

## Reflejo C evocado en el músculo digástrico: Un nuevo método para evaluar actividad wind-up trigeminal aplicable a principios activos de plantas medicinales

[C-reflex evoked in the digastric muscle:  
A new method for evaluating trigeminal wind-up activity applicable to active principles of medicinal  
plants]

Claudio LAURIDO

*Department of Biology, Faculty of Chemistry and Biology, University of Santiago of Chile*  
*Contactos | Contacts: Claudio LAURIDO – E-mail address: [claudio.laurido@usach.cl](mailto:claudio.laurido@usach.cl)*

### Abstract

Wind-up is a measure of nociceptive neurons synaptic potentiation and constitutes an important mechanism in the generation of central sensitization in chronic pain. At the spinal level, the C-evoked reflex in the *biceps femoris* muscle, by low frequency repetitive stimulation of the sural nerve, has enabled us to evaluate the wind-up of nociceptive neurons of the dorsal horn, and also the effect of antinociceptive drugs with a possible potential therapeutic value in chronic pain. In the present work, we electrophysiologically evaluated the trigeminal wind-up activity, utilizing as an experimental paradigm the evoked C-reflex in the Sprague-Dawley rat digastric muscle. The results obtained indicate that: (a) It is possible to evoke an electromyographic reflex in the digastric muscle by stimulation of C-fibers belonging to the third trigeminal branch; (b) It is possible to potentiate the trigeminal C-reflex with low frequency stimuli (wind-up) and (c) it is possible to depress the trigeminal wind-up with the  $\mu$ -opioid agonist morphine and with the NMDA receptor antagonist, ketamine. We can conclude that the simple measurement of the trigeminal wind-up will facilitate future studies on the analgesic efficacy of new drugs in oro-facial chronic pain syndromes like migraine and with special emphasis on medicinal plant active principles.

**Keywords:** Digastric muscle, C-reflex, oro-facial pain, medicinal plants.

### Resumen

El wind-up refleja la potenciación sináptica en neuronas nociceptivas y constituye un importante mecanismo en la generación de sensibilización central en dolor crónico. A nivel espinal, el reflejo C evocado en el músculo *biceps femoris* por estimulación repetitiva de baja frecuencia del nervio sural ha permitido evaluar la actividad wind-up en neuronas nociceptivas del cuerno dorsal, así como el efecto de drogas antinociceptivas con un posible potencial terapéutico en dolor crónico. En el presente trabajo evaluamos electrofisiológicamente la actividad wind-up trigeminal, utilizando como paradigma experimental el reflejo C evocado en el músculo digástrico de ratas Sprague-Dawley. Los resultados obtenidos indican que: (a) es posible evocar un reflejo electromiográfico en el músculo digástrico de la rata por estimulación de fibras C de la tercera rama del trigémino; (b) es posible potenciar el reflejo C trigeminal con estímulos de baja frecuencia (wind-up) y (c) es posible deprimir el wind-up trigeminal con el agonista  $\mu$ -opioides morfina y con el antagonista NMDA, ketamina. Podemos concluir que la medición simple del wind-up trigeminal mediante el reflejo C evocado en el músculo digástrico facilitará futuros estudios sobre eficacia analgésica de nuevos fármacos en cuadros de dolor orofacial crónicos, como la migraña, con especial énfasis en los principios activos de plantas medicinales.

**Palabras Clave:** músculo digástrico, reflejo C, dolor orofacial, plantas medicinales.

**Recibido | Received:** 4 de Octubre de 2011.

**Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form:** 4 de Noviembre de 2011.

**Publicado en línea | Published online:** 30 de Noviembre de 2011.

**Declaración de intereses | Declaration of interests:** Esta investigación fue financiada por los proyectos DICYT N° 021043-01LF, Universidad de Santiago de Chile, Proyecto Basal FB-0807, CEDENNA y FONDECYT 1070115.

**Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as:** Claudio Laurido. 2011. Reflejo C evocado en el músculo digástrico: un nuevo método para evaluar actividad wind-up trigeminal aplicable a principios activos de plantas medicinales. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 10(6): 500 – 506.

