

Identificación microneurográfica de la actividad espontánea de los nociceptores C en los estados de dolor neuropático en humanos y ratas

Microneurographic identification of spontaneous activity in C-nociceptors in neuropathic pain states in humans and rats. Publicado en la Revista Pain 2012;153:42-55

Jordi Serra^{1,2}, Hugh Bostock^{1,4}, Romà Solà^{1,2}, Jordi Aleu^{1,2},
Elizabeth García^{1,2}, Barbara Cokic^{1,2}, Xavier Navarro³, Cristina Quiles^{1,2}



Jordi Serra, MD
Neurólogo
jserra@nsc-tec.com

¹ *Tecnologías en Neurociencias, Parque Científico de Barcelona, Barcelona, España.*

² *Departamento de Neurología, Mutual MC, Barcelona, España.*

³ *Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Instituto de Neurociencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, España.*

⁴ *Sobell Department of Motor Neuroscience and Movement Disorders, Institute of Neurology, University College London, London, UK.*

RESUMEN

Los nociceptores de las fibras de tipo C normalmente no disparan potenciales de acción a menos que sean estimulados por estímulos nocivos adecuados. Sin embargo, en estados patológicos, los nociceptores pueden volverse hiperexcitables y generan descargas ectópicas espontáneas. El objetivo de este estudio fue comparar modelos de dolor neuropático en ratas y evaluar su idoneidad para modelar la actividad espontánea de los nociceptores C que se encontró en pacientes con dolor neuropático. Los estudios fueron realizados en ratas normales (n=40), sujetos humanos sanos (n=15), pacientes con dolor neuropático periférico (n=20) y en cinco modelos de dolor neuropático en ratas: aplastamiento de nervio (n=24), sutura (n=14), lesión por compresión crónica (n = 12), neuropatía diabética inducida por estreptozotocina [STZ] (n=56) y neuropatía inducida por 2,3-dideoxicidina [ddC] (n=15). Los registros microneurográficos fueron combinados con la estimulación eléctrica para monitorear la actividad en múltiples fibras de tipo C. La estimulación con 0,25 Hz permitió que los impulsos espontáneos puedan ser identificados por las fluctuaciones de la latencia basal. Las fluctuaciones anormales de la latencia podrían ser producidas por varios mecanismos. La actividad espontánea fue identificada de manera más fidedigna por la presencia de incrementos inexplicables de la latencia, correspondientes a dos o más potenciales de acción adicionales. La actividad espontánea estuvo presente en determinada proporción de nociceptores de tipo C insensibles a los estímulos mecánicos en los pacientes y en todos los modelos en ratas. Los tres modelos animales de lesión traumática focal en nervios presentaron la proporción más alta (59,5%), mientras que los dos modelos de polineuropatía tuvieron menos (18,6%), en tanto que los pacientes mostraron una proporción intermedia (33,3%). No se registraron nociceptores C sensibles a los estímulos mecánicos espontáneamente activos. Los registros microneurográficos de la actividad espontánea de los nociceptores C enfermos pueden ser de utilidad para el estudio de drogas a corto y largo plazo, tanto en animales como en humanos.

Palabras clave: microneurografía; dolor neuropático; nociceptor

ABSTRACT

C-nociceptors do not normally fire action potentials unless challenged by adequate noxious stimuli. However, in pathological states nociceptors may become hyperexcitable and may generate spontaneous ectopic discharges. The aim of this study was to compare rat neuropathic pain models and to assess their suitability to model the spontaneous C-nociceptor activity found in neuropathic pain patients. Studies were performed in normal rats (n = 40), healthy human subjects (n = 15), peripheral neuropathic pain patients (n = 20), and in five rat neuropathic pain models: nerve crush (n = 24), suture (n = 14), chronic constriction injury (n = 12), STZ-induced diabetic neuropathy (n = 56), and ddC-induced neuropathy (n = 15). Microneurographic recordings were combined with electrical stimulation to monitor activity in multiple C fibers. Stimulation at 0.25 Hz allowed spontaneous impulses to be identified by fluctuations in baseline latency. Abnormal latency fluctuations could be produced by several mechanisms, and spontaneous activity was most reliably identified by the presence of unexplained latency increases corresponding to two or more additional action potentials. Spontaneous activity was present in a proportion of mechano-insensitive C-nociceptors in the patients and all rat models. The three focal traumatic nerve injury models provided the highest proportion (59.5%), whereas the two polyneuropathy models had fewer (18.6%), and the patients had an intermediate proportion (33.3%). Spontaneously active mechano-insensitive C-nociceptors were not recorded. Microneurographic recordings of spontaneous activity in diseased C-nociceptors may be useful for both short- and long-term drug studies, both in animals and in humans.

Keywords: Microneurography; Neuropathic pain; Nociceptor

INTRODUCCIÓN

El dolor neuropático es una de las principales causas de sufrimiento humano, que afecta hasta a un 7% de la población general.⁷ Los pacientes con dolor neuropático se quejan de dolores espontáneos, descritos como ardor, dolor profundo o disestésico.^{2,3} Los diferentes mecanismos involucrados en las distintas sensaciones de dolor siguen siendo pobremente comprendidos, pero existe una amplia evidencia acerca de que las descargas anormales de las neuronas somatosensoriales enfermas serían las responsables.^{1,9,10,16,26,27} La actividad espontánea en el sistema nociceptivo periférico también puede provocar cambios en el sistema nervioso central responsables de la hiperalgesia y alodinia.^{21,43} Por lo tanto, los fármacos dirigidos a controlar los mecanismos generadores de descargas espontáneas de los nociceptores potencialmente podrían ofrecer un excelente tratamiento para el dolor neuropático.

Previamente se ha argumentado que la microneurografía nos provee la extraordinaria oportunidad de evaluar la eficacia de los diferentes factores que contribuyen a detener la actividad anormal en curso de los nociceptores periféricos enfermos, tanto en modelos animales como en pacientes humanos.³² Si bien es cierto que la microneurografía no está diseñada para evaluar un gran número de factores, sin embargo, podría proporcionar una prueba inicial de concepto¹ para candidatos preseleccionados; de esta forma se evitaría una tasa enorme y costosa de fracasos en las fases I y II de los estudios clínicos debido a la falta de eficacia.²⁹

Aunque en humanos la microneurografía es la única técnica disponible para registrar la actividad espontánea de los nociceptores, para los modelos animales existen otras alternativas.^{15,23,44} Pero la microneurografía en los modelos de ratas tiene la ventaja de proporcionar registros que pueden ser comparados directamente con los obtenidos en pacientes humanos. Además, la técnica es menos destructiva, lo que permite que los nervios permanezcan indemnes, de modo que se puedan realizar dos o más registros en el mismo animal.³⁶ Más importante aún es el hecho de que la microneurografía combinada con la estimulación eléctrica proporciona un método eficiente para categorizar a las fibras de tipo C² según sus respuestas a la desaceleración de la velocidad de conducción dependiente de la actividad con 2 Hz^{33,34} y también para identificar la actividad espontánea a partir de las fluctuaciones de la latencia durante la estimulación basal con 0,25 Hz.^{26,35} La eficiencia depende de la manera en que las «imágenes rasterizadas» («*raster plots*», en inglés)³ de latencia vs tiempo puedan ser utilizadas para monitorear simultáneamente la actividad en múltiples fibras C, evitando así la necesidad de obtener registros precisos de una sola unidad.

El presente estudio se realizó para proporcionar información importante antes de que la microneurografía pueda ser utilizada sistemáticamente en la evaluación de la actividad espontánea de los nociceptores. Además, hemos intentado resolver las siguientes preguntas: ¿Cómo las fluctuaciones de la latencia causadas por la actividad espontánea de los nociceptores podrían ser fácilmente distinguidas de aquellas que se producen normalmente en las fibras en reposo?, ¿de qué manera los distintos modelos de dolor neuropático difieren cuantitativamente de los nociceptores C con respecto a la generación de la actividad espontánea?, ¿pueden distinguirse los patrones de descarga ectópica entre sí o de aquellos patrones vistos en pacientes con dolor neuropático?

Los principales hallazgos fueron: 1) las fluctuaciones de la latencia normalmente no exceden del 0,3%, pero tales incrementos de la latencia correspondientes a dos o más impulsos adicionales son suficientes para proporcionar evidencia inequívoca de actividad espontánea; 2) todos los modelos de dolor neuropático investigados produjeron tipos similares de actividad espontánea, que también se parecían a la de los pacientes con dolor neuropático, y 3) todos los modelos produjeron descargas espontáneas abundantes y de larga duración, por lo cual son aptos para su uso en la evaluación de drogas analgésicas.

MÉTODOS

Los registros microneurográficos fueron obtenidos de pacientes con dolor neuropático y de ratas en cinco modelos experimentales de dolor neuropático. Los pacientes firmaron el consentimiento informado de conformidad con el protocolo de estudio aprobado por los comités de ética locales. Los procedimientos experimentales con animales se efectuaron de acuerdo con las recomendaciones de la Unión Europea para el cuidado y uso de animales de laboratorio y fueron aprobados por los comités de ética de experimentación animal de la Universidad Autónoma de Barcelona y la Universidad de Barcelona.

Pacientes con dolor neuropático

Los registros fueron obtenidos de veinte pacientes consecutivos (de 26 a 67 años; 13 pacientes femeninos y 7 masculinos) referidos a nuestra clínica por dolor neuropático periférico. Uno presentó como antecedente una lesión traumática del nervio peroneo superficial. Los otros diecinueve pacientes tenían neuropatía de fibras pequeñas: nueve presentaron neuropatía sensorial idiopática; tres, neuropatía diabética dolorosa; uno, intolerancia oral a la glucosa; dos, enfermedad de Fabry; dos, neuropatía sensorial hereditaria; uno,

enfermedad de Lyme, y uno, enfermedad de Crohn. Todos los pacientes fueron sometidos a una evaluación clínica neurológica acorde con los criterios actuales.^{18,22} El dolor continuo en el momento del examen microneurográfico fue cuantificado empleando una escala de valoración verbal (EVV), con puntajes de 0 a 10.²⁰

Modelos experimentales animales

El estudio fue realizado utilizando tres modelos de lesión nerviosa focal (aplastamiento, $n = 24$; sutura, $n = 14$, y lesión por compresión crónica [LCC], $n = 12$) y dos modelos de polineuropatía generalizada (neuropatía inducida por estreptozotocina [STZ], $n = 56$, y neuropatía inducida por 2,3-dideoxicidina [ddC], $n = 15$) en ratas Sprague-Dawley macho adultas (de 200-350 g).

Para los modelos de lesión focal, los animales fueron sometidos a cirugía, para lo cual fueron anestesiados con ketamina (90 mg/kg intraperitoneal) y xilacina (9 mg/kg intraperitoneal); también se empleó instrumental microquirúrgico y un microscopio para la disección. Para producir una lesión por aplastamiento, se expuso el nervio ciático a nivel de la mitad del muslo y liberó de sus adherencias epineurales a los tejidos circundantes, luego fue aplastado tres veces consecutivas con un fórceps Dumont N° 5 en un mismo punto, a 90 mm de la punta del tercer dedo. Para producir el modelo de lesión nerviosa por sutura, el nervio ciático fue cortado limpiamente con una hoja de bisturí afilada y se suturaron los extremos con seda 9/0. Para el modelo de lesión por compresión crónica,⁴ el nervio ciático fue expuesto a nivel de la mitad del muslo de la rata, próximo a la trifurcación del nervio ciático y se colocaron cuatro ligaduras (con catgut crómico 4/0) a intervalos de 1 mm aproximadamente. A continuación, la herida fue suturada por planos y desinfectada con iodopovidona. A los animales se les mantuvo en un ambiente cálido hasta su recuperación completa de la anestesia y se les permitió que se recuperen de la lesión nerviosa durante al menos un mes.

Los registros fueron obtenidos en diferentes momentos, dependiendo de la recuperación después de la lesión focal del nervio. Las ratas con lesión por aplastamiento fueron registradas entre los meses 2 y 3; las suturadas, entre los meses 3 y 6 y aquellas con lesión por compresión crónica, entre los meses 1 y 2. Un subconjunto de ratas con lesión por aplastamiento fue utilizado para estudios longitudinales repetidos después de la lesión nerviosa (nueve ratas fueron sometidas a registro dos veces y tres ratas, cuatro veces) de 2 a 9 meses. Un solo animal del grupo de lesión por aplastamiento fue registrado 18 meses después de la inducción de la lesión.

Para el modelo de polineuropatía, se indujo la neuropatía diabética con una inyección de estreptozotocina intraperitoneal, a una dosis de 45 mg/kg de peso corporal. Los animales fueron incluidos en el estudio si los niveles de su glicemia eran mayores de 250 mg/dL a las 72 horas después de la administración de estreptozotocina y en el día mismo del registro. La neuropatía antirretroviral fue inducida con ddC intraperitoneal (50 mg/kg) tres veces por semana durante 3 semanas.⁴⁰ Las ratas diabéticas fueron registradas a las 4, 8 y 12 semanas después de la inyección de estreptozotocina y las ratas inyectadas con ddC, 1, 2 y 3 semanas después de finalizado el período de tratamiento.

