

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO EN PODOLOGÍA**



**DESCRIPCIÓN DE UN MODELO ANIMAL PARA EL ESTUDIO DE DOLOR  
ARTICULAR.**

**AUTORA:** HERNÁNDEZ HERRERO, LAURA.

**Nº de expediente:** 154.

**TUTORA:** DE LA PEÑA GARCÍA, ELVIRA.

**Departamento y Área:** Fisiología.

**Curso académico:** 2015-2016.

**Convocatoria de Junio.**

## Índice

1. Resumen .....	4
2. Abstract .....	5
3. Abreviaturas .....	6
4. Introducción	
4.1. Algunos aspectos sobre el dolor .....	7
4.2. Vía somatosensorial del dolor .....	8
4.3. Modulación del dolor .....	9
4.4. Tipos de mecanorreceptores y nociceptores en las articulaciones .....	9
4.5. Tipos de dolor .....	11
4.6. Sensibilización .....	12
4.7. La articulación de la rodilla .....	12
4.8. Transducción de estímulos mecánicos y propioceptivos en una articulación ..	13
4.9. Modelo animal para el estudio de la actividad eléctrica de fibras nerviosas que inervan la cavidad de la articulación .....	14
5. Hipótesis .....	15
6. Objetivos .....	15
7. Material y métodos	
7.1. Animales de experimentación y cumplimiento de las normativas de experimentación animal .....	16
7.2. Periodo de experimentación animal .....	17
7.3. Preparación del animal de experimentación	
7.3.1. Anestesia y sedación .....	17

7.3.2. Cirugías .....	18
7.3.3. Componentes electrónicos para el registro de la actividad eléctrica .....	27
7.3.4. Análisis de la descarga eléctrica de las fibras .....	27
8. Resultados	
8.1. Control de los parámetros fisiológicos durante el registro .....	28
8.2. Registro de la actividad eléctrica .....	29
9. Discusión	
9.1. Sobre el modelo .....	31
9.2. Problemas con el mantenimiento de la rata dentro de los parámetros fisiológicos .....	31
9.3. Correlación frecuencia de disparo-intensidad del estímulo .....	31
9.4. Utilidad del modelo para el estudio de artritis y artrosis .....	32
10. Conclusiones .....	34
11. Agradecimientos .....	35
12. Referencias bibliográficas .....	36
13. Anexos .....	40

## 1. RESUMEN

La investigación con modelos animales permite muchas posibilidades de aprendizaje que nos ayudan a comprender determinados procesos fisiológicos y patológicos, además nos brinda la oportunidad de probar tratamientos con el uso de técnicas precisas a menudo difíciles de aplicar en estudios clínicos en humanos. En el presente trabajo se detalla el procedimiento experimental para la preparación de un modelo animal que permite estudiar la fisiología articular, con el fin de conocer cómo actúan las fibras nerviosas nociceptivas que inervan una cavidad articular cuando se les aplican estímulos nocivos, comparándolos con estímulos inocuos, mediante el registro de su actividad eléctrica. El animal de estudio elegido es la rata y la articulación de la rodilla. Este modelo permite poder realizar posteriores estudios en modelos de dolor, como artrosis o artritis gotosa, y aplicar distintas sustancias y fármacos para poder comprobar el efecto de cada uno de ellos. Los animales de este estudio nunca sufrieron dolor al estar anestesiados y se utilizó el menor número de animales, siendo estos, animales que iban a ser sacrificados al haberse utilizado en estudios previos que no interferían en este trabajo. Se cumplió la normativa europea que rige el estudio experimental con animales.

## 2. ABSTRACT

Animal models research allows learning opportunities that provide better understanding of basic physiological and pathological processes common to several species. At the same time it brings along the possibility of testing accurate techniques often ethically unjustifiable in clinical trials with humans. The present paper details an experimental procedure in order to study joint pain. The report purpose is to achieve knowledge of how knee joint cavity nociceptive fibers act when undergone harmful stimulus compared to harmless ones by registering its electrical activity. Rat has been chosen as animal model and knee as articulation of study. The described technique could result relevant for further pain models studies, such as osteoarthritis or gouty arthritis, as well as for testing several treatment drugs effects. Animal individuals included in the study came from a former trial with no interference with the present work and were going to be euthanized. They suffered no pain due to anesthetics, being used as fewer as possible. European experimental animal research regulations were met throughout the development of the study.

### 3. ABREVIATURAS

**SNC**= Sistema Nervioso Central

**SNS**= Sistema Nervioso Somático

**Na+**= Sodio

**TCS**= Tejido celular subcutáneo

**mN**= Milinewtons

**OR**= Rotaciones externa inocuas/Outward rotations

**NOR**= Rotaciones externa nocivas/Noxious outward rotations

**IR**= Rotaciones internas inocuas/ Inward rotations

**NIR**= Rotaciones internas nocivas/ Noxious outward rotations

**mmHg**= Milímetros de Mercurio

## 4. INTRODUCCIÓN

### 4.1. Algunos aspectos sobre el dolor

El dolor, además de ser una sensación básica para la supervivencia, prevención de riesgos y reflejos protectores, también es un grave problema de salud pública en todo el mundo.

El dolor articular es una de las principales molestias por la cual los pacientes buscan ayuda. La incapacidad funcional que conlleva causa sufrimiento repercutiendo en la calidad de vida, y las terapias poco eficaces pueden hacer que se deteriore el estado emocional.

Un conocimiento deficiente tanto del profesional sanitario como del paciente en el manejo del dolor, una evaluación insuficiente de su intensidad, el temor a la adicción a algunos fármacos o la preocupación por los efectos secundarios de los mismos son las principales causas de un tratamiento infructuoso<sup>1,2</sup>.

El dolor articular y su tratamiento son una especialidad médica, siendo un tema importante en investigación científica. Su estudio y desarrollo es considerado desde diversas disciplinas con el fin de optimizar las terapias relacionadas con patologías como: artritis, artrosis o gota. De los últimos conocimientos acumulados en el campo del dolor a lo largo de las últimas décadas, los mecanismos íntimos de neurotransmisión y neuromodulación de la sensación de dolor son los más importantes<sup>3,4</sup>.

#### 4.2. Vía somatosensorial del dolor

Los tejidos y estructuras como la piel, la musculatura esquelética y las articulaciones tienen receptores sensoriales especializados en la percepción del dolor, llamados nociceptores. Se activan con el estímulo nocivo, lo convierten en señal eléctrica (transducción) y lo conducen mediante potenciales de acción al sistema nervioso central (SNC), asta dorsal de la médula espinal en el caso de tronco y extremidades. Las fibras nociceptivas son neuronas de primer orden. Inmediatamente la información sensitiva se integra en el SNC, cruza al lado contralateral de la médula y viaja por el haz espinotalámico hasta el tálamo por las neuronas de segundo orden, y del tálamo a la corteza cerebral por las neuronas de tercer orden (Figura 1), momento en el que se es consciente del dolor producido por el estímulo.

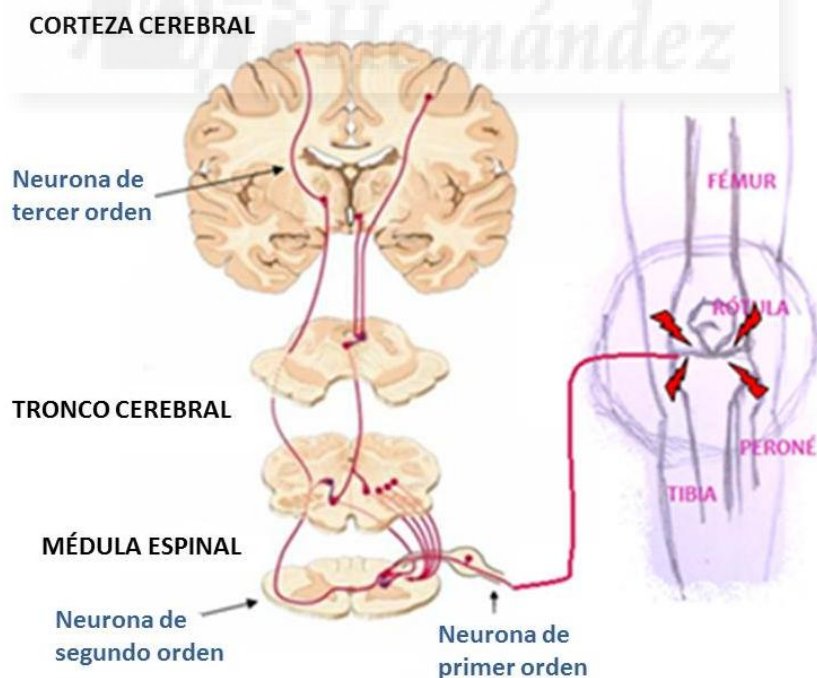


Figura 1. Representación de la vía aferente en la fisiopatología del dolor (Modificada de: Aliaga et al., 1996, con dibujo a mano alzada de la autora de este TFG).