## INTRODUCCION

Svensson *et al.* (2000) demostró electrofisiológicamente que la actividad muscular de la mandíbula humana es influenciada por el dolor proveniente de los tejidos oro faciales. Durante la estimulación de nociceptores orales de los músculos involucrados en el cierre mandibular, se produce una inhibición de estos y a su vez el músculo digástrico es excitado. Existe por lo tanto, una correlación entre las aferencias nociceptivas, llevadas por las fibras A $\delta$  y C y los reflejos orales. Lo anterior fue demostrado por Bombardi *et al.*, (2003) mediante la aplicación de capsaicina en la cámara pulpar de un incisivo inferior de ratas Wistar adultas. Los resultados obtenidos muestran la presencia de degeneración de terminales axonales ipsilaterales presentes en el soma de neuronas del núcleo mesencefálico trigeminal y en dendritas de la neuropila del núcleo trigeminal motor. Respecto de los mediadores que están involucrados en los procesos de regulación inmune y las fases agudas de la inflamación orofacial, figuran la interleucina-1, interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral. Experimentos realizados en ratas Sprague-Dawley acerca del efecto de las citoquinas administradas intracisternalmente en la modulación del reflejo nociceptivo de apertura de la mandíbula, mostraron que IL-6 produjo analgesia en un modelo de dolor agudo orofacial e hiperalgesia en un modelo de inflamación orofacial (Choi *et al.*, 2002). En el ámbito dental, se han realizado estudios acerca del efecto de anestésicos en el reflejo de apertura de la mandíbula (RAM) en ratas con electrodos implantados en la pulpa dental y electrodos posicionados en el músculo digástrico. Se utilizaron los anestésicos locales articaina, bupivacaina, procaina y tetracaina administrados en la zona infratemporal. En todos los casos, se observó un incremento en los umbrales del RAM. Este procedimiento puede ser usado para la evaluación farmacológica de los anestésicos locales (Arreto *et al.*, 2002). Similares experimentos se han realizado con eugenol (Park, 2009). El RAM también ha sido utilizado en el desarrollo de analgesia por la aplicación de pulsos de laser de erbio, itrio, aluminio y granate (Er:YAG), en la zona de la encía de ratas Wistar. El procedimiento se llama terapia de laser de bajo nivel, y la anestesia observada es presumiblemente debida a un mecanismo en el que están involucrados las aferencias pulpares nociceptivas A $\delta$  (Zeredo *et al.*, 2003). La electroacupuntura también ha sido utilizada en el contexto del estudio del

dolor trigeminal. Estudios realizados en la pulpa dental de conejo estimulada con pulsos de corriente, mostraron un incremento en los umbrales nociceptivos después de la aplicación de pulsos eléctricos a diferentes puntos de acupuntura. Comparado con el efecto de morfina, hubo un mayor efecto de la electroacupuntura a partir de los 60 minutos, indicando la mayor efectividad de la electroacupuntura en relación con morfina (Gondim *et al.*, 2010). Finalmente, otro aspecto en el cual el estudio del dolor trigeminal presenta una gran importancia, es en el estudio de la migraña y especialmente el estudio de la posibilidad de existencia de convergencia entre las aferentes de la pulpa dental y el núcleo del seno sagital superior en las neuronas espinales C1 (Fujimi *et al.*, 2006). Respecto del método descrito, la facilidad de montaje de la técnica y su gran sensibilidad, hacen factible su utilización en ensayos de principios medicinales encontrados en las plantas medicinales. Dado que se pueden administrar estos extractos por diferentes vías, intravenosa, intraperitoneal (i.p.) (lo realizado en este trabajo), intra cerebro ventricular, etc., este método es ideal para probar compuestos con diferente solubilidad o grado de pureza, situación normalmente encontrada cuando se trabaja con extractos vegetales crudos.

## METODOS

Ratas Sprague-Dawley fueron anestesiadas intraperitonealmente con uretano (1 g/Kg de peso). Posteriormente se procedió a cortar un diente incisivo inferior hasta el borde de la encía con un disco de carburo de silicio, de 10 mm de diámetro. A continuación, se introduce un electrodo (ver Figura 1) en la cámara pulpar del diente y se conecta al sistema de estimulación. La estimulación para evocar tanto el reflejo C como el wind-up fueron pulsos rectangulares de una corriente de 2 mA y 2 ms de duración. El registro electromiográfico se obtuvo mediante la inserción de dos electrodos de acero inoxidable a lo largo del músculo digástrico ipsilateral.