Registros microneurográficos

La microneurografía³⁹ fue utilizada en humanos para registrar los potenciales de acción de las fibras C del nervio peroneo superficial en el tobillo, utilizando microelectrodos de tungsteno (de 200 μm de diámetro, con aislamiento de laca, con una impedancia nominal de 1 M Ω). Se insertó en la piel un electrodo subcutáneo de referencia a 2 cm lejos del tronco nervioso. Las señales neurales fueron amplificadas con un amplificador aislado, con impedancia de alta entrada (Neuro Amp Ex, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia), con filtro paso banda⁴ (con un rango máximo de 50-5000 Hz), que alimentaba a un eliminador de ruido (Hum Bug, Quest Scientific, North Vancouver, BC, Canadá) y a un monitor digital de audio (audio monitor AM10, Grass Technologies, Astro-Med, Inc, USA). La temperatura de la piel fue medida bien con una termocupla colocada en la piel adyacente a los campos de recepción de las unidades bajo estudio o con un teletermómetro infrarrojo (PCE-IR10, PCE Ibérica, España). Se dispararon estímulos eléctricos y las respuestas a la estimulación eléctrica fueron digitalizadas con una tarjeta de adquisición de datos (PCI-6221, National Instruments, USA) y registradas en una computadora personal. El filtrado digital (paso banda, 0,3-2 kHz) y la determinación del nivel basal se realizaron tanto en línea como durante el análisis fuera de línea, para una mejor visualización de los potenciales de acción.

En los animales, los registros microneurográficos fueron realizados con las ratas anestesiadas con ketamina (90 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg), inyectadas intraperitonealmente. El nervio ciático fue expuesto a nivel de la mitad del muslo y se efectuaron los registros intraneurales de acuerdo con un método recientemente descrito con detalle en un artículo nuestro ya publicado.³⁶ Con excepción de los estimuladores eléctricos, el equipo utilizado para los registros en los animales fue exactamente el mismo que el utilizado en los humanos.

Análisis de las respuestas

Las respuestas fueron registradas con el software QTRAC (Institute of Neurology, London, UK), que tiene la capacidad de determinar múltiples picos de latencia e inmediatamente mostrarlos como «perfiles» de latencia en un tipo de gráfico conocido como «*raster plot*» (imagen rasterizada). En las imágenes rasterizadas de latencia, cada pico en la señal de voltaje filtrada que sobrepasó un nivel específico previamente determinado está representado por un punto en la trama o gráfica en la cual la latencia corresponde al eje de las ordenadas y el tiempo al de las abscisas.³³ Según el nivel elegido, los puntos podrían representar potenciales de acción o ruido (interferencia). Para las imágenes rasterizadas mostradas aquí, las latencias de las unidades seleccionadas con una adecuada relación señal/ruido⁵ fueron medidas nuevamente a partir de la información pura (en bruto), de modo que cada punto representa una sola unidad identificada. Estas figuras o imágenes vueltas a medir se denominan imágenes rasterizadas «modificadas».

Procedimiento de búsqueda de las fibras C utilizando estimulación eléctrica y natural

El territorio de inervación del fascículo que ha sido atravesado por el microelectrodo fue buscado al tocar o rascar suavemente la piel hasta que se pudiera escuchar una respuesta audible característica evocada por contacto. Esta zona se buscó mediante la estimulación eléctrica con un par de electrodos aguja, utilizando pulsos rectangulares de 0,25-0,50 ms en humanos (DS7A, Digitimer, UK) y de 0,50-1 ms en ratas (A385, WPI, USA). La velocidad de conducción fue calculada dividiendo la distancia de conducción entre la latencia basal, mientras que la tasa de estimulación era de 0,25 Hz. Sólo fueron estudiadas las latencias de los potenciales de acción evocadas compatibles con el rango de la velocidad de conducción en las fibras C (< 2 m/s). Las respuestas vinculadas con el tiempo y con dichas latencias se muestran en las imágenes rasterizadas, generalmente como líneas rectas de puntos, a diferencia de los puntos aleatorios originados por el ruido de fondo.^{33,6}

Evaluación de los cambios de larga duración de la latencia en las fibras de los nociceptores C

Un potencial de acción propagado en un axón desmielinizado provoca cambios en la velocidad de conducción tanto de corta (< 1 s) como de larga duración (hasta unos pocos minutos). Los cambios de corta duración pueden ser en dirección de la aceleración (supernormalidad) o la desaceleración (subnormali-

dad) y probablemente dependen de si el balance del movimiento de la carga durante el potencial de acción (primariamente causado por el ingreso de iones Na^+ y Ca^{2+} y la salida de iones K^+) deja a la membrana despolarizada o hiperpolarizada al finalizar el potencial de acción.⁵ Los cambios de larga duración normalmente se dan en dirección de la desaceleración y están causados probablemente por múltiples factores que interactúan, entre los cuales se encuentran la hiperpolarización por la bomba electrogénica de sodio,³⁰ la acumulación intraaxonal de Na^{+17} y el proceso de inactivación parcial de los canales de Na^+ .¹⁴ Estos cambios de larga duración se acumulan durante las series de potenciales de acción y proveen las bases para el empleo de la desaceleración dependiente de la actividad con el propósito de identificar los tipos de las fibras. Para este fin, hemos utilizado la siguiente secuencia: (1) estimulación basal con 0,25 Hz durante 3 min; (2) pausa de 3 min; (3) 6 min con 0,25 Hz; (4) serie de 2 Hz durante 3 min, y (5) retorno a la línea basal con 0,25 Hz hasta que las latencias regresen a sus valores originales.^{33,34} Este método ha demostrado ser extremadamente valioso para diferenciar los «perfiles» de desaceleración dependientes de la actividad en determinados tipos funcionales de fibras C tanto en humanos^{12,33,34} como en ratas.³⁶ Así, los nociceptores son distinguidos por un progresivo incremento de la latencia mayor del 10% durante la estimulación con 2 Hz, mientras que la estimulación con bajas velocidades después de una pausa diferencia a los nociceptores de tipo C sensibles a los estímulos mecánicos (mecanosensibles o de tipo 1A) de los insensibles a los estímulos mecánicos (tipo 1B) (es decir, a las unidades CM de las CMI, respectivamente).^{33,34,41}

Evaluación de los cambios de latencia que se producen espontáneamente

Durante la estimulación basal con 0,25 Hz, todas las fibras C tienden hacia una latencia estable, por lo que producen líneas casi planas en los imágenes rasterizadas de la latencia. Sin embargo, siempre hay algunas pequeñas variaciones de la latencia (por debajo de milisegundos), debido a la interferencia eléctrica en el sistema de registro y posiblemente también a causa de otros factores tales como el comportamiento estocástico⁷ de los canales de sodio,¹⁹ que creemos no ha sido investigado previamente. Por otro lado, nosotros y otros investigadores hemos demostrado previamente que la actividad espontánea de las fibras C induce cambios en la latencia dependientes de la actividad que son del orden de los milisegundos.^{11,12,26,27,35} Bajo estas condiciones, la actividad espontánea de las fibras C típicamente produce imágenes rasterizadas de la latencia con la apariencia irregular de «dientes de sierra».

Para evaluar si las fluctuaciones de la latencia pueden ser utilizadas para separar a los nociceptores C en reposo de los activos espontáneamente, medimos la **variación de la latencia entre los estímulos (Jsd)**, definida como la desviación estándar de los cambios de la latencia de un estímulo al siguiente. También hemos medido la **asimetría estadística** (tercer momento estandarizado) de los cambios de la latencia como un índice de la apariencia de «dientes de sierra». Los cambios espontáneos de la latencia fueron medidos en los nociceptores C de los controles humanos y las ratas normales indemnes y luego comparados con aquellos producidos en las ratas con lesiones nerviosas y en pacientes con polineuropatía.

Ondas del potencial de acción

Las latencias de una sola unidad identificada que fueron medidas nuevamente, fueron utilizadas para alinear las ondas del potencial de acción de la unidad al intervalo más próximo de la muestra (50 μ s) antes de la superposición o el promedio.

RESULTADOS

En la primera sección de resultados (comenzando con la sección 3.1) presentamos información sobre las fluctuaciones normales y anormales de la latencia empleadas para desarrollar los criterios de identificación de la actividad espontánea; en la segunda sección (iniciando con la sección 3.2) utilizamos estos criterios para comparar las descargas espontáneas de los nociceptores en los pacientes con los encontrados en los diferentes modelos de dolor neuropático en ratas.

Fluctuaciones normales y anormales de la latencia no relacionadas con la actividad espontánea

Variación de la latencia en nociceptores normales

El método de registro de las variaciones de la latencia está ilustrado en el gráfico 1. Se trata de una unidad de tipo 1B o CMi, tal como lo indica la desaceleración del 3,1% después de la pausa de la estimulación (**b**) y la desaceleración mayor del 10% durante la estimulación con 2 Hz. Se seleccionó una parte del registro correspondiente al momento en que los cambios de la latencia presentaron un patrón estable (**a**) y se halló que la distribución de los cambios de la latencia estuvo cercana a la curva de Gauss (**B, C**), con una desviación estándar (**Jsd**) de 0,07 ms, ó 0,1% de la latencia basal. El cambio máximo de la latencia entre barridos sucesivos fue cercano a 0,14 ms ó 0,2%, que fue mucho menor de la mitad de los cambios de la latencia que ocurrieron al inicio de la serie de estímulos con 2 Hz debido a dos picos adicionales, es decir, 1,03 ms (**c**)

ó 1,46%. En este caso, por lo tanto, los cambios de la latencia resultantes de los impulsos adicionales pudieron ser claramente distinguidos de aquellos ocurridos debido a las variaciones espontáneas de la latencia. La variación (fluctuación) de la latencia, medida de esta forma en cuatro clases de nociceptores C normales (es decir, en humanos y ratas, de los tipos 1A y 1B), está representada en el gráfico 2. El gráfico 2A muestra que para todas estas clases de nociceptores existe una fuerte correlación lineal entre la Jsd (en milisegundos) y la latencia de la conducción. Así, para las fibras de tipo 1A de 21 ratas, el coeficiente de correlación fue $R = 0,756$ ($P = 9,3 \times 10^{-5}$); para las fibras 1B de 21 ratas, $R = 0,739$ ($P = 1,6 \times 10^{-4}$); para las fibras 1A de 20 humanos, $R = 0,889$ ($P = 3,2 \times 10^{-7}$), y para las fibras 1B de 19 humanos, $R = 0,851$ ($P = 6,1 \times 10^{-6}$). Debido a que la fluctuación está tan íntimamente relacionada con la latencia, generalmente presentamos a la Jsd, al igual que a la desaceleración dependiente de la actividad, como un porcentaje de la latencia basal. Los valores promedio de la Jsd en los nociceptores de las ratas (media \pm SD, $0,092 \pm 0,027\%$; $n = 42$) fueron mayores que en los nociceptores humanos ($0,061 \pm 0,017\%$; $n = 39$; prueba t Student para la diferencia de medias, $P < 0,0001$). Todos estos valores para la Jsd en los nociceptores normales fueron menores de 0,3 ms y del 0,2% de la latencia basal.

La variación de la latencia en las fibras normales puede surgir en el sitio mismo de la estimulación, a lo largo del trayecto del axón debido al comportamiento estocástico de los canales de sodio responsables de la conducción¹⁹ o en el sitio del registro a causa de una interacción entre la forma del pico y el ruido de fondo. Para evaluar si el aumento de la variación de la latencia fue debido a la acumulación de fluctuaciones en el trayecto de una distancia de conducción más larga, evaluamos las correlaciones entre la Jsd en el tiempo (milisegundos) y la distancia. Encontramos que no hubo una correlación significativa para ninguna de las cuatro clases de nociceptores C (todos $R < 0,3$, todos $P > 0,18$). Por otra parte, en cada clase hubo una relación inversa significativa entre la Jsd y la velocidad de conducción (VC) (gráfico 2B). Al combinar la información obtenida de ratas y humanos, encontramos que la Jsd en las fibras de tipo 1B se había incrementado bruscamente casi el doble de veces a bajas velocidades en comparación con la de las fibras de tipo 1A (líneas de regresión para Jsd vs VC: 1A, $Jsd = 0,134 - 0,081 VC$; 1B, $Jsd = 0,216 - 0,154 VC$; prueba t Student para la igualdad de las pendientes: $P = 0,028$).

