



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**“ROL DEL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF) EN
LA GENERACIÓN E INSTAURACIÓN DEL DOLOR CRÓNICO”**

RODRIGO HERNANDO AGUILERA SALAZAR

Memoria para optar al
Título Profesional de Médico
Veterinario. Departamento de
Ciencias Biológicas Animales.

PROFESOR GUIA: TERESA PELISSIER SERRANO

Financiada por el Proyecto FONDECYT 1090476

**Santiago, Chile.
2010**

I. RESUMEN

La neurotrofina BDNF está involucrada en la supervivencia neuronal y en la plasticidad sináptica del sistema nervioso central y periférico. En el dolor crónico, los cambios plásticos observados dan cuenta de un fenómeno de hipersensibilidad mantenida en el tiempo conocido como sensibilización central. Es conocido que esta sensibilización central se acompaña de sobre-expresión de BDNF, sin embargo no está claro el rol de esta neurotrofina en la generación y mantención de los fenómenos de hiperalgesia. En esta memoria de título se estudió si la administración intratecal (i.t.) de BDNF replica la conducta nociceptiva que presentan las ratas con una neuropatía crónica (con un mes y medio de evolución), y si concomitantemente se genera sobre-expresión de BDNF endógeno. Los resultados mostraron que una inyección de BDNF i.t. es suficiente para disminuir el umbral nociceptivo mecánico (*test* de Randall-Selitto) en ratas normales, por un periodo de tiempo de hasta 42 días, sugiriendo que BDNF por si solo es capaz de generar un cambio o remodelación en la médula espinal que perdura en el tiempo, similar a lo que se observa en dolores crónicos como la neuropatía. Adicionalmente se observó que la concentración espinal de BDNF se encuentra aumentada 42 días después de la inyección de BDNF. Resultados similares se observaron en los animales mononeuropáticos a los 42 días de evolución. Estos resultados apoyan la idea que el efecto de BDNF se mantiene en el tiempo gracias a un ciclo de autogeneración, que involucra sobre-expresión de BDNF endógeno.

I. ABSTRACT

Neurotrophin BDNF is involved in neuronal survival and synaptic plasticity of the central and peripheral nervous system. In chronic pain, plastic changes account for a phenomenon of hypersensitivity which is maintained over time, known as central sensitization. It is known that central sensitization is accompanied by BDNF overexpression; however, the role of this neurotrophin in the generation and maintenance of the hyperalgesic phenomenon is still unclear. In the present work it was studied if intrathecal administration of BDNF replicates the nociceptive behaviour presenting chronic neuropathic rats (with one month a half of evolution) and if, concomitantly, overexpression of endogenous BDNF is generated. The results showed that a single i.t. BDNF injection is sufficient to lower the mechanical nociceptive threshold (Randall-Selitto test) in normal rats, for a period up to 42 days, suggesting that BDNF alone is sufficient for generating a long-lasting change or remodelling in the spinal cord, similar to that observed in chronic pain such as that from neuropathy. Additionally, we observed that BDNF concentration in spinal cord was found to be increased 42 days after BDNF injection. Similar results were observed in animals with a 42-day history of mononeuropathy. These results support the hypothesis that BDNF is maintained over time through a self generating cycle, involving overexpression of endogenous BDNF.

INDICE

	Pág.
Introducción	4
Revisión bibliográfica	6
Hipótesis	14
Objetivos	14
Materiales y métodos	15
Resultados	20
Discusión	29
Conclusiones	33
Bibliografía	34
Anexos	39

II. INTRODUCCIÓN

El dolor como forma de percepción se desarrolla en los animales desde estadios tempranos en la filogenia, sugiriendo la importancia del dolor en la supervivencia de las especies. El hombre desde su aparición en la escala filogenética ha tratado de encontrar formas de enfrentar y controlar el dolor para producir su alivio, tanto en los ámbitos mágico-religioso, como en el quirúrgico y farmacológico. Por ejemplo, a nivel quirúrgico se describe, en el código de Hammurabi, la perforación craneal realizada con un trepanador para aliviar el “calor cerebral”, mientras que la cultura china desarrolló técnicas más elaboradas como la acupuntura. A nivel farmacológico, se desarrolló el uso de plantas medicinales como la belladona y mandrágora por los griegos, los derivados de la amapola por los médicos árabes y la ipecacuana por las culturas precolombinas (Gutiérrez y Cadena, 2001).

Durante los siglos XVI y XVII con los avances de la anatomía y la fisiología, se redescubren los opioides, que habían sido utilizados por más de 4000 años. En 1806, Friedrich Sertürner, descubre y extrae la morfina desde el opio, convirtiéndose ésta en una de las herramientas fundamentales en la terapéutica del dolor hasta nuestros días. En 1897, Felix Hoffmann quien al acetilar el ácido salicílico, extraído desde la corteza del sauce años antes por Raffaele Piria, produjo un poderoso analgésico, el ácido acetil salicílico, el cual se mantuvo como analgésico de primera línea por más de 100 años (Merskey *et al*, 2005).

Actualmente existen diversos fármacos opioides y antiinflamatorios no esteroideos (AINES), naturales y sintéticos, que son pilares para el manejo del dolor agudo. Sin embargo, para dolores más complejos, como son los dolores crónicos, no se cuenta con fármacos efectivos para su alivio (Paeile y Bilbeny, 2005).

El dolor crónico se ha convertido en una problemática de salud pública mundial, debido a los grandes costos económicos y sociales que representa su tratamiento. Recientemente, un estudio epidemiológico en Europa, mostró que un 19% de los adultos

Europeos sufren dolor crónico de intensidad moderada a severa y de estos un 40% recibe manejo analgésico inadecuado, afectando su vida social y laboral (Breivik *et al*, 2006). Lo anterior, no sólo nos revela el costo humano y el impacto socioeconómico (US\$ 1 trillón por año en países desarrollados) (Mogil, 2009), sino que también las actuales limitaciones del tratamiento con analgésicos.

El conocimiento de los fenómenos involucrados en la percepción del dolor ha llevado a identificar nuevas sustancias que forman parte del proceso nociceptivo. En particular, existe evidencia robusta de que las neurotrofinas, familia de factores neurotróficos que son conocidos por sus efectos en sobrevivencia y crecimiento neuronal, juegan un papel fundamental como mediadores y moduladores del dolor. Uno de estos factores neurotróficos es el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés brain-derived neurotrophic factor) (Pezet y McMahon, 2006). A pesar del conocimiento del rol de las neurotrofinas y específicamente del BDNF en el procesamiento de la información nociceptiva, aún el conocimiento se encuentra incompleto, específicamente en lo referente al dolor neuropático (Merighi *et al*, 2008).

En la presente memoria de título se estudió la posible participación del BDNF en la sensibilización central que se observa en animales con dolor crónico, para lo que se realizaron comparaciones conductuales y mediciones de BDNF, en ratas sanas con administración intratecal, única o repetida de BDNF y ratas neuropáticas, modelo ampliamente utilizado de dolor crónico.

IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En 1994, la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor, con su grupo de trabajo sobre taxonomía, definió el dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con un daño tisular real o potencial, o descrita en términos de dicho daño” (Merskey y Bogduk, 1994). Por su parte, el dolor en animales ha sido definido por diferentes autores. Molony y Kent en 1997, lo definen como “una experiencia sensorial y emocional aversiva que representa una toma de conciencia por el animal de daño o amenaza a la integridad de sus tejidos, y que cambia su fisiología y comportamiento para reducir o evitar el daño, para reducir la probabilidad de recurrencia y para promover la recuperación”.

En la experiencia dolorosa existe un componente emocional y por lo tanto subjetivo. Sin embargo, esta experiencia se puede transformar en objetiva cuando se observan y cuantifican diferentes alteraciones en la conducta. En el caso de los animales, es aquí donde el etograma de cada especie cobra importancia clave en el entendimiento del dolor, ya que al saber cuáles son las manifestaciones de dolor en el comportamiento animal, éstas se pueden medir. Blood y Radostits (1992), muestran como algunas respuestas en las conductas animales pueden referirse a dolor como: la postura, marchas anormales (cojera, arrastre de extremidades, cambio del sostén del cuerpo de una extremidad a otra), la rodadura, toque de pezuñas, agazapamiento, mirada hacia el flanco, diferentes tipos de vocalizaciones, gemidos, gruñidos y frote de dientes. Otras alteraciones que se observan son: expresión ansiosa, rechazo a la exploración clínica, modificaciones en la ingesta de alimento y agua. Entre las modificaciones fisiológicas relacionadas con el sistema nervioso autónomo se encuentran: taquicardia, taquipnea, midriasis, hipertermia y sudoración.

