

Tesis de Licenciatura

Modulación del reflejo nociceptivo de apertura bucal por el estriado de la rata

Belforte, Juan Emilio

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en
Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Belforte, Juan Emilio. (). Modulación del reflejo nociceptivo de apertura bucal por el estriado de la rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000705_Belforte

Cita tipo Chicago:

Belforte, Juan Emilio. "Modulación del reflejo nociceptivo de apertura bucal por el estriado de la rata". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000705_Belforte

EXACTAS
UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis de Licenciatura

MODULACIÓN DEL REFLEJO NOCICEPTIVO DE APERTURA BUCAL POR EL ESTRIADO DE LA RATA.

Versión preliminar

Autor: Juan Emilio Belforte

Director: Jorge H. Pazo

Laboratorio de Neurofisiología de la Cátedra de Fisiología y
Biofísica de la Facultad de Medicina, UBA.

**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas**

Buenos Aires, diciembre de 1999

> **ÍNDICE**

Resumen	2
Introducción	3
<i>Componentes de los GB</i>	5
<i>Procesamiento somatosensorial en los GB</i>	
<i>Posibles aferencias y eferencias de la información nociceptiva a los GB</i>	7
<i>Sistemas de analgesia endógena</i>	9
<i>Los GB como parte del sistema de analgesia endógena</i>	10
<i>El reflejo nociceptivo de apertura bucal (RNAB)</i>	13
Materiales y métodos	15
<i>Preparación del animal</i>	15
<i>Medición del RNAB evocado por la estimulación dental</i>	16
<i>Estimulación eléctrica del estriado</i>	17
<i>Estimulación química del estriado</i>	18
<i>Histología</i>	18
<i>Ánalisis estadístico</i>	19
Resultados	20
<i>Características del reflejo</i>	20
<i>Efectos de la estimulación eléctrica del estriado</i>	22
<i>Efectos de la estimulación química del estriado</i>	26
Conclusiones	32
Bibliografía	34

RESUMEN

Clásicamente los Ganglios Basales fueron relacionados con las funciones motoras, sin embargo diversas evidencias recientes sugieren su participación en el procesamiento de las aferencias sensoriales inocuas y nociceptivas. Estudios electrofisiológicos, metabólicos y de flujo sanguíneo demuestran que una gran proporción de las neuronas del estriado responden al dolor. También se ha demostrado que el bloqueo de la vía dopaminérgica nigroestriatal disminuye significativamente las respuestas nociceptivas reflejas lo que indicaría un efecto analgésico. Se han obtenido efectos analgésicos por la estimulación eléctrica del estriado (Caudado) en primates y en el hombre. De lo anterior se desprende que el estriado podría estar involucrado en el procesamiento de la información nociceptiva y los mecanismos de analgesia endógena. Sin embargo como se realizan estas funciones no ha sido clarificado hasta el momento. El objetivo del presente trabajo fue determinar si el estriado es capaz de modular el reflejo nociceptivo de apertura bucal evocado por la estimulación de la pulpa dental (RNAB) en ratas anestesiadas. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho anestesiadas. El RNAB se obtuvo mediante la estimulación eléctrica de la pulpa dental de los incisivos inferiores y se midió como la respuesta electromiográfica del músculo digástrico. Distintas zonas de estriado se estimularon eléctricamente precediendo a diferentes tiempos al estímulo dental. Se identificaron zonas capaces de inhibir el RNAB concentradas en la parte central del núcleo. El curso temporal de la respuesta presentaba un efecto inhibitorio máximo cuando el intervalo era de 20 mseg. La estimulación selectiva de las neuronas mediante microinyecciones de L-glutamato fue capaz de inhibir significativamente el RNAB (48% respecto al control con solvente, $p<0.001$ ANOVA y Test de Scheffe $F_{2,45} = 78,74$). Los sitios inhibitorios se concentran en el estriado medio. Se identificaron también sitios capaces de facilitar el RNAB ubicados alrededor de los sitios inhibitorios. Los zonas más externas del núcleo no fueron capaces de modular la amplitud de la respuesta EMG cuando se estimularon eléctrica o químicamente. Los resultados del presente trabajo demuestran que la estimulación de determinados sitios del estriado es capaz de modular el reflejo nociceptivo de apertura bucal evocado por la estimulación eléctrica de la pulpa dental en ratas anestesiadas. Esto sugiere su participación en el procesamiento nociceptivo y en los mecanismos de la analgesia endógena.

➤ INTRODUCCIÓN

Al aplicar sobre un animal despierto un estímulo nociceptivo intenso se provoca en la mayoría de los casos una reacción motora, de hecho, de no mediar esta respuesta, el estímulo nocivo puede derivar en una lesión o incluso en la muerte del organismo. La percepción de la sensación aversiva, displacentera generada por este tipo de estímulos es llamada dolor y en general acompaña al daño tisular o a la posible ocurrencia del mismo. El dolor incluye más que un componente sensorial discriminativo, es una experiencia multisensorial que involucra componentes motivacionales, afectivos, cognitivos y motores.

Es esencial para la sobrevida de un organismo que el sistema nervioso central (SNC) pueda procesar la información nociceptiva y generar una respuesta hacia el agente nocivo o potencialmente nocivo, orientada a alejarlo. Melzack y Wall (1965) mostraron que un estímulo nociceptivo inesperado desencadenaba una reacción motora compleja que involucraba una respuesta de alerta, reflejo de flexión, reajustes posturales, vocalización, orientación hacia la zona lesionada y otros comportamientos destinados a reducir la sensación dolorosa. Por otro lado, el dolor crónico promueve la aparición de comportamientos paliativos, como el resguardo del miembro lesionado y la reducción del movimiento, facilitando de esa manera la recuperación del organismo (Wall 1979).

Si bien se sabe bastante acerca de los aspectos sensorio discriminativos del dolor se tiene poca información acerca de los mecanismos centrales capaces de procesar la información nociceptiva resultando de ellos una respuesta motora coordinada. Los ganglios basales (GB) podrían ser los encargados de dicho procesamiento ya que constituyen una serie de núcleos subcorticales con las aferencias y eferencias necesarias, así como también de un complejo sistema de interconexiones necesario para llevar a cabo procesos integrativos.

Componentes de los GB

Los GB son estructuras telencefálicas bilaterales identificadas generalmente con un control en paralelo e independiente del sistema piramidal de las respuestas motoras. Se

consideran como integrantes de los GB a cinco núcleos subcorticales el cuerpo estriado, el globo pálido (GP), el núcleo subtalámico de Luys y la sustancia negra (SN).

El estriado, también llamado neoestriado, constituye en los roedores una masa única mientras que en los carnívoros y primates está formado por dos estructuras separadas, el núcleo caudado y el putamen los cuales se fusionan por sus extremos rostral y caudal. El estriado es el principal núcleo de entrada de los GB, recibe aferencia de la corteza cerebral (áreas S I y II, 7b, prefrontal, motora primaria, suplementaria y premotora), de los núcleos intralaminares del tálamo (central lateral, paracentral, centromediano y parafascicular), de la sustancia negra compacta, (vía dopaminérgica nigroestriatal), del núcleo pedúnculo pontino, del núcleo del rafe dorsal, así como aferencias del sistema extralemniscal. Las aferencias corticales y las talámicas son excitatorias siendo el neurotransmisor involucrado el glutamato. Por otro lado, el estriado proyecta principalmente sobre solo dos núcleos ambos pertenecientes a los GB: la SN reticulada y el GP.

La SN se encuentra ubicada en el mesencéfalo y se la subdivide en dos zonas citoarquitectónica y funcionalmente diferentes, la SN compacta y la reticulada. La primera proyecta al estriado dando lugar a la vía nigroestriada mientras que la SN reticulada es uno de los núcleos de salida de los GB, proyectando hacia diferentes núcleos del tálamo (núcleos ventral lateral, ventral anterior, centro mediano)

El GP es la estructura filogenéticamente más antigua de los GB, al igual que el estriado está subdividido en dos el GP externo y el interno. Este último se encuentra inmerso en la cápsula interna en los no primates y recibe el nombre de entopeduncular mientras que el GP externo se lo denomina GP a secas. El GP externo es un núcleo de interconexión dentro de los GB mientras que el GP interno es el otro núcleo de salida siendo funcionalmente equiparable a la SN reticulada.

Clásicamente se le atribuyeron a los ganglios basales funciones motoras tales como el planeamiento y ejecución de comportamientos motores aprendidos, el control de los movimientos voluntarios y la coordinación de movimientos dependientes de contexto. Sin embargo, actualmente existe evidencia acerca de su participación en el procesamiento de información somatosensorial sin que el significado de la misma halla sido aclarado por completo.

Procesamiento somatosensorial en los GB

Mediante técnicas electrofisiológicas pueden estudiarse los efectos de la estimulación periférica sobre la actividad neuronal en los diferentes núcleos. De esta manera se identifican distintas poblaciones de neuronas en base a su capacidad de codificar la localización, duración e intensidad del estímulo sensorial. En base a su rango de respuesta ante intensidades crecientes de los estímulos sensoriales se clasifican en neuronas de bajo umbral (LTM), de rango expandido (WDR) y nociceptivas específicas (NE). Las primeras responden a estímulos mecánicos inocuos sin aumentar su frecuencia de descarga al aplicarse, dentro de su campo receptivo, un estímulo nocivo. Las neuronas de rango expandido poseen umbrales de estimulación equiparables a las LTM sin embargo responden a lo largo de todo el rango de intensidades, alcanzando su máxima frecuencia de descarga con los estímulos nocivos más intensos. Las neuronas NE como su nombre lo indica poseen umbrales de respuesta altos y son activadas únicamente con estímulos nocivos. Este sistema de clasificación se utilizó para caracterizar y categorizar las neuronas de la médula espinal, tálamo, amígdala, corteza y más recientemente los GB.

Estudios electrofisiológicos mostraron que aproximadamente el 50% de las neuronas estudiadas en SN respondían exclusivamente a estímulos nocivos (neuronas NE) (Tsai CT 1989, Barasi S. 1979) ya fuera excitándose o inhibiéndose, sugiriendo una función específica respecto al dolor. Numerosos estudios demostraron que las neuronas de la SN reticulada y de la compacta presentan distintos patrones de respuesta ante estímulos nocivos eléctricos, químicos, mecánicos y la estimulación térmica, ya sea incrementando o disminuyendo la frecuencia de descarga. Estas neuronas poseen campos receptivos extensos que muchas veces incluyen todo el cuerpo del animal (Tsai CT 1989, Barasi S. 1979 y Gao et al. 1990). Los campos receptivos extensos sugieren que estas neuronas no se encuentran involucradas en la localización espacial del estímulo nocivo. El papel de estas neuronas podría estar relacionado con la codificación de la intensidad del estímulo, ya que ha sido descripto, en ratas anestesiadas, que neuronas de SN compacta responden incrementando su frecuencia de descarga de manera logarítmica ante un incremento lineal en la intensidad de un pulso eléctrico aplicado en la cola Gao (1990).

Numerosos estudios demuestran la existencia, tanto en el GP como en el estriado, de una gran cantidad de neuronas que pueden ser activadas por estímulos nocivos (WDR y NE) tanto eléctricos, como mecánicos y térmicos (Bernard et al. 1992, Chudler et al. 1993 y Chudler 1998) si bien existen diferencias entre los distintos autores en cuanto a porcentaje de neuronas de cada tipo. A modo de ejemplo podemos citar el trabajo de Richards y Taylor (1982) con 44% neuronas estriatales clasificadas como nociceptivas frente al 97% observado por Chudler y colaboradores (1993), ambos trabajando en ratas anestesiadas. Estas diferencias se deben probablemente a las distintas técnicas de estimulación y muestreo utilizadas, así como también a los diferencias en el grado y el tipo de anestésico empleado. Bernard y colaboradores (1992) demostraron en ratas paralizadas que aproximadamente el 80% de las neuronas del GP ventral respondían preferente o exclusivamente a estímulos nocivos mecánicos y/o térmicos, mientras que otros tipos de estímulos incluyendo inocuos, somatoestésicos, visuales y auditivos resultaban poco o nada efectivos. La mayoría de las neuronas estudiadas presentaban campos receptivos amplios incluyendo en muchos casos la mayor parte del cuerpo. La utilización de estímulos térmicos graduados permitió observar que estas neuronas eran capaces de codificar la intensidad del estímulo nocivo. Resultados similares fueron descriptos por Chudler y colaboradores (1993) con respecto a neuronas estriatales si bien una subpoblación de neuronas de rango expandido, además de a estímulos térmicos, eran capaces de codificar la intensidad de estímulos mecánicos.