### **4.3. Modulación del dolor**

El dolor se puede modular a distintos niveles en el sistema nervioso: periférico, espinal y supraespinal. En el presente trabajo se plantea un modelo de dolor que permite el estudio del efecto de fármacos a nivel periférico (neuronas de primer orden en contacto con los estímulos).

### **4.4. Tipos de mecanorreceptores y nociceptores presentes en las articulaciones**

En las articulaciones podemos encontrar distintos receptores sensoriales que nos informan de la propiocepción y del dolor (nocicepción).

Los propioceptores informan sobre la posición articular en estática y en dinámica (mecanorreceptores), detectando estímulos de vibración, presión o estiramiento.

Distinguimos 3 tipos de receptores del dolor<sup>4</sup>:

- Terminaciones libres o nociceptores: Asociadas a fibras C no mielinizadas. En el periostio son receptores unimodales, respondiendo sólo al dolor.
- Mecanorreceptores de umbral elevado: Transmiten las presiones lesivas en los tejidos a través de las fibras A- $\delta$  mielinizadas. Son responsables del dolor agudo.
- Receptores polimodales cutáneos: Mayormente fibras C. Si el estímulo es suave, se percibe como sensación táctil o de temperatura y si es agresivo, se percibe como dolor. También detectan sustancias químicas como las liberadas en procesos inflamatorios.

Dividimos las fibras nerviosas en tres grupos según su estructura y velocidad de conducción del estímulo:

- Fibras A (A- $\alpha$ , A- $\beta$ , A- $\gamma$ , A- $\delta$ ).
- Fibras B.
- Fibras C.

Las fibras A- $\delta$  y C son las responsables de la transmisión del dolor<sup>6</sup> (Tabla1).

La fibra A- $\delta$  son las fibras nerviosas sensoriales que transmiten información de tipo doloroso y térmico, las fibras C transmiten información de tipo doloroso, térmico y de picor<sup>7</sup>.

Grupo	Cubierta del axón	Umbral de excitación	Diámetro del axón ( $\mu$ )	Velocidad de conducción (m/s)	Dolor asociado
A- $\delta$	Mielínica	Menor	1,0-5,0	4-30	Agudo y punzante
C	Amielínica	Mayor	0,3-1,5	0,5-2	Lento y quemante

*Tabla 1. Fibras nociceptivas y sus características (modificada de: Medical Physiology, Boron-Boulpaep Updated 2nd edit.).*

La diferencia en la velocidad de conducción explica la doble percepción de un estímulo doloroso; uno inicial breve, bien localizado, punzante y rápido, llamado epicrítico, transmitido por las fibras A- $\delta$  y otro profundo, difuso, lento, llamado protopático transmitido por las fibras C. La mielinización sólo es necesaria para la velocidad de transmisión, no para que se produzca la transmisión nerviosa<sup>4</sup>.

#### **4.5. Tipos de dolor**

Existen diferentes clasificaciones del dolor, desarrollando las dos que creo más importantes en este trabajo: según duración (agudo y crónico) y según fisiopatología (nociceptivo y neuropático), siendo no excluyentes entre ellos. El dolor agudo está definido como “una experiencia desagradable y compleja con factores cognitivos y sensoriales que suceden como respuesta a un trauma tisular” [IASP]. Existe una reciprocidad entre la intensidad del dolor y la patología desencadenante, y su evolución es mermar hasta desaparecer una vez sanada la lesión. Puede ser de origen superficial (piel y mucosas), profundo (músculos, huesos, articulaciones, ligamentos) y visceral<sup>8</sup>. El dolor crónico se acepta como “dolor que se extiende más de 3 ó 6 meses, aún habiéndose realizado tratamiento, o el asociado a una condición médica crónica” [IASP]. Cuando no está asociado a cáncer o SIDA se le denomina Dolor Crónico Benigno<sup>9</sup>. El dolor nociceptivo es una respuesta fisiológica a una agresión. Está causado por la activación de los nociceptores A- $\delta$  y C en respuesta a estímulos nocivos sobre tejidos corporales, pudiendo ser éstos secundarios a una lesión, enfermedad, inflamación, infección o cirugía. Existe una correlación entre la percepción del dolor y la intensidad del estímulo desencadenante<sup>9</sup>. El dolor neuropático es un “dolor que se origina como consecuencia directa de una lesión o enfermedad que afecta al sistema somatosensorial” [NeuPSIG-2007].

#### **4.6. Sensibilización**

La sensibilización es un proceso de hiperexcitabilidad del sistema nociceptivo caracterizado por una disminución de los umbrales de dolor y un aumento de la frecuencia de generación de los potenciales de acción. Produce alodinia e hiperalgesia. La alodinia es la percepción de un estímulo doloroso cuando no debería serlo. La hiperalgesia es la percepción del dolor de una intensidad mayor a la esperada en relación al estímulo percibido<sup>10</sup>. Esto pasa cuando hay una estimulación nociceptiva en presencia de una lesión inflamatoria, como por ejemplo en la artritis.

#### **4.7. La articulación de la rodilla.**

La articulación de la rodilla es la mayor del cuerpo<sup>11</sup>. Está formada por las articulaciones femorotibial (cóndilos femorales y platillos tibiales) y patelofemoral (rótula y tróclea femoral)<sup>12</sup>. Ésta es de tipo sinovial, caracterizadas por una gran movilidad y por poseer una membrana fibrosa externa tapizada por otra membrana sinovial serosa que cubre interiormente la cápsula articular. El líquido sinovial, producido por la membrana sinovial, lubrica las superficies articulares facilitando su movimiento<sup>13</sup>. Dentro de la cápsula, el cartílago articular hialino cubre las superficies articulares de los huesos evitando el rozamiento entre ellos durante el movimiento y ayudando a amortiguar los golpes<sup>11</sup>. Está inervada por<sup>12</sup>:

- Cara anterior: Nervio femoral.
- Cara posterior: Nervio tibial (N. Ciático).
- Cara lateral: Nervio peroneo común (N. Ciático).
- Cara medial: Nervio safeno (N. Femoral)

#### **4.8. Transducción de estímulos mecánicos y propioceptivos en una articulación.**

Los estímulos sensoriales que recibe una articulación son las energías del medio externo o interno que percibimos y que estimulan al Sistema Nervioso Somático (SNS) liberando sustancias que producen cambios celulares. Los receptores sensoriales captan la información y la transforman en señales eléctricas (cambios en el potencial de membrana) que cuando alcanzan el umbral de disparo producen la generación de potenciales de acción, forma en la cual se transmite la información hasta el SNC a través de las neuronas y relevos sinápticos<sup>14</sup>.

El potencial se da por la capacidad de las neuronas de cambiar su potencial de membrana y transmitirlo a través de su axón: las membranas celulares están polarizadas con un reparto desigual de cargas eléctricas entre su exterior (positivo/aniones) y su interior (negativo/cationes). Por ejemplo, la entrada de cargas positivas hacia el interior, como puede ser el catión sodio [Na<sup>+</sup>], provocaría una despolarización. Este cambio en el potencial de membrana se le denomina potencial de receptor, que crea una diferencia de potencial que se dispersa por toda la fibra nerviosa<sup>15</sup>.

Para que se genere el potencial de acción es necesario alcanzar un umbral, que es cuando se llega a un valor de potencial de membrana que coincide con el voltaje al que se abren los 'canales de Na<sup>+</sup> voltaje dependientes' responsables de la despolarización.