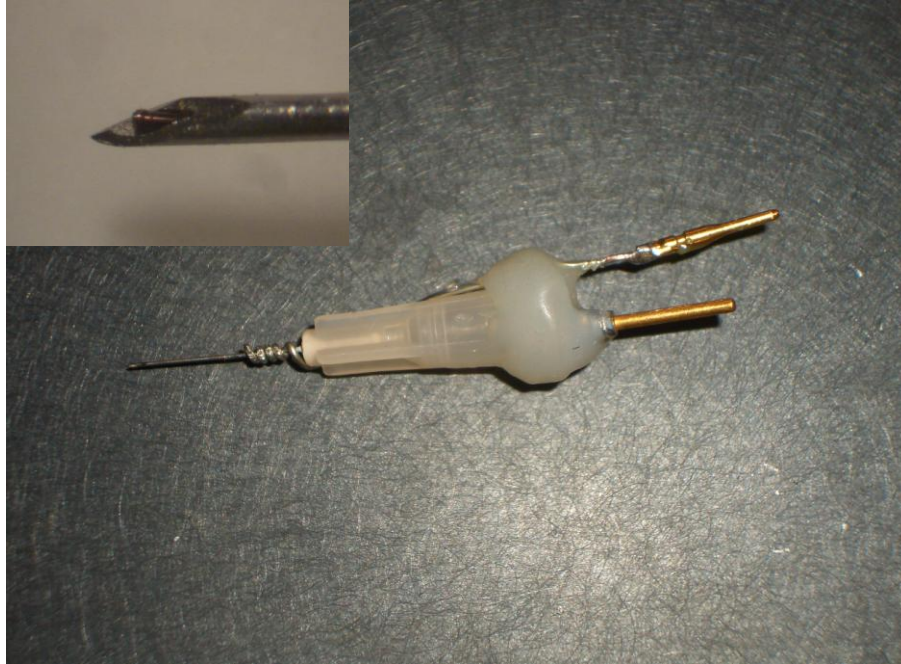
### *Sistema de estimulación y registro de la actividad electromiográfica del músculo digástrico:*

La Figura 2 muestra el esquema general de la estimulación y registro del músculo digástrico. Los pulsos que van a servir de estímulos para la pulpa dental, se originan en el equipo Grass S88. Este equipo se conecta a la unidad aisladora de estímulo Grass SIU5B mediante la salida S<sub>1</sub> y al sistema de gatillado

del equipo PowerLab 2/20, Canal 1, el cual se programa como iniciador del muestreo de datos. Los parámetros utilizados para la obtención del reflejo

evocado C y wind-up en el músculo digástrico en cada elemento del esquema son los siguientes:

**Figura 1**



La Figura 1 muestra el electrodo construido en nuestro laboratorio y utilizado en la estimulación del diente incisivo inferior. Este consta de una aguja hipodérmica marca BC Precision Glide® calibre 30G a la cual se le introduce por el orificio central un alambre esmaltado marca Narishige de 100  $\mu$  de diámetro (ver inserto). Luego se sueldan los conectores (gold pins) para finalmente inmovilizar los alambres con una capa de resina epóxica Araldit®

**Estimulador S88:**

Salida  $S_1$ : esta salida va conectada a la unidad aisladora de estímulo. Esta entrega los pulsos de estimulación que van hacia el electrodo ubicado en la pulpa del diente. Sus valores para evocar un reflejo C son pulsos cuadrados de:

Frecuencia de estimulación: 0,1 Hz\*

Duración del pulso: 2 ms

Voltaje de estimulación: 120 V

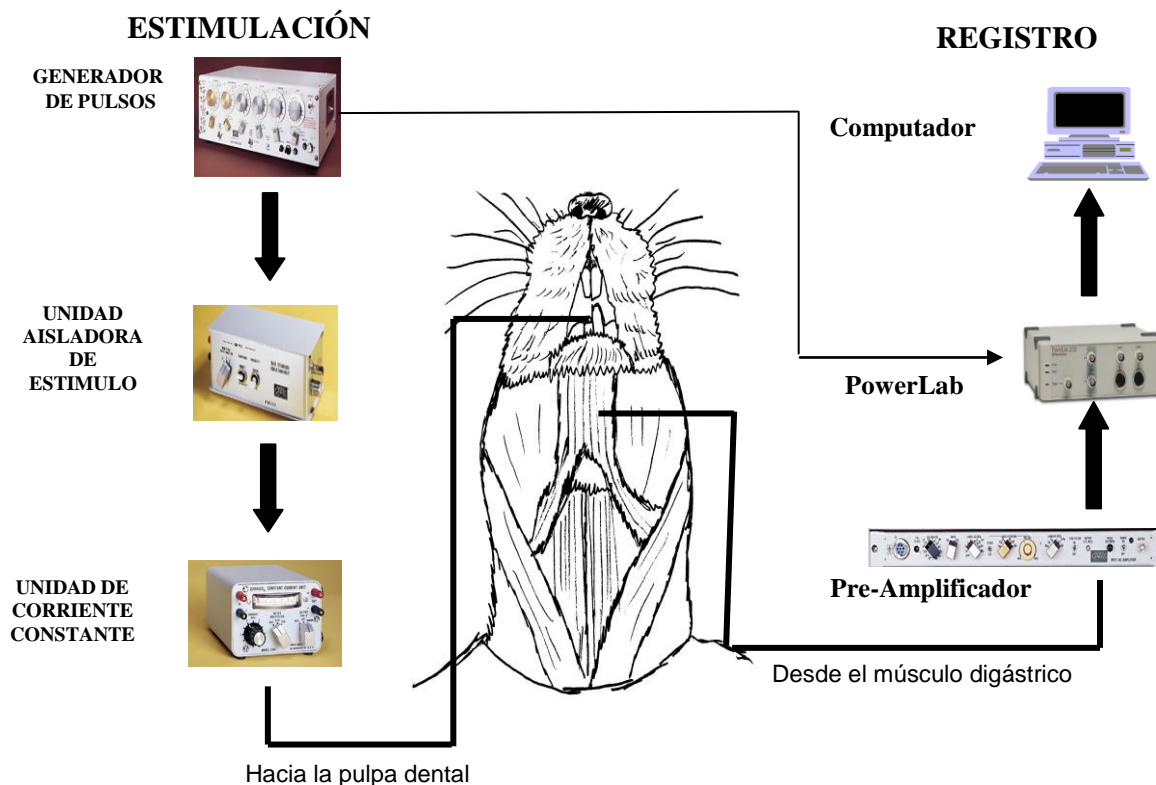
Para evocar un wind-up, se modifica solo la frecuencia a 1 Hz, con un máximo de diez estímulos, luego se retorna a la frecuencia de 0,1 Hz.

Salida  $S_2$ : Esta salida se sincroniza para gatillar al sistema PowerLab desde el tiempo cero hasta 1000 ms.

**Unidad aisladora de estímulo SIU5B:**

Con el propósito de evitar que el artefacto de estímulo producido por la onda cuadrada de estimulación llegue a superponerse con la respuesta electromiográfica, se intercala este dispositivo. Cuando el artefacto de estímulo producido es pequeño y de corta duración, este es incluso deseable, ya que establece claramente el tiempo cero de estimulación. Sin embargo, cuando este artefacto se torna suficientemente grande como para interferir con la respuesta, debe ser eliminado o reducido. Usualmente los artefactos de estímulo se producen por corrientes de tierra circulantes creadas por la existencia de una tierra común entre el estímulo, la preparación y el instrumento de registro. La aislación del estímulo reduce la corriente del estímulo entre tierra y la preparación, reduciendo así la llegada del artefacto al instrumento de registro.