Algunas de las conductas mencionadas han sido seleccionadas y utilizadas en diversas pruebas para estudiar y analizar específicamente la fisiopatología de cuadros dolorosos y acción de diversos analgésicos. Existen múltiples *tests* utilizados; entre los mecánicos se encuentra la prueba de presión de la extremidad (Randall y Sellito, 1957),

donde se estudia la vocalización o la retirada de la extremidad (“*struggle*”), al presionar la extremidad con una punta roma. Entre los térmicos está el de la plancha caliente (“*hot plate*”), o la plancha fría (“*cold plate*”), donde se estudia la temperatura a la cual el animal realiza un lamido de la extremidad, un levantamiento o un salto de escape. Entre los químicos se encuentran los *tests* de formalina o capsaicina, en los que se administran estas sustancias subcutáneamente, y se estudia el tiempo en que el animal se lame o frota la zona afectada (Mogil, 2009). Por otro lado, en el ámbito de la ética en el uso de animales de investigación, las observaciones conductuales también son utilizadas para establecer los protocolos de supervisión y el criterio de “punto final” en cualquier investigación que involucre animales de experimentación (National Institute of Health, 1996)

Conceptos generales

La clasificación más utilizada del dolor se basa en su duración: dolor agudo y dolor crónico. El dolor agudo es también denominado dolor fisiológico o funcional debido a que tiene un rol protector. Este tipo de dolor comprende el lapso entre que se genera un daño tisular y su reparación, considerando que su duración máxima es de tres meses. En cambio el dolor crónico o persistente, es también llamado patológico o no funcional, ya que no posee ningún propósito fisiológico, y presenta una duración mayor, que en seres humanos es de tres meses y se prolonga más allá de la reparación tisular (Paeile y Bilbeny, 2005).

Uno de los mecanismos involucrados en el desarrollo de dolor crónico es la sensibilización central, fenómeno que se define como excitabilidad neuronal aumentada en las neuronas espinales y supraespinales, respecto a una entrada aferente nociceptiva (Paeile y Bilbeny, 2005). En el ámbito conductual, existen dos signos de alteración de la sensibilidad neuronal que son la hiperalgesia, definida como una mayor respuesta a un estímulo doloroso y la alodinia, que es la percepción de dolor provocada por un estímulo no doloroso (Paeile y Bilbeny, 2005).

Una noxa muy intensa o prolongada puede generar alteraciones en la expresión génica, alterando el fenotipo de cada neurona, demostrando la plasticidad neuronal

(neuroplasticidad) del sistema nervioso central, aumentando la actividad espontánea y la respuesta al estímulo por parte de neuronas centrales amplificando el estímulo doloroso. Estos cambios moleculares son los responsables en gran medida de modificaciones funcionales que ocurren en la respuesta de las neuronas del asta dorsal de la médula espinal frente al dolor persistente, modificaciones que en el largo plazo llevan a alteraciones en la conectividad sináptica espinal. Son estos cambios tardíos los que determinan que esto no sea un simple mecanismo de acción neuronal, sino que exista un fenómeno de plasticidad de las neuronas (Paeile y Bilbeny, 2005).

La percepción del dolor implica la activación de nociceptores periféricos (cutáneos, musculares, articulares o viscerales), la generación de una señal nerviosa y la transmisión de esta señal a la corteza cerebral. Receptores especializados, llamados nociceptores, están situados en la periferia del sistema nervioso y detectan la intensidad y el tipo de estímulo nociceptivo. Luego, las fibras aferentes primarias, transmiten el impulso nociceptivo hacia la médula espinal. Estas fibras aferentes se clasifican sobre la base del diámetro, presencia de vaina de mielina y velocidad de conducción. Las fibras más importantes para la transmisión de la información nociceptiva son las fibras mielinizadas delgadas A δ y las no mielinizadas C. Las fibras aferentes originadas en el ganglio raquídeo entran a la médula espinal, vía raíces dorsales y realizan sinapsis en el asta posterior o superior, con neuronas de proyección. Luego, la información nociceptiva viaja por tractos ascendentes ventrolaterales hacia los centros superiores del sistema nervioso central (SNC), como el tracto espinotalámico que termina en el núcleo ventroposterior del tálamo; el tracto espinoreticular, algunos de cuyos axones terminan en células involucradas en la modulación de vías descendentes del dolor y otros componen el tracto espinoreticulotalámico que termina en el tálamo medial; el tracto espinomesencefálico que termina primariamente en el *colliculus* superior y en la sustancia gris periacueductal. Además de las vías anterolaterales hay dos vías que ascienden por las columnas dorsales: algunas neuronas nociceptivas de la lámina V proyectan axones a los núcleos *cuneatus* y *gracilis* y pueden ser particularmente importantes para la transmisión del dolor visceral y el sistema espino-parabraquial-amígdala que se origina en las láminas I y V y se proyecta al

área parabraquial y de ahí a la amígdala y que está involucrado en el miedo y memoria del dolor así como en la conducta y reacciones autonómicas a eventos nociceptivos como a vocalización, escape, inmovilidad, midriasis y respuestas cardiorrespiratorias (Basbaum *et al*, 2005). En la corteza cerebral la información nociceptiva llega al área somatosensorial, donde se interpretan los aspectos sensoriales y discriminativos del dolor, y a la corteza insular donde se procesan los aspectos emocionales del dolor (Paeile y Bilbeny, 2005).

Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)

Las neurotrofinas son una familia de factores de crecimiento que está compuesta por los siguientes miembros: factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés, nerve growth factor), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 1 (NT-1), neurotrofina 3 (NT-3) y neurotrofina 4 (NT-4) (Pezet y McMahon, 2006). Estas neurotrofinas juegan papeles importantes regulando la sobrevivencia, crecimiento y diferenciación neuronal, además de ser potentes moduladores de las sinapsis por medio de su influencia en la eficiencia sináptica de corto y largo plazo (Merighi *et al*, 2008).

El BDNF es una proteína básica de 12.4 kDa, originalmente aislada desde el cerebro porcino (Barde *et al*, 1982). Esta proteína está codificada por el gen que también se conoce como el gen BDNF y en los humanos este gen está localizado en el cromosoma 11. El BDNF comparte el 50% de homología en la cadenas de aminoácidos con las otras neurotrofinas y en condiciones normales BDNF es sintetizado como homodímero y además interactúa con su receptor como homodímero (Zhang *et al*, 2000).

El BDNF y las neurotrofinas en general, se unen a dos tipos de receptores. Los receptores “*tyrosine kinase receptors*” (Trks) y al receptor para neurotrofinas p75. Ambos receptores activan sus propias vías de transducción de señales modulando finamente las respuestas a los factores neurotróficos. El receptor p75, a diferencia de Trks, puede señalar muerte neuronal programada y unir ligandos del tipo no-neurotróficos, tales como la glicoproteína del virus de la rabia, péptidos amiloides y también pro-neurotrofinas.

Además, no posee actividad catalítica *per se*, por lo tanto su señalización depende de la interacción con otras proteínas intracelulares (Numakawa *et al*, 2010).

La mayoría de las acciones del BDNF están reguladas por su receptor de alta afinidad, conocido como TrkB, mientras un número menor de acciones están mediadas por el receptor de baja afinidad p75. La unión de BDNF al receptor TrkB inicia la dimerización del receptor y la transfosforilación de los residuos de tirosina en su región citoplasmática, promoviendo la activación de vías de señalización como ras-raf-MAPK, P13K-Akt-GSkKIII, PLCgama-DAG-PKC y sokinasa. La activación de estas vías durante el desarrollo temprano bloquea la apoptosis y promueve la sobrevivencia y diferenciación celular. En las neuronas adultas esta activación regula la respuesta neuronal y la función sináptica. Si el receptor p75 se expresa en ausencia del TrkB o la relación p75/TrkB es alta, es decir existe mayor expresión de receptores de menor afinidad, el BDNF puede activar otras vías como JNK (quinasa c-Jun N-terminal) o NF-kb (factor de transcripción KAPPA B y promover la apoptosis, es decir esta relación p75/TrkB estaría involucrada en la sobrevivencia neuronal (Pezet y McMahan, 2006).

El receptor TrkB es abundante durante el desarrollo, pero también ampliamente distribuido en el SNC de animales adultos, sugiriendo un rol continuo del BDNF en el sistema nervioso adulto (Merighi *et al*, 2008). Uno de estos roles parece ser el de modulador de la neurotransmisión nociceptiva a nivel espinal y supraespinal (Pezet y McMahan, 2006). El BDNF ha sido identificado en diferentes estructuras relacionadas con las vías nociceptivas, tales como el asta dorsal espinal donde se almacena junto con otros neuropéptidos, en centros integradores como corteza y amígdala, y además en centros de relevo como el tálamo, formación reticular, hipotálamo y núcleo parabraquial (Merighi *et al*, 2008).

Rol del BDNF en la nocicepción

El asta dorsal se ha transformado en el principal foco de atención para investigaciones con respecto al dolor, ya que contiene fundamentalmente: a) terminaciones

centrales de las neuronas sensitivas primarias; b) neuronas intrínsecas del asta dorsal, ya sean estas interneuronas de axón corto, o neuronas de proyección involucradas en la transmisión del dolor hacia estructuras supramedulares; y c) un conjunto de terminaciones axónicas descendentes de origen central, primordiales en la regulación de la información nociceptiva. Lo anterior la transforma en el primer lugar de integración sináptica y modulación de la información nociceptiva proveniente de la periferia. Los cambios a escala molecular y celular que ocurren en el asta dorsal son responsables, en gran medida, de las modificaciones funcionales que ocurren en la respuesta de las neuronas del asta dorsal frente al dolor crónico (Paeile y Bilbeny, 2005).

Debido a lo antes mencionado, surge la importancia de estudiar cual es la participación del BDNF en la generación o mantención del dolor crónico a nivel del asta dorsal. En el asta dorsal, el BDNF ha mostrado modular la neurotransmisión excitatoria (glutamatérgica) e inhibitoria (GABAérgica/glicinérgica), aunque con un predominio de la función excitatoria, producido por un aumento de la liberación de glutamato, lo que mejora la eficacia sináptica (Merighi *et al*, 2008).