Las fibras sensitivas descargan impulsos nerviosos cuando se estimulan mecánicamente o químicamente (Figura 2).

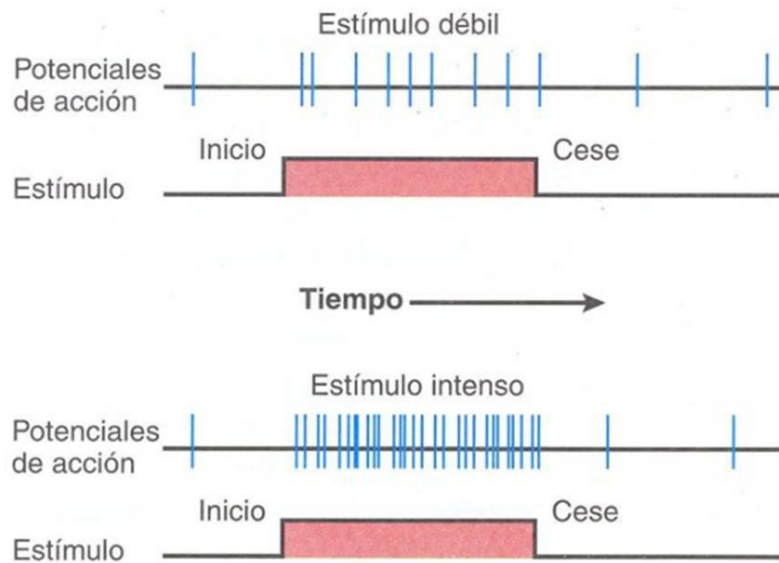


Figura 2. Frecuencia de potenciales de acción en una fibra sensorial.  
 Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

La intensidad y la duración del potencial del receptor varían con el estímulo, por lo tanto la frecuencia de los potenciales de acción es proporcional a la intensidad del estímulo<sup>16</sup>. También ante un estímulo sostenido las neuronas sensoriales disminuyen el nivel de respuesta en el tiempo, porque se adaptan<sup>17</sup>.

#### **4.9. Modelo animal para el estudio de la actividad eléctrica de fibras nerviosas que inervan la actividad de la articulación**

El modelo animal que se estudia en este trabajo está establecido en el laboratorio de la Dra. Ana Gomis y en el del Dr. Carlos Belmonte del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández-CSIC y ha permitido estudios relevantes en nocicepción<sup>18, 19, 20, 21, 22</sup>.

## 5. HIPÓTESIS

Mediante el registro de la actividad eléctrica de las fibras nerviosas que inervan la cavidad articular, ¿podemos estudiar el efecto de sustancias inflamatorias?, ¿podemos estudiar el efecto analgésico de distintos fármacos o sustancias?

## 6. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es obtener el registro de la actividad eléctrica de fibras nerviosas que inervan la cavidad articular de la rodilla de la rata.

### Objetivos específicos:

- Preparación del modelo animal para el registro. Mantenimiento de todos los parámetros fisiológicos: ventilación asistida, saturación de oxígeno en sangre, temperatura corporal.
- Correlación de la actividad eléctrica registrada en el nervio safeno con la intensidad del estímulo mecánico, aplicando un estímulo no nocivo y otro nocivo.
- Discutir el potencial de este modelo de modo que pueda servir para posteriores estudios con distintas aplicaciones de diferentes fármacos o sustancias y poder comprobar y comparar el efecto de cada uno en modelos de dolor como artrosis y artritis gotosa.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

La articulación de elección para el estudio de esta investigación es la rodilla, puesto que es la articulación de mayor tamaño en el miembro inferior del animal de experimentación elegido, en este caso la rata, siendo más fácil extrapolar los datos obtenidos a la raza humana. También por similitud anatómica y funcionalidad.

### **7.1. Animales de experimentación y cumplimiento de las normativas de experimentación animal**

La parte experimental del proyecto ha sido realizada en el Instituto de Neurociencias de Alicante, ubicado en el Campus de San Juan de la Universidad Miguel Hernández.

Se han utilizado ratas macho Wistar con un peso medio de 400 gr.

Todos los animales usados en este trabajo han sido tratados de acuerdo con el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. El procedimiento experimental ha sido aprobado por el Órgano Evaluador Competente (ANEXO 1). Al finalizar cada procedimiento, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico vía intravenosa, no habiendo sufrimiento en ningún momento puesto que siempre estuvo bajo anestesia y periódicamente se le realizaba el test del reflejo interdigital a la presión.



La autora de este trabajo está cualificada para el manejo de animales de experimentación. Diplomas acreditativos:

- Experimentadora Animal (ANEXO 2).
- Responsable del diseño y dirección de procedimientos experimentales con animales (ANEXO 3).
- Cursos (ANEXO 4).
  - ❖ Curso de Anestesia Inyectable.
  - ❖ Curso de Técnicas de Inoculación.
  - ❖ Curso de Toma de Muestras.

## **7.2. Periodo de experimentación animal**

El experimento ha sido llevado a cabo durante los meses de enero a marzo del 2016.

## **7.3. Preparación del animal de experimentación**

### **7.3.1. Anestesia y sedación**

Tras pesarlo, el animal fue anestesiado mediante una inyección intraperitoneal mezcla de Ketamina (75 mg/kg) y Xilacina (10 mg/kg).

Cuando la anestesia fue efectiva se le afeitaron las partes del cuerpo en las que íbamos a trabajar y luego se trasladó a la zona quirúrgica, colocándolo en decúbito supino sobre una manta térmica. Posteriormente fue sedado con inyecciones de Dolethal (Pentobarbital) con una solución de 40 mg/ml. Para controlar las dosis necesarias de sedación se monitorizaron la presión arterial y la frecuencia de pulso

durante todo el procedimiento. También se controló la temperatura corporal mediante la sonda intrarrectal y la manta térmica.

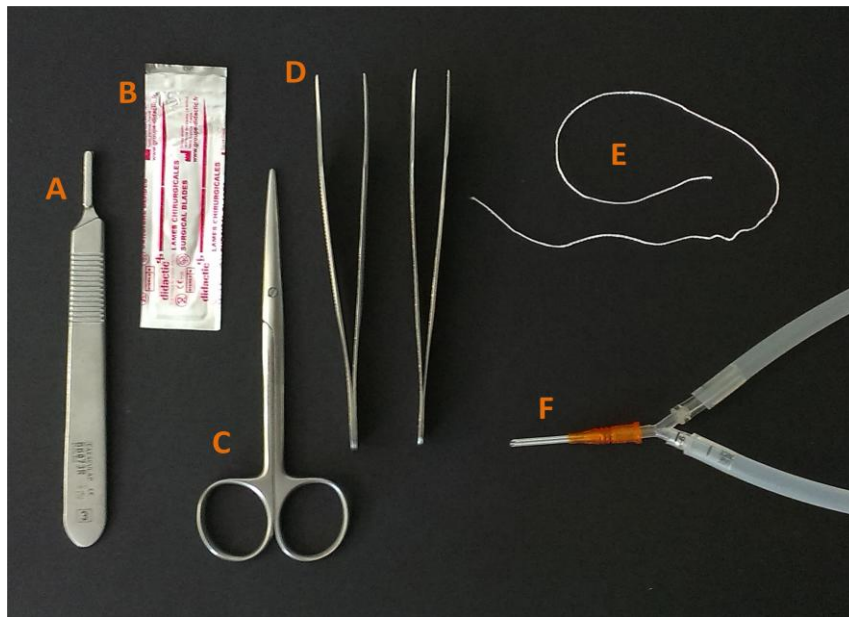
### **7.3.2. Cirugías**

Para poder realizar las cirugías se usó una lupa modelo Leica MZ6 con aumentos de 0,63X hasta 4X.

#### **Traqueotomía**

Al estar anestesiado y sedado el animal puede sufrir una depresión respiratoria. Para evitarla y conseguir una mejor oxigenación, se tuvo al animal con ventilación mecánica mediante un tubo endotraqueal. El tubo va conectado al respirador.