En la mayoría de los estudios no se observa una distribución somatotópica de las neuronas estudiadas, sin embargo Richards y Taylor (1982) observaron en ratas que las neuronas con campos receptivos rostrales y caudales del cuerpo se ubican en la parte anterior y posterior del estriado respectivamente. La convergencia de entradas multisensoriales al estriado sugieren que este núcleo podría estar involucrado en la integración de diferentes modalidades sensoriales, coordinando una respuesta comportamental. (Chudler y Dong 1995).

La utilización de la tomografía de emisión de positrones (PET) para medir el flujo regional de sangre en el SNC permite medir de manera indirecta la actividad neuronal de manera no invasiva. En general un aumento en la actividad neuronal lleva a un aumento en

la demanda de oxígeno con el consiguiente incremento del flujo sanguíneo. Mediante esta técnica se demostró que diferentes núcleos corticales y subcorticales entre los que se encuentra el estriado incrementan su actividad preferentemente ante estímulos nocivos. La estimulación térmica dolorosa (46.4°C) de la mano en humanos voluntarios resulta en un incremento significativo en el flujo sanguíneo en el putamen y GP contralaterales comparada con una estimulación inocua (41.3°C) (Jones et al. 1991). Esta y otras técnicas como la utilización de C¹⁴ deoxiglucosa, presentan algunas limitaciones ya que no pueden discriminar eventos sinápticos excitatorios de inhibitorios ni discriminar entre actividad somática o de fibras, además en algunos casos la actividad neuronal, correlaciona inversamente con el flujo sanguíneo local.

Todos estos resultados tomados en su conjunto sugieren que los GB son capaces de procesar información nociceptiva, además de inocua. La mayoría de las neuronas nociceptivas de los GB poseen campos receptivos extensos y una cierta capacidad de codificar la intensidad del estímulo. Ciertas zonas de la corteza y tálamo poseen estas mismas características y como se mencionó anteriormente proyectan hacia el estriado pudiendo constituir una de las vías aferentes para los estímulos nociceptivos.

Posibles aferencias y eferencias de la información nociceptiva a los GB

El papel de la corteza cerebral en la sensibilidad dolorosa fue puesto en duda hasta no hace mucho. Sin embargo actualmente ha quedado firmemente aceptada su participación debido a evidencias obtenidas tanto en animales como en el hombre. Se ha demostrado que en el área somatosensorial primaria SI existen neuronas que responden al dolor. Algunas son nociceptivas específicas y otras de rango expandido. Sus campos receptivos son pequeños, contralaterales y ubicados somatotópicamente, si bien se han descripto algunas con campos grandes y bilaterales. Es por todo esto que parece poco probable que el área SI contribuya significativamente en la respuesta nociceptiva del estriado en donde predominan los campos receptivos extensos y no organizados somatotópicamente. Sin embargo no puede descartarse que la pérdida de la somatotopía y los campos extensos en el estriado no se deban a la convergencia de las zonas topográficamente organizadas en el área S I. Se ha

demostrado que ablaciones masivas y bilaterales de la corteza frontal, parietal y temporal reducen el número de neuronas que responden a la estimulación del nervio ciático en el núcleo caudado de gatos (Pazo et al. 1992). En la corteza, las áreas SII y 7b reciben importantes aferencias nociceptivas, sus neuronas poseen campos receptivos periféricos grandes, contra y bilaterales capaces de codificar la duración del estímulo y en algunos casos la intensidad del estímulo. Las relaciones anatómicas, electrofisiológicas y funcionales de estas zonas apuntan más bien a una integración que a funciones discriminativas. Por lo que se les atribuye un papel en el componente emocional-afectivo del dolor. Por otro lado las similitudes entre estas áreas y el estriado en lo referente a los campos receptivos y la falta de organización somatotópica lleva a pensar que estas sería una vía directa de entrada de la información nociceptiva a los GB (Houssay 1999).

Una de las principales aferencias de los GB esta constituida por la proyección tálamo estriatal que conecta los núcleos intralaminares centro mediano y el parafascicular con el estriado si bien otros núcleos talámicos también inervan este núcleo (paracentral, centro medial, subparafascicular) (Parent 1990). Estudios electrofisiológicos han demostrado claramente la participación de los núcleo intralaminares en los procesos nociceptivos. El 72% de las neuronas dentro de Pf, CL y Pc en el gato (Dong et al. 1978) han sido clasificadas como nociceptivas. Estas neuronas se caracterizan por tener campos receptivos extensos, bilaterales, sin estar somatotópicamente organizadas, siendo en esos aspectos similares a las observadas en el estriado. Por otro lado, ha sido descripto que una alta proporción de las neuronas, tanto en los núcleos intralaminares como en el estriado, tienen campos receptivos trigeminales (Chudler et al. 1993). Esto sugiere que esta vía podría estar involucrada en el control de los movimientos de la cabeza ante un estímulo nociceptivo, tales como orientación o posicionamiento durante el escape y la vocalización.

Existen otros núcleos capaces de transmitir la información nociceptiva a los GB entre ellos la amígdala, la corteza prefrontal, el giro cingulado, todos ellos conectados con los GB, habiéndose demostrado su participación en el componente afectivo del dolor. Otro componente importante es el núcleo dorsal del rafe, este centro se encuentra involucrado en los mecanismos de analgesia endógena (Wang y Nakai 1994) (que serán discutidos más adelante) y se encuentra conectado con la SN, el estriado y el GP.

Tiene particular interés para este trabajo la existencia de una vía descripta para la información nociceptiva trigeminal independiente del tálamo. Yasui y colaboradores (1987) demostraron la presencia de una proyección directa desde la lamina I del núcleo espinal del trigémino hasta el caudado y el putamen en gatos. Además, estudios realizados en ratas mediante trazadores anterógrados mostraron la presencia de proyecciones directas desde la parte cervical baja y la superior torácica de la médula espinal hasta el GP y la SN (Cliffer et al. 1991). Si bien el significado funcional de estas vías se desconoce, la existencia de estas proyecciones estaría indicando que la información nociceptiva trigeminal puede acceder a los GB mediante una vía directa y otra indirecta a través del tálamo.

A modo de resumen podemos concluir que existe amplia evidencia neuroanatómica y electrofisiológica que demuestra que la información nociceptiva puede alcanzar los GB a través de múltiples vías en paralelo. Esta redundancia en cuanto aferencias aseguraría la llegada de las entradas sensoriales nociceptivas a los GB. Aún más, el circuito de retroalimentación corteza - GB - tálamo - corteza podría participar en la regulación de las señales ascendentes nociceptivas.

Desde hace algunos años se comenzó a considerar a la SN reticulada, que junto con el GP interno constituyen los núcleos de salida de los GB, como parte del sistema de analgesia endógena (Baumeister et al. 1988).

Sistemas de analgesia endógena

Estos sistemas forman parte de los sistemas descendentes o de inhibición distal que controlan las aferencias sensoriales. Este sistema es capaz de “bloquear” la llegada de la información nociceptiva a determinadas zonas del SNC. Las observaciones de Reynolds (1969) demostraron que la estimulación de la sustancia gris periacueductal (SGP) producía analgesia en ratas. Esto confirmaba experimentalmente las observaciones empíricas acerca de la supresión del dolor en ciertas situaciones, por ejemplo soldados durante la batalla, víctimas de accidentes, deportistas durante competencias, que a menudo sienten poco o ningún dolor en el momento que se lesionan pero luego sí.

Estos sistemas analgésicos endógenos pueden ser activados por diferentes estímulos tales como: el estrés agudo, el ejercicio físico, la actividad sexual, ciertas formas de acupuntura entre otros. (Sandkühler 1996). Sin embargo el más potente activador es el dolor mismo. Este sistema puede ser separado en dos grandes divisiones, aquella que utiliza como neurotransmisor o neuromodulador a sustancias opioides, como son las endorfinas, encefalinas y dinorfinas y aquella que no los utiliza. Este último ha sido menos estudiado y parece estar involucrado en ciertas formas de estrés (Tierney et al. 1991). El sistema analgésico opioide es activado por la morfina, uno de los más potentes analgésicos conocidos. Esta sustancia ejerce su acción actuando como agonista de los opioides endógenos, uniéndose a los receptores de tipo μ que tiene como ligando endógeno a las encefalinas y la β -endorfina. (Dirksen 1990). La naloxona bloquea sus efectos ya que es un bloqueante de los receptores para opioides (es antagonista para las tres familias de receptores (μ , κ y δ).

Si bien se sigue considerando que la SGP es uno de los principales centros involucrados en el fenómeno de la analgesia endógena ya no es el único centro analgésico conocido. La estimulación eléctrica y la microinyección, en sitios específicos del SNC, de neurotransmisores excitatorios (glutamato), distintos agonistas del sistema opioide y otros agonistas y antagonistas selectivos ha permitido demostrar un efecto antinociceptivo de una serie de núcleos. Entre ellos se encuentran el rafe dorsal, el rafe magno, la formación reticular mesencefálica, los núcleos reticular gigantocelular y paragigantocelular, ciertos núcleos del hipotálamo (por ej. el núcleo arcuato), otros del tálamo (intralaminares, ventral posterolateral), la amígdala y otros (para revisión ver Kanjhan 1995 y Willis 1988). Más recientemente se han agregado a esta lista los GB.

Los GB como parte del sistema de analgesia endógena

Evidencias neuroanatómicas, electrofisiológicas, clínicas, comportamentales y farmacológicas sugieren que los GB formarían parte del sistema de analgesia endógena (Chudler y Dong 1995).

Ya hemos visto que los GB poseen aferencias nociceptivas y que son capaces de procesar información somatosensorial. Además los GB, específicamente el estriado y el GP, poseen una de las mayores concentraciones de receptores para opioides de todo el SNC, esto ha sido demostrado tanto en humanos como en diferentes modelos animales. (Herkenham y Pert 1981). Por otro lado en estudios de inmunohistoquímica y radioinmunoensayos se detectaron grandes cantidades de encefalinas y dinorfinas (Millan 1992). Mediante estudios electrofisiológicos se ha estudiado la capacidad antinociceptiva y analgésica de los GB mediante el registro de la actividad neuronal evocada por estímulos nocivos. La estimulación eléctrica de la SN es capaz de inhibir significativamente la actividad espontánea y la evocada por estímulos nocivos en neuronas nociceptivas específicas del núcleo parafascicular en ratas anestesiadas (Li et al. 1992). Por otro lado, experimentos realizados en gatos decerebrados a nivel precolicular, mostraron que la estimulación eléctrica de la SN era capaz de inhibir la respuesta evocada, en neuronas de la lámina V a nivel lumbar, por estímulos nociceptivos (Barnes et al 1979). Esta inhibición era bloqueada por antagonistas dopaminérgicos y no por antagonistas serotoninérgicos inyectados por vía intravenosa.

Existen evidencias clínicas que permiten relacionar a los GB con alteraciones en la percepción del dolor. Han sido reportados casos de dolor oral y genital en pacientes con la enfermedad de Parkinson (enfermedad neurodegenerativa en la que se encuentran alteraciones anatómo funcionales de los GB) no atribuibles a las manifestaciones motoras de la patología (Ford et al. 1996). Aproximadamente el 40 % de los pacientes con esta patología presentan anormalidades sensoriales, entre ellas las más frecuentes es el dolor (Chudler y Dong 1995), intermitente o crónico en la mayor parte de los casos no localizado. Sumado a esto, experimentos realizados en modelos animales de Parkinson (ratas lesionadas unilateralmente con 6- hidroxidopamina, 6-OHDA,) muestran una disminución aguda en la sensibilidad nociceptiva ipsilateral respecto al lado lesionado e hipoalgesia crónica contralateral. (Carey 1986)

La evidencia funcional proveniente de estudios comportamentales sugiere que los opioides dentro de los GB estarían asociados con la modulación del dolor. Se han realizado numerosos estudios en los cuales se examinan los efectos comportamentales de la

microinyección de opioides en los diferentes GB (Chudler y Dong 1995). El mayor problema en todos ellos consiste en discriminar los efectos analgésicos de los motores. La manipulación farmacológica de estos núcleos puede modificar la capacidad de respuesta motora ante los estímulos nociceptivos sin alterar la sensación o percepción del estímulo nocivo. Algo similar a lo que ocurre en la parálisis neuromuscular inducida por drogas, en la que se suprime la respuesta motora sin producirse modificaciones sensoriales. La microinyección bilateral de morfina en el GP ha mostrado tener un efecto analgésico dosis dependiente, naloxona reversible, en estudios realizados con ratas ambulantes evaluado mediante el test de la plancha caliente (hot plate) (Anagnostakis et al. 1992). Aún más, la morfina microinyectada en el GP posee un efecto locomotor dosis dependiente, esto sugiere que la analgesia observada no estaría relacionada con un impedimento motor. Por otro lado, resultados similares han sido obtenidos por Baumeister y colaboradores (1990) trabajando con inyecciones bilaterales en la SN. En ratas canuladas en este núcleo, han demostrado que la microinyección de morfina o encefalina es capaz de producir efectos de tipo analgésicos. Estos efectos fueron evaluados en base a respuestas motoras, test de la plancha caliente y reflejo flexor de la cola (tail flick), sin que se observaran alteraciones motoras tales como ataxia, akinesia o catalepsia.

