) con diferencia estadística ( $p > 0.0001$ ) entre ambos. Esta curva de disminución en el umbral está de acuerdo con lo previamente descrito (Kim, S.H., Chung, J.M. 1992). De lo anterior, es posible concluir que se generó en forma exitosa un modelo de dolor neuropático.

## **9.2 Distribución de la marca inmunofluorescente contra la proteína Cx36 en los componentes celulares de GRD.**

### 9.2.1 Somas neuronales.

Aunque el GRD está compuesto por diferentes tipos celulares, en un corte perpendicular la mayor área analizada corresponde a los somas neuronales. En el presente estudio contamos con imágenes de la marca anti-Cx36 tanto de microscopía de fluorescencia confocal (48 imágenes) como microscopía convencional (44 imágenes) (tabla IV) para cortes de GRDL de tres ratas diferentes de cada grupo, que contaron con la mayor definición espacial de la marca. A partir de su análisis podemos concluir lo siguiente:

La marca anti-Cx36-IF positiva en los somas de las neuronas expuestas a ligadura de los nervios espinales fue detectada en forma de pequeñas placas y puntos positivos fluorescentes, siendo semejantes entre los grupos pudiendo formar placas entre las células gliales y las neuronas. Estas marcas fueron específicas, ya que no se observaron en los cortes de los ganglios respectivos que se incubaron solo con anticuerpos secundarios.

El rango de variación de la marca anti-Cx36-IF registrado tanto en la fluorescencia basal como el puntillado fluorescente fue semejante entre los grupos, sugiriendo que ésta resulta de discretas variaciones en la técnica que involucra múltiples procesos experimentales, que van desde la cirugía hasta la adquisición de las imágenes.

La variación de la marca anti-Cx36 punteada entre las diferentes neuronas de un mismo ganglio, también fue semejante entre los grupos y puede deberse a cambios intrínsecos en la expresión de la proteína Cx36, pudiendo depender del fenotipo molecular de la neurona y/o de la situación fisiológica de las neuronas de cada ganglio al momento de sacrificio del animal. Esta variación se observó en los cuatro grupos de GRD estudiados y es consistente con la observación de un estudio previo (Pérez Armendáriz, E.M. et al. 2018).

La media de la pseudo cuantificación automática de la marca anti-Cx36-IF total fue de 2 hasta 5 veces mayor en el grupo de GRDL5 de ratas expuestas a ligadura de los nervios espinales L5 y L6, con respecto a los tres diferentes grupos control. Estos cambios fueron estadísticamente significativos

entre el grupo GRDL5 experimental con respecto a GRDL4 del lado ipsilateral a la lesión ( $p=0.0492$ ) así como con respecto al del GRDL5 sham ( $p=0.0119$ ).

Lo anterior, da sustento a la hipótesis de que la ligadura del nervio espinal L5 al día 21 induce un aumento en el umbral al dolor que se acompaña de cambios en la expresión de la Cx36 en el GRDL5 correspondiente. Esta hipótesis, difiere de una previa, que sugirió la disminución de esta conexina, con base a un decremento cercano al 50% en el RNAm de la Cx36, detectado por estudios de qRT-PCR en el GRDL4 de ratas al día 86 post ligamiento del nervio sural (Pérez Armendáriz, E.M. et al. 2018). La diferencia entre estos resultados puede explicarse tanto por las diferentes fechas a las cuales se determinó el cambio en la Cx36 post-ligamiento (21 vs 86 días), así como la metodología empleada para el desarrollo de la alodinia mecánica. Cabe recalcar que en este estudio presentado medimos la expresión de la proteína, mientras que en el previo se midió mRNA del GRD el cual no necesariamente tiene una relación lineal con respecto a la expresión de la proteína (Park, W-M. et al. 2011).

### 9.2.2 Fibras nerviosas.

Observamos que la marca Cx36 -IF en las fibras nerviosas del GRDL estuvo presente en los ganglios de animales con ligamiento de los nervios espinales (Pérez Armendáriz, E.M. et al. 2018) así como que sus niveles de expresión fueron aparentemente semejantes a los de los grupos sham y su control ipsilateral (tabla IV). Lo anterior, sugiere que en este modelo la ligación en las aferencias que llegan a través de los nervios espinales L5 y L6, no inhibe la expresión de esta proteína de los nervios aferentes que vienen de la periferia y se dirigen hacia la medula espinal al día 21 post ligamiento. Los resultados obtenidos por Nakamura y colaboradores en astas dorsales reportaron una disminución en la expresión de Cx36 medidos mediante estudios de Western Blot, así como de IF (Nakamura, Y., et al., 2015). Esta disminución, se ha interpretado como resultado de una disminución de su expresión en la población de interneuronas inhibitorias dentro de las astas dorsales y/o secundaria un cambio en la expresión de las terminales aferentes que provienen del GRDL. Los resultados aquí presentados apoyan más la primera opción, ya que en nuestros resultados la expresión de esta proteína está



presente en los nervios periféricos.

### 9.2.3 Células gliales satélite.

Un hallazgo de interés en esta tesis fue la identificación de la marca anti Cx36-IF en las zonas de aposición membranal de las CGS que rodean a los somas neuronales. Los experimentos de doble marcaje con anti-Pan Neuronal Marker y anti-Cx36 confirman esta localización en ambos grupos. La tabla IV muestra que la frecuencia de la detección de la marca anti-Cx36-IF en las CGS fue semejante en los cuatro grupos analizados. Por lo anterior, es posible concluir que el ligamiento de los nervios espinales L5 y L6 no inhibe la expresión de la Cx36 en las CGS. No obstante, para comparar sus niveles de su expresión si se requerirá de estudios de doble marcaje para realizar una pseudo cuantificación automática que nos indique los cambios de manera cuantitativa.