Figura 2



La Figura 2 muestra el esquema general de estimulación y registro para obtener respuestas del reflejo nociceptivo C y el wind-up espinal a partir del músculo digástrico. Brevemente, éste consta de dos partes principales, la estimulación (parte izquierda) que condiciona una señal que es tornada flotante en la unidad aisladora de estímulo y luego cuantificada en la unidad de corriente constante. La parte derecha de la figura procesa la señal bioeléctrica procedente del músculo digástrico, la amplifica y luego la envía al sistema PowerLab donde es digitalizada y alimentada al programa de análisis CHART. (Más detalles, ver la sección métodos)

#### **Unidad de corriente constante CCU 1 A:**

Este dispositivo es necesario para asegurar una constancia en la magnitud del estímulo a aplicar a la pulpa dental. Aun cuando los electrodos presentados en este trabajo son bastante uniformes en su diseño, lo que asegura una geometría que se repite en todos ellos y por ende su impedancia es bastante constante. Sin embargo, las variaciones en las propiedades eléctricas de la pulpa dental de cada rata hacen que la impedancia eléctrica del tejido a estimular requiera de un sistema que sea capaz mantener constante la corriente de estimulación en cada experimento y entre los diferentes ejemplares utilizados. Esto se logra con un circuito estabilizado activo de retroalimentación presente en la unidad de corriente constante.

#### **Pre-amplificador P511:**

Brevemente, este equipo amplifica y condiciona el registro electromiográfico. Posee un amplificador de corriente alterna que permite elevar el voltaje de los potenciales de acción musculares de milivoltios a voltios, un sistema de filtros, un filtro pasa bajos y uno pasa altos y un filtro de rechazo de banda o “notch filter”, que minimiza el ruido de 50Hz, producto de la canalización eléctrica. Las señales electromiográficas son entonces enviadas al sistema PowerLab, quien las digitalizará y enviará a un computador provisto de un software ad hoc, en este caso, el programa CHART V 5.0.

\*Símbolos: pps= pulsos/segundo; ms= milisegundos; V= volts; Hz= Hertz; S<sub>1,2</sub>= salidas del estimulador.

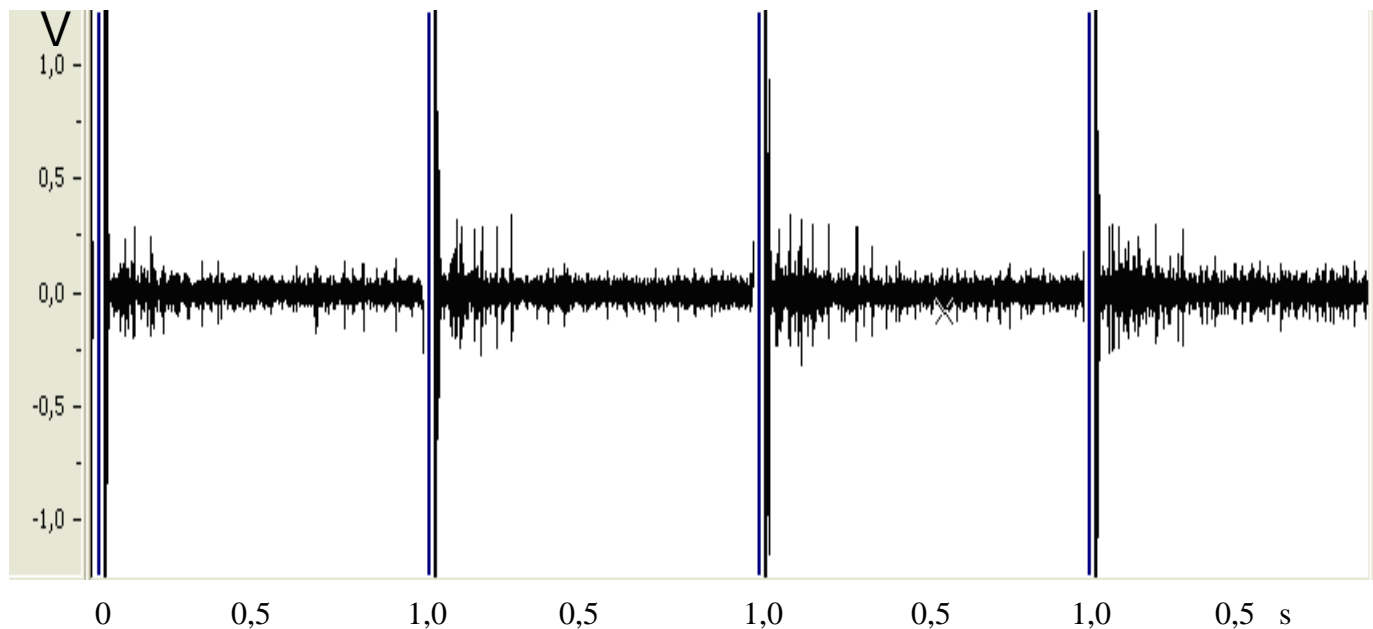
## RESULTADOS

Parámetros utilizados para evaluar el reflejo C y el wind-up espinales:

La Figura 3 muestra cuatro electromiogramas evocados a partir de una estimulación a baja frecuencia, en este caso, a 1 Hz. Existen dos componentes en este registro: el primero, muy rápido que va desde el estímulo (tiempo cero) hasta alrededor de los 20 ms. Esta respuesta corresponde a la activación de las fibras A $\beta$  y  $\delta$ , las cuales no presentan el fenómeno de wind-up y son insensibles a los fármacos utilizados en este trabajo (Figuras 4 y 5). Las fibras C, más lentas se manifiestan desde aproximadamente los 20-25 ms hasta los 400-500 ms. Estas últimas son las que responden a los tratamientos

con morfina y ketamina. Se probaron varios esquemas de estimulación tomando una ventana de observación de la respuesta electromiográfica de 1000 ms. Luego se variaron la frecuencia de estimulación desde 0,1 Hz hasta 3 Hz y las corrientes inyectadas a la pulpa dental desde 1 a 5 mA y duraciones entre 0,5 y 3 ms. Se utilizaron 6 ratas en esta parte de los resultados. Los valores probados de 0,1 Hz, estimulación de 2 mA y una duración de 2 ms para evocar el reflejo C y duración de 1 Hz, 2 mA y 2 ms para evocar el wind-up espinal resultaron ser los más repetibles y además, similares a los valores utilizados para evocar estas respuestas encontradas en el *biceps femoris* de la rata mediante la estimulación del nervio sural.

**Figura 3**



**Electromiogramas obtenidos del músculo digástrico y graficados en función del tiempo. Se pueden observar las espigas del reflejo C en el primer tercio de cada estimulación.**

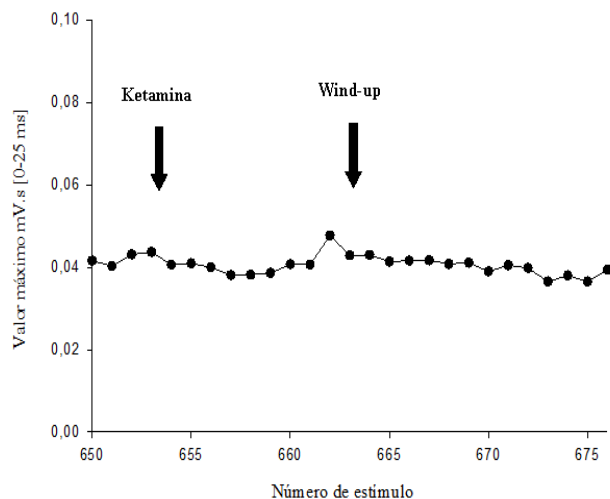
### ***Efecto de ketamina en el reflejo C y wind-up espinal:***

Ketamina es un inhibidor no competitivo de los receptores de NMDA y su efecto es la inhibición o abolición del wind-up espinal dependiendo de la dosis empleada. La Figura 6 muestra los valores de la electromiografía expresados en mV x seg. Alrededor del estímulo número 10 (se debe recordar que cada

estímulo corresponde a un tiempo de 10 segundos, excepto cuando evocamos un wind-up, en el cual los estímulos se repiten cada 1 segundo) se evoca un wind-up control. Luego, se aplica ketamina 100 mg/Kg i.p., repitiéndose la estimulación a los 7 minutos de agregado el fármaco. Se puede observar la completa abolición del wind-up, sin que existan

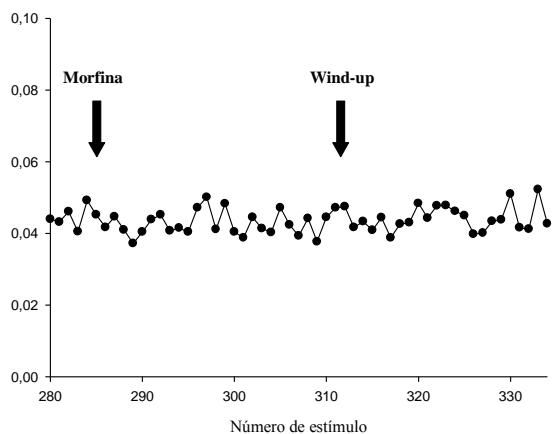
cambios evidentes en el reflejo C, el cual se mantiene constante durante todo el transcurso del experimento en alrededor de 22 mV x seg (Laurido *et al.*, 2001).