Para realizar la traqueotomía se hizo un corte longitudinal con el bisturí en la piel a lo largo de la zona media del cuello, entre el esternón y el cartílago cricoides, de 1 cm aproximadamente. Se separó la piel del tejido celular subcutáneo (TCS) con una disección roma, y retiramos el TCS necesario. Con pinzas se apartaron las glándulas salivales y el tejido conjuntivo que hay por encima de los músculos prelaríngeos. A continuación se dividieron los músculos esternotiroideos y esternohioideos presionando con la punta de las pinzas cerradas sobre la línea que separa sus vientres hasta ver la tráquea y se pinzaron con tijeras mosquito, separándolos. Se introdujeron pinzas curvas bajo la tráquea y se abrieron para liberar las estructuras bajo ésta y poder introducir un hilo de 6 cm de longitud, que serviría para asegurar el tubo endotraqueal. Se efectuó un corte transversal bajo el cartílago cricoides sin seccionar la tráquea por completo y se introdujo el tubo. Se anudaron los hilos haciendo un anclaje de seguridad para que no se saliera al movilizar al animal.



*Figura 3. Material para la traqueotomía. A: Mango de bisturí nº3. B: Hoja de bisturí nº15. C: Tijeras punta roma. D: Pinzas Hudson. E: Hilo para sujetar el tubo endotraqueal a tráquea. F: Tubo endotraqueal.*



## Canulación venosa y arterial

Tras la disección de la piel de la zona interna del muslo izquierdo de unos 5 cm de longitud en oblicuo desde el tobillo hasta la zona inguinal, y retirada de la grasa, se canularon la vena y arteria femoral para inyectar sustancias y controlar la presión arterial respectivamente, utilizando un transductor de presión arterial (Figura 4).

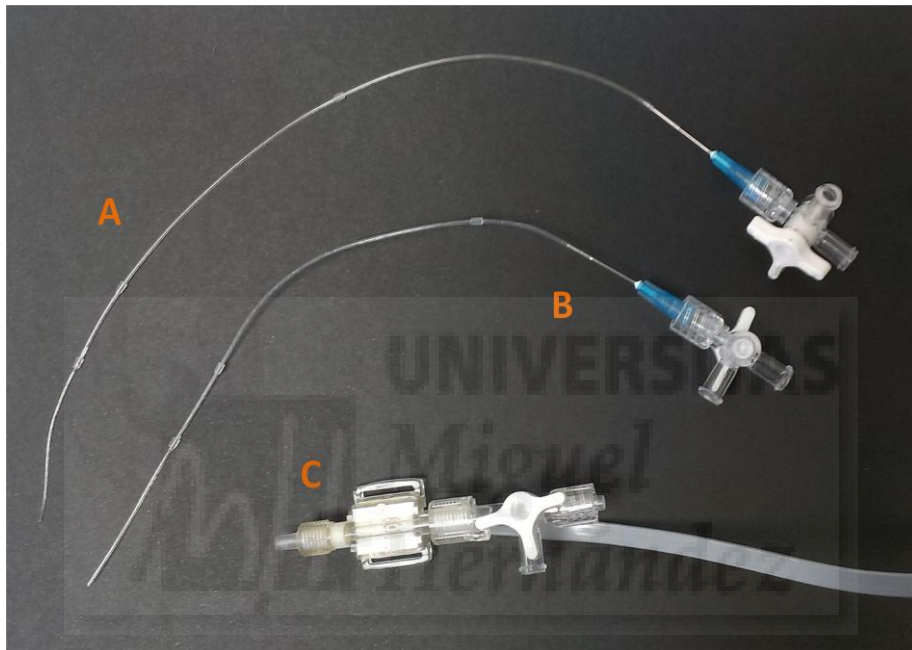


Figura 4. A: Cánula para arteria. B: Cánula para vena. C: Transductor.

La cánula de la vena quedó libre para inyectar sustancias como solución glucosada para mantener la hidratación y la glucemia, y la cánula de la arteria iba conectada a un transductor para medir la presión arterial. Antes de canular se llenaron con una solución especial para ratas mezclada con heparina.

Para realizar las canulaciones se separaron vena y arteria femoral con la punta de las pinzas. Una vez separadas se pinzó y elevó la vena y se pasaron bajo ésta dos hilos de 6 cm, llevando uno a distal y otro a proximal y marcando un nudo en cada uno. Siguiendo la dirección del flujo de la sangre se clampó en proximal tras el nudo (así se

engrosa el diámetro de la vena y se puede realizar el corte con más seguridad). Una vez hecho el corte se introdujo la cánula para vena, comprobando antes que no había burbujas de aire, se retiró el clamp y anudamos los hilos para que no se saliera la cánula. Se ejecutó la misma operación para la arteria, con dos diferencias: que en ella se pasaron tres hilos, dos de ellos llevados a proximal (ya que hay que asegurar mejor esta zona por la fuerza del flujo sanguíneo que puede hacer que se nos salga la cánula), y que el clamp se colocó en distal (ya que el flujo de sangre va al contrario que en la vena).

### **Disección de la pata derecha para acceder a la articulación de la rodilla**

En esta pata se busca y registra el nervio safeno. Para ello se realizó un corte oblicuo de 1 cm y después se practicó una disección roma de tejidos subyacentes, para continuar el corte de la piel de unos 5 cm de longitud total. Se retiró la grasa de los bordes y se cauterizaron los vasos encontrados en ella para limpiar el campo. Se tienen que separar los tejidos bajo la piel de casi toda la pata y el muslo del animal para poder trabajar mejor en el resto de procedimientos. Se identificó el nervio safeno y se hizo un corte de éste por encima de donde se ramifica cerca de la rodilla, ya que estas ramas van a la pierna y pie y no se quería hacer su registro.

### **Colocación de la abrazadera al fémur**

El fémur se fijó a una abrazadera para asegurar que las rotaciones sólo se realizaban en la rodilla. Con el bisturí se elaboró otro corte en la piel de la zona trasera del muslo en el que se metió la abrazadera más adelante. Se retiró la fascia que cubre los músculos del muslo por la parte externa y se hizo una incisión bajo la línea tendinosa, introduciendo una pala roma para separar los tejidos del fémur. Se acopló y se aseguró al hueso. Se subió al animal a la plataforma y se asentó la abrazadera a una base fija que impedía que se moviera, colocando primero la pata en una posición fisiológica (similar a la pata contralateral).

### **Realización de la piscina de aceite de inmersión**

El aceite de inmersión es un aceite desmineralizado que tiene dos cualidades esenciales para que este tipo de experimentos pueda ser llevado a cabo: crea un ambiente de alta resistencia al flujo de corriente evitando que ésta se disperse, y conserva los tejidos con los que se van a trabajar. Los potenciales de acción que se quieren registrar con este modelo animal son minúsculos, por lo que si el medio que rodea al nervio y al electrodo dejara pasar la corriente se disiparía y no detectaríamos cambio de voltaje en el electrodo.

Se comenzó a realizar la piscina de aceite desmineralizado suturando a la anilla la piel diseccionada del muslo derecho, y dando un punto también en el peritoneo para apartarlo de la ingle. Se llenó la piscina con el aceite.

### **Colocación de la pata al rotador mecánico-torque**

El torque es el instrumento que utilizamos para aplicar el estímulo mecánico. Va conectado al medidor de fuerza-giro y éste nos indica la cantidad de miliNewtons (mN) que aplicamos en cada rotación.

Se agarró con cinta la pata del animal al soporte rotador en una posición fisiológica y se imantó a la mesa. Se encendió el medidor de fuerza-giros, se puso a cero y se probaron para medir:

- Rotaciones externas inocuas (OR/Outward Rotations) y nocivas (NOR/Noxious Outward Rotations).
- Rotaciones internas inocuas (IR/Inward Rotations) y nocivas (NIR/Noxious Inward Rotations).

Los rangos de medida de las rotaciones varían según el animal, pudiendo movernos desde los 20 mN en OR-IR hasta los 50 mN en NOR-NIR.