Los resultados obtenidos mediante estudios similares con respecto al estriado son controversiales. Existen trabajos que muestran que la microinyección de morfina y distintos opioides en el diferentes núcleos, entre ellos el estriado, es incapaz de elevar los umbrales para el dolor (ver revisión en Chudler y Dong 1995). Sin embargo, estos resultados se oponen a lo observado por otros grupos. Jurna y Heinz (1979) demostraron en que la microinyección estriatal de morfina tenía un efecto antinociceptivo, al evaluar la respuesta de latigazo de la cola en ratas ambulantes. Este efecto era bloqueado por naloxona. Además la microinyección de etorfina en diferentes zonas del estriado produce analgesia sin catatonía. (Thorn-Gray y Levitt 1983).

Al tomar en cuenta todos los resultados obtenidos hasta el momento la participación de los GB en el procesamiento de la información nociceptiva y en los mecanismos de analgesia endógena parece clara. Sin embargo el papel de los mismos en estos procesos dista mucho de ser conocido. Los estudios referentes al estriado, el principal núcleo de

entrada de los GB, arrojan resultados contradictorios. Este núcleo se extiende en la rata seis mm en el plano antero posterior y cinco mm en el dorso ventral, ocupando un volumen significativo dentro del cerebro. De esta manera las diferencias en los resultados obtenidos podrían deberse a diferencias en el sitio de microinyección dentro del estriado. Hasta el momento no se han llevado a cabo estudios sistemáticos para explorar la capacidad antinociceptiva y/o analgésica de las distintas zonas del estriado. Por otro lado, existe una tendencia a atribuir al estriado con un efecto analgésico solamente en aquellos estudios comportamentales que involucran comportamientos supraespinales (plancha caliente y paw-lick) no observándose este efecto para los reflejos nociceptivos espinales como el reflejo flexor de la cola.

Este trabajo tiene como objetivo general extender los conocimientos actuales en lo referente a la capacidad del estriado como modulador de las respuestas nociceptivas así como estudiar su participación en los mecanismos de analgesia endógena. En particular deseo analizar si el estriado es capaz de modular (inhibiendo o facilitando) el reflejo nociceptivo de apertura bucal (RNAB) evocado estimulación de los incisivos inferiores de la rata anestesiada. Además, de existir esta capacidad modulatoria sería de gran interés determinar cuales son las zonas dentro del estriado involucradas en dicha modulación.

El reflejo nociceptivo de apertura bucal

RNAB pose una serie de características que lo hace ideal para el estudio del papel del estriado en los mecanismos de la analgesia endógena:

- Este modelo ha sido validado como un modelo de dolor (para revisión ver Mason et al. 1985) y ha sido utilizado para evaluar el efecto analgésico de distintas estructuras dentro del SNC. Tanto en estudios clásicos sobre la SGP y el núcleo del rafe magno (Oliveras et al. 1974, Sessle et al. 1981, Sessle y Hu 1981), como en estudios más recientes relacionados con estructuras como la corteza orbital y el núcleo pretectal anterior (Chiang et al. 1989, Zhang et al. 1998)
- Es generalmente aceptado como un modelo de dolor puro ya que la estimulación eléctrica de la pulpa dental estimula únicamente aferencias nociceptivas (Myslinski y

Matthews 1987). La pulpa se encuentra inervada exclusiva o casi exclusivamente por fibras de tipo A δ y C (conductoras de la información nociceptiva, Sessle 1990),.

- Se trata de un reflejo supraespinal, recordemos que no existe evidencia de una posible acción analgésica del estriado en un reflejo espinal. Sin embargo la bibliografía es escasa y se concentra únicamente en el estudio del reflejo flexor de la cola.
- Constituye uno de los modelos de dolor trigeminal más utilizados. La evidencia clínica indicaba que en la enfermedad de Parkinson cursa en muchos casos con dolor orofacial.
- Puede obtenerse una respuesta estable y duradera por horas (Mason et al. 1985), es fácil de medir y cuantificar.
- Permitiría, en un próxima etapa, continuar los estudios analizando mediante registros extracelulares la actividad unitaria (single unit) de las neuronas del al vía del reflejo. Esto permitiría discriminar efectos sensoriales de motores.

➤ **MATERIALES Y MÉTODOS**

Preparación del animal

Se utilizaron 47 ratas Sprague-Dawley machos con un peso de 350 a 500 gr. anestesiadas con Uretano (1,2 gr./kg. i.p.) y Durocaína s.c. como anestésico local. El grado de anestesia se evaluó a lo largo del experimento pinchando patas y cola o tocando la cornea, al observarse reflejos de retirada o el reflejo corneal se administraron dosis suplementarias de Uretano. Se utilizó Uretano debido a que, en la dosis utilizada, tiene un efecto analgésico estable y duradero, durante el cual no se observan variaciones en la presión sanguínea o en la frecuencia respiratoria y se obtiene un RNAB estable por varias horas (Li et al. 1992, Gear y Levine 1995). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la NIH's *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

El RNAB se obtuvo mediante la estimulación eléctrica de la pulpa dental de los incisivos inferiores según una variación del método descripto por Myslinski y Matthews (1987). Brevemente, se taladró un orificio de 0,5 mm de diámetro 1 mm por delante de la papila interdental hasta alcanzar la cámara pulpar en cada diente. Durante este procedimiento se bañó la zona por goteo con solución fisiológica para evitar el sobrecalentamiento de la zona. Se introdujeron en los orificios electrodos monopolares de plata fijándolos al diente mediante acrílico dental. El RNAB se midió como la respuesta electromiográfica (EMG) del músculo digástrico (músculo depresor mandibular en la rata) mediante electrodos bipolares de acero inoxidable aislados implantados en vientre anterior del digástrico izquierdo y derecho (registro bilateral). Los mismos se sujetaron mediante sutura al tendón del músculo y a la piel del animal a fin de evitar su desplazamiento durante las subsiguientes manipulaciones. En algunos experimentos se seccionó la pulpa dental de ambos incisivos inferiores a nivel de la papila dentaria para comprobar que las respuestas observadas se deben a la estimulación de los terminales nerviosos del diente y no al pasaje de la corriente de estimulación a estructuras vecinas como el periodonto, con la consiguiente estimulación de terminales neurales no nociceptivas (Myslinski y Matthews

1987). En estos experimentos se implantó un electrodo de estimulación bipolar en el labio inferior para evocar el reflejo mediante la estimulación del periodonto.

Se sujetó la cabeza de la rata en un marco estereotáxico, se expuso la superficie del cráneo y se le practicaron pequeñas craniotomías sobre las zonas del estriado a estudiar según el atlas de Paxinos y Watson (1986). Se controló la temperatura rectal ($37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) mediante una manta calefaccionada autorregulable.

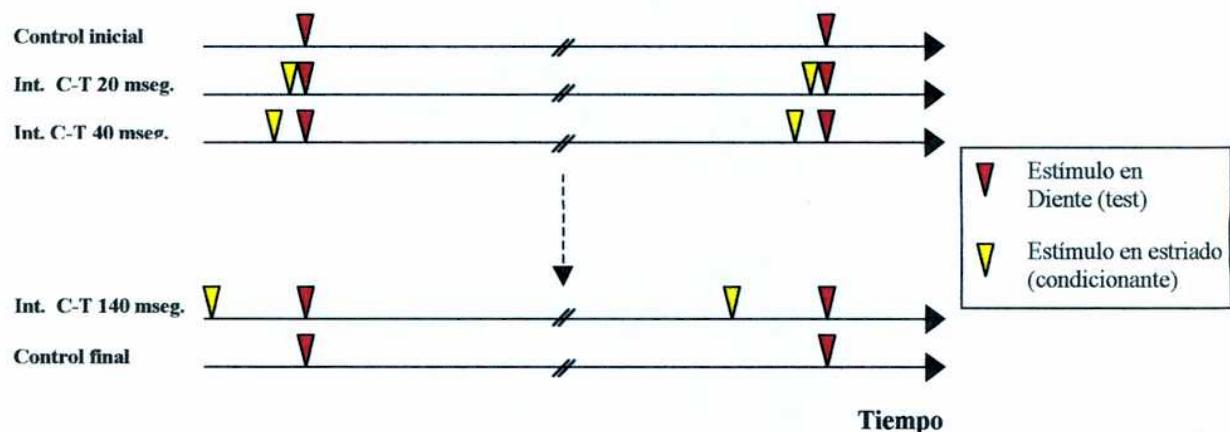
Medición del RNAB evocado por la estimulación dental

Para evocar el RNAB se estimuló la pulpa dental mediante un pulso cuadrado (0,5 msec. de duración, 0,83 Hz. de frecuencia e intensidad variable) mediante un estimulador electrónico (Pulsemaster A3000). Se estableció para cada animal el valor umbral de la respuesta definido como la intensidad de estimulación a la cual en la mitad de casos se observa respuesta. Luego, la intensidad de estimulación se incrementó 1 - 1.5 veces respecto el umbral de manera de obtener una respuesta estable y fácilmente cuantificable. Los métodos de registro fueron los convencionales en electrofisiología, el animal en experimentación se alojó dentro de una jaula de Faraday, la actividad refleja se filtró (ancho de banda 30-300 Hz.), se registró mediante amplificadores y cambiadores de impedancia (Grass p511). La señal se monitoreó en un osciloscopio y almacenó en cinta de video por medio de un grabador PCM (Neurodata DR-890) para su análisis off-line. La adquisición se llevó a cabo mediante una computadora personal equipada con el hardware y software necesario para realizar la conversión A/D (tarjeta A/D Digidata 1200, Axoscope1.1, frecuencia de muestreo 5 kHz.). El RNAB se midió como la respuesta electromiográfica del músculo digástrico. Para cuantificar esta respuesta se midió la amplitud pico a pico y la latencia de la respuesta evocada en el músculo. La amplitud de la respuesta EMG, en estas condiciones experimentales, correlaciona con el grado de dolor según estudios en animales y humanos voluntarios (Mason et al. 1985). Para efectuar la medición de la amplitud pico a pico y la latencia de cada respuesta se utilizó un programa ad-hoc (PSW, Data Wave Technology).

Estimulación eléctrica del estriado

Para la estimulación eléctrica del estriado se utilizó un electrodo bipolar concéntrico de acero inoxidable barnizado (diámetro externo 300-350 μm , punta expuesta 50-100 μm) ubicado estereotácticamente en las posiciones a estudiar. Los efectos del estímulo en el estriado (estímulo condicionante, tren de pulsos de 0,5 mseg a 333 Hz. durante 20 mseg. cada 1,2 seg.) fueron evaluados en el RNAB evocado por el estímulo aplicado en la pulpa dental (estímulo test). El esquema experimental fue el siguiente: se obtuvo la muestra control sin estimular el estriado (control inicial) para luego estimular el estriado precediendo al estímulo test entre 20 y 140 mseg. (Intervalo C-T 20-140 mseg.), al finalizar la serie se realizó un nuevo control (control final), (esquema 1).

ESQUEMA 1



Las series fueron separadas entre si por 1-2 minutos de tiempo de recuperación, se controló que la amplitud del RNAB al comenzar cada serie fuera similar a la del control previo. Se analizaron cuatro posiciones antero posteriores por animal (dos por lado) como máximo, separadas entre si por lo menos 1 mm. En cada posición se descendió el electrodo de a 1 o 0.5 mm desde la parte superior del núcleo hasta la base del mismo. En cada una de las alturas se testeó el efecto de la estimulación eléctrica de ese punto sobre el RNAB evocado por el estímulo dental. Cada punto se evaluó con los diferentes intervalos C-T, comenzando con una intensidad de estimulación de 5 μA incrementándola en saltos de a 5-

25 μ A hasta llegar a 200 μ A. De encontrarse un efecto modulador se registraba el valor umbral del mismo para luego realizar una serie completa de estimulación con los distintos intervalos C-T con una intensidad de estimulación 1 vez mayor a la umbral para el estímulo estriatal. De esta manera se clasificó cada zona en función de su efecto sobre la amplitud del RNAB. Se consideraron sitios inhibitorios (capaces de producir una inhibición mayor al 30%), excitatorios (capaces de producir una excitación mayor al 30%) y sin efecto (incapaces de modular significativamente los valores del RNAB respecto al control).