Entre la evidencia que sugiere la participación de BDNF en cuadros de dolor crónico se puede mencionar que:

- a) La síntesis de BDNF está aumentada en diferentes poblaciones neuronales en el ganglio de la raíz dorsal (GRD), en modelos de dolor neuropático e inflamatorio (Obata *et al*, 2004).
- b) La síntesis de BDNF no sólo se incrementa en los aferentes primarios durante cuadros de dolor crónico, sino también en neuronas nociceptivas de segundo orden (Onda *et al.*, 2004; Pezet y McMahon, 2006), e incluso en células gliales del asta dorsal (Tokumine *et al.*, 2003).
- c) Pacientes que sufren dolor de cabeza crónico diario, mostraron aumentos significativos de los niveles de BDNF en el fluido cerebroespinal y estos niveles altos parecieran estar correlacionados con la duración de este tipo de dolor (Sarchielli y Gallai, 2004).

- d) La administración de BDNF directamente a las neuronas del GRD, indujo alodinia mecánica en ratas normales, condición que fue revertida por la aplicación de anticuerpos anti-BDNF al GRD. La alodinia producida por la sección del nervio isquiático también fue revertida por aplicación de anticuerpos anti-BDNF (Zhou *et al*, 2000).
- e) La administración intratecal de BDNF indujo hiperalgesia en ratones normales, mientras que oligonucleótidos antisentido dirigidos contra BDNF o al receptor TrkB previnieron la hiperalgesia inducida por carragenina (Groth y Aanonsen, 2002), lo que implica directamente a la neurotrofina BDNF en la hiperalgesia inducida en procesos inflamatorios.
- f) La inflamación crónica, inducida por la inyección intraplantar del Adyuvante completo de Freund (suspensión de *Mycobacterium* muertos por calor), produjo un incremento en la expresión del receptor TrkB en neuronas del GRD (Lee *et al*, 1999).
- g) Zhang *et al* (2000), al administrar anticuerpo antiBDNF a ratas y ratones sometidos a modelo de dolor neuropático, obtuvo una dramática reducción del número de axones mielinizados distal a la lesión y una disminución en la elongación de los axones en regeneración, lo que indicaría que esta neurotrofina juega un papel importante en la reparación de daños en los nervios periféricos.
- h) Coull *et al* (2005), mostraron que el BDNF exógeno produce alodinia táctil, probablemente debido al cambio en el gradiente aniónico transmembrana, reforzando la posibilidad de que el BDNF endógeno juegue un rol importante como mediador en los daños generados en una neuropatía periférica.

En resumen, tanto la evidencia funcional como anatómica, convergen al indicar que los receptores TrkB presinápticos ubicados en las fibras aferentes primarias y los receptores TrkB postsinápticos participarían, en la modulación de la liberación de neurotransmisores en la nocicepción. Sin embargo, aún se necesita un mayor entendimiento de como el BDNF endógeno es liberado e interactúa con su receptor para inducir un cuadro de dolor que sea capaz de perdurar en el tiempo. (Merighi *et al*, 2008).

El conjunto de estos antecedentes conducen a investigar si BDNF por si solo puede llegar a producir un estado de dolor crónico, de más de un mes duración, y si este estado es similar a lo observado en un modelo de dolor neuropático,

V. HIPÓTESIS

La administración de BDNF intratecal, replica la conducta nociceptiva que presentan las ratas neuropáticas, indicando que el BDNF controla las remodelaciones plásticas que se producen durante las lesiones de nervios periféricos.

VI. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Estudiar la participación del BDNF en la sensibilización nociceptiva espinal que se observa en ratas sometidas a un modelo de dolor neuropático.

2. Objetivos específicos

2.1. Evaluar el efecto de la administración intratecal de inyecciones múltiples (3 inyecciones, una cada 7 días), de 0,0003, 0,03, 0,3 y 3,0 ng/10 µl de BDNF sobre la nocicepción mecánica (Randall-Selitto), en ratas sanas, a los 3, 7, 10, 14, 17, 21, 28, 35 y 42 días de evolución.

2.2. Determinar el efecto de la administración intratecal de una inyección de 0,0003, 0,03, 0,3 y 3,0 ng/10 µl de BDNF sobre la nocicepción mecánica (Randall-Selitto), en ratas sanas, a los 3, 7, 10, 14, 17, 21, 28, 35 y 42 días de evolución.

2.3. Evaluar el efecto de la sección del nervio sural (neuropatía experimental) sobre la nocicepción mecánica (Randall-Selitto) en ratas sanas, a los 3, 7, 10, 14, 17, 21, 28, 35 y 42 días post-cirugía.

2.4. Determinar la concentración de BDNF en la médula espinal lumbar de ratas que recibieron 42 días antes, una inyección intratecal de 3 ng BDNF/10 µl salino, y compararla con la de ratas mononeuropáticas con 42 días de evolución.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar

Laboratorio de Farmacología del Dolor Crónico, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

2. Animales

Los experimentos de este estudio se realizaron en ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague Dawley, machos, de 250-280g de peso, mantenidas en un régimen de luz: oscuridad 12:12 y alimentadas con una dieta comercial y agua *ad-libitum*. En este estudio se utilizaron animales sanos y animales que padecieron una neuropatía inducida por sección del nervio sural. Estos experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y se realizaron de acuerdo a la Guía de uso y cuidado de animales de laboratorio preparada por el National Institute of Health (1996), utilizando siempre la menor cantidad de animales posibles.

3. Protocolo experimental

Modelo de neuropatía. Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral 400 mg/kg intraperitoneal en una solución al 7%. Luego se rasuraron a nivel del nervio isquiático y se procedió a hacer una incisión en la piel de aproximadamente 1 cm. Se debridó el tejido subcutáneo y luego se separó el músculo *biceps femoris* de la cabeza pélvica y vertebral hasta encontrar el nervio isquiático. Se siguió su recorrido hasta la división del nervio en tres ramos: el sural, el fibular común y el tibial. Se separaron los ramos y se seccionó el nervio sural a dos milímetros de su nacimiento; luego se suturó por planos. Una vez terminada la intervención se administró al animal ketoprofeno 3 mg/kg como analgésico y enrofloxacino 5 mg/kg como antimicrobiano durante 2 días. Esta lesión nerviosa, genera una hiperalgesia que se mantiene por más de un mes (Decosterd y Woolf, 2000). Como grupo control se utilizó ratas que recibieron el mismo procedimiento quirúrgico, pero sin seccionar el nervio sural (*sham*).

Test nociceptivo mecánico de presión de la extremidad posterior (Randall-Selitto).

Para el estudio de la hiperalgesia mecánica se utilizó el *test* de presión mecánica de la extremidad posterior de Randall-Selitto (1957), que consiste en la compresión gradual ascendente de la extremidad, utilizando el aparato Analgesy-meter® modelo 37215 (Ugo Basile, Italia). Este procedimiento permite determinar el umbral nociceptivo a la estimulación mecánica consistente en una vocalización de la rata o bien la retirada de la extremidad. El equipo entrega valores entre 0 y 25, los cuales son multiplicados por 30 para ser convertidos a gramos de presión. Este *test* se realizó tanto en ratas sanas, como aquellas que recibieron BDNF (inyección única o repetida) y en ratas neuropáticas. Las mediciones algésimétricas se realizaron previo a las inyecciones o cirugía y luego a los 3, 7, 10, 14, 17, 28, 35, 42 días.

Administración de suero o BDNF. Los animales se rasuraron a nivel lumbar y luego dependiendo del grupo experimental recibieron una inyección (única) de suero o BDNF, o 3 inyecciones (una cada 7 días) de suero o BDNF (múltiple), mediante inyección intratecal percutánea directa entre las vértebras lumbares 5 y 6 (Mestre *et al.*, 1994) (Figura 1). El BDNF fue administrado en diferentes grupos de animales con inyección única o múltiple en dosis de 0,0003, 0,03, 0,3 y 3,0 ng/10 µl de BDNF.

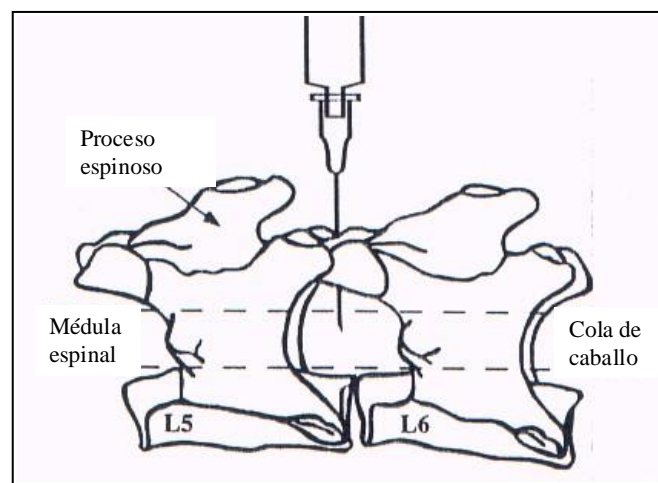


Figura 1. Esquema que indica administración intratecal (i.t)

Cuantificación del BDNF en la médula espinal. A los 42 días posteriores al inicio de la administración de BDNF, los animales fueron sacrificados por sobredosis de uretano (5g/Kg, vía intraperitoneal) y sometidos a una laminectomía para la extracción de los segmentos L2 al L6 de la médula espinal. Estos segmentos fueron disecados, pesados y congelados a -80 °C.