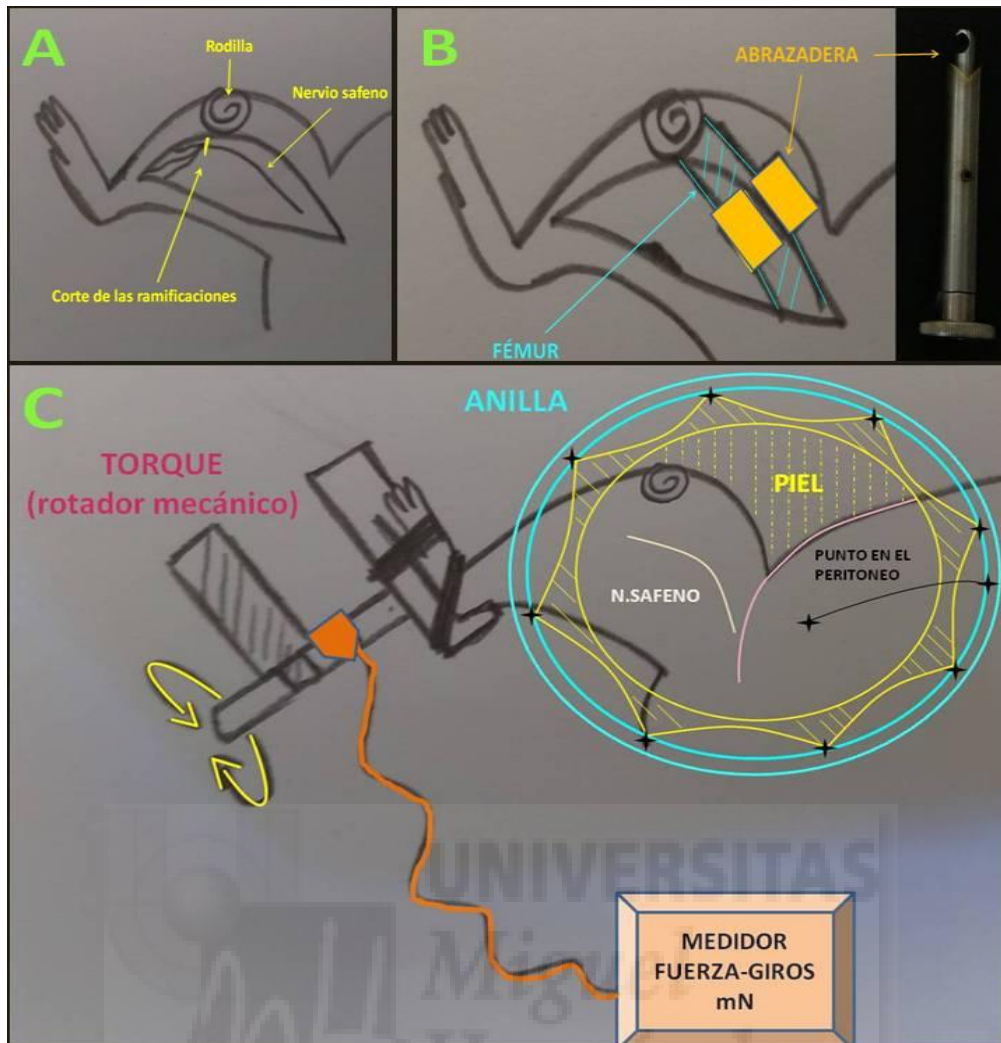
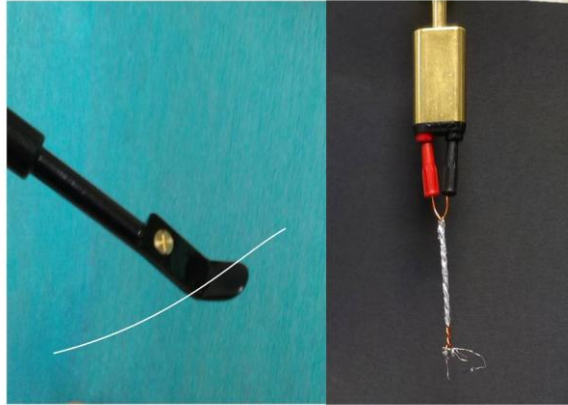


Figura 5. A: Corte de las ramificaciones del nervio safeno hacia la pierna. B: Perspectiva de la abrazadera al fémur. C: Piscina de aceite de inmersión y torque (modificadas de: Pawlak M et al, 2008; con dibujos a mano alzada de la autora de este TFG).

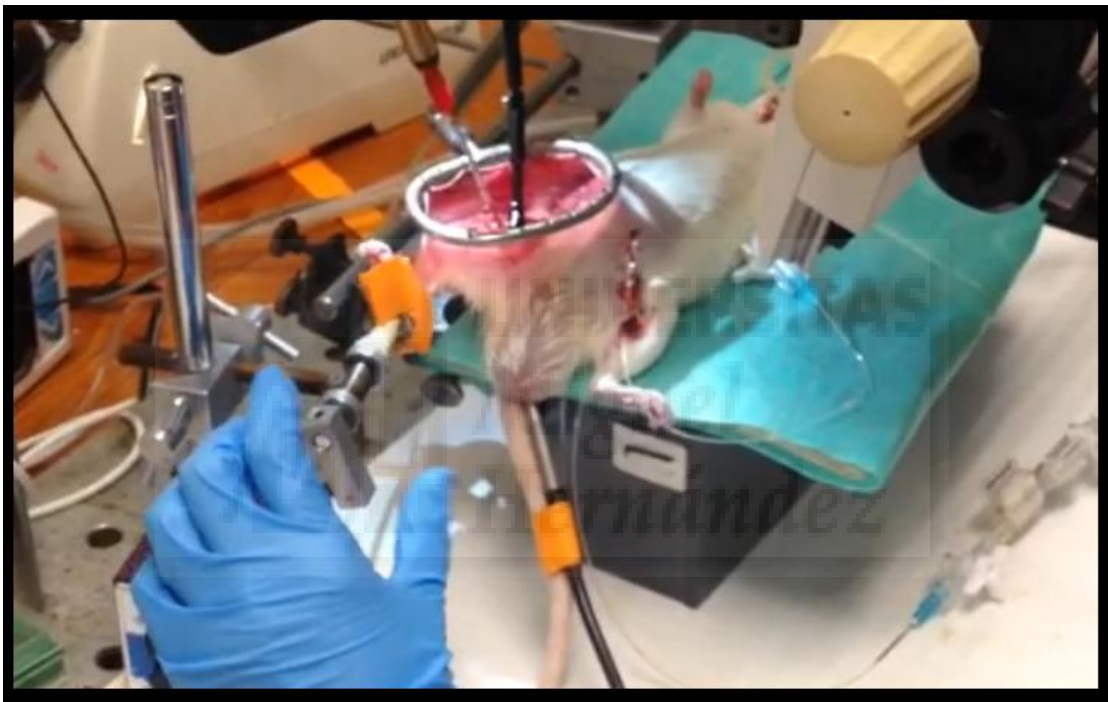
### Aislamiento de fibras nerviosas y estimulación del nervio

Se separó el safeno del resto pinzándolo con cuidado desde la zona más proximal a la ingle, desprendiéndolo del suelo muscular, hasta que se tuvo una longitud adecuada para poder trabajar las fibras cómodamente (más o menos unos 2,5 cm), procurando no dañarlo. Se preparó la placa plástica dentro de la piscina y se posó el nervio en ella. Se retiró el perineuro y se dividió la fibra en varios filamentos colocándolos uno a uno en el electrodo de alambre de platino. Se encendieron las máquinas y se comenzaron a testear las fibras separadas.