En diferentes modelos de dolor se ha documentado un incremento en la transferencia intercelular del trazador fluorescente AL entre las CGS del GRD. Esta observación se ha hecho tanto por la adición local de agentes proinflamatorios (Ledda, M., Blum, E. 2009), axotomización de nervio ciático (Pannese, E., Ledda, M. 2003) o de manera sistémica por la inyección intraperitoneal de lipopolisacárido de E. Coli (LPS) (Blum, E. Procacci, P. 2014) valorado en distintos momentos tras el trauma. Este incremento se ha observado en el intervalo de los 3 a los 7 días posteriores a la lesión (Zhang, H. et al. 2009; Pannese E., Ledda M., 2003) existiendo un mayor acople entre la población glial (Huang, T-Y., Belzer, V., 2010) así como el incremento en transferencia intercelular entre células gliales y neuronas que en condiciones fisiológicas no es detectable (Ledda, M., Blum, E. 2009; Blum, E. Procacci, P. 2014).

Por otra parte, el uso de bloqueadores de canales de unión comunicante conlleva a una disminución de este acople intercelular, paralelamente disminuye las manifestaciones conductuales en respuesta a un estímulo mecánico nociceptivo, así como reduce la presencia de neuronas con potenciales de acción espontáneos dentro del GRD (Blum, E. Procacci, P. 2014; Huang, T-Y., Belzer, V., 2010)

sugiriendo que las UC tienen un papel dentro de la generación de dolor al permitiendo un incremento en la comunicación celular. No obstante, varios de estos bloqueadores de canales intercelulares tienen poca especificidad bloqueando otros tipos de canales, en particular los dependientes de voltaje, con lo cual también habría una disminución de la excitabilidad y del dolor. Por lo que resta demostrar que su efecto anestésico no resulta de este aspecto.

En las células gliales este acople intercelular directo se ha documentado que resulta al menos en parte de la expresión de la Cx43 (Wu, A., Green, C.R., 2012; Pérez Armendáriz, E.M. et al. 2018). Existe un incremento en la incidencia del acople con colorantes fluorescentes entre las células CGS posterior a una lesión compresiva del GRD acompañado de la presencia de marcadores de activación glial y cambios en las propiedades eléctricas membranales como: menor resistencia de entrada y mayor capacitancia de membrana, cambios que se explicaron como secundarios al incremento en el acople celular. Dichos cambios se revirtieron tras la adición de bloqueadores de canales de UC (Zhang, H. et al. 2009).

De forma similar, en las CGS del ganglio trigémino se vio incrementada la inmunoreactividad de Cx43 posterior a la lesión y el silenciamiento de este gen se ha encontrado asociado a una reducción de las manifestaciones clínicas del dolor (Vit, J.P et al. 2006; Ohara, P.T. et al. 2008). Con ello se ha pensado que las UC en las CGS juegan un papel importante en la amortiguación del exceso de  $K^+$  intersticial que se produce por el aumento de la excitabilidad neuronal derivado de una lesión neuropática (Cherkas, P.S. et al. 2004; Zhang, H. et al. 2009).

El incremento de la expresión de Cx36 se ha identificado en distintos escenarios: durante el desarrollo embrionario permitiendo la sinaptogénesis (Personius, K.E. et al. 2007), diferenciación neuronal (Hartfield, E.M. et al. 2011) y maduración de circuitos cerebrales (Maher, B.J., McGinley, M.J. 2009) y secundario a la lesión neuronal en modelos como: isquemia cortical, choque hipo osmótico e hiperactividad (Wang, Y. et al. 2012). El incremento en la expresión de la Cx36 se observó en forma aguda posterior a la lesión coincidiendo en forma temporal con la liberación de glutamato de forma

masiva (Storfel, M. et al. 2002). Este incremento de la expresión de la Cx36 se redujo cuando se bloqueó la actividad de los receptores glutamatérgicos mGluR II (Wang, Y. et al. 2012). Interesantemente, en cortes de GRD lumbar de ratón y humano la expresión de mGluRII se encontró colocalizando con marcadores específicos para neuronas peptidérgicas (anti-CGRP) y no peptidérgicas (IB4) por estudios de inmunofluorescencia (Davidson, S., Golden, J.P. 2016; Carlton, S.M., Largett G.L. 2007).

En este contexto, el incremento en la marca anti Cx36-IF total en los GRDL5 de ratas expuestas a la ligadura, con respecto a la de los grupos del GRDL4 experimental y el GRDL4 y GRDL5 de ratas sham nos permiten proponer que en la hiperexcitación neuronal secundaria al dolor inducido ocurre un incremento en la comunicación intercelular directa entre glía y neuronas formada por canales intercelulares formados por la Cx36. Esta mayor intercomunicación, contribuiría como un mecanismo modulador frenando la hiperexcitación celular.

### 9.2.3 Núcleos celulares.

Finalmente, otro hallazgo novedoso del desarrollo de esta tesis ha sido el encontrar la marca de la anti-Cx36 en el núcleo de algunas neuronas, pero no en los núcleos de las CGS ni en los núcleos de las células de Schwann que envuelven a los nervios periféricos. Igualmente, esta marca tampoco se observó en los cortes incubados únicamente con anticuerpo secundario. Lo anterior indica el que la marca anti-Cx36 IF nuclear es específica y sugiere su papel funcional. No obstante, la frecuencia de la identificación de la marca anti-Cx36 (tabla IV), muestran que la fracción de esta marca es semejante entre los GRDL de las ratas sham como experimentales. De lo anterior, esta localización subcelular de la marca no parece estar relacionada a la manifestación de dolor.

Esta distribución celular no es común a las conexinas. No obstante, existe el antecedente de la que la transfección del cDNA que codifica para la cola de la Cx43, induce cambios en proliferación de la línea celular (Dang, X., Doble, B.W. 2003). La ampliación a futuro en la detección de imágenes tanto en el grupo control como experimental, permitirá el tener más información a este respecto.