Para tener una idea de cómo surgen las fluctuaciones, el gráfico 2C ilustra las ondas de potencial de acción superpuestas de tres unidades humanas muy diferentes, en las cuales la fluctuación variaba en más

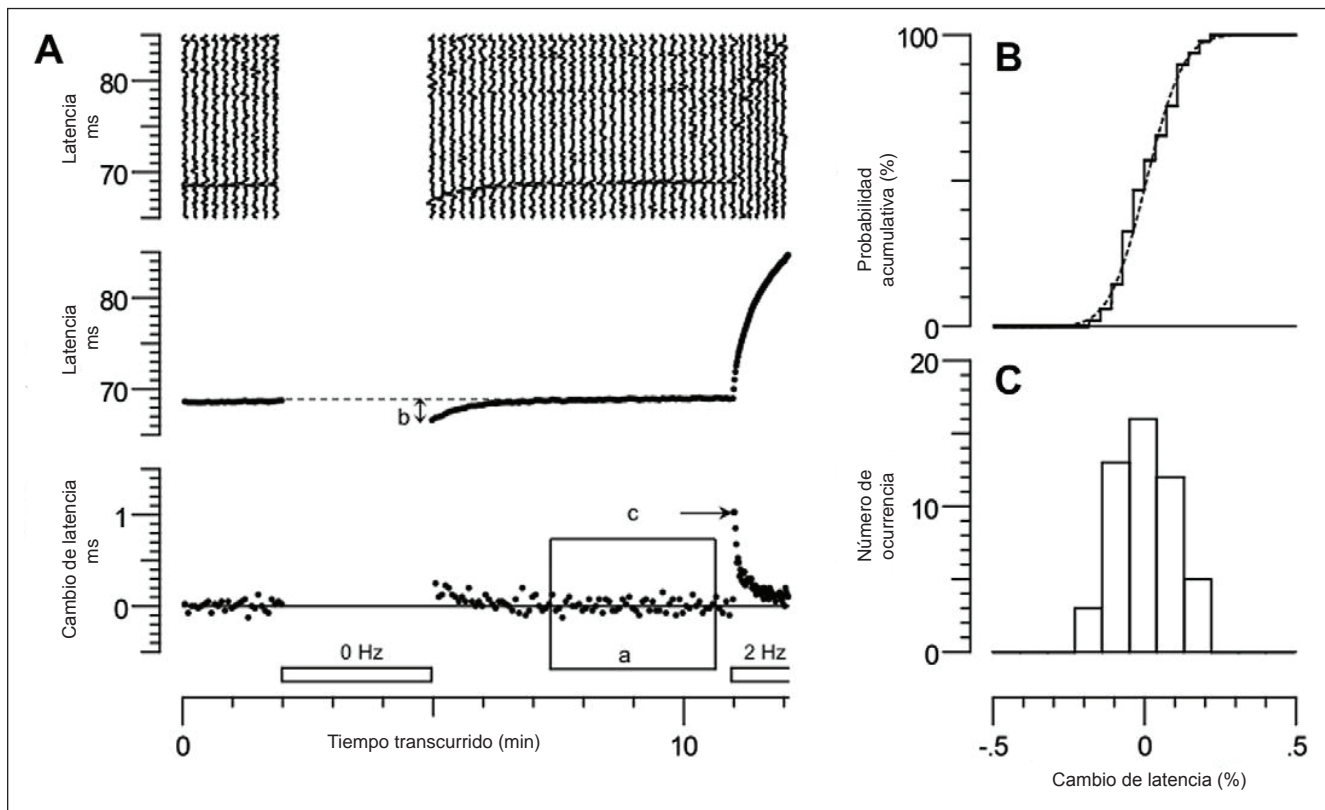


Gráfico 1. Fluctuación de la latencia en una fibra de tipo 1B en una rata normal. **A: Panel superior:** Selección comprimida de una de tres señales durante la estimulación cutánea con el protocolo «pausa», es decir, estimulación basal con 0,25 Hz, una pausa de 2 a 5 minutos y estimulación con 2 Hz entre los minutos 11 y 14, de los cuales sólo se muestra el comienzo. **Panel medio:** Imagen rasterizada modificada, mostrando cada aparición de una unidad seleccionada como un punto simple; la flecha doble (b) indica una desaceleración del 3,1% luego de la pausa, la cual junto con la desaceleración mayor del 10% durante los 2 Hz permite clasificar la unidad como del tipo 1B (nociceptor insensible a los estímulos mecánicos). **Panel inferior:** Los cambios de la latencia entre los barridos sucesivos. La caja a indica un período de latencia estable seleccionado para las mediciones de la fluctuación en B; la flecha (c) indica un incremento de la latencia de 1,03 ms posterior a los primeros dos estímulos con 2 Hz. **B: Panel superior:** Distribución acumulada de los cambios de latencia en la caja a, con una curva ajustada normal ($Jsd = 0,10\%$). **Panel inferior:** Histograma de los cambios de latencia en la caja a, expresados en porcentajes de la latencia basal, mostrando una simetría de aproximadamente cero.

de seis pliegues: la unidad 1A con una VC más rápida y fluctuación baja (a), la unidad 1A con la VC más baja y fluctuación baja (b) y la unidad 1B con VC baja y fluctuación más alta (c).

Cambios de la latencia causados por picos adicionales estimulados

El cambio de la latencia al inicio de la serie con 2 Hz que se muestra en el gráfico 1 fue de 1,03 ms ó 1,46% de la latencia basal. Debido a que esto fue registrado después de un segundo de la serie, luego de dos picos adicionales, esto nos proporciona un estimado de la desaceleración adicional resultante de los potenciales de acción adicionales, ya sea de los

receptores o de los generadores ectópicos, por encima de los estímulos basales. Esta estimación es sólo aproximada, ya que no permite la recuperación parcial de la velocidad entre los picos, lo que depende de la coordinación precisa de los impulsos. Sin embargo, el primer cambio de la latencia con 2 Hz proporciona una calibración aproximada que nos permite inferir si cierto cambio de la latencia fue causado por uno o más potenciales de acción. En las fibras de tipo 1B de 19 ratas normales, esta desaceleración que resultó de dos picos adicionales tuvo un valor promedio de 1,24%, con un valor máximo de 2,2%. Estas observaciones se utilizaron para inferir un límite sobre el cual los incrementos de la latencia puedan ser atribuidos con certeza a más de un pico (ver sección 4).

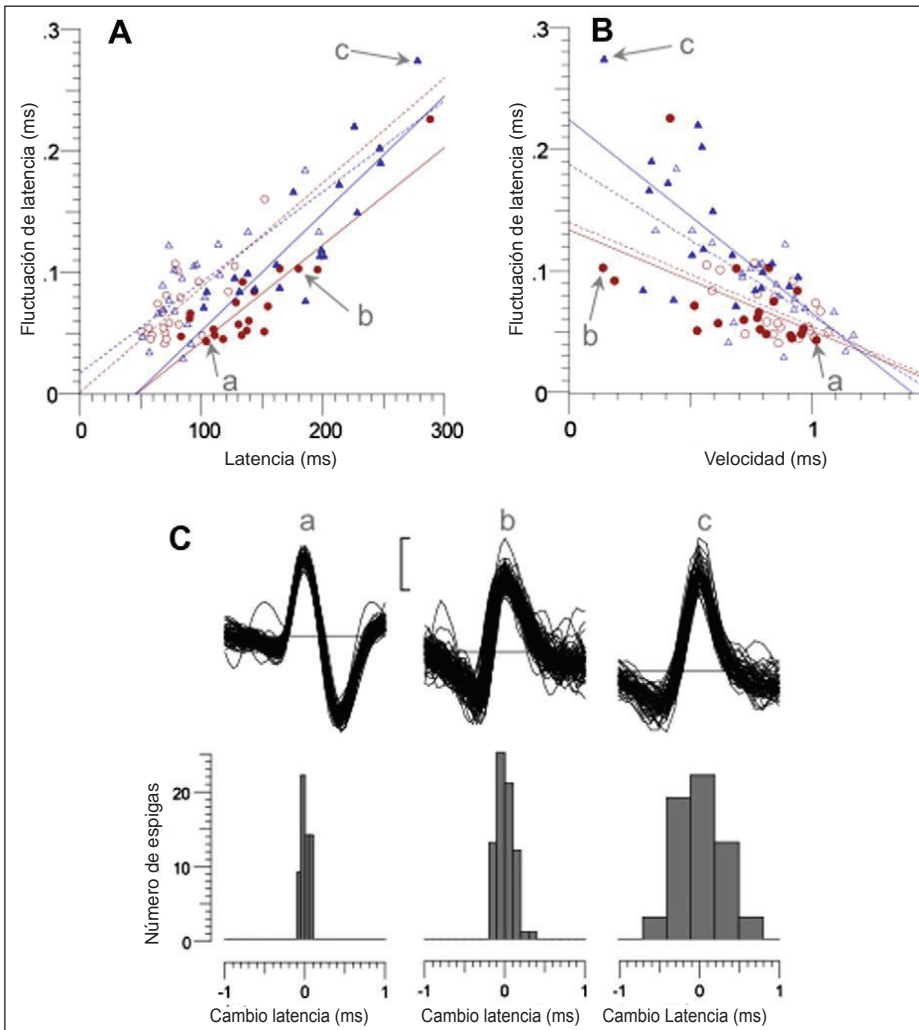


Gráfico 2. Variación de la latencia en fibras nociceptivas normales relacionada con la latencia, velocidad de conducción y ondas en pico. **A:** Relación entre la fluctuación de la latencia (expresada como la desviación estándar de los cambios de la latencia entre sucesivos barridos, en ms) y la latencia para los nociceptores de tipo 1A (círculos rojos) y 1B (triángulos azules) de humanos (símbolos rellenos, líneas sólidas) y ratas (símbolos abiertos, líneas discontinuas). Para todas estas cuatro clases de nociceptores existe una tendencia similar de incremento de la fluctuación de la latencia. **B:** Relación entre la fluctuación de la latencia (J_{sd}) y la velocidad de conducción (VC); los símbolos son iguales y significan lo mismo que en A. Letras a, b, c indican las unidades seleccionadas en C. **C:** Ejemplos de ondas en pico por encima de los histogramas de las fluctuaciones representados en la misma escala de tiempo y con las amplitudes del ruido (basura) ajustadas para dar conteos similares de la basura. Amplitud de la barra de la escala = $3 \mu V$ (a), $3,4 \mu V$ (b), $4,5 \mu V$ (c). La unidad de alta velocidad (a) ($J_{sd} = 0,043 \text{ ms}$, $VC = 1,02 \text{ ms}^{-1}$) tiene una mejor relación señal/ruido que la unidad de conducción lenta (b) ($J_{sd} = 0,10 \text{ ms}$, $VC = 0,14 \text{ ms}^{-1}$), lo que ayuda a explicar las diferencias en la fluctuación, pero la unidad c ($J_{sd} = 0,27 \text{ ms}$, $VC = 0,14 \text{ ms}^{-1}$) tiene una fluctuación mucho mayor que b pese a tener similares relaciones señal/ruido y velocidades de conducción.

Fluctuaciones anormales de la latencia no relacionadas con la actividad espontánea de los nociceptores C

Aunque, como se mostrará en la siguiente sección, la actividad espontánea de los nociceptores C está evidenciada con cierta precisión por las fluctuaciones anormales de la latencia en las imágenes rasterizadas, existen varios otros fenómenos patológicos y no patológicos que generan cambios de la latencia por fuera de los límites normales.

Salto de latencia

Un fenómeno bien conocido hallado en la micro-neurografía de los nociceptores es que el potencial de acción registrado puede cambiar entre dos latencias diferentes, presumiblemente debido a que los axones están ramificados y el fracaso intermitente para excitar una rama puede resultar en una conducción a lo largo de una rama más larga que tiene un umbral más bajo.^{25,38} Las dos (o más) latencias involucradas en los saltos de latencia normalmente están bien separadas,

lo que da origen a dos líneas distintas en las imágenes rasterizadas, pero ocasionalmente pueden estar lo suficientemente cerca que llegan a verse como una sola línea, amplia y fluctuante. En el gráfico 3 se muestra un ejemplo en una rata control. En este caso, la $J_{sd} = 0,31\%$, está fuera del rango normal, pero la distribución de los cambios de la latencia es simétrica, como lo es siempre en el caso de los saltos de latencia, de modo que la fluctuación anormal fácilmente se distingue de la actividad espontánea.

Potencial de acción de doble pico

El gráfico 4 ilustra otro fenómeno que también puede dar lugar a una distribución simétrica de los cambios de latencia (D). En este caso, la imagen rasterizada de alta resolución en B muestra que dos picos pueden presentarse muy juntos; esto es debido a que el potencial de acción tuvo dos picos (E). En este caso, la J_{sd} anormal de $0,51\%$ fue causada por el efecto del ruido, que algunas veces causa que el primero y otras veces el segundo pico tenga la mayor amplitud.

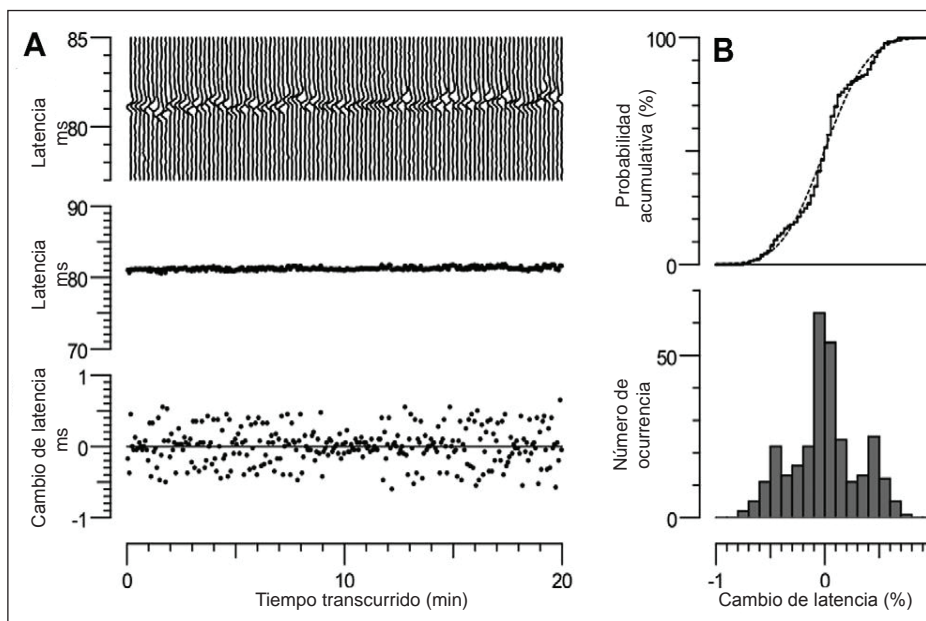


Gráfico 3. Fluctuación anormal debido a los saltos de latencia en una fibra de tipo 1B en una rata normal. **A:** Selección comprimida de datos, imagen rasterizada modificada y secuencia de los cambios de la latencia (véase Fig. 1A) de una unidad en la que existe una tendencia a fluctuar entre dos latencias, 0,45 ms aparte, probablemente a causa de la excitación de las diferentes ramas terminales con longitudes similares. **B:** Distribución acumulada e histograma de los cambios de la latencia (véase Fig. 1B). Los saltos pequeños de latencia se ven más claramente en el histograma de los cambios de la latencia. La fluctuación de la latencia está fuera del rango normal ($Jsd = 0,31\%$), pero la distribución es simétrica (asimetría = 0,002).