Figura 4



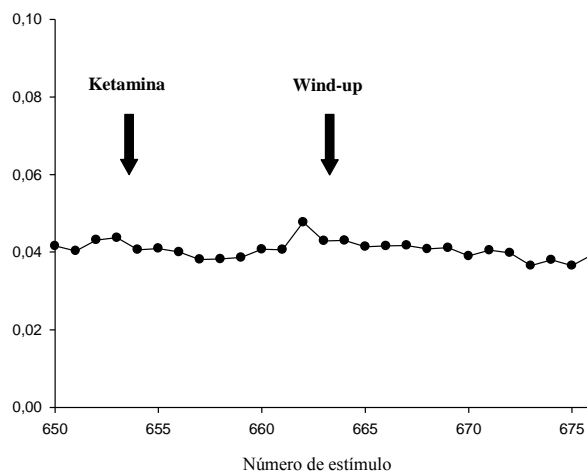
**Respuesta de las fibras A $\beta$  y  $\delta$  a la aplicación de ketamina (100 mg/Kg i.p.). Se puede observar que el wind-up espinal no es evocado frente a la estimulación repetitiva a 1 Hz.**

Figura 5



**Respuesta de las fibras A $\beta$  y  $\delta$  a la aplicación de morfina (2 mg/Kg i.p.). Se puede observar que el wind-up espinal no es evocado frente a la estimulación repetitiva a 1 Hz.**

Figura 6



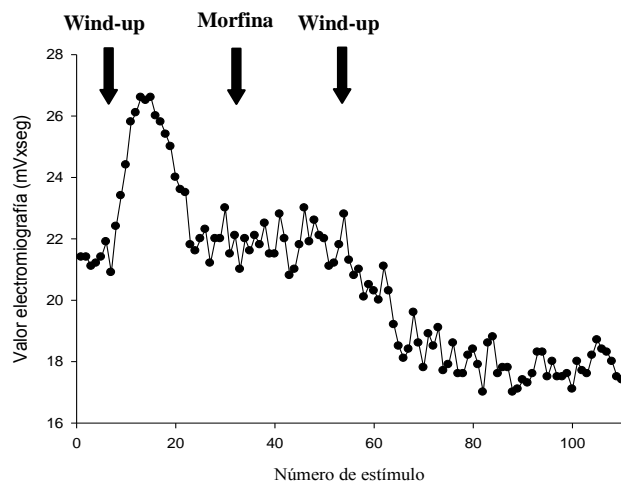
**Efecto de ketamina en el wind-up espinal. Inicialmente se evoca un wind-up control para luego aplicarse ketamina (100 mg/Kg i.p.). Luego de 5 minutos, se procede a evocar otro wind-up. Se puede observar la abolición completa de la potenciación sináptica, manteniéndose, sin embargo, la actividad refleja C.**

#### **Efecto de morfina en el reflejo C y wind-up espinal:**

La morfina es un potente agonista de los receptores opiáceos  $\mu$ . Aun cuando originalmente se ha atribuido la analgesia de los opioides a la activación de receptores localizados exclusivamente en el sistema nervioso central, en los últimos 15 años se han descrito potentes acciones periféricas de los opioides. Estos receptores estarían ubicados en las terminaciones periféricas de las fibras delgadas mielínicas y amielínicas de los nervios sensitivos tanto en animales como humanos (Stein y Yassouridis, 1998). La Figura 7 muestra el efecto de la aplicación de morfina a un registro electromiográfico. Previo a la adición de morfina, se evoca un wind-up espinal. Luego se aplica morfina (2 mg/Kg i.p.) y a los 5 minutos se evoca otro wind-up. Se puede observar la ausencia de wind-up bajo morfina y la paulatina abolición de la actividad del reflejo C, el cual desaparece alrededor de los 7-9 minutos, quedando solo la respuesta de ruido de alrededor de 17-18 mV x seg. (Pollin *et al.*, 2011)



Figura 7



Efecto de morfina en el wind-up espinal. Inicialmente se evoca un wind-up control para luego aplicarse morfina (2 mg/Kg i.p.). Luego de 4 minutos, se procede a evocar otro wind-up. Se puede observar la abolición completa de la potenciación sináptica, inhibiéndose además, la respuesta C.