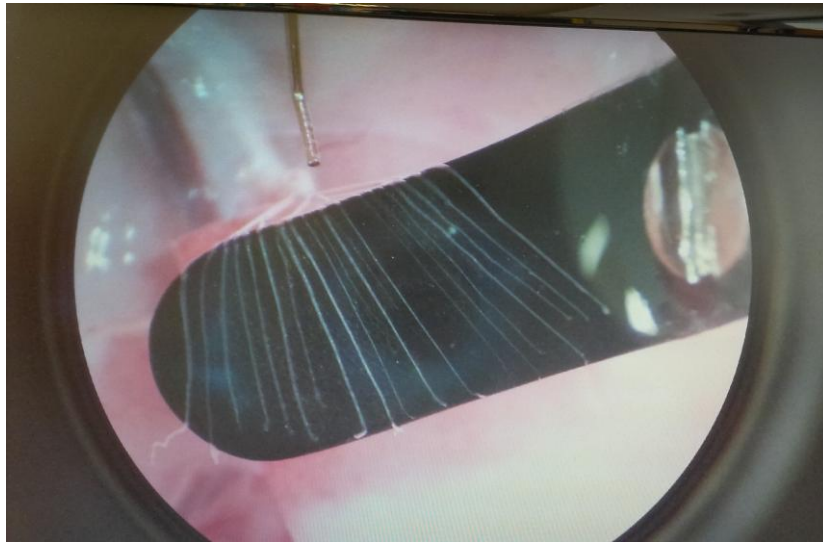


*Figura 6. Izquierda: Placa plástica; Derecha: Electrodo de registro.*



*Figura 7. Experimento en proceso con la placa y el electro dentro de la piscina.*

El objetivo de este punto era registrar una fibra nociceptiva, por lo que se dividieron los filamentos (Figura 8) las veces necesarias hasta encontrar una, testeando OR-NOR-IR-NIR.



*Figura 8. Tomada del laboratorio del Dr. Carlos Belmonte y Dra. Ana Gomis. Realizada por Stuart Ingham. Instituto de Neurociencias. Universidad Miguel Hernández-CSIC.*

Para identificar la fibra como articular, se estimuló su campo receptor aplicando presión con vidrio pulido. Posteriormente para clasificarla según la velocidad de conducción, se aplicó un pulso eléctrico, generando así un potencial de acción que se transmite con una latencia determinada y se midió la distancia recorrida desde el punto de estimulación al electrodo de registro.

### 7.3.3. Componentes electrónicos para el registro de la actividad eléctrica

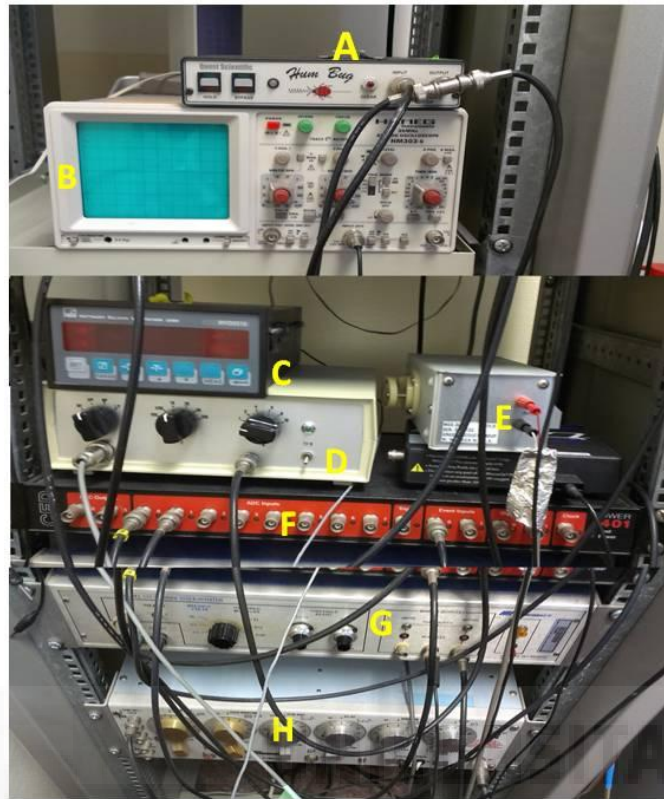


Figura 9. Rack. A: Hum Bug. Sirve para filtrar el ruido de la red eléctrica. B: Osciloscopio. Sirve para visualizar el registro electrofisiológico. C: Medidor de torsión. Mide los miliNewtons (mN) de fuerza que se aplican. D: Amplificador. Amplifica y filtra la señal. E: Fuente de energía del estimulador eléctrico. F: Digidata o convertidor analógico-digital. Transforma señales eléctricas analógicas en señales digitales (en código binario 0-1). G: Discriminador de ventana. Detecta los disparos de la fibra de registro. H: Generador de estímulos eléctricos (intensidad en Amperios, duración en milisegundos y frecuencia o veces que se estimula).

Las señales eléctricas se recogieron en un ordenador conectado a este sistema de aparatos eléctricos para su posterior análisis.

### 7.3.4. Análisis de la descarga eléctrica de las fibras

Para el análisis de las descargas eléctricas de las fibras se utilizó un programa de adquisición de señales bioeléctricas (Spike2) que permite contar el número de potenciales de acción y discriminar por altura del potencial si se está registrando de una fibra única o varias simultáneamente.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Control de los parámetros fisiológicos durante el registro

- La frecuencia de pulso y la saturación de oxígeno arterial se midieron mediante un pulsioxímetro, siendo los valores normales para las pulsaciones de 350 ppm en reposo y bajo anestesia entre 200-300 ppm y la saturación de oxígeno entre 90-99%. Una disminución de pulsaciones significa que nuestro animal está sobredosado y un aumento que está sufriendo. La saturación de oxígeno por debajo de valores normales se llama hipoxemia y alerta de que algo ocurre con la respiración artificial.
- La presión arterial se monitorizó mediante la canulación de la arteria femoral, estando los valores normales entre 80-120 mmHg (milímetros de mercurio). Valores >120 mmHg= El animal está despertando. Valores <80 mmHg= El animal está muriendo.
- Para controlar las dosis necesarias de sedación se realizaron pinzamientos interdigitales en la pata, inyectando la dosis adecuada cuando el animal comenzaba a responder de forma refleja mínimamente a ellos.
- La temperatura se mantuvo a valores fisiológicos para la rata, entre 36º-37º. Es importante tener al animal a su temperatura normal porque puede morir de hipertermia o hipotermia.

## **8.2. Registro de la actividad eléctrica**

Inicialmente se estimuló el campo receptor buscando que la fibra fuera articular y no muscular, comprobando la zona correcta en la que queríamos hacer el registro del nervio safeno, situado en la cara medial de la articulación.

Los resultados muestran que hay correlación entre la actividad eléctrica registrada en el nervio safeno y la intensidad del estímulo mecánico aplicado en estímulos inocuos y nocivos. Para el registro comenzamos la maniobra desde una posición neutra de la pata en reposo y después se le practicaba una estimulación aplicando una OR constante (10-20 mN, 5 segundos) dándonos a conocer así la presión necesaria para inducir una respuesta de la fibra (umbral), seguida de otra estimulación mecánica NOR de una presión mayor (40-55 mN, 5 segundos). A continuación regresamos a la posición neutra durante 5 segundos y repetimos los pasos anteriores pero en rotaciones internas (IN: 10-20 mN, 5 segundos-NIR: 40-55 mN, 5 segundos)<sup>18</sup> (Figura 10-A).

Registro tomado el 14 de marzo del 2016:

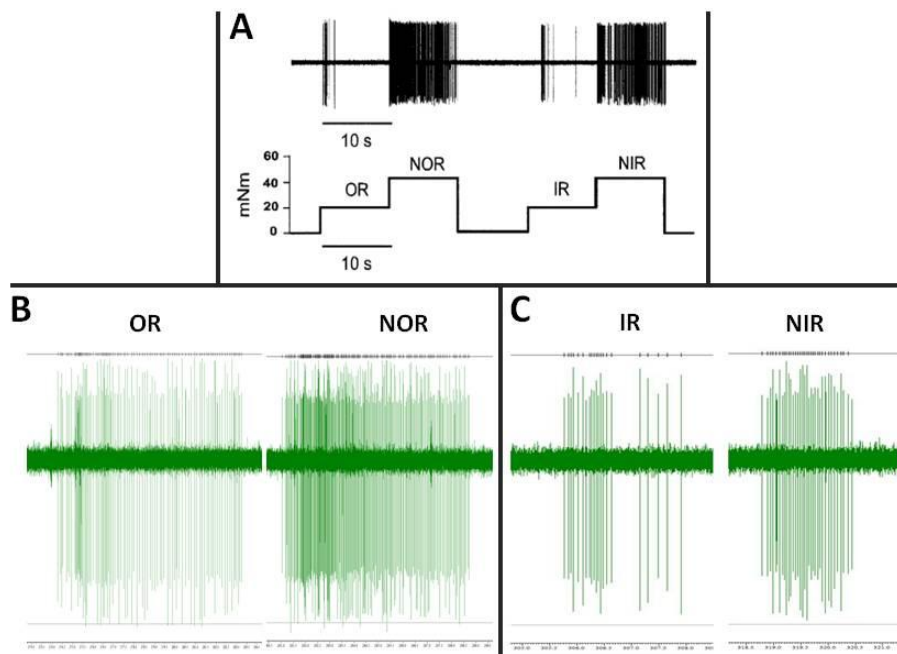


Figura 10. A: Esquema de frecuencia de disparo registrada de los impulsos eléctricos OR, NOR, articulación en posición neutra otros 5 segundos, IR, NIR. Abajo el tiempo y la fuerza en mN ejercidos (Figura adaptada de Gomis A et al., 2004). B: Registro In-Vivo de rotaciones externas inocuas y nocivas. C: Registro In-Vivo de rotaciones internas inocuas y nocivas.