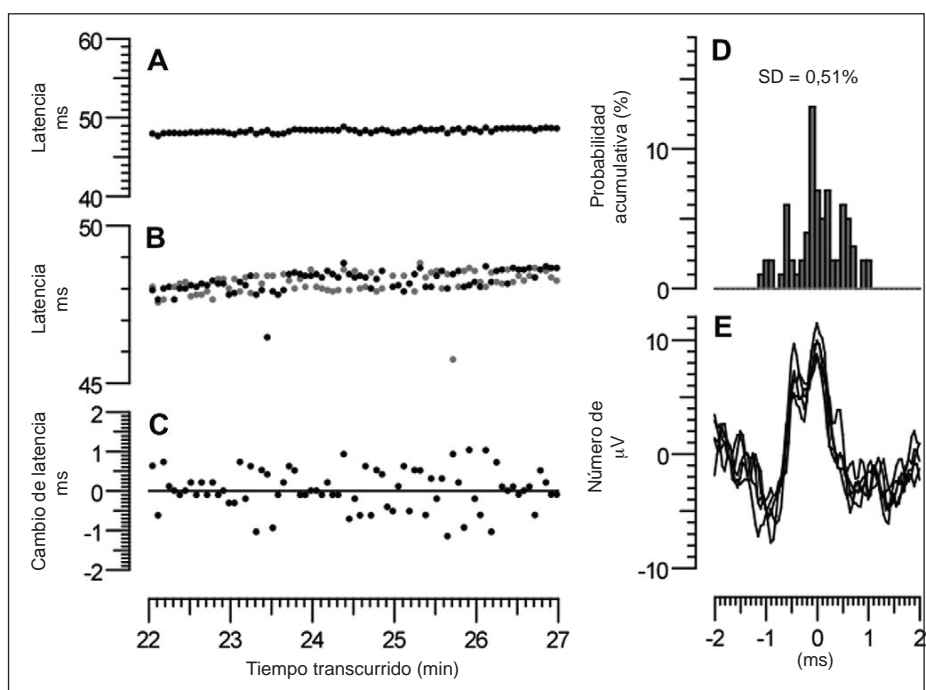


Gráfico 4. Fluctuación anormal debido al potencial de acción de doble pico. Un eferente simpático registrado de una mujer normal de 37 años de edad. **A:** La latencia hasta el pico del potencial de acción es más fluctuante de lo normal. **B:** Imagen rasterizada detallada de los dos picos más altos, mostrados en negro y gris, que lucen como «rieles de tranvía» debido a estos dos picos similares se encuentran entrelazados en el tiempo. **C:** Cambios de la latencia entre picos sucesivos. **D:** El histograma de los cambios de la latencia muestra una fluctuación anormal ($Jsd = 0,51\%$) pero con la apariencia simétrica similar al de el gráfico 3. **E:** Ondas de potenciales de acción superpuestas que muestran un potencial de acción anormal de doble pico.

Picos múltiples

La figura 5 ilustra múltiples picos, un fenómeno común en registros de pacientes con dolor neuropático y en modelos animales de esta misma patología.^{6,37} Los picos dobles, y ocasionalmente triples, se cree que ocurren cuando se excitan dos ramas de un axón y hay un bloqueo unidireccional en un punto de la rama, de modo que el primer impulso que lo alcanza no invade la rama más lenta y por lo tanto falla en colisionarse con un segundo impulso y evitar que este alcance la médula espinal.⁴² Los picos múltiples pueden causar

perfiles de latencia con apariencia de «dientes de sierra» similares a los producidos por la actividad espontánea, porque en cada caso un potencial de acción adicional es transmitido a lo largo de una importante longitud del axón hasta el sitio de registro. En el ejemplo de el gráfico 5, fue posible identificar los segundos picos, que se presentaron aproximadamente 70 ms después de los primeros (gráfico 5A, panel central). Se observaron dos patrones de doble pico en esta fibra. En el primer patrón (a), los picos dobles aparecieron en el lapso de aproximadamente un minuto, de modo que produjeron una desaceleración dependiente de la actividad que

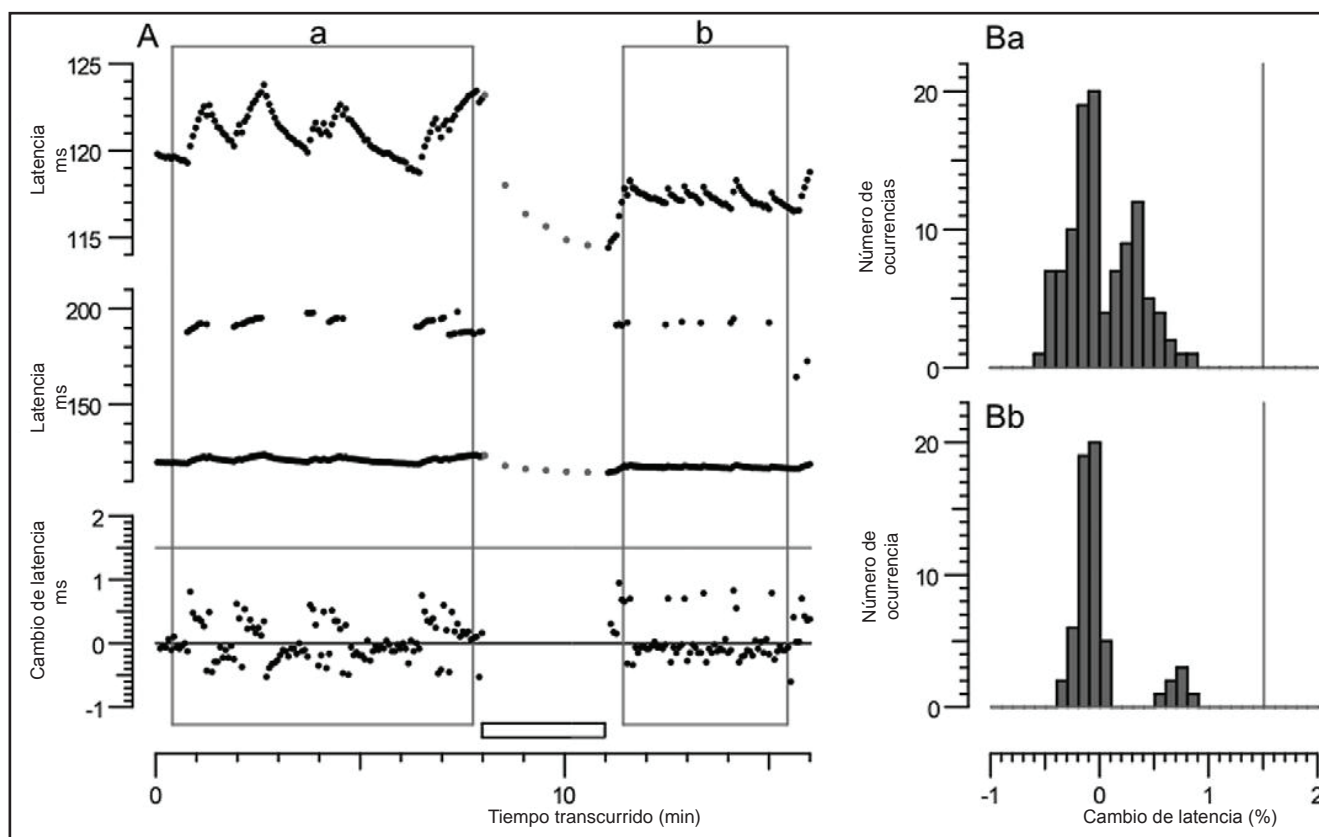


Gráfico 5. Fluctuación anormal debido a picos dobles. **A: Panel superior:** Perfil de latencia de alta resolución con la aparición de «dientes de sierra» que muestra picos adicionales intermitentes, registrado de una fibra de tipo 1B de una rata, 170 días después de la lesión nerviosa por aplastamiento. **Panel 2:** Imagen rasterizada de baja resolución que muestra los segundos picos intermitentes, aproximadamente 70 ms después, lo que explicaría la desaceleración dependiente de la actividad. **Panel inferior:** Cambios de la latencia entre los sucesivos potenciales de acción mostrados en el panel superior. **Ba, Bb:** Histogramas de los cambios porcentuales de la latencia durante dos períodos indicados por las cajas **a** y **b** en **A**. Los histogramas son asimétricos hacia la derecha, como en la actividad espontánea, pero los cambios de la latencia nunca alcanzaron el 1,5% (líneas verticales), pues nunca hubo más de un solo pico adicional. La barra clara indica el período de estimulación con 1/30 Hz.

duró varios milisegundos; mientras que después de la pausa, los picos dobles se presentaron individualmente (**b**) y produjeron «dientes de sierra» de baja amplitud (poco menos de 1 ms), correspondiente a la desaceleración dependiente de la actividad causada por un solo impulso adicional. Las distribuciones de los cambios de latencia (gráfico 5B) tuvieron una asimetría positiva, a semejanza de lo observado en una auténtica actividad espontánea.

Fracasos de la estimulación

Una limitación del registro simultáneo de múltiples fibras C dentro de una imagen rasterizada es que se debe emplear el nivel de un solo estímulo para todas las fibras y que puede haber fibras con umbrales muy cercanos al nivel del estímulo que se activen sólo intermitentemente. Esto puede producir una onda de latencia que es una versión invertida de los «dientes de sierra» causada por un pico doble e intermitente. Un ejemplo se muestra en el gráfico 6. En esta situación,

la distribución de los cambios de latencia es asimétrica negativa (figura 6C). Cuando se registran los perfiles rasterizados de las fluctuaciones de este tipo, al aumentar el estímulo (flecha en la figura 6B) usualmente se eliminan los fracasos de la estimulación y se normaliza la fluctuación (figura 6D).

La naturaleza complementaria de los cambios de la latencia resultantes de los fracasos de estimulación y los picos dobles están bien ilustrados en el registro de el gráfico 7. En el gráfico 7A, la señal inferior de la imagen rasterizada muestra un patrón irregular en «dientes de sierra», que sugiere descargas espontáneas en estallido; debido a la presencia de otras unidades de amplitud similar, no fue posible identificar a partir de los registros si se estaban presentando múltiples picos. Sin embargo, dos consideraciones proporcionan una fuerte evidencia de que los cambios de la latencia no fueron debido a la actividad espontánea. En primer lugar, las fluctuaciones de la latencia se hicieron mucho mayores cuando el estímulo aumentó (flecha), lo cual, como se

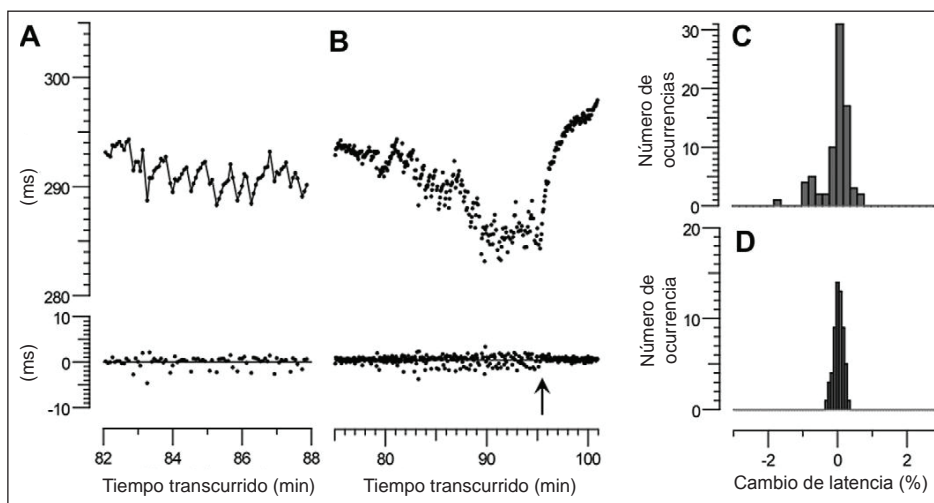


Gráfico 6. Fluctuación anormal debido a fracasos de la estimulación. **A:** Perfil de latencia en «dientes de sierra» invertidos registrado de una unidad de tipo 1B de una rata 91 días después de la lesión nerviosa por aplastamiento. **B:** Imagen rasterizada durante un período más extenso, mostrando el cese de las fluctuaciones cuando se aumentó el estímulo (dicho momento está señalado por la flecha). **C y D:** Histogramas de los cambios de la latencia antes (82-88 min) y después (97-101 min) del aumento del estímulo. La variación en C fue anormalmente alta y asimétrica (Jsd = 0,41%, asimetría = -1,48), mientras que en D fue normal (Jsd = 0,14%, asimetría = -0,14).