No obstante, nuestro estudio tiene la limitación de que la pseudo cuantificación se realizó en un número relativamente reducido de animales. De ahí que, como un paso inicial para confirmar las observaciones anteriores, será necesario la ampliación de estas mediante el estudio de los GRD L6 que ya fueron preservados.

## **10. Conclusiones.**

- Se logró generar un modelo de dolor neuropático de forma exitosa, conduciendo a la disminución del umbral desde la primera evaluación manteniéndose hasta el día 21.
  
- En los ganglios estudiados como en los controles la Cx36 se localiza tanto en los somas neuronales, fibras, así como en las CGS de acuerdo con la distribución previamente descrita y publicada en ratas control por nuestro grupo.
  
- La marca Cx36 se localizó en las zonas de aposición entre CGS y en el soma neuronal formando pequeñas placas IF positiva, lo que sugiere la existencia de comunicación intercelular tanto de tipo homocelular entre las CGS, como heterocelular entre las CGS y las neuronas.
  
- La pseudo cuantificación automatizada de la marca anti-Cx36-IF positiva total de los cortes obtenida en imágenes obtenidas por microscopía confocal mostró que los GRDL5 de ratas experimentales mostraron una densidad relativa del inmuno-puntilleo mayor con respecto a los ganglios utilizados como control. Lo anterior, indica el incremento en la expresión de la Cx36 bajo condiciones de neuropatía.
  
- Lo anterior, sugiere que el dolor induce un incremento en las placas de Cx36 formadas entre las neuronas y las CGS que las rodean. Lo anterior, permitiría una mayor sincronía entre la actividad de ambos tipos celulares, lo cual contribuiría a frenar la hiperexcitabilidad neuronal y mejorar la tolerancia al dolor. Por su parte la mayor sincronía entre las CGS es posible que favorezca la mayor remoción de  $K^+$  intersticial, secundaria a la hiperexcitabilidad neuronal ya descrita.

## **11. Perspectivas del trabajo.**

Las repercusiones sociales, físicas y económicas que ocasiona el dolor neuropático representan un problema de salud pública por lo que es primordial investigar más al respecto con la finalidad del desarrollo de estrategias terapéuticas.

La identificación de que la Cx36 se expresa en las CSG y neuronas en condiciones aun de dolor y la evidencia de que su expresión aumenta en estas condiciones presentada en esta tesis, permite identificar a esta proteína como otro blanco molecular posible entre los múltiples mecanismos involucrados en la fisiopatología del dolor. El avance en la investigación en esta línea permitirá entender mejor la fisiopatología del dolor y generar alternativas para su manejo.

Experimentalmente, como perspectivas inmediatas de este estudio están el confirmar el incremento en la expresión de la Cx36 en condiciones de dolor inducidas por daño a las aferentes del nervio espinal L6, ya preservadas, y que por la pandemia no pudieron estudiarse. Para esto es posible analizar con estos mismos métodos los cortes de los GRDL6, y comparar sus niveles de expresión de la Cx36 con respecto a los controles (GRDL4 y GRDL6) de animales sham y el GRDL4 ipsilateral. Otra perspectiva sería el realizar estos estudios con doble marcaje utilizando anticuerpos específicos para células gliales (anti-GFAP, anti-glutamina sintetasa) lo que nos permitirá tener mayores evidencias de que este aumento también ocurre en la glía, lo cual fortalecería nuestra hipótesis de que la comunicación heterocelular entre glía y neuronas contribuye a la regulación de la excitabilidad neuronal dentro del ganglio.

## **12. Referencias.**

1. Abbadie, C., Lindia, J.A., Cumiskey, A.M., Peterson, L.B., Mudgett, J.S., et al. (2003). Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc Nat Acad Sci USA*, 100(13), 7947-52.
2. Acevedo, J.C., Amaya, A., Casasola, O.L., Chinchilla, N., De Giorgis, M., Flórez, S. et al. (2008). Guías para el diagnóstico y el manejo del dolor neuropático: consenso de un grupo de expertos latinoamericanos. *Rev Iberoamericana de Dolor*, 2, 15-46.
3. Amir, R., Devor, M. (2003). Electrical excitability of the soma sensory neurons is required for spike invasion of the soma, but not for through-conduction. *Biophysical Journal*, 84, 2181-2191.
4. Amir, R., Devor, M. (1996). Chemically mediated cross-excitation in rat dorsal root ganglia. *J. Neurosci*, 16, 4733-4741.
5. Amir, R., Devor, M., (1999). Functional cross-excitation between afferent A- and C-neurons in dorsal root ganglia. *Neuroscience*, 95(1), 189-195.
6. Amir, R., Kocsis, J.D., Devor, M. (2005). Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons. *J Neurosci*, 25(10), 2576-258
7. Apkarian, A.V., Bushnell, M.C., Treede, R.D., Zubieta, J.K. (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain*, 9: 463-484.
8. Bahia, P.K., Suzuki, R., Benton, H., Jowett, J.A., Chen, M.X., Trezise, D.J., Dickenson A.H., Moss, G.W.J. A functional role for small-conductance calcium-activated potassium channels in sensory pathways including nociceptive processes. *JNeurosc*, 25(14), 3489-98.
9. Barragán-Berlanga, A.J., Mejía-Arango, S., Gutiérrez-Robledo, L.M. (2007). Dolor en adultos mayores de 50 años: Prevalencia y factores asociados. *Salud Pública Mex* 2007, 49(4), S488 S494.
10. Baron, R. (2006). Mechanisms of disease: neuropathic pain-a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol*, 2, 95-106.
11. Baron, R. Binder, A., Wasner, G. (2010). Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol*, 9, 807-19.
12. Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267-84.