Luego el tejido espinal fue homogenizado para la determinación de BDNF mediante un inmunoensayo ELISA (del inglés "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay"). Al tejido congelado se le adicionó un 50 µL buffer de lisis (137 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1% NP40; 10% glicerol; 1mM PMSF; 10 µg/ml aprotinina; 1 µg/ml leupeptin; 0.5 mM vanadato de sodio), por mg de tejido y se homogenizó por 5 minutos con un homogenizador (Ultra Turrax; Biospec), en frío. El homogenizado fue centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm y el sobrenadante fue usado para realizar el ELISA ("BDNF Emax ImmunoAssay system", Promega).

Para realizar el ELISA, inicialmente se cubrió cada pocillo de la placa con 100 µl de un anticuerpo monoclonal anti-BDNF diluido 1:1000 en buffer carbonato (pH 9,7) y se mantuvo sin agitar durante la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizó un lavado con 100 µL de TBST (20mM Tris-HCl, pH 7.6; 150mM NaCl; 0.05% Tween 20) y se adicionó 100 µl del tampón de "bloqueo y muestra" (ByM; incluido en el kit) y permaneció sin agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó una vez y se cargó 100µL por pocillo de la curva estándar de BDNF (500 a 8 pg/ml) o las muestras en duplicado y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de 5 lavados se adicionó 100 µL/pocillo un anticuerpo policlonal anti-BDNF humano 1:500 diluido con ByM y permaneció con agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de 5 lavados con TBST se agregó 100 µL/pocillo de anticuerpo Anti-IgY aviar conjugado HRP 1:200 diluido en ByM y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente.

Finalmente la placa fue lavada 5 veces con TBST y se agregó 100 μ L/pocillo con tetrametilbenzidina (TMB) y se agitó por 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción de detuvo con 100 μ L de HCl (1N). La reacción se leyó antes de 30 minutos de detenida la reacción en un lector de placas de ELISA (Multiskan FC, Thermo Scientific) a 450 nm. Las lecturas fueron extraídas y procesadas en el programa EXCEL. La concentración de BDNF se expresó como pg/gr de tejido.

4. Fármacos

El BDNF utilizado es una proteína recombinante producida en *E. Coli* homodimérica y no glicosilada, constituida por 2x119 aminoácidos y con un peso molecular de 26.984 Dalton (Tocris®, Laboratorio Bioscience, UK, Cat No. 2837).

5. Expresión de los resultados

Los resultados obtenidos fueron expresados como la media \pm error estándar de los umbrales nociceptivos medidos antes y durante los 42 días que siguieron a los tratamientos, y representados como curvas de evolución en el tiempo. Para evaluar el efecto global de los tratamientos en el umbral nociceptivo durante el período completo de observación, se calculó el área bajo cada curva (ABC), mediante el método de los trapecios. Los cambios en las concentraciones de BDNF, medidas 42 días después de los tratamientos, se expresaron como cambio porcentual respecto al grupo control respectivo.

6. Procesamiento estadístico de los datos

Para cuantificar los diferentes factores involucrados entre ratas sanas, ratas con BDNF o ratas neuropáticas en nuestros experimentos, se realizó:

- A. Un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías de medidas repetidas, para determinar si el factor “dosis de BDNF” y el factor “tiempo” influyen significativamente en los valores de umbral nociceptivo, y si existe interacción entre ambos factores. Esto, tanto para la administración única y múltiple de BDNF intratecal. Cada vez que el resultado del ANDEVA fue significativo, se realizó la prueba de comparación múltiple de

Bonferroni. Para los resultados, el nivel de significancia se estableció en $p \leq 0,05$. Un análisis similar fue realizado para comparar los resultados obtenidos en ratas *sham* y neuropáticas.

- B. Un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía, para determinar diferencias en los efectos inducidos por las diversas dosis de BDNF durante el curso completo del experimento (42 días), a través del área bajo la curva (ABC). Esto, tanto para la administración única y múltiple de BDNF intratecal. Cada vez que el resultado del ANDEVA fue significativo, se realizó la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Para los resultados, el nivel de significancia se estableció como sigue: $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$. Un análisis similar fue realizado para comparar todos los resultados obtenidos en ratas normales versus las ratas neuropáticas.
- C. Un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías, para determinar diferencias en los efectos inducidos por las diversas dosis de BDNF tanto en administración única como múltiple, y si existe interacción entre ambos factores, durante el curso completo del experimento (42 días), a través del área bajo la curva (ABC). Cada vez que el resultado del ANDEVA fue significativo, se realizó la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Para los resultados, el nivel de significancia se estableció como sigue: $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$.

VIII. RESULTADOS

1. Efecto de la administración intratecal de inyecciones múltiples de BDNF sobre el umbral nociceptivo.

Se comparó el umbral nociceptivo de ratas que recibieron 3 inyecciones intratecales de BDNF, una cada 7 días, con el umbral de ratas inyectadas intratecalmente con salino. Las inyecciones de BDNF se realizaron con concentraciones de 0,0003, 0,03, 0,3 y 3,0 ng/10 µl. El umbral nociceptivo fue medido antes de la inyección de la primera dosis de salino o BDNF, para cuantificar el umbral nociceptivo individual de cada animal, y luego a los 3, 7, 10, 14, 17, 21, 28, 35 y 42 días, a partir de la primera inyección de BDNF o salino.

Los umbrales nociceptivos de los animales tratados con salino no mostraron diferencia estadística respecto al control previo a la inyección en ninguno de los días estudiados a diferencia de los animales tratados con inyecciones múltiples de BDNF que mostraron una disminución significativa del umbral nociceptivo respecto al control previo a la inyección en las 4 concentraciones estudiadas, a excepción del día 3 con la dosis de 0,0003 ng, disminución que se mantuvo hasta el día 42 después de la primera inyección de BDNF (Figura 2A). El cálculo de la ABC mostró que el umbral nociceptivo en los 42 días que duró el estudio, disminuyó significativamente para todas las concentraciones de BDNF, respecto al grupo de ratas tratadas con salino (Figura 2B).

2. Efecto de la administración intratecal de una inyección única de BDNF sobre el umbral nociceptivo.

La inyección intratecal única de BDNF, en concentraciones de 0,0003, 0,03, 0,3 y 3,0 ng/10 µl, produjo una disminución significativa del umbral nociceptivo respecto al grupo control que recibió salino. Esta disminución se observó en todos los días en los cuales se realizó la medición del umbral nociceptivo (3, 7, 10, 14, 17, 21, 28, 35 y 42 días post

inyección), a excepción del día 3 con la dosis de 0,0003 ng (Figura 3A). El cálculo de la ABC mostró que el umbral nociceptivo disminuyó significativamente durante los 42 días que duró el estudio, para todas las concentraciones de BDNF, respecto al grupo de ratas tratadas con salino, sin observarse una disminución dosis-dependiente del umbral; sin embargo hubo diferencias significativas en el efecto de BDNF entre algunas de las dosis inyectadas a diferentes días de observación (Figura 3B).

3. Comparación del efecto de BDNF administrado en dosis múltiples y dosis únicas

La Figura 4 muestra que la administración de BDNF en dosis múltiple o única produjo globalmente efectos pronociceptivos similares cuando se utilizó concentraciones de 0,0003 y 0,03 ng/10 μ l i.t. A concentraciones mayores, de 0,3 y 3 ng/10 μ l i.t., BDNF produjo una mayor disminución del umbral nociceptivo cuando se administró en dosis múltiple, efecto que fue estadísticamente significativo.

4. Efecto de la inducción de la neuropatía sobre el umbral nociceptivo

Antes de inducir la neuropatía se compararon los grupos de animales que sufrirían la sección del nervio sural y aquellos que sólo sufrirían la cirugía simulada (*sham*) y no se encontraron diferencias significativas entre ellos a los días -7, -3 y día 0 previo a la cirugía (resultados no mostrados). Las ratas que sufrieron la sección del nervio sural a partir de la primera observación posterior a la cirugía (día 3) y durante las siguientes observaciones (días 7, 10, 14, 17, 21, 28, 35 y 42) mostraron una diferencia significativa respecto a las ratas *sham*, observándose el umbral más bajo entre los días 3 a 10 posterior a la cirugía, estabilizándose posteriormente hasta el día 35, para luego al día 42 comenzar a aumentar dicho umbral. A pesar de ello, durante todo el tiempo de experimentación se mantuvo una disminución significativa del umbral nociceptivo respecto a las ratas *sham* (Figura 5).