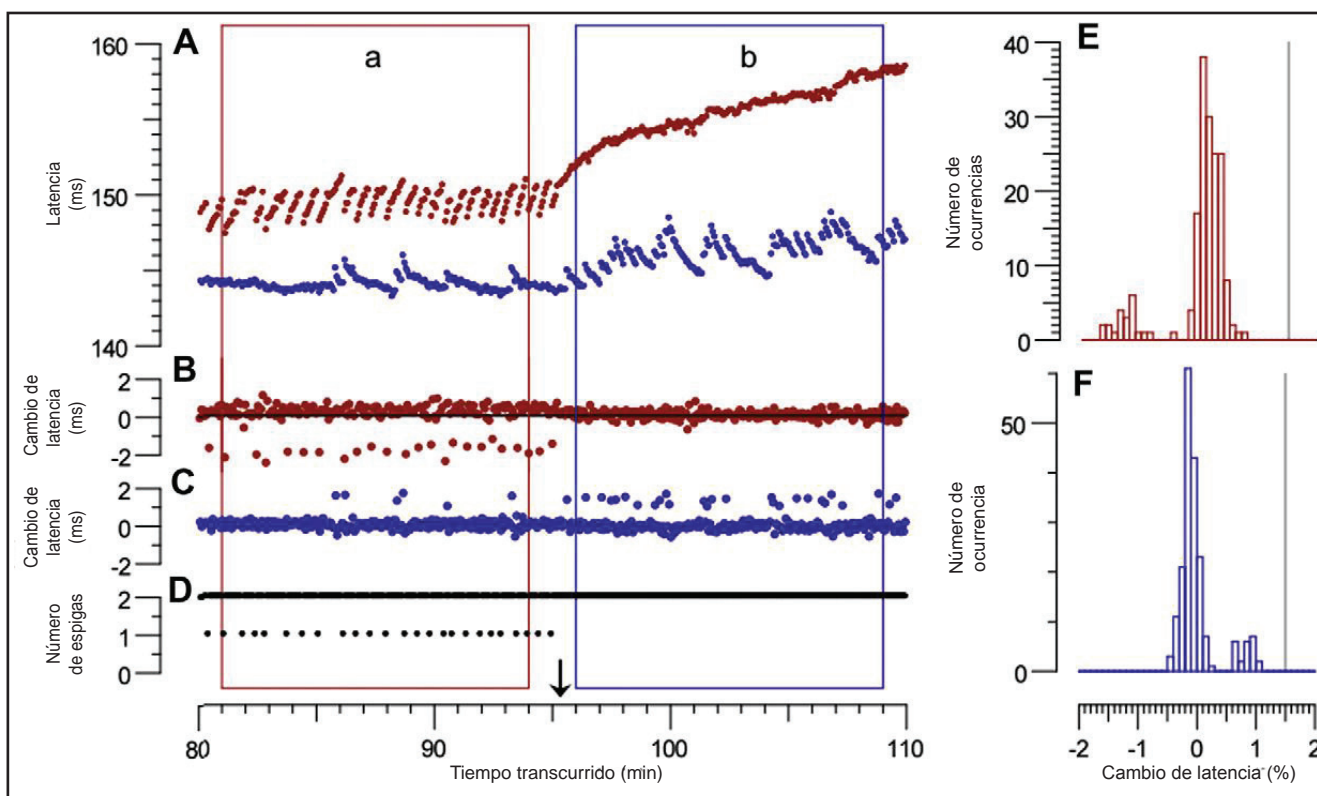


Gráfico 7. Imagen de los cambios de la latencia en «dientes de sierra» en espejo causados por fracasos de la respuesta y picos dobles. **A:** Dos fibras más registradas de la misma lesión nerviosa por aplastamiento, que muestran que los cambios de la latencia en «dientes de sierra» no siempre son causados por la actividad espontánea. El cambio de los perfiles de latencia que ocurre en el momento señalado por la flecha (~95 min) evidencia que los cambios de la latencia fueron dependientes del estímulo. La unidad de latencia más grande (señal superior, en rojo) exhibió cambios de la latencia en «dientes de sierra» hacia abajo durante el período contenido en la caja roja (a). Los descensos de la latencia (B) siempre siguieron a un fracaso de la excitación (D), y se evitaron al aumentar la intensidad del estímulo en el momento señalado por la flecha. A la inversa, la unidad de latencia más corta (señal inferior, en azul) exhibió cambios de la latencia en «dientes de sierra» hacia arriba, que fueron una reminiscencia de aquellos causados por la actividad espontánea, pero siempre fueron de la misma amplitud (C), lo que indica que todos fueron causados por un solo pico adicional. El aumento de la frecuencia de esos picos adicionales, cuando el estímulo se incrementó (flecha), indica que estaban relacionados con la excitación de una segunda rama, una característica de los picos dobles, aunque en este caso no fue posible identificar los picos dobles en el registro, debido a la descarga de otras fibras. Los histogramas de los cambios de la latencia en E (Jsd = 0,34%, asimetría = -1,94) y F (Jsd = 0,34%, asimetría = 1,82) muestran que todos los incrementos de la latencia fueron menores del 1,5%.

describió previamente,³⁷ incrementa la cantidad de picos múltiples al activar más ramas. Este incremento de la actividad de la señal inferior (unidad de latencia más corta, en azul) fue complementario a la abolición de las fluctuaciones de la latencia en la señal superior (unidad de latencia más grande, en rojo), que fueron causadas por los fracasos de la estimulación. La segunda característica que argumenta en contra de la actividad espontánea es que los incrementos de latencia siempre fueron cercanos a los 0,8 ms, que corresponden a un solo pico adicional (gráfico 7F). Nunca se dio el caso de que se presentaran dos o más picos adicionales dentro de un solo intervalo de 4 segundos. Esto contrasta con las descargas espontáneas verdaderas mostradas en el gráfico 9, en donde los incrementos de la latencia en varios milisegundos se presentaron ocasionalmente. Las líneas verticales del 1,5% de incremento de la latencia en los histogramas de las fluctuaciones que se observan en los gráficos 5, 7 y 9 representan un límite que es sobrepasado solamente por las unidades que descargan espontáneamente (ver sección 4).

3.2. Descargas de los nociceptores en los pacientes y modelos de dolor neuropático en ratas

3.2.1. Actividad espontánea de los nociceptores C en los pacientes y estados de dolor neuropático.

La actividad espontánea observada tanto en los nociceptores de los pacientes y las ratas normalmente se presenta de manera errática, lo que genera perfiles de latencia irregulares en «dientes de sierra». En el gráfico 8A mostramos un ejemplo de un paciente con sensación de ardor en el pie y neuropatía de fibras pequeñas de causa desconocida. Esta unidad tiene el perfil característico de la desaceleración dependiente de la actividad de un nociceptor de «tipo 1», cuando posteriormente es estimulado con 2 Hz (gráfico 8B) después de haber cesado la actividad espontánea. El hecho de que esta fuese la misma unidad fue confirmado por las similares ondas promediadas, que se muestran en el gráfico 8C. Aparte del salto de latencia al inicio de la serie de 2 Hz (acompañado por un salto hacia atrás al final), la latencia se incrementó debido a dos picos

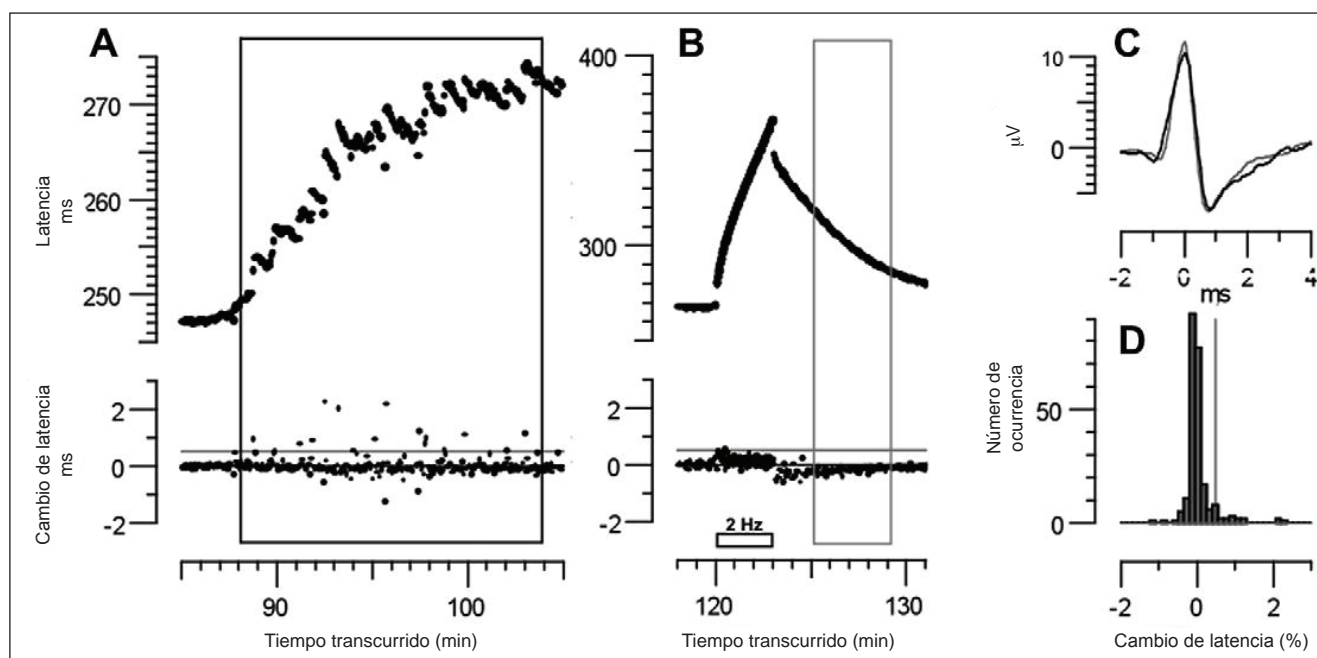


Gráfico 8. Descargas espontáneas de los nociceptores C de tipo 1B de un paciente con dolor neuropático. Se trata de un varón de 33 años de edad, quien se quejaba de sensación de ardor en el pie. La tasa de estimulación basal fue de 0,25 Hz. **A: Arriba:** Perfil de latencia en «dientes de sierra» de la unidad C que inicialmente conducía a $0,38 \text{ ms}^{-1}$. **Abajo:** Cambios de la latencia desde un barrido al siguiente, que muestra incrementos superiores al 2%. **B: Arriba:** Desaceleración dependiente de la actividad registrada después de la misma unidad en respuesta a la serie de 2 Hz. Nótese bien que el eje de la latencia está comprimido en comparación con el que se muestra en A. **Abajo:** Cambios de la latencia que han sido presentados de manera semejante que en A. Aparte del salto inicial, los incrementos de la latencia a causa de dos picos adicionales por segundo durante la estimulación con 2 Hz están limitados al 0,5% aprox., indicado por la línea gris en la imagen rasterizada inferior. **C:** Las ondas promedio de las ondas de los potenciales de acción registrados durante los periodos señalados por las cajas en A (negra, un promedio de 240 señales) y B (gris, 60 señales). **D:** Histograma de los cambios de la latencia durante el periodo comprendido por la caja en A, que muestra una distribución asimétrica y los múltiples incidentes de incrementos de la latencia correspondientes a dos o más picos adicionales (línea gris vertical).

adicionales por intervalo de muestreo de un segundo que no excedieron los 0,5 ms. Este límite, señalado por las líneas grises horizontales en los gráficos 8A y 8B y la línea vertical en el gráfico 8D, fue ampliamente sobrepasado por los incrementos espontáneos de la latencia en el gráfico 8A, lo que confirma que estos no podrían ser explicados por los picos múltiples. Esta unidad fue clasificada como correspondiente al tipo 1B basados en su baja velocidad de conducción ($0,38 \text{ ms}^{-1}$) y una lenta recuperación lenta luego de los 2 Hz (185 s para una recuperación del 50% de la latencia, comparado con los rangos normales de 15-63 s para las fibras del tipo 1A y 35-190 s para las del tipo 1B)³⁴ y el fracaso para activarla mediante los estímulos mecánicos, que sí activaron siete fibras 1A registradas simultáneamente.

En el gráfico 9 se ilustran ejemplos de actividad espontánea en los cinco diferentes modelos de dolor neuropático en ratas. En cada caso se muestran las descargas espontáneas que se presentaron en una fibra de tipo 1B, aunque la desaceleración característica posterior a una pausa de la estimulación se ilustra solamente en la segunda imagen (sutura). La desaceleración adicional causada por los dos picos que se observa al inicio de las series de 2 Hz estuvo cercana al 1,5%, y en cada caso hubo aumentos espontáneos de latencia por encima de este valor, de modo que los picos múltiples pueden ser excluidos como un factor de confusión.