13. Basbaum, A.I., Jessell, T.M. (2013). Capítulo 24. Dolor. En Kandel, E.R. (Ed.), *Principles of neural science*. (pp. 530-555). Estados Unidos, McGraw-Hill.
14. Belousov, A.B. (2012). The regulation and role of neuronal gap junctions during neuronal injury. *Channels*, 6(5), 390-392.
15. Belousov, A.B., Fontes, J.D. (2013). Neuronal gap junctions: making and breaking connections during development and injury. *Trends Neurosci*, 36(4), 227-236.
16. Bernard, J.F., Dallel, R., Raboisson, P., Villanueva, L., Le Bars, D. (1995). Organization of the efferent projections from the spinal cervical enlargement to the parabrachial area and periaqueductal gray: a PHA-L study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 353, 480–505.
17. Bingham, S., Beswick, P.J., Blum, D.E., Gray, N.M., Chessell, I.P. (2006). The role of the cicloxygenase pathway in nociception and pain. *Semin Cell Dev Biol*, 17, 544-554.
18. Blum, E., Procacci, P., Conte, V., Hanani, M. (2014). Systemic inflammation alters satellite glial cell function and structure. A possible contribution to pain. *Neuroscience*, 274, 209-217.
19. Bonica, J.J. (1953). *The management of pain*. Philadelphia: Lea & Febiger.
20. Bonica, J.J. (1990). *Definitions and taxonomy of pain*. Philadelphia: Lead & Febiger.
21. Bonin, R.P., De Konink, Y. (2013). Restoring ionotropic inhibition as an analgesic strategy. *Neuroscience Letters*, 557, 43-51.
22. Braz, J., Solorzano, C., Wang, X., Basbaum, A.I. (2014). Transmitting pain and itch messages: A compemporaty view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron Review*. 87: 1-15.
23. Breivik, H. Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact in daily life, and treatment. *Eur J Pain*, 10(4), 287-333.
24. Brennan, F., Carr, D.B., Cousins, M.J. (2007). Pain management: a fundamental human right. *Anesth Analg*, 105, 205-22.
25. Brochet, B., Michel, P., Barberger-Gateau, P., Dartigues, J-F. (1998). Population-based study of pain in elderly people: a descriptive survey. *Age and ageing*, 27, 279-284.
26. Brooks, J., Tracrey, I. (2005). From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. *J Anat*, 207, 19-33.

27. Burstein, R., Cliffer, K.D., Giesler, G.J. (1990). Cells of origin of the spinothalamic tract in the rat. *J. Comp. Neurol.* 291, 329–344.
28. Burnstock, G. (2000). P2X receptors in sensory neurons. *Br. J. Anaesth.* 84, 476–488.
29. Carlton, S.M., Hargett, G.L. (2007). Colocalization of metabotropic glutamate receptors in rat dorsal root ganglion cells. *J Comp Neurol.* 10;501(5),780-9.
30. Campbell, J.N., Meyer, R.A. (2006). Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*, 52(1), 77-92.
31. Cervero, F., Iggo, A. (1980). The substantia gelatinosa of the spinal cord. A critical review. *Brain*, 103, 717-772.
32. Challa, S.R. (2015). Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and cons. *International Journal of Neuroscience*, 125(3), 170-174.
33. Chen, Y. Zhang, X., Wang, C., Li, G., Gu, Y., Huang, L-Y. M. (2008). Activation of P2X7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of P2X3 receptors in nociceptive neurons. *PNAS*, 105(43),16773-16778.
34. Cherkas, P.S., Huang, T-Y., Pannicke, T., Tal, M., Reichenbach, A., Hanani, M. (2004). The effects of axotomy on neurons and satellite glial cells in mouse trigeminal ganglion. *Pain*, 110, 290-8.
35. Chiz, B., Cumberbatch, M., Herrero, J., Stirk, G., Headley, P. (1997). Stimulus intensity, cell excitation and the N-Methyl-D-Aspartate receptor component of sensory responses in the rat spinal cord in vivo. *Neuroscience*, 80(1), 251-265.
36. Coda, B.A., Bonica, J.J. (2001). General considerations of acute pain. En: Bonica, J.J. (Ed.) del libro. *Management of Pain.* (p.22-40). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
37. Condorelli, D.F., Belluardo, N., Trovato-Salinaro, A., Mudo, G., (2000). Expression of Cx 36 in mamalian neurons. *Brain Researchs Reviews*, 32, 72-85.
38. Coull, J.A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., DeKonick, Y. (2005). BDNF from microglía causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 15, 1017-1021.
38. Coutaux, A., Adam, F., Willer, J., LeBars, D. (2005). Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*, 72, 359-371.