Estimulación química del estriado

Para la estimulación química de las diferentes posiciones del estriado se microinyectó L-glutamato (163 nmoles/0,5 μ l solución fisiológica), que es el neurotransmisor excitatorio natural del estriado, a través de una cánula de acero (diámetro externo 300 μ m) utilizando una jeringa Hamilton (5 μ l) conectada a un micromanipulador. Se ubicó la cánula en el sitio a estudiar. Se estimuló la pulpa dental cada 1,2 segundos en forma ininterrumpida durante todo el ensayo. Luego de dos minutos de estimulación, que se tomaron como control de la actividad basal del RNAB inducido por el estímulo dental, se microinyectó L-glutamato o su solvente a razón de 0.5 μ l por minuto. La cánula de permaneció en el lugar, una vez finalizada la microinyección, por lo menos un minuto antes de ser elevada para permitir la correcta difusión de la droga. Se continuó estimulando durante 10 minutos post-inyección registrando y midiendo para cada estímulo la amplitud del RNAB. Se realizaron hasta 6 inyecciones por rata (3 por lado) separadas 1 mm entre sí como mínimo.

Histología

Al finalizar el experimento se marcaron las posiciones de estimulación eléctrica en el estriado con una corriente continua (anódica 50 μ A durante 30 seg), luego el animal se perfundió por vía transcardial con solución fisiológica y paraformaldehido (PFA) 4%

buffereado (300 ml de cada solución) en ese orden. En el caso de la estimulación química la cánula se ubicó en la posición de la última microinyección y se dejó allí durante la perfusión de manera de manera de marcar su posición en el estriado. Las posiciones de estimulación y microinyección fueron confirmadas histológicamente. Para ello el cerebro fue extraído y fijado por un par de días como mínimo en (PFA) 4% buffereado. Se cortó el estriado en secciones de 70 μm mediante un micrótomo de congelación. Los cortes se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y tiñeron con Cresil violeta (técnica habitualmente utilizada para tejido del sistema nervioso) Se dibujaron diagramas de las secciones con ayuda de una cámara clara. Los trazos y los sitios de estimulación se reconstruyeron sobre esquemas de los cortes de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1986). Al finalizar cada experimento se extrajeron los incisivos inferiores para confirmar el sitio de estimulación, se descartaron aquellos experimentos en los que los electrodos no se encontraban ubicados correctamente en la cámara pulpar.

Análisis estadístico

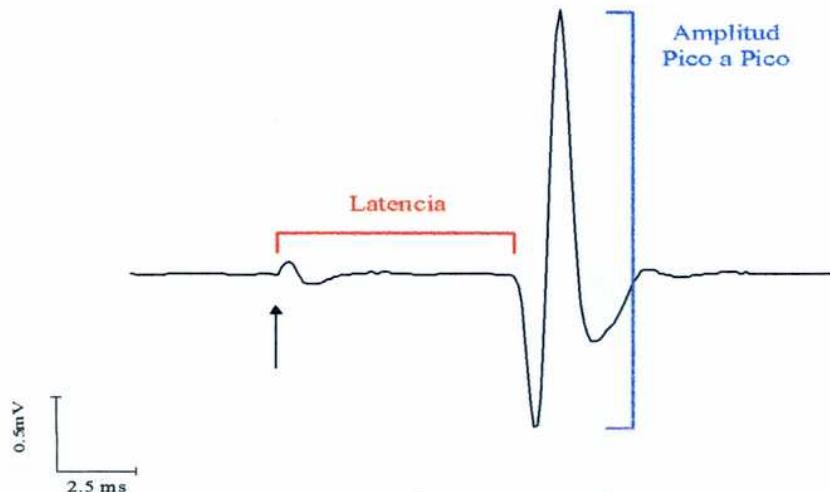
Todos los datos se presentan como media \pm sem y se expresan como porcentaje respecto a la amplitud basal (salvo cuando se indica). Fueron analizados estadísticamente mediante test de student, ANOVA de 1 vía, test de Scheffe. Se consideró significativo un $p \leq 0.05$.

➤ **RESULTADOS**

Características del reflejo

La **figura 1** ilustra la respuesta electromiográfica registrada en el músculo digástrico evocada por la estimulación de los incisivos inferiores (RNAB). En la misma se indican las mediciones de latencia y amplitud efectuadas. El valor umbral para el RNAB evocado por la estimulación de la pulpa dental fue de $0,51 \pm 0,16$ mA. La latencia de la respuesta oscila entre los 7 y 10 mseg y la duración entre 2,7 y 8,2 mseg. No se observaron diferencias significativas entre el digástrico izquierdo y el derecho en los valores umbrales, las latencias ni en la duración de las respuestas pero sí en la amplitud de las mismas. Un aumento en la intensidad en la estimulación de la pulpa dental provoca un aumento en la amplitud de la respuesta (**figura 2**) y una ligera disminución en la latencia. Se lograron respuestas óptimas mediante la estimulación de los dientes con valores 1 a 1,5 veces el valor umbral de respuesta, en estas condiciones la amplitud del reflejo es estable, fácilmente cuantificable y no ha alcanzado su valor máximo.

FIGURA 1

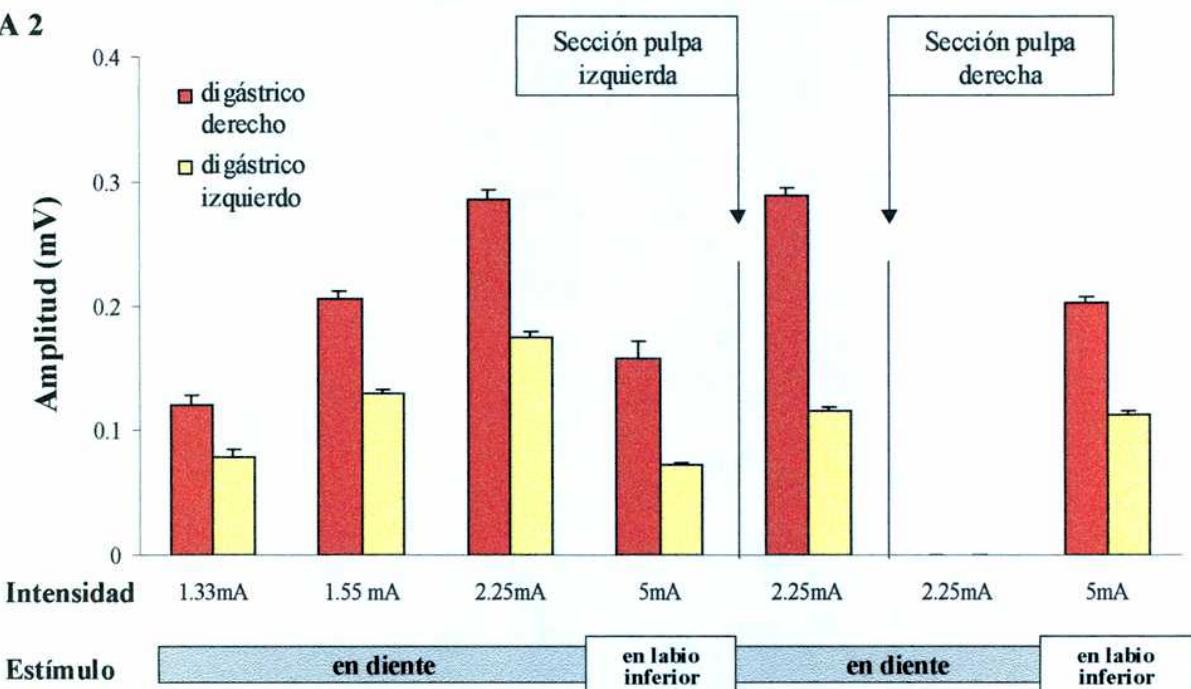


Registro de la respuesta EMG del músculo digástrico (RNAB), obtenida por la estimulación de los incisivos inferiores. La primera deflección corresponde al artefacto de estimulación (la flecha indica el estímulo dental) y la segunda a la respuesta evocada por el estímulo nociceptivo.

En los experimentos control, realizados bajo estas condiciones microinyectando solvente, la variación del reflejo fue del $5,3 \pm 1,7\%$. El valor umbral fue evaluado a lo largo

del experimento realizándose las modificaciones correspondientes para mantener la estabilidad de la respuesta. Estas características del RNAB se encuentran de acuerdo con lo esperado respecto a los datos bibliográficos (Chung et al. 1987, Chiang et al 1989, Zhang et al. 1998). La respuesta evocada por la estimulación de los incisivos inferiores es eliminada por la sección bilateral de la pulpa dental a nivel de la papila dentaria, no así aquella inducida por la estimulación del labio inferior (**figura 2**). Demostrándose de esta manera que el RNAB se debe a la estimulación de la pulpa dental y no a la difusión de corriente a estructuras cercanas, como el periodonto, inervadas por fibras no nociceptivas. La estimulación del labio inferior se utilizó como control positivo para constatar que durante la sección de la pulpa dental no se lesionó inespecíficamente el nervio maxilar inferior que inerva el periodonto.

FIGURA 2

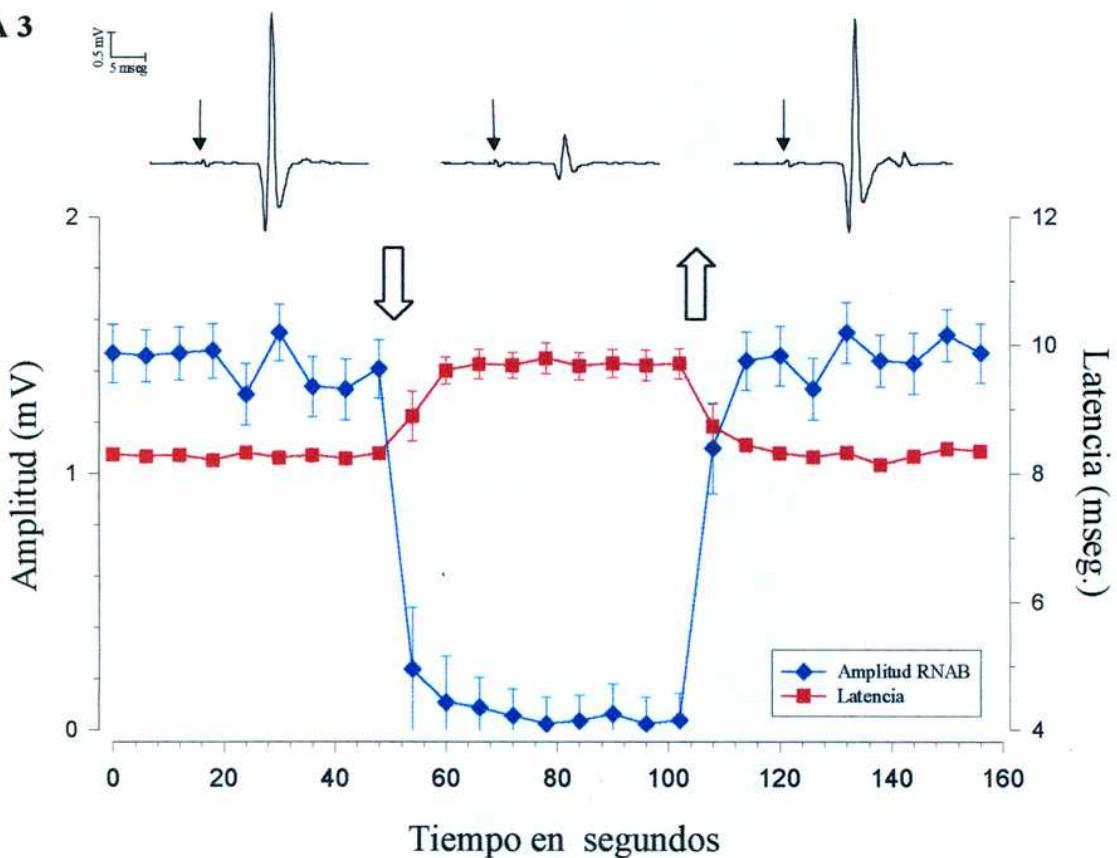


Sección bilateral de la pulpa dental a nivel de la papila dentaria, el estímulo en el labio inferior se utilizó para controlar de la integridad del nervio maxilar inferior luego de la sección. Las barras representan la media + sem de la amplitud pico a pico de la respuesta electromiográfica de cada músculo digástrico evocada por la estimulación de la pulpa dental. Se indican las diferentes corrientes de estimulación así como el sitio de aplicación, antes y después de la transección de la pulpa.

Efectos de la estimulación eléctrica del estriado

La estimulación eléctrica de determinadas zonas del estriado fue capaz de modular tanto la amplitud como la latencia del RNAB. La mayor parte de los sitios estimulados tuvieron como resultado una disminución en la amplitud de la respuesta EMG y un aumento en la latencia (**figura 3**). La corriente media necesaria para producir inhibiciones mayores al 70 % fue de $59,1 \pm 2,2 \mu\text{A}$, mientras que el umbral para la inhibición del RNAB mediada por la estimulación estriatal fue de $26,3 \pm 5,7 \mu\text{A}$ ($n=31$).