El modo en que el perfil rasterizado de la latencia está relacionado con la actividad espontánea de la unidad lo podemos apreciar con detalle en el gráfico 10, la misma

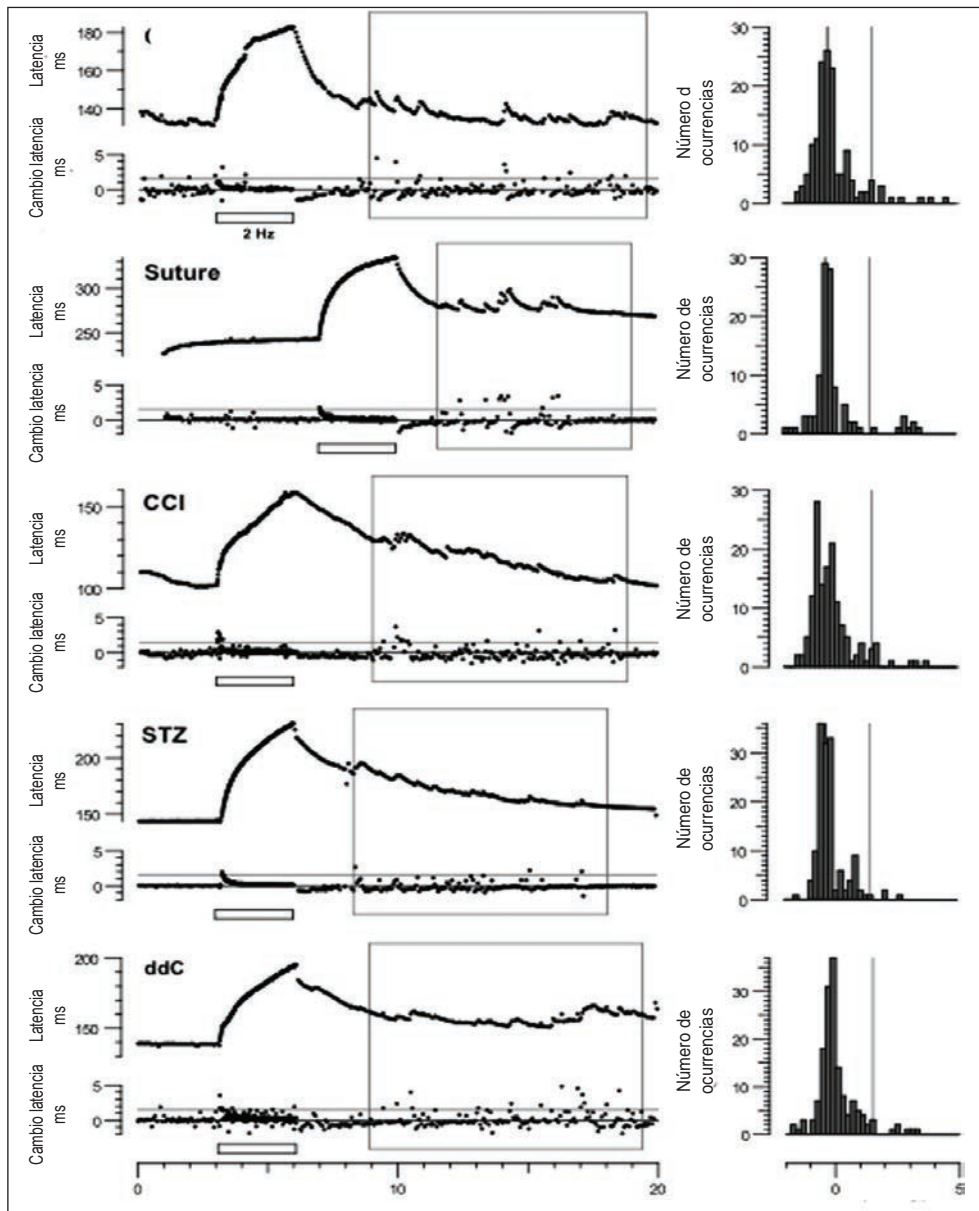


Gráfico 9. Descargas espontáneas de los nociceptores C de tipo 1B en cinco modelos diferentes de dolor neuropático en ratas: (1) crush = aplastamiento (55 días), $Jsd = 0,94\%$, asimetría = 2,1; (2) suture = sutura (56 días), $Jsd = 0,98\%$, asimetría = 2,1; (3) CCI = lesión por compresión crónica (15 días), $Jsd = 0,88\%$, asimetría = 1,7; (4) STZ = estreptozotocina (56 días), $Jsd = 0,58\%$, asimetría = 1,88; (5) ddC = dideoxicitidina (14 días después de la última inyección), $Jsd = 0,79\%$, asimetría = 1,58. Para cada una de las fibras C: **Señal superior en cada una las imágenes de la izquierda** = latencia desde el estímulo eléctrico hasta el pico del potencial de acción; **señal inferior en cada una de las imágenes de la izquierda** = cambio de la latencia entre estímulos sucesivos, expresado como % de la latencia basal; **derecha** = histograma de los cambios porcentuales de la latencia durante el período señalado por la caja gris de la izquierda, cuando las descargas espontáneas eran evidentes. Las descargas espontáneas están indicadas por los cambios irregulares de la latencia, con la apariencia de «dientes de sierra», que se suprimieron durante la estimulación repetitiva (2 Hz, 3 min, cajas claras). Las líneas grises verticales de la derecha y las horizontales grises de la izquierda señalan el cambio de la latencia de 1,5%.

que corresponde a la primera unidad (aplastamiento) mostrada en el gráfico 9. El período de registro de 6 minutos de el gráfico 10C corresponde al período de 13 a 19 minutos de el gráfico 9A. La señal superior (gráfico 10A) muestra cinco artefactos de estímulo y los registros de 4 s entre los estímulos. La unidad se mantuvo excitada durante casi 140 ms después de cada estímulo y, adicionalmente, descargó 3 veces, 0 veces, 4 veces y una vez durante los períodos de intervención. Estas señales se observan comprimidas en la figura 10B, que corresponde a la porción central del perfil de latencia en C. Así, los primeros tres cambios de la latencia con respecto a su basal durante este período en D muestran los incrementos de la latencia correspondientes a los picos espontáneos 1, 3 y 4. El ritmo aleatorio de las descargas se combina con la desaceleración dependiente de la actividad para generar las características imágenes rasterizadas en «dientes de sierra» y la distribución asimétrica positiva de los cambios de latencia que se observan en la figura 10F.

3.2.2. Incidencia de la actividad espontánea en diferentes modelos animales y tipos de nociceptores

La tabla 1 muestra la proporción de nociceptores espontáneamente activos de diferentes tipos en los cinco modelos de dolor neuropático en ratas y en los pacientes con neuropatía de fibras pequeñas. Los nociceptores fueron identificados como del tipo 1A (normalmente sensibles a los estímulos mecánicos) o del 1B (generalmente insensibles a los estímulos mecánicos) basados en la desaceleración que ocurre luego de una pausa de 3 minutos en la estimulación. Sin embargo, en una minoría de casos no fue posible obtener una medición adecuada de la desaceleración luego de la pausa, por ejemplo cuando hubo actividad espontánea durante este mismo momento. Estos receptores sin clasificar son designados como pertenecientes al tipo 1. La proporción de fibras activas de tipo 1B fue más alta en los modelos de lesión nerviosa traumática que en los modelos de neuropatía tóxica, mientras que el valor para los pacientes fue intermedio.

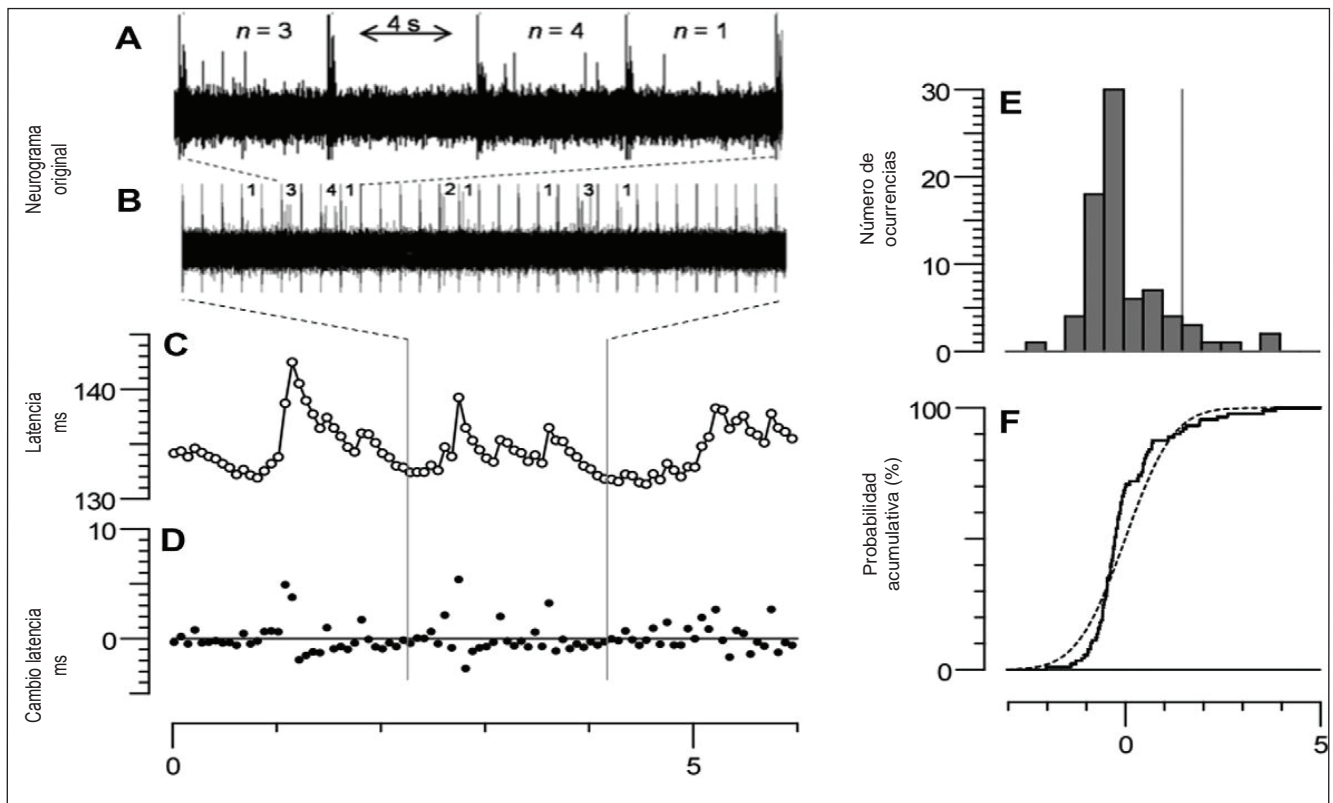


Gráfico 10. Relación entre la actividad espontánea y los cambios de latencia en una sola fibra de tipo 1B de una rata después de la lesión nerviosa por aplastamiento (55 días, la misma fibra que se expuso en la Fig. 9A). **A:** Neurograma puro (en bruto), que muestra un artefacto de estímulo cada 4 s, seguido inmediatamente por una respuesta evocada eléctricamente y luego una cantidad variada de impulsos espontáneos, como lo indican los números (3, 0, 4, 1). **B:** Igual que en A, pero comprimido para mostrar los impulsos espontáneos durante 2 min. **C:** Latencias de las respuestas evocadas eléctricamente. **D:** Cambios de la latencia entre las sucesivas respuestas evocadas eléctricamente. Los incrementos de la latencia en C y D claramente estuvieron relacionados con la cantidad de impulsos espontáneos en B, lo que confirma que las respuestas eran de la misma unidad. **E:** Histograma de los cambios de la latencia en D, expresados como % de la latencia basal ($Jsd = 0,97$, $asimetría = 1,7$). **F:** Distribución acumulada de los cambios de la latencia, comparada con una curva de Gauss ajustada

Tabla 1. Proporciones de los nociceptores activos espontáneamente en pacientes y modelos de dolor

	Animals or patients (n)	Type 1A		Type 1B		Type 1 ^a		All nociceptors	
		N fibers	% Active	N fibers	% Active	N fibers	% Active	N fibers	% Active
Rats									
Crush	24	39	0	100	58.0	20	55.0	159	43.4
Suture	14	18	0	30	63.3	7	71.4	55	43.6
CCI	12	7	0	33	60.6	10	40.0	50	48.0
All traumatic	50	64	0	163	59.5	37	54.1	264	44.3
STZ	56	215	0	314	21.0	45	33.3	574	14.1
ddC	14	108	0	175	14.3	13	8.0	296	8.8
All toxic	70	323	0	489	18.6	58	27.6	870	12.3
All rat	120	387	0	652	28.8	95	37.9	1134	19.8
Humans									
SFN	20	53	0	39	33.3	10	80.0	102	20.6

CCI = Lesión por compresión crónica; STZ = neuropatía diabética inducida por estreptozotocina; ddC = neuropatía inducida por 2,3-dideoxicitidina; SFN = neuropatía de fibras pequeñas. ^aTipo 1 indica nociceptores sin clasificar (1A ó 1B).

Los cambios en la proporción de fibras activas de tipo 1B en el transcurso del tiempo después de la lesión nerviosa se ilustran en el gráfico 11, correspondientes a todos los modelos en ratas. La proporción de fibras activas en el modelo de lesión por aplastamiento no varía de manera significativa con el tiempo, según muestran los primeros registros efectuados entre el día 20 y una fecha posterior mayor al año desde el aplastamiento (pruebas χ^2 para la comparación de proporciones y para evaluar tendencias). Los registros de los otros modelos de lesión traumática fueron menos extensos, pero tampoco evidenciaron alguna tendencia con el tiempo. En los modelos de toxicidad, la única evidencia de cambio fue la ausencia de actividad espontánea en el modelo de neuropatía inducida por 2,3-dideoxicitidina [ddC] durante una sola semana, un período no investigado con los otros modelos.