39. Covarrubias-Gómez, A., Guevara-López, U., Gutiérrez-Salmerón, C., Betancourt-Saldival, J.A., Córdova-Domínguez, J.A. (2010). Epidemiología de dolor crónico en México. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 33(4), 207-213.
40. Covarrubias-Gómez, A., Guevara-López, U., Lara-Solares, A., Tamayo-Valenzuela, A.C., Salinas-Cruz, J., Torres-González, R. (2008). Características de los enfermos que acuden a clínicas del dolor por primera vez. *Rev. Med. IMSS*, 46, 467-472.
41. Dang, X., Doble, B.W., Kardami, E. (2003). The carboxyl-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cells growth. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 242, 35-38.
42. Dansereau, M.A., Gosselin, R.D., Pohl, M., Pommier, B., Mechighel, P., Mauborgne, A. et al. (2008). Spinal CCL2 pronociceptive action is no longer effective in CCR2 receptor antagonist treated rats. *J. Neurochem*, 106, 757-69.
43. Davidson, S., Golden, J.P., Copits, B.A., Ray, P.R., Vogt, S.K., Valtcheva, M.V., Schmidt, R.E., Ghetti, A., Price, T.J., Gereau, R.W. (2016). Group II mGluRs suppress hyperexcitability in mouse and human nociceptors. *Pain*. 157(9),2081-2088.
44. Devor, M. (1999). Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain Supplement*, 6, 27-35.
45. Devor, M., Wall, P.D. (1990). Cross excitation in dorsal root ganglia of nerve-injured and intact rats. *J Neurophysiol*, 64(6), 1733-1746.
46. División técnica de información estadística en salud. (2003). Motivos de consulta en medicina familiar en el IMSS, 1991-20002. *Rev. Med. IMSS*, 41, 441-448.
47. Dong, X., Han, S., Zylka, M.J., Simon, M.I., and Anderson, D.J. (2001). A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* 106, 619-632.
48. Doyon, N., Prescott, S., Castonguay, A., Godin, A., Kröger, H., De Koninck, Y. (2011). Efficacy of synaptic inhibition depends on multiple, dynamically interacting mechanisms implicated in chloride homeostasis, *PLoS Comp. Biol*, 7(9), e1002149.
49. Dunn, P.M., Burnstock, Y.Z.G. (2001). P2X receptors in peripheral neurons. *Prog Neurobiol*, 65(2), 107-134.
50. Duquette, M., Roy, M., Leporé, F., Peretz, I., Rainville, P. (2007). Mecanismos cerebrales implicados en la interacción entre el dolor y las emociones. *Rev Neurol (Paris)*, 132(2): 169-179.

51. Eijkelkamp, N., Linley, J.E. (2012). Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels. *Brain*, 135, 2585-2612.
52. Farrant, M., Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of gabaa receptors. *Nature*, 6, 215-219.
53. Fields, H. (1987). *Pain*. New York: McGraw Hill.
54. Fine, P.G. (2011). Long-Term consequences of chronic pain: Mounting evidence for pain as neurological disease and parallels with other chronic disease states. *Pain Medicine*, 12, 996-1004.
55. Gary, W., Jay, M.D., Robert, L., Barkin, M.B.A. (2014). Neuropathic pain: Etiology, pathophysiology, mechanisms, and evaluations. *Disease-a-Month*, 60, 6-47.
56. Gaskin, D.J., Richard, P. (2012). The economic costs of pain in the United States. *J Pain*, 13(8), 715-724.
57. Gelderd, J.B., Chopin, S.F. (1976). The vertebral level of origin of spinal nerves in the rat. *Anat Rec*, 188, 45-8.
58. Gierthmühlen, J., Baron, R. (2016). Neuropathic pain. *Semin Neurol*, 36, 462-468.
59. Gilron, I., Baron R., Jenten, T. (2015). Neuropathic pain: Principles of diagnosis and treatment. *Mayo Clinic Proc*, 90(4), 532-545.
60. Gilron, I., Watson, P.N., Cahill, C.M., Moulin, D.E. (2006). Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. *CMAJ*, 175, 265-75.
61. Goldberg, D., S., McGee, S., J. (2011). Pain as a global public health priority. *BMC Public Health*, 11(770), 1-5.
62. Goodenough, D.A., Paul, D.L. (2009). Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a002576.
63. Gordillo-Alvarez, V., Ramírez-Bermejo, A., Solís-Valadez, G.P., Bautista-Sánchez, S.G. (2004). Causas del dolor crónico en la clínica del dolor del Hospital General de México. *Dol. Clin Ter*, 2, 15-23.
64. Groves, M.J., Christopherson, T., Giometto, B., Scaravilli, F. (1997). Axotomy-induced apoptosis in adult rat primary sensory neurons. *Journal of Neurocytology*, 26, 615-624.

65. Grudt, T.J., Perl, E.R. (2002). Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J. Physiol.* 540, 189–207.
66. Gu, Y., Chen, Y., Zhang, X., Li, G.W., Wang, C., Huang, L.Y. (2010). Neuronal soma satellite glial cell interactions in sensory ganglia and the participation of purinergic receptors. *Neuron Glia Biol*, 6, 53-62.
67. Hanani, M. (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res. Rev.* 48(3), 457–476.
68. Harstal, C., Ospina, M. (2003). How Prevalent is Chronic Pain?. *Pain Clin Update*, 11, 1-4.
69. Hartfield, E.M., Rinaldi, F., Glover, C.P., Wong, L-F., Caldwell, M.A., Uney, J.B. (2011) Connexin 36 expression regulates neuronal differentiation from neural progenitor cells. *PLoS ONE* 6, e14746.
70. Heppenstall, P.A., Lewin, G.R. (2000). Neurotrophins, nociceptors and pain. *Curr Opin Anaesthesiol*, 13, 573-576.
71. Herrero, J.F., Laird, J.M., Lopez-Garcia, J.A. (2000). Wind-up of spinal cord neurons and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol*, 61, 169-203.
72. Herve, J.C., Derangeon, M. (2012). Gap-junction-mediated cell-to-cell communication. *Cell Tissue Res.* DOI 10.1007/s00441-012-1485-6.
73. Hu, S.J., Xing, J.L. (1998). An experimental model for chronic compression of dorsal root ganglion produced by intervertebral foramen stenosis in the rat. *Pain*, 77, 15–23.
74. Huang, L.Y., Belzer, V., Hanani, M. (2010). Gap junctions in dorsal root ganglia: possible contribution to visceral pain. *Eur J. Pain*, 14(1), 1-11.
75. Huang, L.Y., Gu, Y., Chen, Y. (2013). Communication between neuronal somata and satellite glial cells in sensory ganglia. *Glia*, 61, 1571-1581.
76. Huang, L.Y., Neher, E. (1996). Ca<sup>2+</sup> dependent exocytosis in the somata of dorsal root ganglion neurons. *Neuron*, 17, 135-145.
77. Hylden, J.L., Nahin, R.L., Dubner, R. (1987). Altered responses of nociceptive cat lamina I spinal dorsal horn neurons after chronic sciatic neuroma formation. *Brain Res.* 411, 341–350.