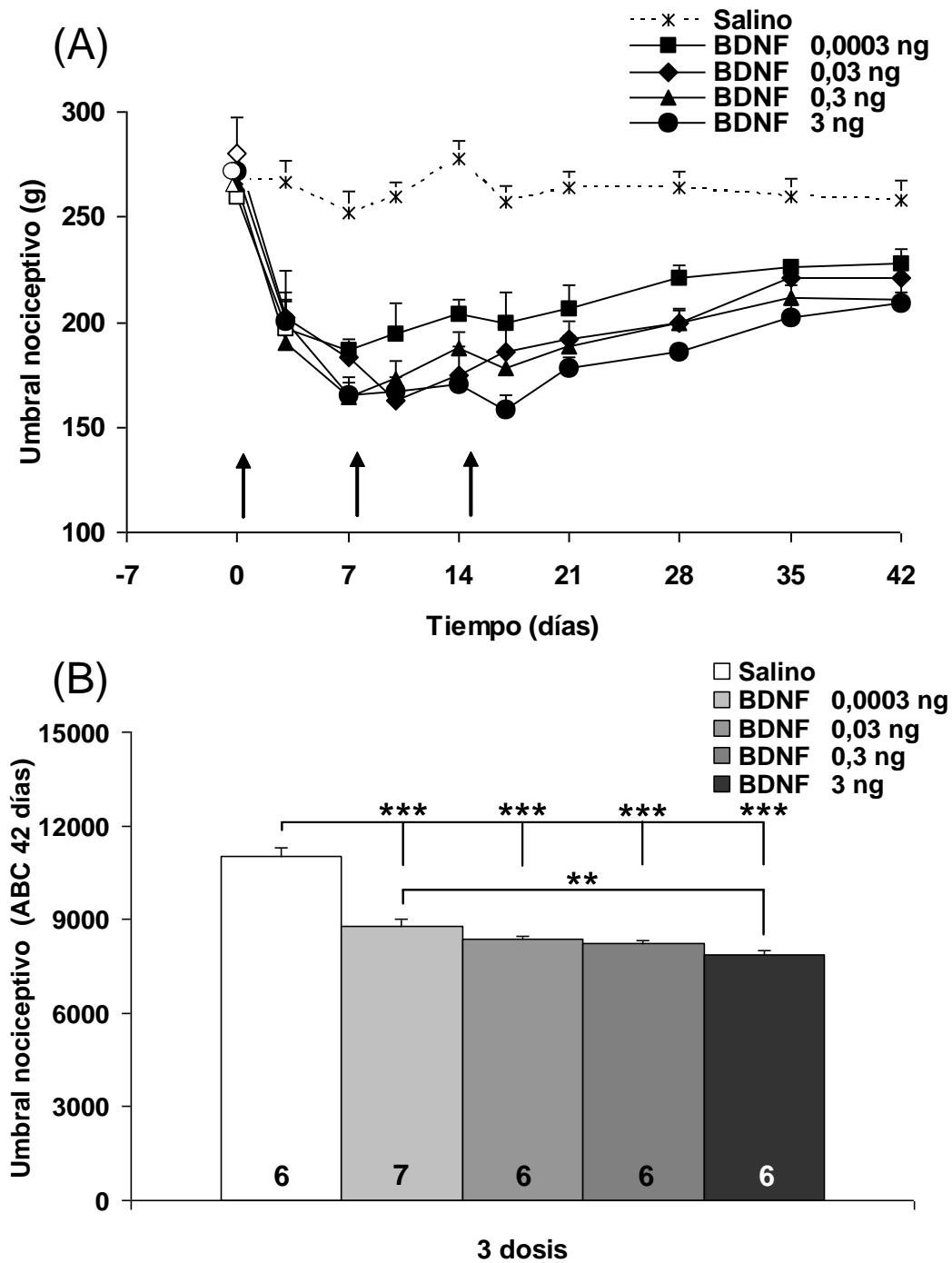


Figura 2. Efecto de la administración intratecal de dosis múltiples de BDNF o salino (indicadas por las flechas) en el umbral nociceptivo mecánico. El número dentro de cada barra corresponde al número de animales utilizado. Los valores son el promedio \pm SEM. (A) Evolución temporal: ANDEVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (símbolos llenos: $p \leq 0,05$). (B) Área bajo la curva: ANDEVA de una vía seguido del test de Bonferroni (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

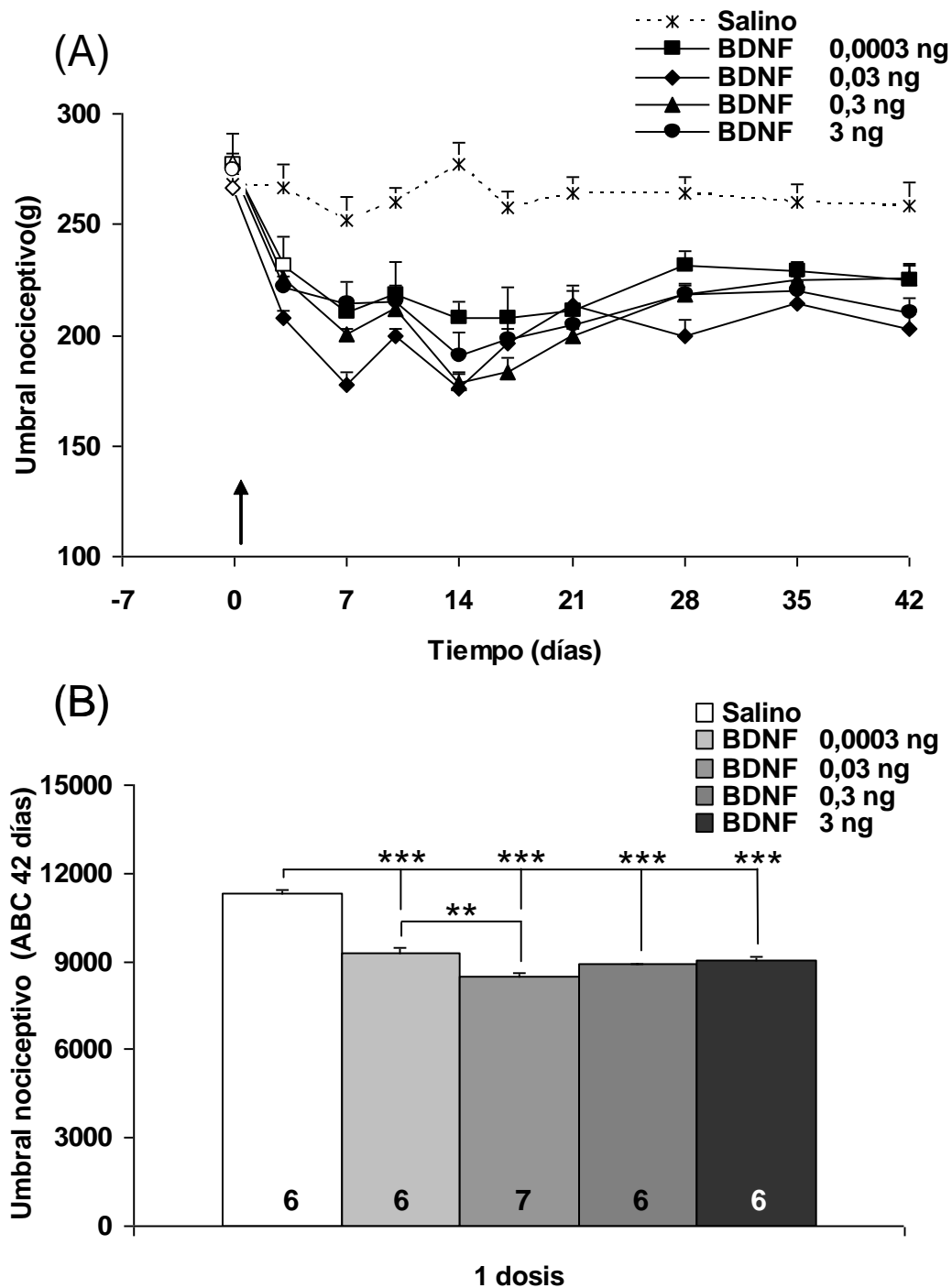


Figura 3. Efecto de la administración intratecal de dosis únicas de BDNF o salino (indicadas por las flechas) en el umbral nociceptivo mecánico. El número dentro de cada barra corresponde al número de animales utilizado. Los valores son el promedio \pm SEM. (A) Evolución temporal: ANDEVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (símbolos llenos: $p \leq 0,05$). (B) Área bajo la curva: ANDEVA de una vía seguido del test de Bonferroni (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). .

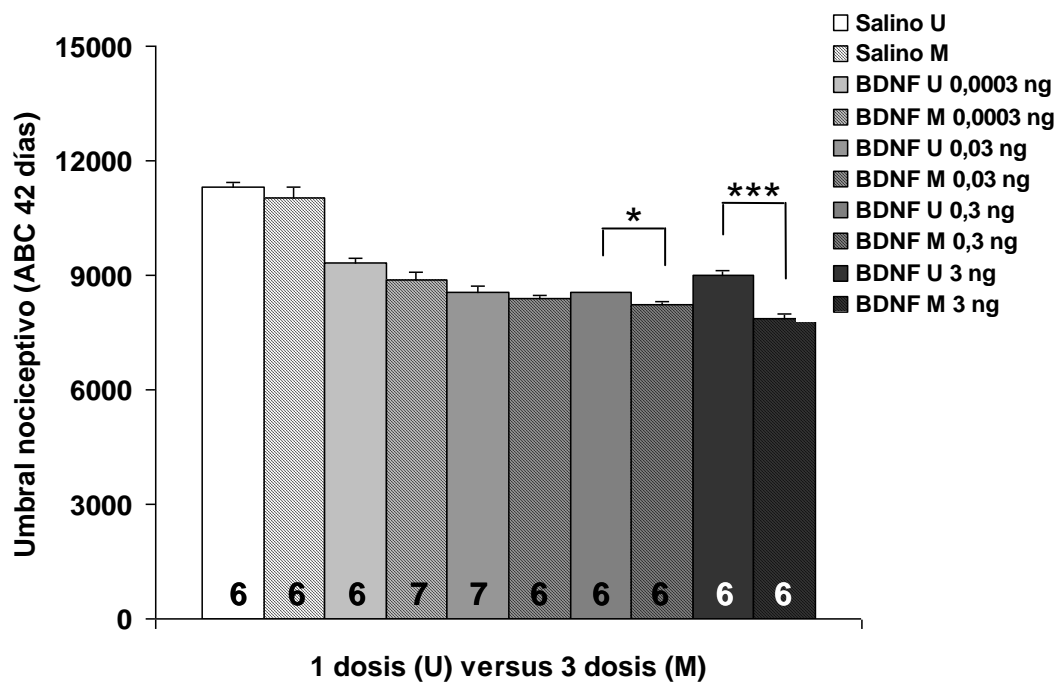


Figura 4. Efecto de la administración intratecal de dosis únicas (U) y múltiples (M) de BDNF o salino en el umbral nociceptivo mecánico. El número dentro de cada barra corresponde al número de animales utilizado. Los valores son el promedio \pm SEM del área bajo la curva: ANDEVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