3.2.3 Comparación entre las fibras de tipo 1B espontáneamente activas y en reposo. En los pacientes y en todos los modelos en ratas, algunas fibras de tipo 1B se activaron espontáneamente, mientras que otras estuvieron inactivas. Para determinar si estos dos grupos pueden ser distinguidos mediante sus propiedades de conducción, comparamos la desaceleración dependiente de la actividad y la velocidad de conducción en ratas y humanos (gráfico 12). No fue posible obtener comparaciones fiables para el tiempo de recuperación luego de la estimulación con 2 Hz, pues la actividad espontánea interfirió con el proceso de recuperación. La única diferencia estadísticamente significativa que se halló fue una velocidad de conducción más lenta en las fibras espontáneamente activas tanto en las ratas como en los pacientes humanos. Se esperan bajas tasas

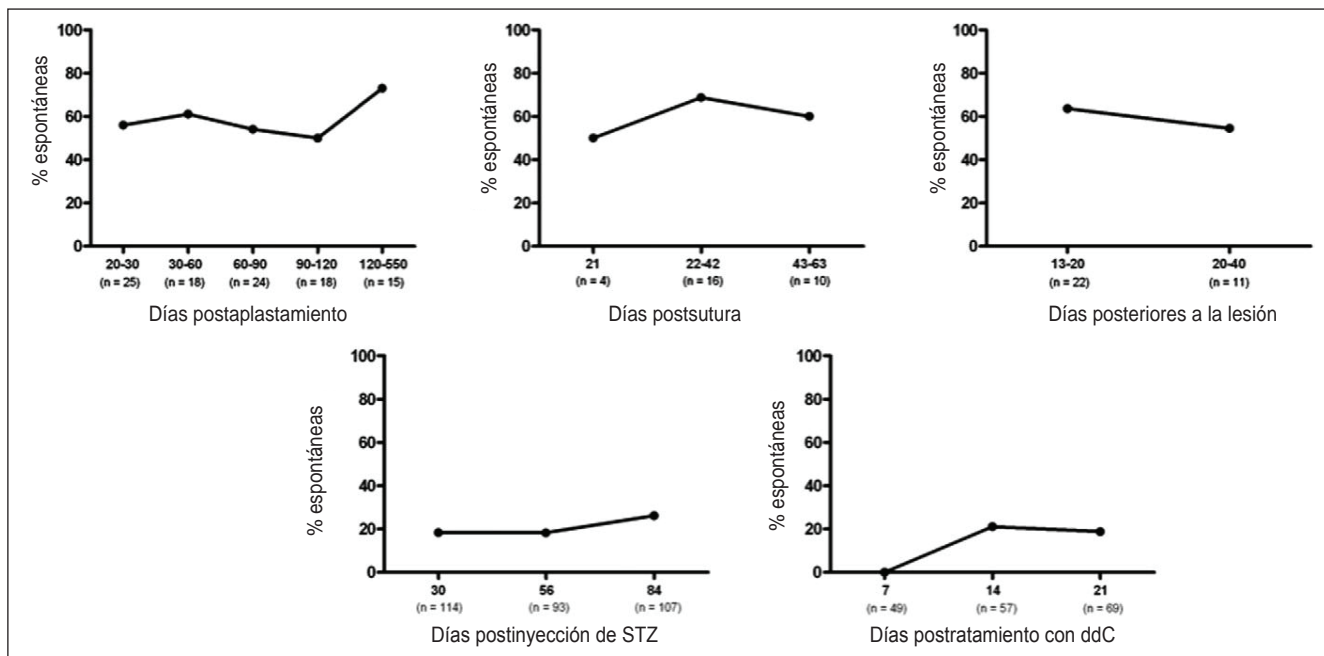


Gráfico 11. Cambios en la actividad espontánea en diferentes modelos en ratas con el tiempo. La proporción de fibras de tipo 1B activas espontáneamente, agrupadas según el número de días desde la lesión (en el caso de la neuropatía inducida por 2,3-dideoxicitidina [ddC], los días desde la última inyección). Nótese las diferentes escalas de tiempo para los diferentes modelos en ratas.

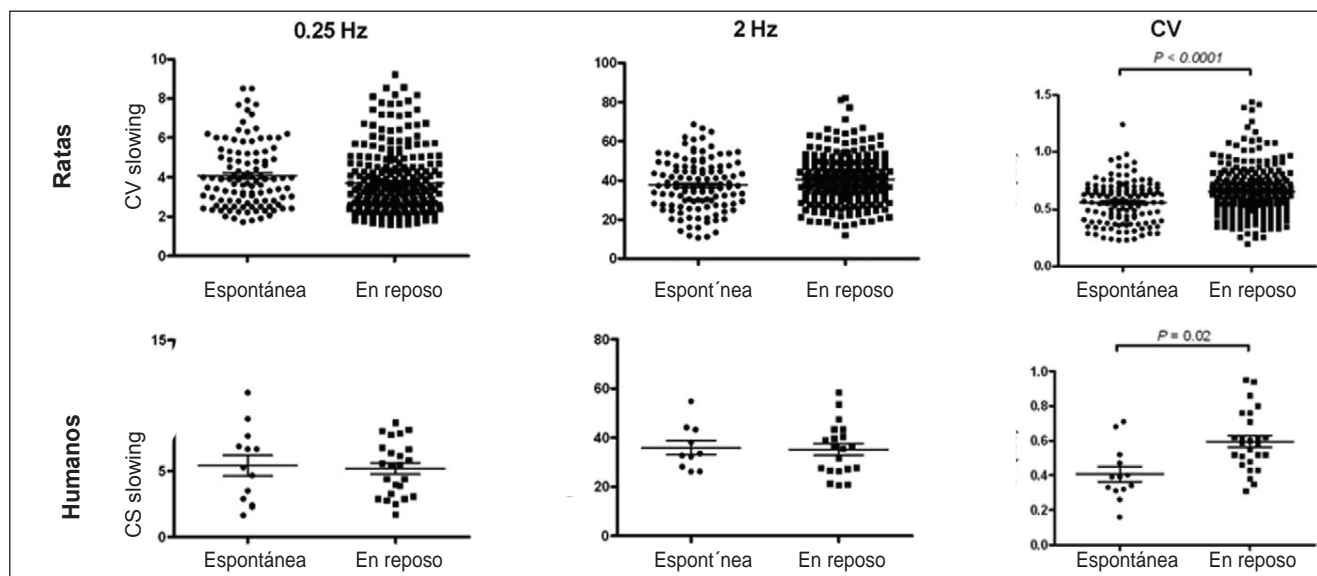


Gráfico 12. Desaceleración dependiente de la actividad en axones espontáneos y en reposo. Izquierda: Porcentaje de desaceleración con 0,25 Hz luego de una pausa de 3 minutos, que compara las fibras de tipo 1B activas espontáneamente (Spont) con las inactivas (Resting) en modelos de dolor neuropático en ratas (panel superior) y pacientes (panel inferior). Centro: Porcentaje de desaceleración luego de 3 minutos con 2 Hz. Derecha: Velocidades de conducción [CV]. No hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la desaceleración dependiente de la actividad. La única diferencia entre las fibras activas espontáneamente y las inactivas fue que las fibras activas tendieron a conducir más lentamente que las inactivas.

* CV Slowing (%) = Desaceleración de la velocidad de conducción (expresada en porcentaje).

de actividad para una conducción lenta en las fibras de tipo 1B, pero las diferencias entre las velocidades de las fibras espontáneas y las que estaban en reposo (las fibras activas condujeron un 46% más lento en los humanos) fueron demasiado grandes como para que puedan ser explicadas solamente por este efecto.

En los pacientes, también se ha investigado la relación entre el porcentaje de fibras activas y la escala de valoración verbal del dolor (EVB). Hubo una proporción ligeramente mayor de fibras activas de tipo 1B en los pacientes que manifestaron mayor dolor (EVB 5-8: 34,3%) que en el grupo con menor dolor (EVB 1-4: 31,7%), pero esta diferencia no fue significativa.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró que los registros de los pacientes con dolor neuropático, y de cinco modelos diferentes de dolor neuropático en ratas, se caracterizan por una actividad espontánea de las fibras de los nociceptores C mucho mayor de lo normal. Aquí se discute acerca de cómo la actividad espontánea puede ser distinguida en las imágenes rasterizadas de otras causas de fluctuaciones de la latencia, dónde surge la actividad espontánea y cuál es la relevancia de las mediciones de la misma para el dolor neuropático y la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos.

Fluctuaciones de la latencia en los nociceptores normales

Al principio se supuso que podría ser posible identificar las unidades espontáneamente activas simplemente a partir de la amplitud de sus fluctuaciones de latencia, por lo que se evaluaron los límites de la variación normal de la latencia, medida como la **desviación estándar de los cambios de latencia** entre barridos sucesivos (Jsd). En todos los tipos de nociceptores, la Jsd (en milisegundos) tiende a incrementar con el aumento de la latencia y a disminuir con el incremento de la velocidad (gráfico 2A). Las características de las ondas mostradas en la figura 2C proporcionan cierta evidencia sobre la fuente de la variación (fluctuación) normal. Para las unidades **a** y **b** de «baja variación», las fluctuaciones de la latencia fueron proporcionales a la propagación de los potenciales de acción alrededor del pico, sugiriendo que en estos casos la variación surgió simplemente de la interacción de la onda del potencial de acción con el ruido del registro. Para tales unidades puede surgir una relación con la velocidad debido a que los axones más veloces propenden a tener potenciales de acción más cercanos y más amplios. Por otro lado, la unidad **c** tuvo una variación mucho mayor de que la que se podría explicar de esta manera. Debido a que la fluctuación en dichas unidades de «alta variación» también tiene una relación inversa con la velocidad,

puede originarse en el sitio de la estimulación, debido a la variabilidad del sitio de inicio del impulso. Una variabilidad de 0,1 mm en el punto de excitación podría dar lugar a una variación de la latencia de 0,1 ms para una velocidad de 1 ms^{-1} pero 0,5 ms para una velocidad de $0,2 \text{ ms}^{-1}$. La falta de correlación entre la Jsd y la distancia es un argumento en contra de una contribución significativa del comportamiento estocástico de los canales de sodio.¹⁹ Cualquiera que haya sido la causa de las fluctuaciones de la latencia, la Jsd en todos los nociceptores normales fue menor de 0,3 ms o menor del 0,2% de la latencia basal.

Criterios para identificar la actividad espontánea a partir de las fluctuaciones de la latencia

Aunque los límites ya mencionados son útiles para distinguir si las fluctuaciones espontáneas de la latencia están dentro de los límites normales o no, se encontró que, especialmente en las fibras patológicas, la variación podría incrementarse muy por encima de lo normal debido a varios otros factores diferentes de la actividad espontánea. Cuando una variación anormal es causada por la actividad espontánea, los cambios de la latencia siempre son asimétricos positivos (gráficos 8 y 9). La asimetría positiva separa la variación causada por los impulsos adicionales de la variación causada por los saltos de latencia (gráfico 3), potenciales de acción de doble pico (gráfico 4) y fracasos de la estimulación (gráfico 6).

Sin embargo, los impulsos adicionales también pueden presentarse debido a picos múltiples inducidos por los estímulos, los cuales generalmente se encuentran en las fibras patológicas.³⁷ Los picos múltiples pueden producir perfiles de latencia irregulares en «dientes de sierra», con cambios de latencia asimétricos positivos, imitando a los de las unidades espontáneas. Cuando se sospecha, los picos múltiples a menudo pueden ser confirmados al alterar la intensidad del estímulo (gráfico 7). Sin embargo, incluso con estímulos constantes, una característica distintiva de los picos múltiples fue que de un barrido al siguiente jamás se volvió a presentar más de un solo pico adicional. La desaceleración adicional promedio causada por dos picos adicionales al inicio de una serie de 2 Hz para las ratas de tipo 1B fue de 1,24%, y la desaceleración adicional causada por picos múltiples típicamente fue aproximadamente la mitad de aquella (figuras 5B y 7F). Dado que la desaceleración máxima producida por dos picos adicionales fue del 2,2%, inferimos que un solo pico podría incrementar la latencia en no más del 1,1%. Debido a que las fibras patológicas pueden comportarse de manera diferente, se estableció que el 1,5% sería el límite más conservador para el aumento

de la latencia con el cual podríamos estar seguros de que por encima de este valor ya no habría ningún otro pico adicional (gráficos 5, 7, 9 y 10). En pacientes humanos, la desaceleración adicional causada por dos picos adicionales puede ser mucho menor que esto y es medida mejor en cada fibra (gráfico 8).

En resumen, para estar seguros de que un perfil de fluctuación anormal de la latencia en una imagen rasterizada es causado por la actividad espontánea, el histograma de los cambios de la latencia entre los barridos sucesivos debería ser asimétrico positivo y extenderse hacia el aumento de la latencia esperado para dos picos adicionales. Estos criterios fueron utilizados en la segunda parte de este estudio cuando fueron necesarios para ayudar en la identificación de fibras C activas espontáneamente en los diferentes modelos de dolor neuropático y en pacientes con dolor neuropático. Es importante distinguir las fluctuaciones de la latencia debido a la actividad espontánea de aquellas generadas por los picos múltiples que se presentan tanto en las fibras de tipo 1A como en las de tipo 1B;³⁷ no obstante, en este estudio nunca se observó una actividad espontánea incuestionable de las fibras de tipo 1A. Debemos hacer notar que un patrón regular de «descarga espontánea» previamente reportado teniendo en cuenta una imagen rasterizada de un paciente con dolor neuropático (gráfico 5A, en Ochoa *et al*)²⁶ no satisficaría este criterio. No hemos observado estas descargas espontáneas regulares en el presente estudio y es posible que una unidad de doble pico por error no haya sido identificada en este caso.

4.3. Origen de los impulsos espontáneos

Los dos principales hallazgos en este estudio relevantes para el mecanismo de la actividad espontánea de los nociceptores C son: 1) que la actividad espontánea estuvo confinada a las fibras con patrón de tipo 1B o de desaceleración dependiente de la actividad, que (por lo menos en humanos) corresponde a la clase de nociceptores normalmente insensibles a los estímulos mecánicos o «silentes», y 2) que, en cinco modelos diferentes de dolor neuropático en ratas (gráfico 9) y en pacientes (gráfico 8) se registraron patrones aparentemente similares a los de las descargas espontáneas. Para saber qué tan similares son los patrones de descarga y si estos proporcionan evidencia de un origen común (por ejemplo, de brotes neuronales), se requiere registros con una relación señal/ruido lo suficientemente alta para determinar el ritmo de todos los potenciales de acción de una sola unidad sin ambigüedades, pero aún no tenemos datos suficientes para presentar dicho análisis.