	FUERZA (mN)	TIEMPO (seg.)	RESPUESTA (espigas)
OR	20	5	94
NOR	42	5	184
IR	13	5	21
NIR	45	5	33

Tabla 2. Fuerza ejercida, tiempo y respuestas en OR, NOR, IR y NIR de la fibra nerviosa nociceptiva registrada el 14 de marzo 2016.

En los registros se distinguen tres fibras nociceptivas diferentes. Para un registro más limpio deberíamos de aislarlas hasta poder registrar una sola, siendo esto posible si se trabaja más en la división de filamentos.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1. Sobre el modelo

Como se ha comentado en la introducción, este modelo animal está establecido en el laboratorio de la Dra. Ana Gomis y del Dr. Carlos Belmonte del Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC.

### 9.2. Problemas con el mantenimiento de la rata dentro de los parámetros fisiológicos

Se realizó la cirugía a 9 ratas, pero sólo se obtuvo el registro de la actividad eléctrica en una de ellas. En el resto de experimentos no fue posible por causas relacionadas con el procedimiento experimental, como la falta de experiencia de la autora en el método quirúrgico o en la división de las fibras nerviosas.

### 9.3. Correlación frecuencia de disparo-intensidad del estímulo

- Las rotaciones inducidas OR e IR obtuvieron como respuesta impulsos de corta duración, normales dentro del rango de trabajo de la articulación.
- Las rotaciones inducidas NOR y NIR obtuvieron una respuesta mucho más enérgicas al exceder el rango de trabajo de la articulación.
- El patrón de descargas registrado resultó típico de los nociceptores y mecanorreceptores descritos anteriormente en este trabajo.
- La frecuencia de disparo es proporcional al estímulo evocado.

En el caso de la estimulación con rotaciones externas en respuesta al estímulo doloroso la fibra disparó el doble de potenciales de acción, en el caso del estímulo con

rotaciones internas disparó 12 más en respuesta al estímulo doloroso. En cualquier caso, se obtuvo una mayor frecuencia de disparo en respuesta a estímulos nociceptivos, confirmando lo observado por otros autores<sup>18, 19, 20, 21</sup>.

#### **9.4. Utilidad del modelo para el estudio de artritis y artrosis**

Con este modelo se describe la actividad nerviosa dentro del funcionamiento normal y contrarresistencia de los tejidos de la articulación rotuliana<sup>18, 19, 22</sup>, siendo los de bajo umbral los primeros y correspondiendo a fibras mecanorreceptoras, y de alto umbral los segundos, correspondiendo fibras nociceptoras. Conociendo la frecuencia de disparo en una articulación en respuesta a un estímulo no doloroso y en respuesta a un estímulo doloroso, se puede estudiar el efecto analgésico de una sustancia, observando si la sustancia disminuye la frecuencia de disparo acercándola a la respuesta normal. El resultado obtenido en este registro fue satisfactorio y acorde con lo observado por otros autores<sup>18, 19, 21, 22</sup>. La falta de tiempo impidió que se pudieran obtener más datos y haber podido inyectar alguna sustancia con las que trabajan en el grupo de investigación para observar su poder analgésico. También podría haber obtenido un registro control en respuesta a estímulos no dolorosos y comparar como responde la misma fibra después de unas horas tras haber inyectado en la cavidad articular una sustancia que produce artritis gotosa dolorosa mediante la inyección de cristales de urato, o también irritantes como Kaolina-Carragenina que produce inflamación. Con estas sustancias lo que se espera es que en el plazo de unas horas, ante estímulos no dolorosos, aumente mucho la frecuencia de disparo como respuesta a su presencia. Así se consigue reproducir un modelo de dolor articular. Esto permite posteriormente incluso inyectar en estos modelos una sustancia con potencial



analgésico y observar si realmente es un analgésico adecuado para esas dolencias, estudiando si se recupera la actividad de las fibras nerviosas a su nivel basal en respuesta a los estímulos no dolorosos. De cualquier manera ya se conoce que la articulación de la rodilla de la rata es un buen modelo experimental de dolor<sup>18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26</sup>.



## 10. CONCLUSIONES

1. Este modelo permite estudiar modelos de dolor articular. A través de ellos se puede estudiar si disminuye la actividad nociceptiva en la cavidad articular mediante la inyección de fármacos o sustancias.
2. Para estudiar el efecto analgésico de una sustancia en una articulación dolorosa habría que inyectarlo y realizar todo el protocolo, midiendo la frecuencia de disparo de las fibras nerviosas y comparando con un registro normal.
3. Es posible identificar si las fibras son articulares o musculares estimulando su campo receptor, y clasificarlas según su velocidad de conducción aplicando un estímulo eléctrico.
4. La frecuencia de disparo de los impulsos nerviosos es proporcional a la magnitud del estímulo evocado.
5. Es necesaria una buena curva de aprendizaje y tiempo para realizar los procedimientos experimentales, y tener monitorizado al animal para comprobar que todos los parámetros están dentro de la normalidad para que no influyan en los resultados.
6. Todavía es necesaria la experimentación con animales, ya que hay partes de investigaciones que no son posibles sin ella, aunque se siguen buscando formas de reemplazo, reducción y refinamiento para disminuir su uso y sufrimiento.

## 11. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mi tutora Elvira De La Peña por estar siempre disponible y procurar que aprendiera todo lo posible. Gracias también a la Dra. Ana Gomis por permitirme trabajar en su "Set-up" compartido con el Dr. Carlos Belmonte y ser tan amable de responder mis dudas e ilustrarme cuando lo he necesitado, y a Ana Miralles por explicarme la técnica. Agradecer infinitamente a Eva Quintero y a Eduardo Dominguez Sala por la paciencia conmigo y por enseñarme todo lo que han podido en este tiempo. Gracias a todos ellos por acompañarme e instruirme en un mundo tan interesante como es el de la investigación.



## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brennan F, Cousins M J (2005) El alivio del dolor como un derecho humano. Rev. Soc. Esp. del Dolor 12, 17-23.
2. Bolibar I, Catalá E, Cadena R (2005) El dolor en el hospital: de los estándares de prevalencia a los de calidad. Rev Esp Anestesiol Reanim 52(3), 131-40.
3. Ibarra E. (2006) Una Nueva Definición de "Dolor": Un Imperativo de Nuestros Días. Rev. Soc. Esp. Dolor 13(2), 65-72 [Internet. Consultado el 28 de abril de 2016]; Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1134-80462006000200001&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1134-80462006000200001&lng=es)
4. Romera E, Perena M J, Perena M F (2000) Rodrigo M. Neurofisiología del dolor. Rev Soc Esp Dolor 7(2), 11-17.
5. Caires R (2015) Modulación de la Actividad del Canal Iónico TRPV1 por el Hialuronato Sódico [Tesis Doctoral] San Juan de Alicante: Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández.
6. Pérez-Ruíz A (2015) Descripción de las propiedades funcionales del sistema nociceptivo trigeminal en relación al dolor pulpar. Rev Cubana Estomatol 52(3), [Internet. Consultado el 5 de abril de 2016]; Disponible en: <http://www.revestomatologia.sld.cu/index.php/est/article/view/376>
7. Medical Physiology, Boron-Boulpaep. Updated 2nd Edition. Edit. Elsevier. 2012.
8. Aliaga L, Baños JE, De Barutell C, Molet J, Rodríguez de la Serna A, editores. Dolor y utilización clínica de los analgésicos. Barcelona: Editorial MCR, S.A., 1996;7-40