78. Jensen, T.S., Baron, R., Haanpää, M., Kalso, E., Loseser, J.D., Rice, A.S.C., Treede, R-D. (2011). A new definition of neuropathic pain. *Pain*, 152(10), 2204-2205.
79. Jorum, E. Warncke, T. Stubhaug, A. 2003. Cold allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: the effect of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist ketamine-a double-blind, cross-over comparison with alfentanil and placebo. *Pain*, 101(3), 229-35.
80. Julius, D., Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203–210.
81. Kim, S.H., Chung, J.M. (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 50, 355-363.
82. Kohno, T., Moore, K.A., Baba, H., Woolf, C.J. (2003). Peripheral nerve injury alters excitatory synaptic transmission in lamina II of the rat dorsal horn. *J Physiol*, 548, 131-138.
83. Krames, E.S. (2014). The role of dorsal root ganglion in the development of neuropathic pain. *Pain Medicine*, 15, 1669-1685.
84. Kuner, R., Flor, H. (2016). Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. 1518(1):20-30.
85. Lai, J., Hunter, J.C., Porreca, F. (2013). The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. *Curr Opin Neurobiol*, 13, 291–97.
86. Ledda, M., Blum, E., de Palo, S., Hanani, M. (2009). Augmentation in gap junction-mediated cell coupling in Dorsal root ganglia following sciatic nerve neuritis in the mouse. *Neuroscience*, 164, 1538-1545.
87. Livingston, W.K., (1943). *Pain mechanisms: A physiologic interpretation of causalgia*. Mac-millan, New York.
88. Lohmann, D., Schleifer, R., Amon, J., J. (2010). El acceso al tratamiento del dolor como derecho humano. *Archivos de medicina*, 6(2), doi: 10.3823/057.
89. López, J.R., Rivera-Largacha, S. (2018). Historia del concepto dolor total y reflexiones sobre la humanización de la atención a pacientes terminales. *Rev Cienc Salud*, 16(2), 340-356.
90. Luo, C. Gangadharan,V., Bali, K.K., Xie, R-G., Agarwai, N. Kureiova, M., Tappe-Theodor, A., Tegeder, I., Feil, S., Lewin, G., Polgar, E., Todd, A.J., Schlossmann, J.,

- Hofmann, F., Liu, D-L., Hu, S-J., Feil, R., Kunet, T., Kuner, R. (2012). Presynaptically localized cyclic GMP-dependent protein kinase 1 is a key determinant of spinal synaptic potentiation and pain hypersensitivity. *PLoS Biol*, 10, e1001283.
91. Maher, B.J., McGinley, M.J., Westbrook, G.L. (2009) Experience-dependent maturation of the glomerular microcircuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 16865–16870.
92. Mäntyselkä, P., Kumpusalo, E., Ahonen, R., Kumpusalo, A., Kauhanen, J., Viinamäki, H., Halonen, P., Takala, J. (2001) Pain as a reason to visit the doctor: a study in Finnish primary health care. *PAIN*, 89, 75–80.
93. Martínez, M., Quiróga, N.Y., Castellanos, J.E., Hurtado, H. (2000). Subpoblaciones neuronales presentes en el ganglio de la raíz dorsal. *Biomedica*, 20, 248-260.
94. Maeda, S., Tsukihara, T. (2011). Structure of the gap junction channel and its implications for biological functions. *Cell Mol Life Sci*, 68, 1115-1129.
95. Mason, P. (2001). Contributions of the medullary raphe and ventromedial reticular region to pain modulation and other homeostatic functions. *Annu Rev Neurosci*, 24, 737-777.
96. Maxwell, D.J., Belle, M.D., Cheunsuang, O., Stewart, A., Morris, R. (2007). Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn. *J. Physiol.* 584, 521–533
97. McCarberg, B.H., Nicholson, B.D., Todd, K.H., Palmer, T., Penles, L. (2008). The impact of pain on quality of life and the unmet needs of pain management: Results from pain sufferers and physicians participating in an internet survey. *Am J Ther*, 15(4), 312-320.
98. Melzack, R., Wall, P.D Pain Mechanism: a new theory. *Science*, 3699(150), 971-979.
99. Mendell, L.M., Wall, P.D. (1965). Responses of single dorsal cord cells to peripheral cutaneous unmyelinated fibers. *Nature*, 206, 97-99.
100. Moczydlowski, E.G. (2017). Capítulo 6. Electrofisiología de la membrana celular. En Boron, W.F., Boulpaep E. L. (Ed.) *Fisiología Médica* (pp141-172). Philadelphia, EU. Elsevier.