## DISCUSION

Hemos desarrollado un método simple para evaluar el wind-up trigeminal mediante el reflejo C evocado en el músculo digástrico. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que se puede observar un registro electromiográfico consistente con el reflejo C localizado en una escala temporal que va desde los 25-200 ms después del estímulo. Este electromiograma resultó potenciado con estímulos de baja frecuencia (wind-up) Se observó además la depresión del wind-up trigeminal con morfina (agonista  $\mu$ -opioide) y ketamina (antagonista NMDA). Este método es ideal para probar sustancias de origen natural, en las cuales se pretende evaluar el efecto antinociceptivo de sustancias con posible efecto sobre modelos animales de migraña, situación que es imposible de realizar con sistemas *in vitro* o en humanos, por los posibles efectos colaterales tóxicos de los extractos vegetales a utilizar, especialmente en sus primeras etapas de extractos crudos o parcialmente purificados.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por los proyectos DICYT N° 021043-01LF, Universidad de Santiago de Chile, Proyecto Basal FB-0807, CEDENNA y FONDECYT 1070115.

## REFERENCIAS

- Arreto CD, Robert C, Limoge A, Gaudy JF. 2002. Use of the jaw opening reflex for assessing the effects of local anaesthetics in freely moving rats. **J Pharmacol Toxicol Method** 48: 45 - 51.
- Bombardi C, Chiochetti R, Grandis A, Clavenzani P, Lucchi ML, Bortolami R. 2003. Central distribution of A Delta and C afferent fibres from the dental pulp and periodontium in the rat. **Vet Res Comm** 27: 579 - 581
- Choi HS, Ju JS, Lee HJ, Kim BC, Park JS, Ahn DK. 2003. Effects of intracisternal injection of interleukin-6 on nociceptive jaw opening reflex and orofacial formalin test in freely moving rats. **Brain Res Bull** 59: 365 - 370.
- Fujimi Y, Takeda M, Tanimoto T, Matsumoto S. 2006. N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists suppress the superior sagittal sinus-evoked activity of C1 spinal neurons responding to tooth pulp electrical stimulation in rats. **Odontology** 94: 22 - 28.
- Gondim DV, Krishnamurti de MC, Mariana Lima Vale ML. 2010 Pain behavior to electroacupuncture in rabbit tooth pulp. **Braz J Oral Sci** 9: 415 - 420.
- Laurido C, Pelissier T, Pérez H, Flores F, Hernández A. 2001. Effect of ketamine on spinal cord nociceptive transmission in normal and monoarthritic rats. **Neuro Rep** 12: 1551 - 1554.
- Park CK. 2009. Molecular mechanism for local anesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system. **Pain** 144: 84 - 94.
- Pollin B, Roy-Ledoux R, Le Bars D, Adam F. 2011. Dose-dependent opposite effects of gabapentin on the depressive action of morphine on a C-fibre reflex in the rat. **Neuropharmacology** 61: 551 - 557.
- Stein Ch, Yassouridis A. 1998. Acción analgésica de la morfina. **Rev Soc Esp Dolor** 5: 3 - 7.
- Svensson P, Miles TS, Graven-Nielsen T, Arend-Nielsen L. 2000. Modulation of stretch-evoked reflexes in single motor units in human masseter muscle by experimental pain. **Exp Brain Res** 132: 65 - 71.
- Zeredo J, Sasaki, Fujiyama R, Okada, Y, Kazuo T. 2003. Effects of Low Power Er:YAG Laser on the Tooth Pulp-Evoked Jaw-Opening Reflex. **Lasers Surg Med** 33: 169 - 172.