9. Mesas-Idáñez A (2012) Dolor agudo y crónico. Clasificación del dolor. Historia clínica en las unidades del dolor. Hospital Universitario Vall d'Hebrón. Área de Traumatología Clínica del Dolor, Servicio de Anestesiología. Disponible en: <http://www.scartd.org/CursDolor/DolorAgutICronic.pdf>
10. Martínez-Salio A. Anamnesis del paciente con dolor neuropático. En: Serra J. Tratado dolor neuropático. Madrid. Editorial Panamericana; 2007.159-167
11. Tortora G, Derrickson B. Principios de Anatomía y Fisiología. 13ªEdición. Editorial Médica Panamericana. 2013.
12. Sobotta. Atlas de Anatomía Humana. 20ªEdición. Tomo 2: Tronco, vísceras y miembro inferior. Editorial Médica Panamericana. 1994.
13. Moore K, Dalley A, Agur A. Fundamentos de anatomía con orientación clínica. 7ªEdición. Lippincott Williams & Wilkins Copyright. 2013.
14. Purves D. Invitación a la Neurociencia. Edit. Panamericana. 2001.
15. Borge M (2011) Funciones sensoriales: sistema somatosensorial. Web de OCW Universidad de Cantabria. [Internet. Consultado el 05 de abril de 2016]; Disponible en: <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/fisiologia-humana-2011-g367/material-de-clase/bloque-tematico-6.-fisiologia-del-sistema-nervioso/tema-2.-funciones-sensoriales-sistema/tema-2.-funciones-sensoriales-sistema>
16. Silverthorn. Fisiología Humana. Un enfoque integrado. 4ªEdición. Editorial Médica Panamericana. 2009.

17. Guyton A, Hall J. Tratado de Fisiología Médica. 9ª Edición. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. 1996.
18. Schaible H-G, Schmidt RF (1988) Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. *J Neurophysiol* 60, 2180-95.
19. Just S, Pawlak M, Heppelmann B (2000) Responses of fine primary afferent nerve fibres innervating the rat knee joint to defined torque. *Journal of neuroscience methods* 103(2), 157-162.
20. McDougall JJ, Pawlak M, Hanesch U, Schmidt RF (2000) Peripheral modulation of rat knee joint afferent mechanosensitivity by nociceptin/orphanin FQ. *Neuroscience Letters* 288, 123-126.
21. Pawlak M, Borkiewicz P, Podgórski T, Schmidt RF (2008) The activity of fine afferent nerve fibres of the rat knee joint and their modulation by inflammatory mediators. *Medsportpress: Ortopedia, Traumatología y Rehabilitación* 1(6); 10, 63-74.
22. Just S, Heppelmann B (2001) Neuropeptide Y changes the excitability of fine afferent units in the rat knee joint. *British Journal of Pharmacology* 132(3), 703-708.
23. Gomis A, Pawlak M, Balazs EA, Schmidt RF, Belmonte C (2004) Effects of different molecular weight elastoviscous hyaluronan solutions on articular nociceptive afferents. *Arthritis Rheum* 50, 314-26.
24. Gomis A, Miralles A, Schmidt RF, Belmonte C (2009). Intra-articular injections of hyaluronan solutions of different elastoviscosity reduce nociceptive nerve activity in a

model of osteoarthritic knee joint of the guinea pig. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 798-804.

25. Gomis A. Therapeutic Effects of Sodium Hyaluronan Derivatives (Viscosupplementation) in Experimental Models of Osteoarthritis Pain. Edit. Hermann O. Handwerker and Lars Arendt-Nielsen. *Pain Models: Translational Relevance and Applications*. IASP Press, Washington DC. 2013; 247-261.

26. García-Martínez C, Fernández-Carvajal A, Valenzuela B, Gomis A, Van Den Nest W, Ferroni S, Ferrer-Montiel A (2006) Design and characterization of a noncompetitive antagonist of the transient receptor potential vanilloid subunit 1 channel with in vivo analgesic and anti-inflammatory activity. *The Journal of Pain* 7(10), 735-746.



### 13. ANEXOS

- ANEXO 1: Aprobación del procedimiento del Órgano Evaluador Competente.



#### AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2014/VSC/PEA/00214

Vista la solicitud realizada en fecha 18/12/14 con nº reg. entrada 23646 por D/Dª. **Fernando Borrás Rocher**, Vicerrector de Investigación e Innovación, centro usuario ES031190001002, para realizar el procedimiento:

***"Reducción del dolor articular causado por osteoartritis bajo los efectos analgésicos del hialuronato sódico y bloqueantes del canal iónico nociceptivo TRPV 1"***

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Sanidad y Bienestar Animal.

#### AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: 2014/VSC/PEA/00214 tipo 2, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat Miguel Hernández**

Responsable del proyecto: **Carlos Belmonte Martínez**

Establecimiento: **Animalario San Juan**


Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 15 de enero de 2015

El director general de Producción Agraria y Ganadería

  
José Miguel Ferrer Arranz



- ANEXO 2: Diploma acreditativo de Experimentadora Animal de la autora.



**El Excmo. y Magfco. Rector de la Universidad Miguel Hernández de Elche,  
y en su nombre la Vicerrectora de Estudios**

otorga a

**Dña. LAURA HERNANDEZ HERRERO**

con DNI: 74005082Y

el presente diploma acreditativo del aprovechamiento y suficiencia en el curso

**"EXPERIMENTADOR ANIMAL. VI EDICIÓN"**

impartido desde el 28 de abril de 2014 al 10 de mayo de 2014,  
con una duración de 40 horas, y con la calificación de APTO.

Elche, a 30 de junio de 2014



**Maria José Alarcón García**

Registrado con el núm. 2014/00018443  
Fecha: 30 de junio de 2014

- ANEXO 3: Diploma acreditativo de Responsable del Diseño y Dirección de Procedimientos Experimentales con Animales.



**El Rector de la Universidad Miguel Hernández de Elche,  
y en su nombre la Vicerrectora de Estudios**

otorga a

**Laura HERNANDEZ HERRERO**

con DNI: 74005082Y

el presente diploma acreditativo del aprovechamiento y suficiencia en el curso

**"RESPONSABLE DEL DISEÑO Y DIRECCIÓN DE PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES  
CON ANIMALES- CATEGORÍA C PARA ACREDITADOS B. III EDICIÓN"**

impartido desde el 1 de septiembre de 2015 al 30 de septiembre de 2015,  
con una duración de 40 horas, y con la calificación de APTO.

Elche, a 6 de octubre de 2015



María Del Carmen Acosta Boj

Registrado con el núm. 2015/00029140  
Fecha: 6 de octubre de 2015.

- ANEXO 4: Otros cursos.



**DÑA. MARIA EMMA BENLLOCH MARCO  
GERENTE DE LA UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

**CERTIFICO**

Que D./Dña. **LAURA HERNANDEZ HERRERO**, con DNI 74005082-Y, según los antecedentes que constan en esta Universidad, ha participado en los cursos que se detallan a continuación, integrados en el Plan de Formación del Personal de Administración y Servicios 2015 de la Universidad Miguel Hernández de Elche, obteniendo las siguientes calificaciones:

Nombre del curso	Fecha de realización	Horas	Calificación
ANESTESIA INYECTABLE	del 01/04/2015 al 30/04/2015	10	ASISTENCIA
TÉCNICAS DE INOCULACIÓN	del 02/02/2015 al 28/02/2015	10	ASISTENCIA
TOMA DE MUESTRAS	del 02/03/2015 al 31/03/2015	10	ASISTENCIA

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Elche, a 22 de diciembre de 2015.

  
**Maria Emma Benlloch Marco**  
Gerente



Registrado con el núm. 2015/00030207  
Fecha: 21 de diciembre de 2015