101. Nakamura, Y., Morioka, N., Zhang, F.F., Hisaoka-Nakashima, K., Nakata, Y. (2015). Downregulation of connexin36 in mouse spinal dorsal horn neurons leads to mechanical allodynia. *J. Neurosci*, 93(4), 584–591.
102. Neumann, S., Braz, J.M., Skinner, K., Llewellyn-Smith, I.J., Basbaum, A.I. (2008). Innocuous, not noxious, input activates PKC $\gamma$  interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J. Neurosci*. 28, 7936–7944.
103. Neumann, E., Hermanns, H., Barthel, F., Werdehausen, R., Brandenburger, T. (2015). Expression changes of microRNA-1 and its targets Connexin 43 and brain-derived neurotrophic factor in the peripheral nervous system of chronic neuropathic rats. *Mol. Pain*, 11, 39.
104. Nielsen, M.S., Axelsen, L.N., Sorgen, P.L., Verma, V., Delmar, M., Holstein-Rathlou, N.H. (2012). Gap junctions. *Compr. Physiol*, 2(3), 1981–2035.
105. Ohara PT, Vit JP, Bhargava A, Jasmin L. (2008). Evidence for a role of connexin 43 in trigeminal pain using RNA interference in vivo. *J Neurophysiol*, 100, 3064–3073.
106. Ohara, P.T., Vit, J.P., Bhargava, A., Romero, M., Sundberg, C., Charles, A.C., Jasmin, L. (2009). Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad. *Neuroscientist*, 15, 450–463.
107. Olausson, H., Lamarre, Y., Backlund, H., Morin, C., Wallin, B.G., Starck, G., Ekholm, S., Strigo, I., Worsley, K., Vallbo, A.B., Bushnell, M.C. (2002). Unmyelinated tactile afferents signal touch and project to insular cortex. *Nat. Neurosci*. 5, 900–904.
108. ONU: Asamblea General, *Declaración Universal de Derechos Humanos*, 10 Diciembre 1948, 217 A (III), disponible en esta dirección: <https://www.refworld.org/es/docid/47a080e32.html> [Accesado el 8 Junio 2021]
109. Osterweis, M., Kleiman, A., Mechanic, D. (1987). Del capítulo Illnes behavior and the experience of pain. En *Pain and Dissability: Clinical, Behavioral, and Public Policy Perspectives*. (pp.146). Washington. National Academy Press.
110. Página Instituto Nacional de estadística, Geografía e Informática (INEGI). Disponible en internet en: [www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx). Fecha de consulta, mayo, 2020.
111. Pannese, E. (1981). The satellite cells of the sensory ganglia. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol*, 65, 1–11.
112. Pannese, E. (2010). The structure of the perineuronal sheath of satellite glial cells (SGCs) in sensory ganglia. *Neuron Glia Biol*. 6(1), 3–10.

113. Pannese, E., Ledda, M., Cherkas, P.S., Huang, T.Y., Hanani, M. (2003). Satellite cell reactions to axon injury of sensory ganglion neurons: increase in number of gap junctions and formation of bridges connecting previously separate perineuronal sheaths. *Anat Embryol*, 206, 337–347.
114. Pérez Armendáriz, E.M. (2013). Connexin36, a key element in pancreatic beta cell function. *Neuropharmacology*, 75, 557-566.
115. Pérez Armendáriz, E.M., Norcini, M., Hernández-Tellez, B., Castell-Rodríguez, A., Coronel-Cruz, C., Guerrero Alquicira, R. et al. (2018). Neurons and satellite glial cells in adult rat lumbar dorsal root ganglia express connexin 36. *Acta Histochemica*, 120, 168–178.
116. Personius, K.E., Chang, Q., Mentis, G.Z., O'Donovan, M.J., Balice-Gordon, R.J. (2007) Reduced gap junctional coupling leads to uncorrelated motor neuron firing and precocious neuromuscular synapse elimination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 11808–11813.
117. Pezet, S., McMahon, S.B. (2006). Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci*, 29, 507-538.
118. Prescott, S.A., Ma, Q., De Koninck, Y. (2014). Normal and abnormal coding of somatosensory stimuli causing pain. *Nat Neurosci*, 17(2), 183-191.
119. Price, D.D. (2000). Psychological and neuronal mechanisms of the affective dimension of pain. *Science*. 288: 1769-1772.
120. Proudlock, F., Spike, R.C., Todd, A.J. (1993). Immunocytochemical study of somatostatin, neurotensin, GABA, and glycine in rat spinal dorsal horn. *J. Comp. Neurol.* 327, 289–297.
121. Rash, J.E., Yasumura, T., Dudek, F.E., Nagy, J.I. (2007). Cell-Specific expression of connexins and evidence of restricted Gap Junctional coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci*, 21(6), 1983-2000.
122. Raja, S.N., Carr, D.B., Cohen, M., Finnerup, N.B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F.J., Mogil, J.S., Ringkamp, M., Sluka, K.A., Song, X., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P.R., Ushida, T., Vader, K. (2020). The revised international association for the study of pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 00, 1-7

123. Rosenfeld, B., Breitbart, W., McDonald, M.V., Passik, S.D., Thaler, H., Portenoy, R.K. (1996). Pain in ambulatory AIDS patients. II: Impact of pain on psychological functioning and quality of life. *Pain*, 68, 323-328.
124. Scholz, J. Broom, D.C., Youn, D.H., Mills, C.D., Kohno, T., Suter, M.R., Moore, K.A., Decorsted, I., Coggeshall, R.E., Woolf, J.C. (2005). Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *Journal of Neuroscience*, 25(32), 7317-7323.
125. Scholz, J., Finnerup, N.B., Nadine Attal, N., Aziz, Q., Baron, R., Bennett, M.I., Benoliel, R., Cohen, M., Cruccu, G., Davis, K. D., Evers, S., First, M., Giamberardino, M. A., Hansson, P., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Nurmikko, T., Perrot, S., Raja, S. N., Rice, A.S.C., Rowbotham, M. C., Schug, S., Simpson, D. M., Smith, B.H., Svensso, P., Vlaeyen, J.W.S., Wang, S-J., Barke, A., Rief, W., Treede, R-D. (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *Pain*. 160: 53-59.
126. Siqueira, S.R.D.T., Alves, B., Malpartida, H.M.G., Teixeira, M.J., Siqueira, J.T.T. (2009). Abnormal expresión of voltage-gated sodium channels Nav1.7, Nav1.3 and Nan1.8 in trigeminal neuralgia. *Neuroscience*, 164(2), 573-7.
127. Shrinder, W.D., McMahon, S.B. (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*, 20, 629-632.
128. Snider, W.D., McMahon, S.B. (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 20, 629–632.
129. Srinivas M., Rozental, R., Kojima, T., Dermietzel, R., Mehler, M., Condorelli, D.F., Kessler, J.A., Spray, D.C. (1999). Functional properties of channels formed by the neuronal gap junction protein connexin36. *J Neurosci*, 19, 9848–9855.
130. Stoll, R. R. (1963). *Set theory and logic*. Dover Publications Inc. Ohio.
131. Stoffel, M., Plesnila, N., Eriskat, J., Fürst, M., Baethmann, A. (2002) Release of excitatory amino acids in the penumbra of a focal cortical necrosis. *J. Neurotrauma* 19, 467–477.
131. Söhl, G., Maxeiner, S., Willecke, K. (2005). Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat. Rev. Neurosci*, 6(3), 191–200.