FIGURA 3

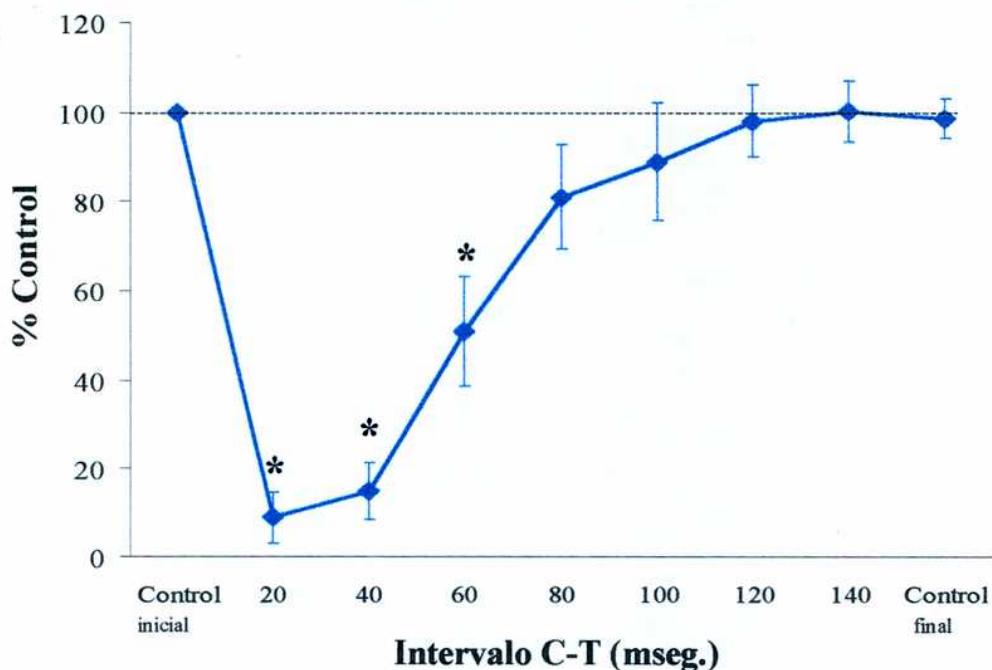


Inhibición del RNAB por estimulación eléctrica del estriado, en un caso representativo, con un intervalo C-T de 20 mseg. Cada punto es la media \pm sem de 5 mediciones consecutivas. Las flechas vacías indican el inicio y el fin de la estimulación eléctrica. Los insets muestran registros EMG representativos de cada caso. Con una flecha negra se señala el estímulo dentario, la primera deflección corresponde al artefacto de estimulación y la segunda al RNAB. En este caso se muestra el registro ipsilateral.

La estimulación unilateral del estriado en los sitios inhibitorios fue capaz de disminuir la amplitud del RNAB de manera bilateral. No se observaron diferencias significativas entre el digástrico ipsilateral y el contralateral, en cuanto a los valores umbrales para el efecto inhibitorio mediado por la estimulación eléctrica del estriado y el porcentaje de inhibición de la respuesta (no se muestran los resultados). No se observó ningún efecto en estimulaciones simuladas en las que se descendía el electrodo en la posición a estudiar sin aplicar corriente eléctrica. La estimulación del estriado por sí sola no tuvo efecto sobre la actividad del músculo digástrico registrada mediante el EMG.

Se evaluó el curso temporal de la inhibición producida por el estímulo condicionante en el estriado en la misma posición en 5 animales. Se obtuvo un efecto inhibitorio máximo con un intervalo C-T de 20 mseg (figura 4). Con intervalos C-T mayores la capacidad inhibitoria decae lentamente al aumentar el mismo. No se encontraron diferencias significativas con respecto al control al utilizar intervalos C-T mayores a 80 mseg.

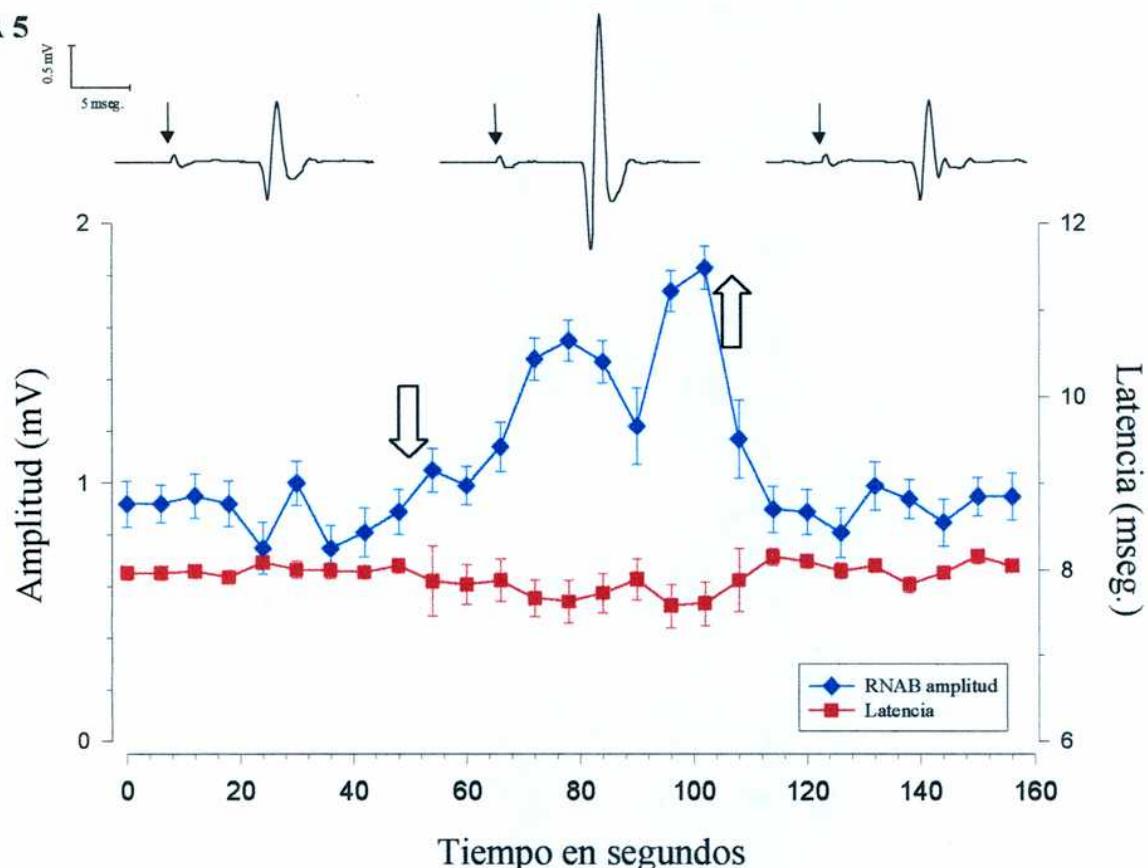
FIGURA 4



Curso temporal del efecto inhibitorio estriatal para diferentes intervalos C-T. Cada punto representa la media \pm sem de 7 ensayos en sitios similares en 5 ratas. Cada ensayo consistió en la estimulación del estriado durante 1 minuto con una intensidad de 48-85 μ A tomándose como resultado del ensayo el promedio de la amplitud de 50 RNAB consecutivos bajo la estimulación estriatal (1 minuto = 50 estímulos). Los valores se expresan como % del control inicial. * = $p < 0,01$ respecto al control final (ANOVA de 1 vía para medidas repetidas, Test de Scheffe $F_{6,49} = 2,72$.)

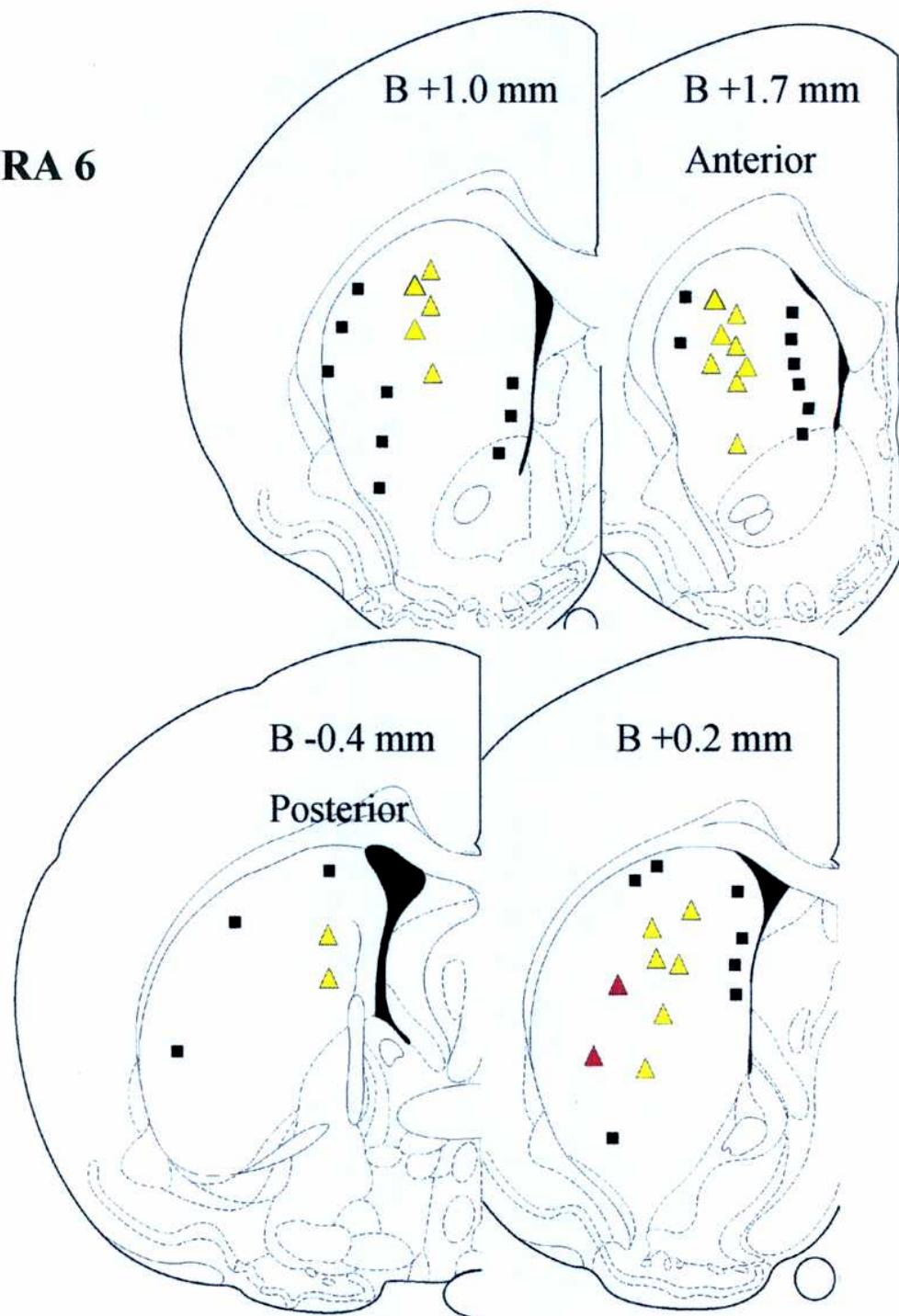
Si bien la mayor parte de las zonas estimuladas eléctricamente en el estriado poseen un efecto inhibitorio sobre el RNAB se encontraron también zonas facilitatorias (**figura 5**). La estimulación eléctrica en estas zonas provocó un aumento en la amplitud de la respuesta sin presentar cambios significativos en la latencia, sin embargo se observó una tendencia de la misma hacia valores más bajos. Este efecto facilitador es infrecuente y se encuentra restringido a una estrecha zona. En la **figura 6** se observan los diferentes sitios estimulados eléctricamente así como su efecto sobre la amplitud de la respuesta evocada. La distribución de los sitios no es azarosa, concentrándose los sitios inhibitorios en el centro del núcleo mientras que los sitios sin efecto se distribuyen hacia los bordes. El 42% de las zonas estudiadas presentaba un efecto modulador inhibitorio sobre el RNAB evocado por el estímulo dental, el 54% no tenía efecto y solo el 4% (2/50) tenían un efecto facilitador.

FIGURA 5



Facilitación de la respuesta del RNAB por estimulación eléctrica del estriado, en un caso representativo, con un intervalo C-T de 20 mseg. Cada punto es la media \pm sem de 5 mediciones consecutivas. Las flechas indican el inicio y el fin de la estimulación eléctrica. Los insets muestran registros EMG representativos de cada caso, con una flecha negra se señala el estímulo dentario.