La restricción de la actividad espontánea a los nociceptores de tipo 1B también fue reportada en un estudio microneurográfico de pacientes con eritromelalgia.²⁸ No toda actividad espontánea de los nociceptores en los estados de dolor surge de las fibras de tipo 1B; sin embargo, previamente hemos reportado el caso de un paciente con alodinia al frío⁸ en el cual indiscutiblemente las fibras de tipo 1A descargaban de manera espontánea.³⁵ La actividad espontánea estuvo asociada con una sensibilidad anormal al frío y al mentol que se manifestó en ambos nociceptores, 1A y 1B.

La asociación de la actividad espontánea con una menor velocidad de conducción, tanto en pacientes humanos como en ratas (gráfico 12), puede parecer paradójica, pues se esperaría que una fibra más excitable condujera más rápido. Sin embargo, si la conducción lenta estaba relacionada con un diámetro reducido,²⁸ entonces la paradoja estaría resuelta, porque un pequeño diámetro puede incrementar la probabilidad de descargas ectópicas espontáneas.¹⁹

Papel funcional de la actividad espontánea de los nociceptores C y sus implicancias para las pruebas de drogas

Este estudio ha confirmado, con la evidencia previa microneurográfica, que los nociceptores de tipo C generalmente son más activos en los pacientes con dolor neuropático que en los sujetos sanos.^{9,26,28,35} Puesto que la estimulación selectiva intraneural de los nociceptores C evoca una percepción de ardor o dolor profundo en los sujetos control,²⁴ es razonable asumir que la actividad espontánea en los pacientes con dolor neuropático contribuye a su dolor espontáneo (a condición de que se satisfagan ciertos requisitos temporales y espaciales sumatorios). De esto se deduce que la detección y cuantificación de la actividad espontánea de los nociceptores C pueden proporcionar una medida objetiva útil de la fuente de las sensaciones dolorosas.

Aquí se ha restringido el análisis de la actividad espontánea a un simple recuento de la cantidad de nociceptores activos e inactivos. Sería claramente deseable proporcionar índices más precisos de la actividad espontánea, teniendo en cuenta la frecuencia y extensión de los cambios de la latencia dependientes de la actividad. Un «índice optimizado de ectopía» tendría que considerar también las consecuencias sensoriales del patrón temporal de los impulsos ectópicos así como la tasa global de generación de impulsos y debería, en el futuro, incrementar considerablemente el poder

de la microneurografía para evaluar la actividad de los nociceptores y los tratamientos que los afectan. Sin embargo, la validación de estas medidas tomaría tiempo. Los presentes resultados ya muestran que las descargas espontáneas de los nociceptores C pueden ser cuantificadas en los cinco modelos de dolor neuropático estudiados, empleando el sencillo método de calcular la proporción de fibras activas en las imágenes rasterizadas de la microneurografía.

Hay una escasez de fármacos analgésicos satisfactorios para el dolor neuropático, por lo que consideramos que estos nuevos resultados son relevantes para la búsqueda de mejores tratamientos. Las limitaciones de los estudios preclínicos previos han dado lugar a un nuevo y ambicioso proyecto de la Unión Europea «Iniciativa para Medicamentos Innovadores», con la finalidad de determinar el valor predictivo de los diferentes modelos animales de dolor neuropático (<http://www.imi.europa.eu/>). Una limitación pudo haber sido el énfasis inapropiado en las medidas del comportamiento del dolor evocado, como la hipersensibilidad relacionada con el reflejo de retirada de la extremidad.^{8,31} Estos pueden modelar la hiperalgesia y alodinia que se observan en los pacientes; pero los pacientes con neuropatía de fibras pequeñas con mayor frecuencia se quejan de sensación de ardor o dolores profundos. Por consiguiente, se han propuesto medidas del comportamiento del dolor espontáneo, como el levantamiento del pie,^{4,13} que se ha relacionado con la frecuencia de disparos de los nociceptores C.¹⁵ El presente estudio ha demostrado que la actividad espontánea de los nociceptores C también puede ser identificada de manera fiable y consistente mediante la microneurografía, tanto en los pacientes con dolor neuropático como en los modelos de dolor neuropático en ratas, y que esto puede proporcionar un enfoque más directo para la evaluación de potenciales tratamientos.

Agradecimientos

Este trabajo es parte del proyecto IMI European y financiado parcialmente por la empresa IMI Ju, subvención 11507. XN fue apoyado con becas CP-FP-INFOS-224012 (proyecto TIME) de la UE y financiamiento provenientes del TERCEL y CIBERNED del Fondo de Investigación Sanitaria de España. JS, RS, JA, EG, BC y CQ son empleados de Neuroscience Technologies SL, Barcelona, y HB es un consultor de esta misma entidad. HB recibe regalías por las ventas del programa Qtrac.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amir R, Michaelis M, Devor M. Burst discharge in primary sensory neurons: triggered by subthreshold oscillations, maintained by depolarizing afterpotentials. *J Neurosci* 2002;22:1187-98.
2. Attal N, Fermanian C, Fermanian J, Lanteri-Minet M, Alchaar H, Bouhassira D. Neuropathic pain: are there distinct subtypes depending on the aetiology or anatomical lesion? *Pain* 2008;138:343-53.
3. Baron R, Tölle TR, Gockel U, Brosz M, Freynhagen R. A cross-sectional cohort survey in 2100 patients with painful diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia: differences in demographic data and sensory symptoms. *Pain* 2009;146:34-40.
4. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33:87-107.
5. Bostock H, Campero M, Serra J, Ochoa J. Velocity recovery cycles of C fibres innervating human skin. *J Physiol* 2003;553:649-63.
6. Bostock H, Campero M, Serra J, Ochoa JL. Temperature-dependent double spikes in C-nociceptors of neuropathic pain patients. *Brain* 2005;128:2154-63.
7. Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 2008;136:380-7.
8. Boyce S, Hill RG. Discrepant results from preclinical and clinical studies on the potential of substance P-receptor antagonist compounds as analgesics. En: Devor M, Rowbotham MC, Wiesenfeld-Hallin Z, editors. *Proceedings of the 9th world congress on pain*. Seattle: IASP Press; 2000. p. 313-24.
9. Campero M, Bostock H, Baumann TK, Ochoa JL. A search for activation of C nociceptors by sympathetic fibers in complex regional pain syndrome. *Clin Neurophysiol* 2010;121:1072-9.
10. Campero M, Serra J, Marchettini P, Ochoa JL. Ectopic impulse generation and autoexcitation in single myelinated afferent fibers in patients with peripheral neuropathy and positive sensory symptoms. *Muscle Nerve* 1998;21:1661-7.
11. Campero M, Serra J, Bostock H, Ochoa JL. Slowly conducting afferents activated by innocuous low temperature in human skin. *J Physiol* 2001;535:855-65.
12. Campero M, Serra J, Bostock H, Ochoa JL. Partial reversal of conduction slowing during repetitive stimulation of single sympathetic efferents in human skin. *Acta Physiol Scand* 2004;182:305-11.
13. Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 1994;59:369-76.
14. De Col R, Messlinger K, Carr RW. Conduction velocity is regulated by sodium channel inactivation in unmyelinated axons innervating the rat cranial meninges. *J Physiol* 2008;586:1089-103.
15. Djouhri L, Koutsikou S, Fang X, McMullan S, Lawson SN. Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors. *J Neurosci* 2006;26:1281-92.
16. Devor M. Ectopic discharge in A-beta afferents as a source of neuropathic pain. *Exp Brain Res* 2009;196:115-28.
17. Endres W, Grafe P, Bostock H, ten Bruggencate G. Changes in extracellular pH during electrical stimulation of isolated rat vagus nerve. *Neurosci Lett* 1986;64:201-5.
18. England JD, Gronseth GS, Franklin G, Carter GT, Kinsella LJ, Cohen JA, Asbury AK, Szigeti K, Lupski JR, Latov N, Lewis RA, Low PA, Fisher MA, Herrmann DN, Howard Jr JF, Lauria G, Miller RG, Polydefkis M, Sumner AJ, American Academy of Neurology. Practice parameter: evaluation of distal symmetric polyneuropathy: role of autonomic testing, nerve biopsy, and skin biopsy (an evidence-based review). Report of the American Academy of Neurology, American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology* 2009;72:177-84.
19. Faisal AA, Laughlin SB. Stochastic simulations on the reliability of action potential propagation in thin axons. *PLoS Comput Biol* 2007;3:e79.
20. Jensen MP, Karoly P. Self-report scales and procedures for assessing pain in adults. In: Turk DC, Melzack R, editors. *Handbook of pain assessment*. New York: Guilford Press; 2001. pp. 135-51.
21. Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 2009;10:895-926.
22. Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, Kennedy WR, Leger JM, Mellgren SI, Nolano M, Merkies IS, Polydefkis M, Smith AG, Sommer C, Valls-Solé J. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 2010;17:e44-9.
23. Lee DH, Chang L, Sorkin LS, Chaplan SR. Hyperpolarization-activated, cation nonselective, cyclic nucleotide-modulated channel blockade alleviates mechanical allodynia and suppresses ectopic discharge in spinal nerve ligated rats. *J Pain* 2005;6:417-24.
24. Lundberg LE, Jørum E, Holm E, Torebjörk HE. Intra-neural electrical stimulation of cutaneous nociceptive fibres in humans: effects of different pulse patterns on magnitude of pain. *Acta Physiol Scand* 1992;146:41-8.
25. McMahon SB, Wall PD. Physiological evidence for branching of peripheral unmyelinated sensory afferent fibers in the rat. *J Comp Neurol* 1987;261:130-6.
26. Ochoa JL, Campero M, Serra J, Bostock H. Hyperexcitable polymodal and insensitive nociceptors in painful human neuropathy. *Muscle Nerve* 2005;32:459-72.
27. Ørstavik K, Namer B, Schmidt R, Schmelz M, Hilliges M, Weidner C, Carr RW, Handwerker H, Jørum E, Torebjörk HE. Abnormal function of C-fibers in patients with diabetic neuropathy. *J Neurosci* 2006;26:11287-94.
28. Ørstavik K, Weidner C, Schmidt R, Schmelz M, Hilliges M, Jørum E, Handwerker H, Torebjörk E. Pathological C-fibers in patients with a chronic painful condition. *Brain* 2003;126:567-78.
29. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, Schacht AL. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:203-14.
30. Rang HP, Ritchie JM. The ionic content of mammalian non-myelinated nerve fibres and its alteration as a result of electrical activity. *J Physiol* 1968;196:223-36.
31. Rice AS, Cimino-Brown D, Eisenach JC, Kontinen VK, Lacroix-Fralish ML, Machin I, Preclinical Pain Consortium, Mogil JS, Stöhr T. Animal models and the prediction of efficacy in clinical trials of analgesic drugs: a critical appraisal and call for uniform reporting standards. *Pain* 2008;139:243-7.
32. Serra J. Microneurography: an opportunity for translational drug development in neuropathic pain. *Neurosci Lett* 2010;470:155-7.
33. Serra J, Campero M, Ochoa J, Bostock H. Activity dependent slowing of conduction differentiates functional types of C fibers innervating human skin. *J Physiol* 1999;515:799-811.
34. Serra J, Campero M, Bostock H, Ochoa J. Two types of C-nociceptors in human skin and their behavior in areas of capsaicin-induced secondary hyperalgesia. *J Neurophysiol* 2004;91:2770-81.
35. Serra J, Solà R, Quiles C, Casanova-Molla J, Pascual V, Bostock H, Valls-Solé J. C-nociceptors sensitized to cold in a patient with small-fiber neuropathy and cold allodynia. *Pain* 2009;147:46-53.
36. Serra J, Bostock H, Navarro X. Microneurography in rats: a minimally invasive method to record single C-fiber action potentials from peripheral nerves in vivo. *Neurosci Lett* 2010;470:168-74.
37. Serra J, Solà R, Aleu J, Quiles C, Navarro X, Bostock H. Double and triple spikes in C-nociceptors in neuropathic pain states: an additional peripheral mechanism of hyperalgesia. *Pain* 2011;152:343-53.
38. Torebjörk HE, Hallin RG. Responses in human A and C fibres to repeated electrical intradermal stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1974;37:653-64.

39. Vallbo A, Hagbarth KE. Activity from skin mechanoreceptors recorded percutaneously in awake human subjects. *Exp Neurol* 1968;21:270-89.
40. Wallace VC, Blackbeard J, Segerdahl AR, Hasnie F, Pheby T, McMahon SB, Rice AS. Characterization of rodent models of HIV-gp120 and anti-retroviral associated neuropathic pain. *Brain* 2007;130:2688-702.
41. Weidner C, Schmelz M, Schmidt R, Hansson B, Handwerker HO, Torebjörk HE. Functional attributes discriminating mechanosensitive and mechanoresponsive C-nociceptors in human skin. *J Neurosci* 1999;15:10184-90.
42. Weidner C, Schmidt R, Schmelz M, Torebjörk HE, Handwerker HO. Action potential conduction in the terminal arborisation of nociceptive C-fiber afferents. *J Physiol* 2003;547:931-40.
43. Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* 2010;152:S2-S15.
44. Xie W, Strong JA, Meij JT, Zhang JM, Yu L. Neuropathic pain: early spontaneous afferent activity is the trigger. *Pain* 2005;116:243-56