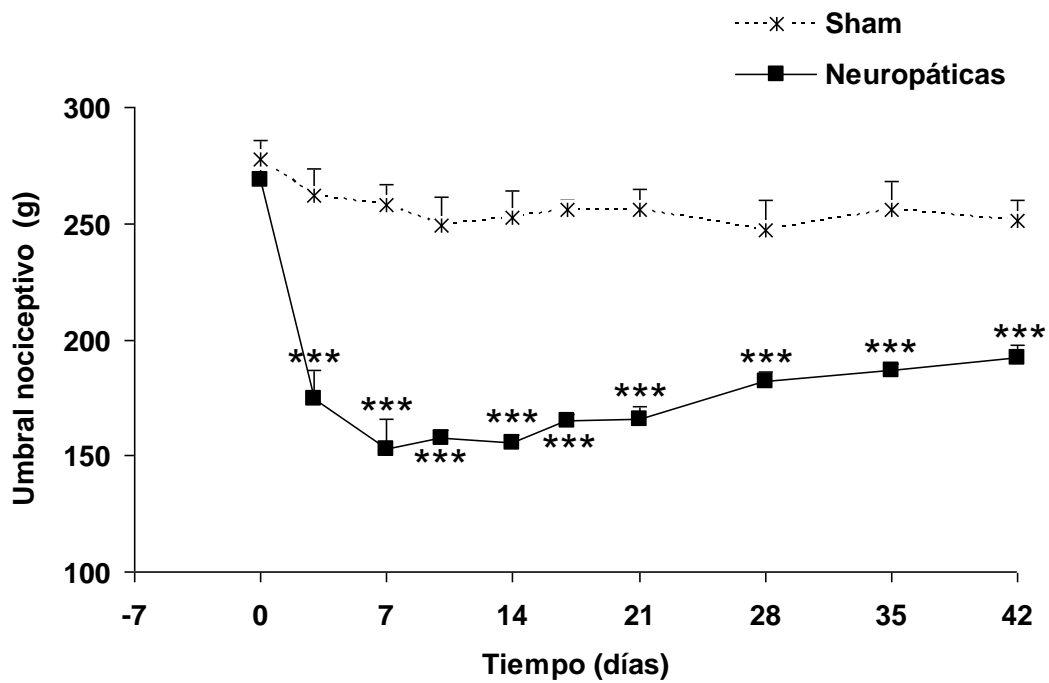


Figura 5. Efecto de la sección del nervio sural (neuropatía) (n=6) o cirugía simulada (*sham*) (n=6) en la evolución temporal del umbral nociceptivo mecánico. Los valores son el promedio \pm SEM. ANDEVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (***) $p \leq 0,001$.

5. Comparación de la neuropatía respecto a las ratas tratadas con salino o BDNF en dosis única o múltiple.

La comparación entre ratas neuropáticas y el resto de los animales tratados a los 42 días mostró que las ratas neuropáticas presentaron un umbral nociceptivo inferior al resto de los animales, el que fue estadísticamente significativo con excepción de las ratas que recibieron 3 dosis de BDNF intratecal de 3 ng/10 µl cada una (Figura 6).

6. Comparación de la concentración de BDNF en la médula espinal de ratas tratadas con BDNF y ratas mononeuropáticas.

La concentración de BDNF en el tejido espinal, determinada mediante ELISA 42 días después de la administración intratecal de BDNF o de la inducción quirúrgica de mononeuropatía, mostró que tanto la administración intratecal única de 0,3 y 3,0 ng de BDNF i.t. como la inducción de mononeuropatía incrementaron significativamente la concentración de BDNF en la médula espinal respecto a sus respectivos grupos controles, en porcentajes de incrementos similares (Figura 7).

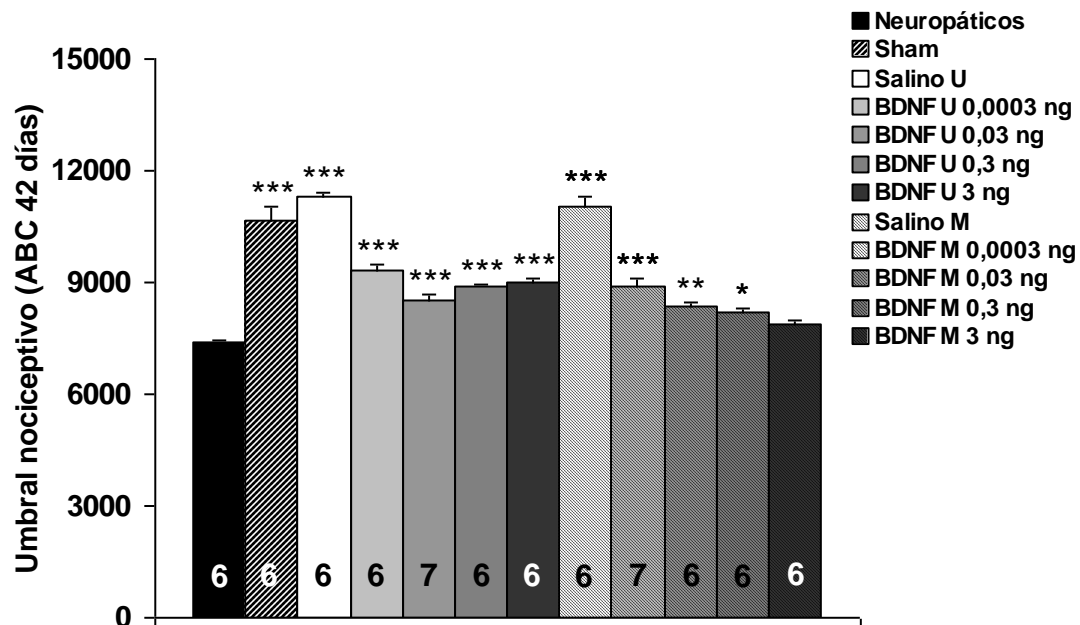


Figura 6. Efecto comparativo de la administración intratecal de dosis únicas (U) o múltiples (M) de BDNF o salino respecto del umbral nociceptivo mecánico obtenido en ratas neuropáticas. El número dentro de cada barra corresponde al número de animales utilizado. Los valores son el promedio \pm SEM del area bajo la curva: ANDEVA de una vía seguido del test de Bonferroni (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

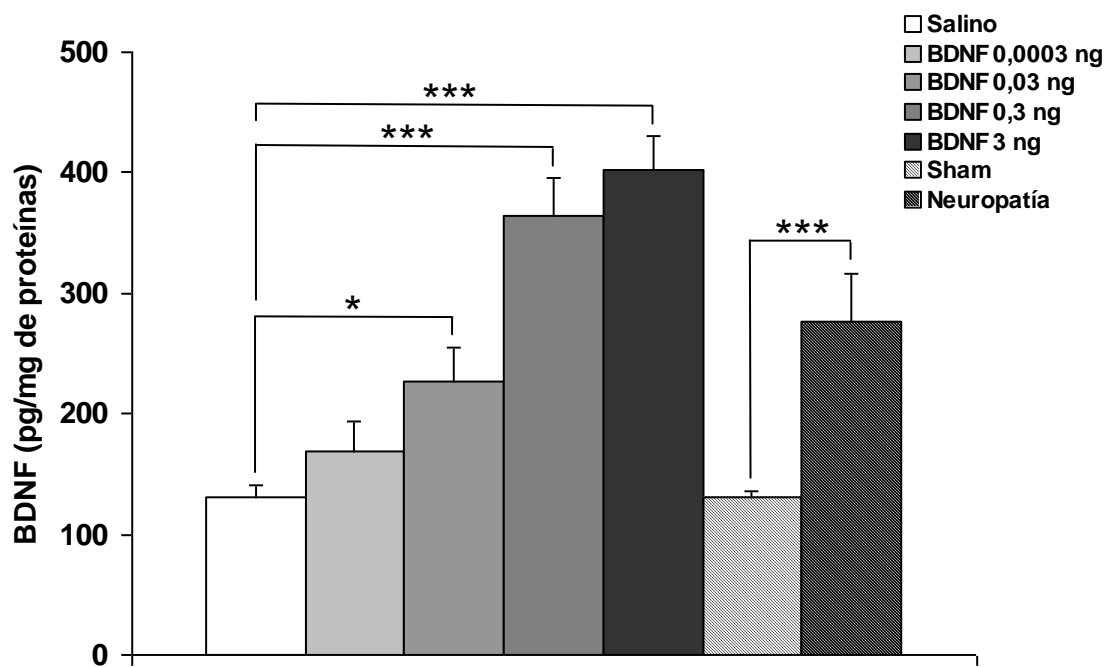


Figura 7. Comparación de la concentración de BDNF (expresada en porcentaje de cambio) en la médula espinal de ratas tratadas con BDNF dosis única (n=6) y ratas mononeuropáticas (n=6), respecto a sus respectivos grupos controles (n=6 respectivamente). Los valores son el promedio \pm SEM. ANDEVA de una vía seguido del test de Bonferroni (***) $p \leq 0,001$.