132. Thacker, M.A., Clark, A.K., Bishop, T., Grist, J., Yip, P.K., Lawrence D.F. et al (2009). CCL2 is a key mediator of microglía activation in neuropathic pain states. *Eur J Pain*, 13(2), 263–72.
133. Todd, A.J., McKenzie, J. (1989). GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 31, 799–806.
134. Tominaga, M., Caterina, M.J. (2004). Thermosensation and pain. *J Neurobiol*, 61, 3-12.
135. Torsney, C., MacDermott, A.B. (2006). Dishinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin-1 receptor expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci*, 26(6), 1833-1843.
136. Treede, R-D., Rief, W., Barke, A., Aziz, O., Bennett, M.I., Benoliel, R., Cohery, M., Evers, S., Finnerup, N.B., First, M.B., Giamberardino, A., Kaasa, S., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S., Smith, B.H., Svensson, P., Vlaeven, J.W.S., Wang, S-J. (2015). A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain*, 156, 1003-1007.
137. Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter M.W. et al. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*, 424(6950), 778–83.
138. Tsuda, M. Kuboyama, K., Inoue, T., Nagata, K., Tozaki-Saitoh, H, Inoue, K. (2009). Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays. *Mol Pain*, 5, 28.
139. Tulleuda, A., Cokic, B., Callejo, G., Saiani, B., Serra, J., Gasull, X. (2011). TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Mol Pain*, 7(30), 1-17.
140. Ubaidi, M.R, White, T.W., Ripps, H., Poras, I., Anver, P., Gomes, D., Bruzzone, R., (2000). Functional properties, developmental regulation, and chromosomal localization of murine connexin36, a gap-junctional protein expressed preferentially in retina and brain. *J Neurosci Res*, 59(6), 813-26.
141. Ultenius, C., Linderoth, B., Meyerson, B.A., Wallin, J. (2006). Spinal NMDA receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat. *Neurosci Lett*, 399, 85–90.

142. van Hecke, O., Austin S., K., Khan, R. A., Smith, B., H., Torrance, N. (2013). Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain*, 155(4), 654-662.
143. Velazco, M. (2014). Dolor Neuropático. *Rev. Med. Clin. Condes*, 25(4), 625-634.
144. von Hehn, C.A., Baron, R., Woolf, C.J. (2012). Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron*, 73(4), 638-652.
145. Vrontou, S. Wong, A.M., Rau, K.K., Koerber, H.R., Anderson, D.J. (2013). Genetic identification of C-fibers that detect massage-like stroking of hairy skin in vivo. *Nature*, 493(7434): 669-673.
146. Wall, P.D., Devor, M. (1983). Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. *Pain*, 17(4), 321-339.
147. Wang, Y., Song, J-H., Denisova, J.V., Park, W-M., Fontes, J.D., Belousov, A.B. (2012). Neuronal gap junction coupling is regulated by glutamate and plays critical role in cell death during neuronal injury. *J Neurosci*, 32, 713–725.
148. Wieseler, F.J., Maier, S.F., Watkins, L.R. (2005). Central proinflammatory cytokines and pain enhancement. *Neurosignals*, 14(4), 166–174.
149. Willis, W.D. (1985). *The pain system: The neural basis of nociceptive transmission in the mammalian nervous system*. Basel: Kager Press.
150. Woolf, C.J. (2011). Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, 152(3), S2-S15.
151. Woolf, J.C., Costigan, M. (1999). Transcriptional and posttranslational plasticity and generation of inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 7723-7730.
152. Woolf, C.J., Mannion, R.J. (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. *Lancet*, 353, 1959-1964.
153. Wu, A., Green, C.R., Rupenthal, I.D., Moalem-Taylor, G. (2012). Role of gap junctions in chronic pain. *J. Neurosci. Res*, 90(2), 337–345.
154. Yam, M.F., Loh, Y.C., Tan, C.S., Adam, S.K., Manan, N.A., Basir, R. (2018). General pathways of pain sensation and the mayor neurotransmitters involved in pain regulation. *Int. J. Mol. Sci*, 19, 1-23.

155. Yasaka, T., Tiong, S.Y., Hughes, D.I., Riddell, J.S., Todd, A.J. (2010). Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 151, 475–488.
156. Zeilhofer, H.U., Benke, D., Yevenes, G.E. (2012). Chronic pain states: Pharmacological strategies to restore diminished inhibitory spinal pain control. *Annu Rev Pharmacol*, 52, 111-133. Zhang, X. Chen, Y. Huang, L.Y. (2007). Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 9864-9869.
157. Zhang, J., De Koninck, Y. (2007). Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve. *J. Neurochem*, 97, 772– 83.
158. Zhang, H., Mei, X., Zhang, P., Ma, C., White, F.A., Donnelly, D.F., Lamotte, R.H. (2009). Altered functional properties of satellite glial cells in compressed spinal ganglia. *Glia*, 57, 1588–1599.
159. Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16, 109–110.