FIGURA 6



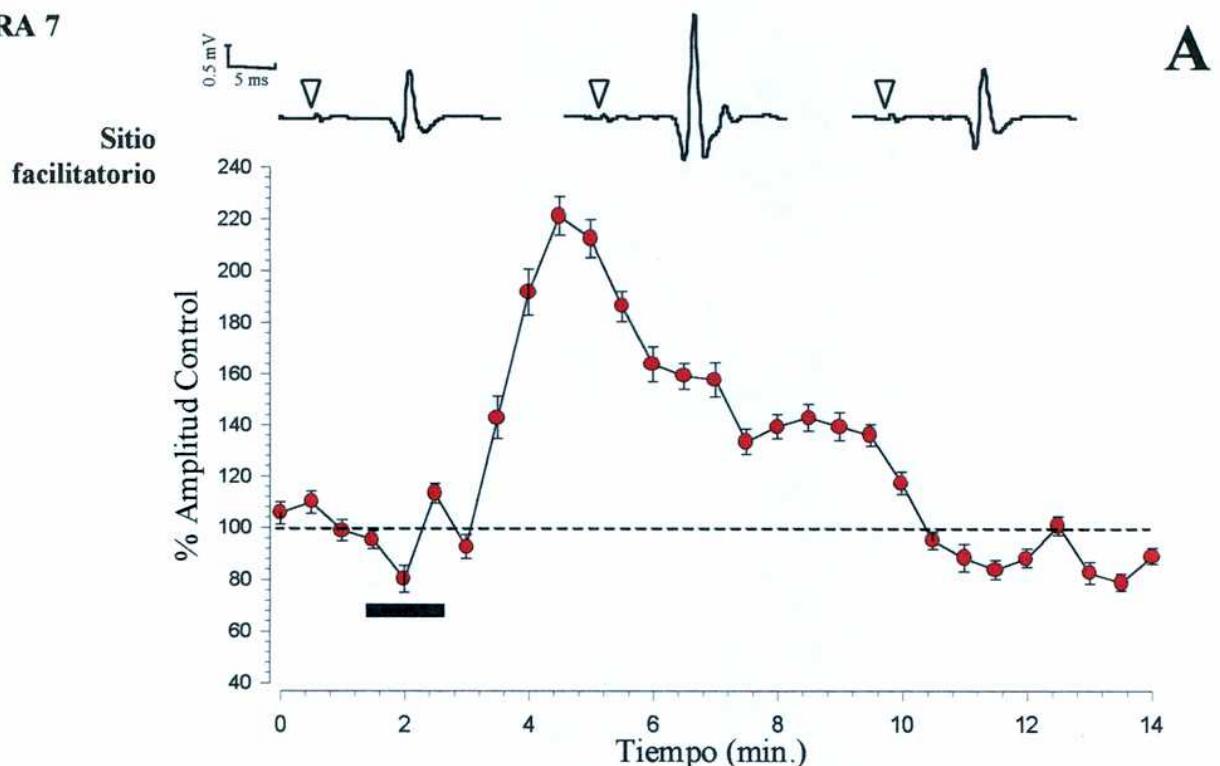
Distribución de los sitios estimulados eléctricamente en el Estriado y respuesta inducida por los mismos. Los sitios de estimulación se agruparon en cuatro planos, ubicándose cada punto sobre el plano más próximo de los esquematizados.

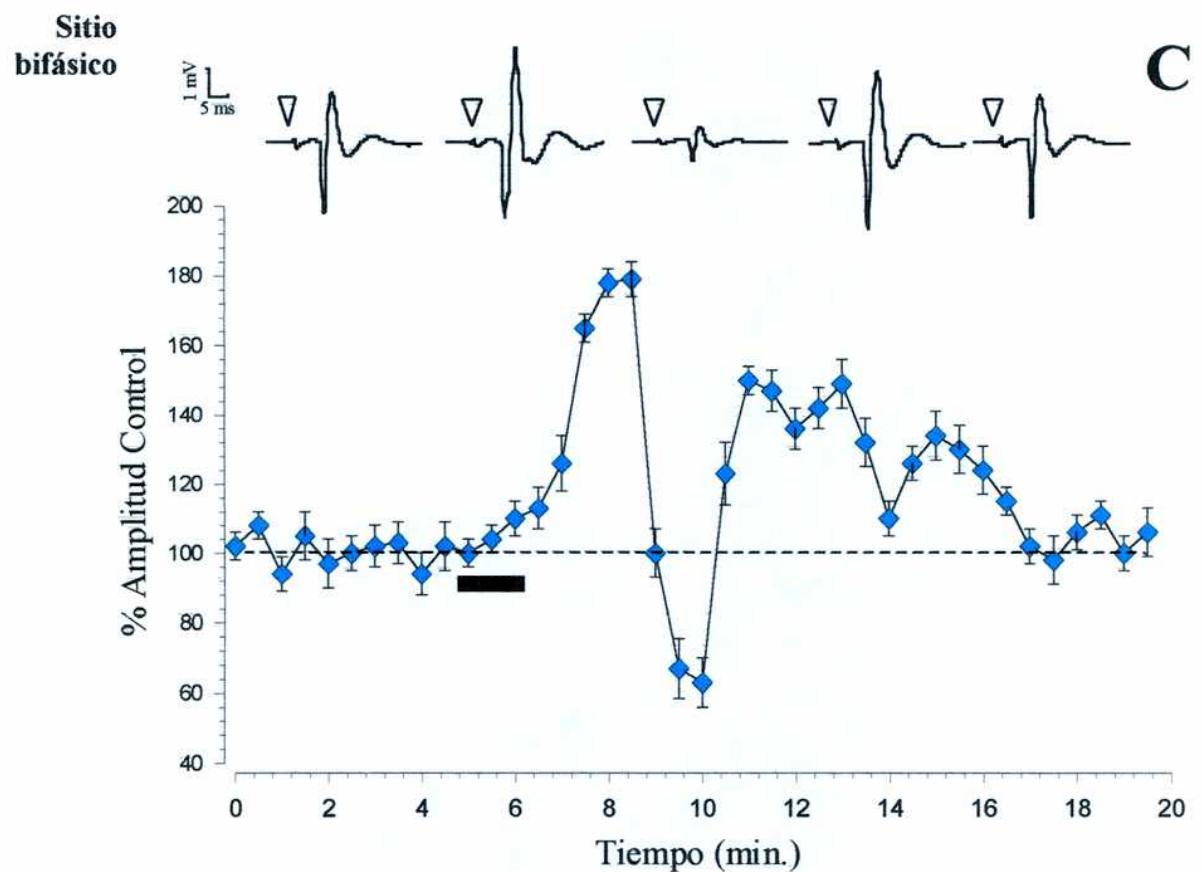
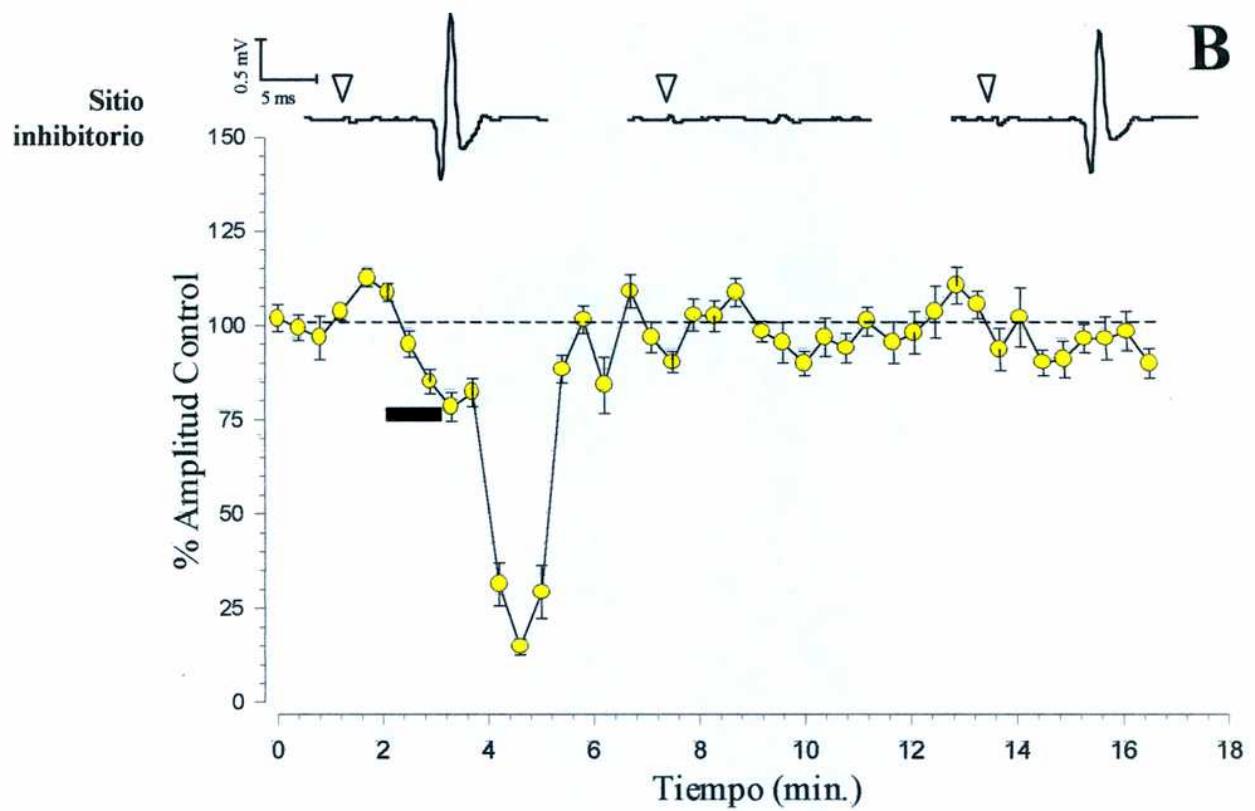
Referencias	▲ Sitio facilitatorio
	▲ Sitio inhibitorio
	■ Sitio sin efecto

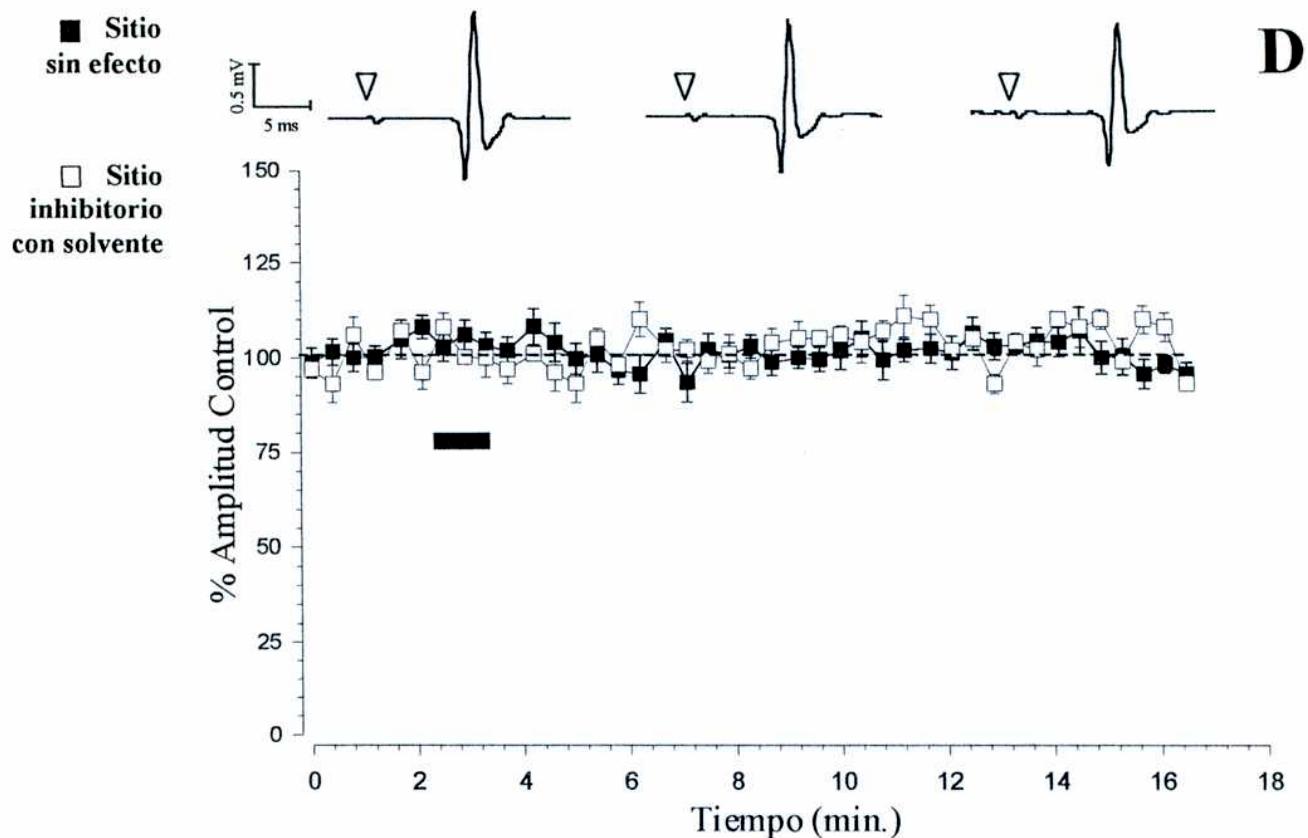
Efectos de la estimulación química del estriado

La estimulación eléctrica actúa inespecíficamente activando tanto neuronas estriatales como las fibras que atraviesan el núcleo. Para confirmar el papel del estriado en la modulación del RNAB y determinar correctamente las zonas involucradas, se estimularon químicamente, mediante microinyecciones de L-glutamato, las zonas previamente mapeadas. La estimulación de diferentes zonas dentro del estriado mediante un neurotransmisor excitatorio como el glutamato confirmó y amplió los resultados obtenidos mediante la estimulación eléctrica. La estimulación química demostró la existencia de zonas capaces tanto de facilitar (sitio facilitatorio **figura 7 A**), como de inhibir (sitio inhibitorio **figura 7 B**) el RNAB evocado por la estimulación de la pulpa dental. También se identificaron zonas de comportamiento dual (sitio bifásico, **figura 7 C**) y otras en las cuales no se observó efecto (sitio sin efecto **figura 7D**). La microinyección de solvente en las zonas capaces de modular el RNAB no tuvo ningún efecto sobre la amplitud de la respuesta electromiográfica (**figura 7 D**).