IX. DISCUSIÓN

Los presentes resultados mostraron que una inyección de BDNF i.t. es suficiente para disminuir el umbral nociceptivo de ratas normales, por un periodo de tiempo de hasta 42 días, sugiriendo que BDNF por si solo es suficiente para generar en la médula espinal un cambio o remodelación perdurable en el tiempo, similar a lo que se observa en dolores crónicos como en la neuropatía. Resultados comparables se obtuvieron mediante la administración repetida de BDNF i.t. (3 dosis similares con 1 semana de intervalo) y con la inducción de neuropatía por sección del nervio sural. Adicionalmente, la administración de BDNF i.t. y el desarrollo de neuropatía fueron capaces de inducir la síntesis de BDNF endógeno en la médula espinal lumbar, dado que los altos niveles de BDNF encontrados a nivel espinal 42 días después de la administración de BDNF exógeno solo pueden corresponder a síntesis *de novo* de la neurotrofina.

Los presentes resultados son coherentes con diversos tipos de evidencia que apoyan la participación de BDNF en los procesos de sensibilización central observados en modelos de animales neuropáticos (Vanelderen *et al.*, 2010). En forma general, podemos señalar que entre dicha evidencia se encuentra la identificación de BDNF en las neuronas sensoriales primarias así como en neuronas de segundo orden y en células gliales de la médula espinal (Pezet *et al.*, 2002b). También se ha descrito regulación de la expresión y liberación de BDNF desde las neuronas sensoriales primarias, así como efectos postsinápticos del BDNF (Bramham y Messaoudi, 2005). Las vías de activación intracelular y los segundos mensajeros generados por BDNF también han sido identificados (Pezet *et al.*, 2002b; Branham y Messaoudi, 2005). Dentro de este conjunto de conocimientos, permanece aún sin descifrar como el BDNF puede generar cambios o modificaciones crónicas que se observan en diferentes modelos de dolor neuropático. A este respecto existen dos posibles hipótesis, la primera es que BDNF active mecanismos de plasticidad neuronal que permanezcan en el tiempo, o alternativamente, que el efecto crónico se genere debido a que

BDNF se mantenga en el tiempo por un sistema de autogeneración. Estas hipótesis son parte de un proyecto mayor del cual esta tesis es solo el trabajo inicial.

Un punto importante a destacar es si BDNF participa en la transmisión normal del impulso nociceptivo o sólo en casos de dolor patológico. BDNF normalmente se encuentra almacenada en vesículas de núcleo denso en las terminaciones espinales de neuronas aferentes primarias, en la cual se co-almacena con glutamato y sustancia-P (Walker *et al.*, 2001). Sin embargo, a pesar que el BDNF se encuentra co-almacenado con otros neurotransmisores, se ha demostrado que es necesaria una frecuencia eléctrica específica de estimulación para producir la liberación de BDNF (Lever *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha mostrado que la administración intratecal de un anticuerpo conjugado al receptor TrkB a ratas normales, el cual secuestra BDNF endógeno, no genera modificaciones en el reflejo evocado por estimulación de fibras C o A, ni altera los umbrales dolor termal y mecánico en esos animales (Kerr *et al.*, 1999). Estos datos sugieren que BDNF modularía la transmisión espinal del dolor sólo cuando la estimulación dolorosa es intensa y repetitiva, lo suficiente como para liberar BDNF endógeno y generar plasticidad a largo plazo.

Antecedentes previos habían señalado que la administración de BDNF exógeno en animales normales genera cambios en la conducta nociceptiva en ratas y ratones. En ratones, la administración intratecal de 75 fmol (equivalentes a 0,002 ng) de BDNF recombinante genera hiperalgesia termal la cual es bloqueada por antagonistas del receptor NMDA, lo cual constituye un efecto pronociceptivo (Groth y Aanonsen, 2002). Adicionalmente, Yajima *et al* (2005), observaron hiperalgesia termal y alodinia táctil después de administrar 50 ng de BDNF i.t. a ratones. En ratas, aunque los antecedentes reportados inicialmente indicaban que la administración intratecal de 12 µg de BDNF generaba un incremento del umbral en la estimulación termal nociceptiva (Pezet *et al.*, 2002b), resultados más recientes indicaron que la administración de 20 µg de BDNF intratecal produce en la rata disminuciones significativas del umbral nociceptivo a la estimulación mecánica, efectos que son replicados por la administración de un adenovirus que expresa BDNF (Coull *et al.*, 2005) y que son coherentes con aquellos reportados en ratón. En conjunto, estos datos muestran que BDNF administrado intratecalmente en

animales sanos genera efectos pronociceptivos, lo que es consistente con las presentes observaciones.

Interesantemente, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que los efectos pronociceptivos de BDNF intratecal persistieron por 42 días, aún después de una inyección única de sólo 0,0003 ng de BDNF i.t. Los estudios previos contemplaron períodos de observación de solo algunas horas (Pezet *et al.*, 2002a; Coull *et al.*, 2005) en rata, y de hasta 6 días (Yahima *et al.*, 2005) en ratón. Como se señalara anteriormente, existen dos posibles hipótesis para explicar la inusual duración del efecto pronociceptivo de la neurotrofina: (i) la primera es que BDNF activa mecanismos de plasticidad neuronal que se mantienen en el tiempo, o alternativamente (ii) que el efecto crónico se genera debido a que BDNF perdura en el tiempo por un sistema de autogeneración.

La primera alternativa se basa en los ya conocidos mecanismos de transducción de señales de BDNF, que incluyen las cascadas ras-raf-MEK-ERK, P13K-Akt-GSkKIII, PLCgama-DAG-PKC-CamKII y que finalmente, vía fosforilación de CREB, activan a diversos genes que generan proteínas implicadas en remodelación neuronal. La segunda alternativa implica a las mismas vías, pero generando como producto final la síntesis de nuevo BDNF, el cual puede ser exocitado a nivel dendrítico por secreción constitutiva (independiente de calcio) y/o dependiente de actividad (calcio-dependiente) (Kuczewski *et al.*, 2009); el BDNF exocitado podría activar receptores TrkB de la misma neurona (autocrinamente) y de neuronas vecinas (paracrinamente), lo que induciría “río abajo” (vía ras-MAP kinasas) la fosforilación de CREB (Patapoutian y Reichardt, 2001), lo que llevaría a la autogeneración de más BDNF, perpetuando el proceso neuroplástico. Ambas alternativas implican necesariamente efectos genómicos, lo que asegura su persistencia temporal, pero la segunda implica la síntesis de BDNF endógeno como factor crucial para la mantención del efecto hiperalgésico del BDNF intratecal. Las determinaciones de BDNF a nivel espinal mediante ELISA decididamente apoyan a la segunda alternativa, dado que los niveles de BDNF estuvieron significativamente incrementados 42 días después de la administración intratecal de BDNF recombinante. El BDNF medido en estas condiciones solo puede corresponder a BDNF endógeno, dado que no es probable encontrar BDNF

exógeno después de 42 días de administración. A modo de ejemplo, los niveles de BDNF endógeno decrecen un 50% cuatro días después de administrar intratecalmente un oligonucleótido antisentido contra BDNF (que bloquea su síntesis) (Groth y Aaronsen, 2002), lo que demuestra un recambio relativamente rápido de esta molécula, incompatible con una persistencia de varias semanas en el caso del BDNF recombinante administrado. Se debe señalar, sin embargo, que el BDNF medido a nivel espinal no es solo de origen neuronal (aférentes primarios nociceptivos y/o neuronas intrínsecas espinales), dado que la glía espinal también es capaz de sintetizar y secretar BDNF (Tokumine *et al.*, 2003).

Es interesante señalar que la médula espinal lumbar, proveniente de ratas mononeuropáticas, también mostró niveles aumentados de BDNF, equivalentes a los observados en médula lumbar de ratas que recibieron BDNF intratecal. Niveles elevados de BDNF espinal se han descrito muy recientemente en ratas mononeuropáticas (Geng *et al.*, 2010). Aunque ésta es una observación correlacional, sugiere la participación directa o indirecta de BDNF endógeno en la hiperalgesia inducida en procesos neuropáticos. Experimentos futuros, diseñados para impedir el incremento de BDNF endógeno posterior a la inducción de neuropatía (mediante inhibidores de la cascada ras-MAPK), podrán entregar valiosos datos respecto a la validez de la hipótesis anterior.

X. CONCLUSIONES

1. La administración de BDNF intratecal produce un estado hiperalgésico que se mantiene por 42 días.
2. La administración de 3 inyecciones de BDNF intratecal con una semana de intervalo produce efectos similares a los que produce solo una inyección de BDNF intratecal.
3. La sección del nervio sural en la rata genera hiperalgesia mecánica que se mantiene por 42 días, constituyendo un modelo experimental de neuropatía.
4. La administración de BDNF intratecal genera niveles elevados de BDNF en la médula espinal lumbar, 42 días después de administrada la neurotrofina, equivalentes a los que se observan en ratas mononeuropáticas.
5. Parte de los efectos crónicos de BDNF intratecal probablemente se producen por una autogeneración de BDNF endógeno.
6. El dolor crónico de los animales neuropáticos podría ser producto de la liberación y autogeneración de BDNF en la médula espinal.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 15: 549-553.
- Basbaum A, Bushnell C, Devor M. 2005. Pain: basic mechanism. **In:** Pain 2005-An update refresher course syllabus. Ed. Douglas M Justins, IASP Press, Seattle.
- Blood, DC, Radostits, OM. 1992. *Medicina Veterinaria*. 7º edición, vol. 1. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. Barcelona, España. 851 p.
- Bramham CR, Messaoudi E. 2005. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol.* 76: 99-125.
- Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. 2006. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10: 287-333.
- Coull, JM, Beggs, M, Boudreau, D, Boivin, D, Tsuda, M, Inoue, K, Gravel, C, Salter, M, De Konink, Y. 2005. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017-1021
- Decosterd I, Woolf CJ. 2000. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87: 149-158.
- Geng SJ, Liao FF, Dang WH, Ding X, Liu XD, Cai J, Han JS, Wan Y, Xing GG. 2010. Contribution of the spinal cord BDNF to the development of neuropathic pain by activation of the NR2B-containing NMDA receptors in rats with spinal nerve ligation. *Exp Neurol.* 222: 256-266.
- Groth, R., Aanonsen, L. 2002. Spinal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) produces hyperalgesia in normal mice while antisense directed against either BDNF or trkB, prevent inflammation-induced hyperalgesia. *Pain* 100: 171–181.
- Gutierrez, G., Cadena, LP. 2001. Breve reseña histórica sobre el estudio del dolor. *MedUnab* 10: 110-115.
- Kerr BJ, Bradbury EJ, Bennett DL, Trivedi PM, Dassan P, French J, Shelton DB, McMahon SB, Thompson SW. 1999. Brain-derived neurotrophic factor modulates

- nociceptive sensory inputs and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord. *J Neurosci.* 19: 5138-5148.
- Kuczewski N, Porcher C, Lessmann V, Medina I, Gaiarsa JL. 2009. Activity-dependent dendritic release of BDNF and biological consequences. *Mol Neurobiol.* 39:37-49.
 - Lee SL, Kim JK, Kim DS, Cho HJ. 1999. Expression of mRNAs encoding full-length and truncated trkB receptors in rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation. *Neuroreport* 10: 2847–2851.
 - Lever IJ, Bradbury EJ, Cunningham JR, Adelson DW, Jones MG, McMahon SB, Marvizón JC, Malcangio M. 2001. Brain-derived neurotrophic factor is released in the dorsal horn by distinctive patterns of afferent fiber stimulation. *J Neurosci.* 21: 4469-4477.
 - Merighi, A, Salio, C, Ghirri, A, Lossi L, Ferrini F, Betelli C, Bardoni R. 2008. BDNF as a pain modulator. *Progr Neurobiol*, 85: 297-317.
 - Merskey HM, Bogduk N. 1994. *Classification of Chronic Pain*, 2nd ed., IASP Press, Seattle, pp. 209-214.
 - Merskey HM, Loeser JD, Dubner R. 2005. *The paths of pain 1975-2005*, IASP Press, Seattle, 550 p.
 - Mestre C, Péliissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A. 1994. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Meth.* 32: 197-200.
 - Mogil J. 2009. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci.* 10: 283-294.
 - Molony V. y Kent J. E. 1997. Assessment of Acute Pain in Farm Animals Using Behavioral and Physiological Measurements. *J Anim Sci.* 75: 266-272.
 - National Institute of Health. 1996. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Ed. National Academy Press, Washington D.C..
 - Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H. 2010. BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol Histopathol.* 25: 237-258.
 - Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Mizushima T, Fukuoka T, Tokunaga A, Yoshikawa H, Noguchi K. 2004. Contribution of degeneration of motor and sensory fibers to pain

- behavior and the changes in neurotrophic factors in rat dorsal root ganglion. *Exp Neurol.* 188: 149–160.
- Onda A, Murata Y, Rydevik B, Larsson K, Kikuchi S, Olmarker K. 2004. Infliximab attenuates immunoreactivity of brain-derived neurotrophic factor in a rat model of herniated nucleus pulposus. *Spine* 29: 1857-1861.
 - Paeile, C, Bilbeny, N. 2005. *El dolor: De lo molecular a lo clínico.* 3 ° edición. Ed. Mediterráneo Ltda. Santiago, Chile. 704p.
 - Patapoutian A, Reichardt LF. 2001. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* 11: 272-280.
 - Pezet, S., Malcangio, M., Lever, I.J., Perkinson, M.S., Thompson, S.W., Williams, R.J., McMahon, S.B. 2002a. Noxious stimulation induces Trk receptor and Downstream ERK phosphorylation in spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci.* 21: 684–695.
 - Pezet, S, McMahon, S. 2006. Neurotrophins: Mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci.* 29: 507-538.
 - Pezet S, Cunningham J, Patel J, Grist J, Gavazzi I, Lever IJ, Malcangio M. 2002b. BDNF modulates sensory neuron synaptic activity by a facilitation of GABA transmission in the dorsal horn. *Mol Cell Neurosci.* 21: 51-62.
 - Randall LO, Selitto JJ. 1957. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 111: 409-419.
 - Sarchielli P, Gallai V. 2004. Nerve growth factor and chronic daily headache: a potential implication for therapy. *Expert Rev Neurother.* 4: 115–127.
 - Tokumine J, Kakinohana O, Cizkova D, Smith DW, Marsala M. 2003. Changes in spinal GDNF, BDNF, and NT-3 expression after transient spinal cord ischemia in the rat. *J Neurosci Res.* 74: 552-561.
 - Vanelderden P, Rouwette T, Kozicz T, Roubos E, Van Zundert J, Heylen R, Vissers K. 2010. The role of brain-derived neurotrophic factor in different animal models of neuropathic pain. *Eur J Pain.* 14: 473.e1-9.
 - Walker SM, Mitchell VA, White DM, Rush RA, Duggan AW. 2001. Release of immunoreactive brain-derived neurotrophic factor in spinal cord of the rat following sciatic nerve transection. *Brain Research* 899: 240-247.

- Yajima, Y., Narita, M., Usui, A., Kaneko, C., Miyatake, M. 2005. Direct evidence for the involvement of brain-derived neurotrophic factor in the development of a neuropathic pain-like state in mice. *J. Neurochem.* 93: 584-594.
- Zhang JY, Luo XG, Xian CJ, Liu ZH, Zhou XF. 2000. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci.* 12: 4171-4180.
- Zhou XF, Deng YS, Xian CJ, Zhong JH. 2000. Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats. *Eur J Neurosci.* 12: 100–105.

XII. ANEXOS

Tabla I

Resultados de las distintas dosis de BDNF (múltiples o únicas) y comparación estadística contra salino (***) = $P \leq 0,001$) o contra las diferentes dosis entre si (& = $P \leq 0,05$; & = $P \leq 0,001$).

Fármacos	Dosis múltiples 0 a 42 días (ABC)	Dosis única 0 a 42 días (ABC)
Salino	11019,8 ± 276,0 (n=6)	11293,2 ± 131,7 (n=6)
BDNF 0,0003 ng	7895,7 ± 200,6 (n=7) ***	9306,7 ± 153,0 (n=6)
BDNF 0,03 ng	9378,8 ± 96,0 (n=6) ***	8477,6 ± 146,6 (n=7) ***
BDNF 0,3 ng	8213,0 ± 101,2 (n=6) *** &	8908,7 ± 18,9 (n=6) ***
BDNF 3 ng	7858,3 ± 138,9 (n=6) *** &&&	9057,0 ± 85,9 (n=6) ***

Tabla II

Resultados de las ratas *sham* y ratas neuropáticas. Diferencias estadísticas entre ambos grupos (***) = $P \leq 0,001$.

Tiempo	Ratas Sham	Ratas Neuropáticas
Día 0	277,5 ± 8,3 (n=6)	268,7 ± 12,9 (n=6)
Día 3	261,9 ± 11,9 (n=6)	174,4 ± 3,5 (n=6) ***
Día 7	258,1 ± 11,3 (n=6)	153,1 ± 3,3 (n=6) ***
Día 10	249,34 ± 4,4 (n=6)	157,5 ± 3,1 (n=6) ***
Día 14	252,5 ± 8,9 (n=6)	155,6 ± 5,5 (n=6) ***
Día 17	255,6 ± 13,1(n=6)	165,0 ± 4,0 (n=6) ***
Día 21	255,6 ± 12,5 (n=6)	165,6 ± 2,5 (n=6) ***
Día 28	246,9 ± 8,6 (n=6)	181,9 ± 5,5 (n=6) ***
Día 35	255,6 ± 10,2 (n=6)	186,9 ± 8,7 (n=6) ***
Día 42	251,3 ± 6,8 (n=6)	191,90 ± 9,5 (n=6) ***