FIGURA 7





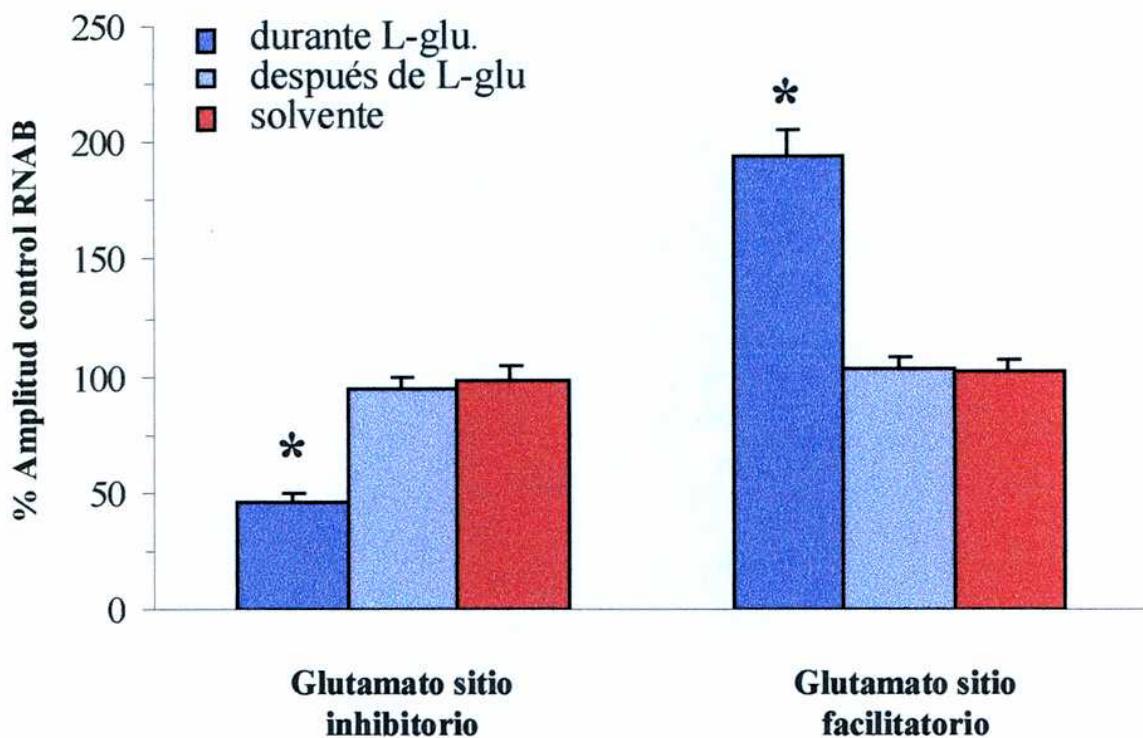


Efecto de la microinyección de L-glutamato intraestriatal sobre la amplitud de la respuesta EMG del músculo digástrico producido por la estimulación de la pulpa dental. Diferentes respuestas producidas por la microinyección de L-glutamato, se observan registros representativos de respuestas excitatorias (A), inhibitorias (B) y bifásicas (C) y sitios sin efecto (D), así como la respuesta debida a la microinyección de solvente en un sitio capaz de modular el RNAB (D). Cada punto representa la media \pm sem de 20 RNAB consecutivos expresados como porcentaje respecto al control. La barra negra indica el momento de la microinyección de L-glutamato. Los insets muestran registros EMG representativos de cada caso, con una flecha vacía se señala el estímulo dentario, la primera deflección corresponde al artefacto de estimulación y la segunda al RNAB.

La microinyección de L-glutamato en los sitios inhibitorios fue capaz de disminuir significativamente la amplitud del RNAB inducido por estimulación de la pulpa dental respecto a microinyecciones de solvente (**figura 8**). El porcentaje de inhibición promedio en el pico de la respuesta es ligeramente superior al 50%. El efecto inhibitorio del glutamato no puede atribuirse a una lesión celular, la reinyección (sin haber retirado la

cánula luego de la microinyección) produce una respuesta similar a la observada durante la primera microinyección (datos no mostrados).

FIGURA 8



Efectos inhibitorio y facilitatorio inducidos por la microinyección intraestriatal de L-glutamato. Cada barra representa la amplitud media+sem del RNAB expresado como porcentaje respecto al control, durante y después del efecto del glutamato o del solvente. Este último medido en el tiempo correspondiente al pico de respuesta para el glutamato, en 11-18 sitios estriatales inhibitorios o facilitatorios.
* = $p < 0,0001$ (contraste de Scheffe luego de ANOVA de una vía $F_{2,45} = 78,74$).

El efecto del glutamato, en las zonas donde produce respuesta es rápido (**TABLAI**), no observándose respuestas con latencias mayores a 6 min. No se encontraron diferencias significativas entre las latencias para los diferentes tipos de respuesta pero sí para la duración de las mismas. Las respuestas excitatorias resultaron significativamente más prolongadas que las inhibitorias (Test Student $t_{13} = 5.2$ $p < 0.001$). Las respuestas inhibitorias constituyen la respuesta más observada 38.8 % (26 de las 67 microinyecciones realizadas en el estriado). Las respuesta facilitatorias representan el 19.4% mientras que las bifásicas

solo el 8.9%, el resto corresponde las microinyecciones realizadas en sitios incapaces de modular el RNAB evocado por la estimulación de la pulpa dental.

TABLA I

Tipo de respuesta	Características de la respuesta			Número de microinyecciones
	Latencia (min)	Duración (min)	% de cambio	
inhibitoria	2,1 ±0,6	0,86 ±1,3*	-54,2 ±4,2	n = 26
excitatoria	1,6 ±0,2	4,9 ±0,7	+93,5 ±11,7	n = 13
bifásica	1,1 ±1,3	5,0 ±1,4	+81,3±9/-35,1±5	n = 6

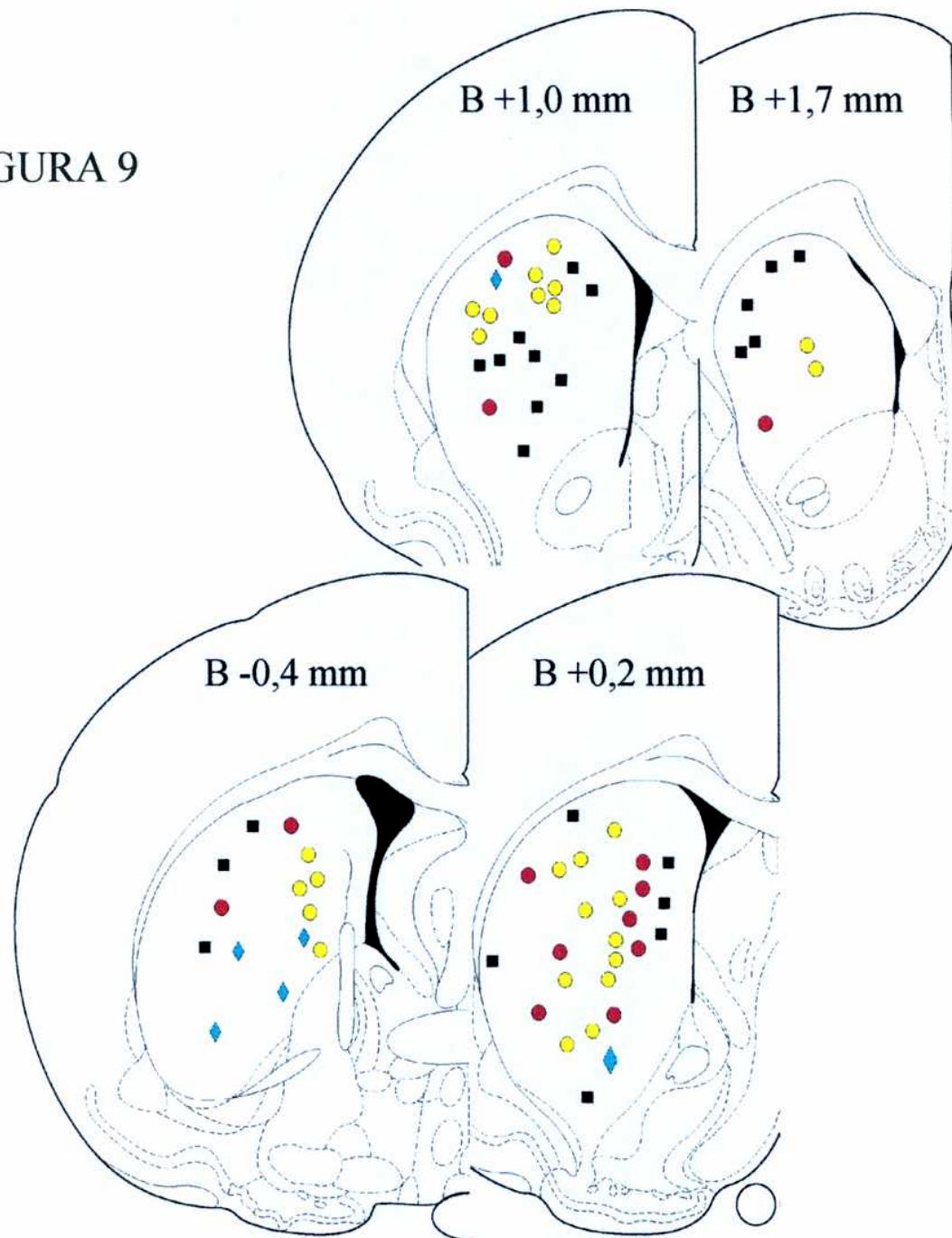
% de cambio: variación porcentual respecto al control del RNAB evocado por la estimulación de la pulpa dental medido en el pico de respuesta para el efecto del glutamato

* = p<0.001, Test Student.

Los sitios inhibitorios se concentran principalmente en la zona central del núcleo, especialmente en la región media del estriado (B+0,2mm **figura 9**). Las regiones anteriores (B +1 a +1,7 mm) presentan una importante cantidad de sitios inhibitorios agrupados en la parte central y central superior superior del núcleo. En la zona posterior del estriado (B-0,4 mm) los sitios inhibitorios se distribuyen en una estrecha franja vertical paralela al ventrículo lateral.

Los sitios facilitatorios se distribuyen principalmente en la región media del estriado, rodeando los sitios inhibitorios. Los sitios en los que la microinyección de L-glutamato no tuvo efecto modulador se encuentran principalmente en la periferia del núcleo concordando con lo observado en la estimulación eléctrica. Las respuestas bifásicas, que se caracterizan por una excitación seguida de una inhibición, se concentran en la parte posterior e inferior del núcleo en la región cercana al GP (bregma -0,4mm), sin embargo se encontraron algunos sitios capaces de inducir este tipo de respuesta dispersos a lo largo del estriado.

FIGURA 9



Distribución de los sitios donde se microinyectó L-glutamato en el Estriado y respuesta inducida por los mismos.

Referencias

- Sitio facilitatorio
- Sitio inhibitorio
- Sitio sin efecto
- ◆ Sitio bifásico

➤ CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo demuestran que la estimulación unilateral del estriado es capaz de modular bilateralmente el reflejo nociceptivo de apertura bucal evocado por la estimulación eléctrica de la pulpa dental en ratas anestesiadas. La estimulación, tanto eléctrica como química, de determinados sitios dentro del núcleo tiene un marcado efecto inhibitorio sobre el RNAB. Habitualmente se asume que este reflejo, medido a partir de la respuesta electromiográfica en el músculo digástrico, evocado por un estímulo supraumbral y controlando la no difusión de corriente eléctrica más allá de la pulpa dental, constituye un modelo puro de una respuesta nociceptiva mediada por aferencias trigeminales (Mason et al. 1985). Nuestro trabajo sugiere que el estriado no estaría solo involucrado en la nocicepción (Chudler et al. 1993 y Chudler 1998), sino también en los mecanismos moduladores de la misma. Esto concuerda con los resultados obtenidos por 3W, en los cuales, la estimulación eléctrica del nucleo caudado en monos puede reducir la respuesta de escape ante un estímulo nocivo sin alterar la habilidad motora.

Nuestras observaciones ponen en evidencia la importancia que tiene el sitio de estimulación dentro de un núcleo de gran tamaño como el estriado. La mayor parte de los trabajos farmacológicos realizados para evaluar el papel del estriado en la nocicepción no contemplan este factor, considerando al núcleo como homogéneo (Chudler y Dong 1995). Esto podría explicar las diferencias en los resultados obtenidos por los diferentes grupos en cuanto al posible papel antinociceptivo - analgésico del estriado. En nuestro estudio se llevó a cabo un estudio topográfico abarcando la mayor parte del estriado, pudiendo identificarse regiones con efectos opuestos, así también como zonas incapaces de modular el RNAB. Este estudio involucró el mapeo mediante dos técnicas de estimulación distintas (estímulos eléctricos y químicos) lo que permitió comparar las diferentes zonas demarcadas por las mismas. Las regiones delimitadas mediante las dos metodologías se superponen en la mayoría de los sitios. Sin embargo, en algunas regiones la estimulación eléctrica resultó efectiva mientras que la microinyección de L-glutamato no modificó la amplitud de la respuesta. Esto se debe probablemente a la estimulación de fibras de pasaje al aplicar un estímulo eléctrico, no siendo estas estimuladas por el glutamato que ejerce su efecto sobre receptores dendríticos y somáticos. Es de esperar, en cuanto a la estimulación eléctrica, que si el estímulo

condicionante se aplica mucho tiempo antes sea incapaz de modificar la respuesta evocada por el estímulo test. Esto se observa claramente al evaluar el curso temporal de la inhibición producida por el estímulo condicionante aplicado en el estriado, en donde se observa un efecto inhibitorio máximo con un intervalo C-T de 20, disminuyendo la capacidad inhibitoria al aumentar la separación temporal entre los dos estímulos. Los valores umbrales así como las latencias obtenidas para el RNAB se corresponden con los descriptos en la literatura (Chung et al. 1986, Zhang et al. 1998). La disminución en la amplitud de la respuesta electromiográfica lograda al estimular las zonas inhibitorias se ve acompañada por un aumento en la latencia. La asociación entre una disminución en la amplitud y un incremento en la latencia había sido observado en otros trabajos (Chiang et al. 1989).

Al analizar las respuestas al L-glutamato encontramos que, si bien el efecto predominante es el inhibitorio, existen sitios capaces de facilitar el reflejo. Además, se identificaron sitios con un efecto bifásico, excitatorio - inhibitorio, sobre la amplitud de la respuesta. Este efecto podría entenderse en función de la difusión del glutamato a sitios excitatorios e inhibitorios cercanos entre si. La respuesta en estos casos sería la suma de la acción de sitios de efecto contrapuesto. Esta explicación resulta particularmente adecuada para los sitios dispersos (bregma +1 y +0,2 mm) ya que estos se encuentran próximos tanto a sitios excitatorios como a inhibitorios. Sin embargo, no resulta convincente para la región posterior en la cual los sitios bifásicos se distribuyen en toda la zona ventral. Se acepta abitualmente que la difusión de glutamato queda limitada a una esfera de aproximadamente 1 mm de diámetro, al microinyectar 0.5 μ l de una solución del mismo y en condiciones experimentales similares a las utilizadas.

De esta manera, los resultados obtenidos proveen evidencia comportamental acerca del posible papel del estriado en los mecanismos moduladores de las aferencias nociceptivas a nivel trigeminal. Si bien hemos confirmado la capacidad antinociceptiva del estriado no puede demostrarse su participación en los sistemas de analgesia endógena. Para comprender el mecanismo por el cual el estriado estaría actuando es necesario realizar estudios adicionales, diseñado experimentos destinados a distinguir efectos motores de sensoriales. Resultados preliminares de nuestro grupo indicarían un efecto antinociceptivo mediado por la inhibición de las neuronas sensoriales en el núcleo caudal del trigémino, indicando la participación del estriado en los mecanismos de analgesia endógena (experimentos en curso).

➤ **BIBLIOGRAFÍA**

- Anagnostakis, Y. Zis, V. y Spyros, C., Analgesia induced by morphine injected into the pallidum, (1992) *Behav. Brain Res.* 48, 135-143.
- Barasi, S., Responses of substantia nigra neurons to noxious stimulation, (1979) *Brain Res.* 171, 121-130.
- Barnes, C.D., Fung, S.J. y Adams, W.L., Inhibitory effects of substantia nigra on impulse transmission from nociceptors, (1979) *Pain* 6, 207-215.
- Baumeister, A.A., Anticich, T.G., Hawkins, M.F., Liter, J.C., Thibodeaux, H.F. y Guillory, E.C., Evidence that substantia nigra is a component of the endogenous system in the rat, (1988) *Brain Res.* 447, 116-121.
- Bernard, J.F., Huang, G.F. y Besson, J.M., Nucleus centralis of the amygdala and the globus pallidus ventralis: electrophysiological evidence for a involvement in pain processes, (1992) *J.Neurophysiol.* 68, 551-569.
- Carey, R.J., Acute ipsilateral hyperalgesia and chronic contralateral hypoalgesia after unilateral 6-hydroxidopamine lesions of the substantia nigra, (1986) *Exp. Neurol.* 91, 277-284.
- Chiang, C.Y., Chen, I.C., Dostrovsky, J.O. y Sessle, B.J., Inhibitory effect of stimulation of the anterior pretectal nucleus on jaw-opening reflex, (1989) *Brain Res.* 497, 325-333.
- Chudler, E.H., Sugiyama, K. y Dong, W.K., Nociceptive responses of neurons in the neostriatum and globus pallidus of the rat, (1993) *J.Neurophysiol.* 69 1890-1903.
- Chudler, E.H. y Dong, K., The role of the basal ganglia in nociception and pain, (1995) *Pain* 60, 3-38.
- Chudler, E.H., Response properties of neurons in the caudate-putamen and globus pallidus to noxious and non-noxious thermal stimulation in anesthetized rats, (1998) *Brain Res.* 812, 283-288.
- Chung, R.Y., Mason, P., Strassman, A. y Maciewicz, R., Suppression of the jaw-opening reflex by periaqueductal gray stimulation is decreased by paramedian brainstem lesions, (1987) *Brain Res.* 403, 172-176.
- Cliffer, K.D., Burstein, R. y Giesler, G.J., Distributions of spinothalamic, spinohypothalamic, and spinotelencephalic fibers revealed by anterograde transpot of PHA-L in rats, (1991) *J. Neurosci.* 11, 852-868.
- Dirksen, R., Opioid receptors and pain, (1990) *Pharm. Weekbl [Sci]* 12, 41-45.

- Dong, W.K., Ryu, H. y Wagman, I.H., Nociceptive responses of neurons in medial thalamus and their relationship to spinothalamic pathways, (1978) *J. Neurophysiol.* 41, 1592-1613.
- Ford, B., Louis, E.D., Greene, P. y Fahn, S., Oral and genital pain syndromes in parkinson's disease, (1996) *Mov. Disord.* 11, 421-426.
- Gao, D.M., Jeaugey, L., Pollak, P. y Nenabid, A.L., Intensity-dependent nociceptive responses from presumed dopaminergic neurons of the substantia nigra, pars compacta in the rat and their modification by lateral habenulainputs, (1990) *Brain Res.* 529, 315-319.
- Gear, R.W. y Levine, J.D., Antinociception produced by an ascending spino-supraspinal pathway, (1995) *J. Neurosci.* 15, 3154-3161.
- Herkenham, M., Pert, C.B., Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum, (1981) *Nature* 291, 415-418.
- Houssay B.A. *Fisiología humana* séptima edición (1999 en prensa) Ed. El Ateneo, cap. sistema somatosensorial por Pazo, J.H.
- Jones, A.K.P., Brown, W.D., Friston, K.J., Qi, L.Y. y Frackowiak, R.S.J. Cortical and subcortical localizationof response to pain in man using positron emission tomography, (1991) *Proc. R. Soc. Lond.* 244, 39-44.
- Jurna , I. y Heinz, G., Anti-nociceptive effect of morphine, opioid analgesics and haloperidol injected into the caudate nucleus of the rat, (1979), *Arch. Pharmacol.* 309, 145-151.
- Kanjhan, R., Opioids and pain (1995) *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 22, 397-403.
- Li, J., Ji, Y.P., Qiao, J.T. y Dafny, N., Suppression of nociceptive responses in parafascicular neurons by stimulation of substantia nigra: an analysis of related inhibitory pathways, (1992) *Brain Res.* 591, 109-115.
- Mason, P., Strassman, A. y Maciewicz, R., Is the Jaw-opening reflex a valid model of pain?, (1985) *Brain Res. Rev.* 10, 137-146.
- Melzack, R. y Wall, P.D., Pain mechanisms: a new theory, (1965) *Science* 150, 971-979.
- Millan, M.J., Multiple opioid systems and pain, (1992) *Pain* 26, 303-349.
- Myslinski, N. y Matthews, B., intrapulpal nerve stimulation in the rat, (1987) *J. Neurosci. Meth.* 22, 73-78.
- Oliveras, J.L., Woda, A., Guilbaud, G. y Besson, J.M., Inhibition of jaw opening reflex by electrical stimulation of the periaqueductal gray matter in the awake, unrestrained cat, (1974) *Brain Res.* 72, 328-331.

- Parent, A., Extrinsic connections of the basal ganglia, (1990) Trends Neurosci 13, 254-258.
- Paxinos, G. y Watson, C., The rat brain in stereotaxic coordinates, (1986) Plenum, New York.
- Pazo, J.H., O'Donnell, P. y Murer, M.G., Spontaneous and evoked activity of the caudate neurons to central and peripheral stimuli after brain lesions, (1992) Neuroscience 50, 387-393.
- Reynolds, D.V., Surgery in the rat during analgesia induced by focal brain stimulation, (1969) Science 164, 444-445.
- Richards, C.D. y Taylor, D.C.M., Electrophysiological evidence for a somatotopic sensory projection to the striatum of the rat, (1982) Neurosci. Lett. 30, 235-240.
- Sandkühler, J., The organization and function of endogenous antinociceptive systems, (1996) Progr. Neurobiol. 50, 49-81.
- Sessle, B.J. y Hu, J.W., Raphe-induced suppression of jaw-opening reflex and single neurons in trigeminal subnucleus, and influence of naloxone and subnucleus caudalis, (1981) Pain 10, 19-36.
- Sessle, B.J., Hu, J.W., Dubner, R. y Lucier G.E., Functional properties of neurons in cat trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). II. Modulation of responses to noxious and nonnoxious stimuli by periaqueductal gray, nucleus raphe magnus, cerebral cortex, and afferent influences, and effect of naloxone, (1981) J. Neurophysiol. 45, 193-207.
- Sessle, B.J., Anatomy, physiology and pathophysiology of orofacial pain, (1990) Headache and facial pain, chapter 1, Raven Press, Ltd., New York.
- Thorn-Gray, B.E. y Levitt, R.A., Rat brain sites responsive to etorphine: analgesia and catatonia, (1983) Behav. Neurosci. 97, 768-778.
- Tierney, G., Carmody, J. y Jamieson, D., Stress analgesia: the opioid analgesia of swims suppresses the non-opioid analgesia induced by short swims in mice, (1991) Pain 25, 89-95.
- Tsai, C.T., Involvement of serotonin in mediation of inhibition of substantia nigra neurons by noxious stimuli, (1989) Brain Res. Bull. 22, 121-127.
- Wall, P.D., On the relation of injury to pain, (1979) Pain 6, 253-264.
- Wang, Q.P. y Nakai Y., The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation, (1994) Brain Res. Bull. 34, 575-585.

- Willis, W.D., Anatomy and physiology of descending control of nociceptive responses of dorsal horn neurons: comprehensive review, (1988) *Prog. Brain Res.* 77, 1-29.
- Yasui, Y., Itoh, K. y Mizuno, M., Direct projections from the caudal spinal trigeminal nucleus to the striatum in the cat, (1987) *Brain Res.* 408, 334-338.
- Zhang, S., Tang, J.S., Yuan, B. y Jia, H., Inhibitory effects of electrical stimulation of ventrolateral orbital cortex on the rat jaw-opening reflex, (1998) *Brain Res.* 813, 359-366.

