



**EFEECTO DE LA OXITOCINA Y LA ESTIMULACIÓN DEL NÚCLEO  
PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO EN LA POTENCIACIÓN A LARGO  
PLAZO EN EL ASTA DORSAL.**

**Salvador De La Torre Orozco**

**Instituto de Neurobiología  
Universidad Nacional Autónoma de México**

**Tesis que presenta el pasante Salvador De La Torre Orozco, como requisito para  
obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias (Neurobiología)**

**Directores de Tesis  
Dr. Miguel Condés Lara  
Dr. Gerardo Rojas Piloni**

**Campus Juriquilla, Querétaro. Agosto 2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Instituto de Neurobiología**

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Salvador De la Torre Orozco, cuyo título es: Acción de la oxitocina y de la vía hipotálamo espinal sobre la potenciación a largo plazo en el asta dorsal” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**Presidente**

**Dr. Manuel Salas Alvarado**

**Secretario (Tutor)**

**Dr. Gerardo Rojas Piloni**

**Vocal**

**Dr. Francisco Javier López Muñoz**

**Suplentes**

**Dr. Flavio Mena Jara**

**Dra. Stéphanie Thebault**

**Aprobado por el Comité Académico**

---

**Dra. Teresa Morales Guzmán**

**Coordinadora del Programa**

**Resumen**

La potenciación a largo plazo (PLP) en las astas dorsales de la médula espinal ha sido usada en numerosos estudios como un modelo de dolor neuropático. La PLP se realiza por medio de una estimulación de alta frecuencia del nervio ciático (NC) y provoca un incremento en la eficiencia sináptica que persiste horas o incluso días. Por otro lado, el núcleo paraventricular hipotalámico (PV) por medio de una proyección descendente oxitocinérgica juega un papel inhibitorio de la información nociceptiva en las astas dorsales. El propósito de este trabajo es explorar si esta vía puede modular o prevenir la PLP.

Se realizaron registros extracelulares en ratas macho Wistar anestesiadas en los segmentos espinales L4-L5, en respuesta a la estimulación plantar. También, en ratas de libre movimiento, medimos las respuestas conductuales frente a estímulos térmicos y mecánicos. Utilizamos oxitocina (OT) intratecal o una estimulación eléctrica del PV antes o después de la electroestimulación del NC.

Al realizar la PLP se observó un incremento en el número de potenciales de acción y de frecuencia en las respuestas aversivas en experimentos electrofisiológicos y conductuales, respectivamente.

La electroestimulación del PV, o la administración intratecal de OT posterior a la PLP decrementa significativamente el número de respuestas electrofisiológicas y conductuales. Pero antes de la estimulación del NC, se previno la aparición de la PLP con la aplicación de OT o electroestimulando el núcleo PV.

Estos hallazgos describen por primera vez una vía descendente capaz de bloquear o incluso prevenir la aparición de la PLP.

## Summary

Long term potentiation in spinal dorsal horns has been used in numerous studies as a model of neuropathic pain. This is a rise of the synaptic efficiency that persists hours or even days and it occurs between primary nociceptive afferents and second order neurons in the spinal cord, through a high-frequency electric stimulation of the sciatic nerve. On the other hand, paraventricular hypothalamic nucleus plays a role in a descendent pathway which inhibits nociceptive information in the spinal cord. The purpose of this work is to explore whether this projection can modulate or prevent long term potentiation in spinal dorsal horns.

Extracellular recordings were made in anesthetized Wistar male rats in dorsal horn's L4-L5 spinal segments, in response of the hindpaws stimulation, and we also measured the behavioral responses to thermal and mechanical stimuli after a SN electrical stimulation. It was observed an increased number of action potentials and an increased frequency of aversive responses using electrophysiological and behavioral experiments.

Electrical stimulation of the ipsilateral paraventricular nucleus or intrathecal administration of oxytocin after the rise of the long term potentiation strongly decreases the number of action potentials or aversive responses. In contrast when oxytocin was applied or the paraventricular nucleus stimulated before the sciatic nerve stimulation, the long term potentiation was prevented.

These findings suggest that oxytocinergic hypothalamic-spinal pathway can temporally block or even prevent the long term potentiation. This is relevant because it's the first time that one projection is described to prevent a model of neuropathic pain.

## **Agradecimientos**

Deseo agradecer al Instituto de Neurobiología (INB) por la educación recibida durante los dos años de la maestría, al Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) en París Francia, por permitirme realizar una estancia de investigación y así terminar la fase experimental de la maestría. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becario No: 206252) así como a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (Cuenta No: 507002990) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por su apoyo económico.

También deseo agradecer al Dr. Miguel Condés Lara y al Dr. Gerardo Rojas Piloni, cotutores en este trabajo de maestría, al Dr. Luis Villanueva por sus aportes en todo el trabajo de investigación, a la Quím. Leonor Casanova Rico, responsable del área de enseñanza, a la Dra. Guadalupe Martínez Lorenzana y al MVZ Javier Rodríguez Jiménez, técnicos académico y laboratorista respectivamente del laboratorio B-16, a la Lic. Pilar Galarza Barrios, encargada de la Biblioteca, al MVZ Martín García Servín por su apoyo en el Bioterio y a Omar González Hernández de la Unidad de Cómputo.

Además, agradezco enormemente a Christian Salvador Castillo Muñoz por su apoyo incondicional, a Daniela Ávila González, a mis compañeros de posgrado y en especial a los profesores de las diferentes asignaturas del programa de la Maestría en Ciencias por todo lo aprendido durante esta fase de mi formación, Ustedes son mi fuente de conocimiento y de motivación para seguir adelante.

## **Abreviaturas**

<b>AINE</b>	Antiinflamatorio no esteroideo
<b>AMPA</b>	Ácido alfa-amino-3-hydroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
<b>Ca<sup>++</sup></b>	Calcio
<b>EE</b>	Error estándar
<b>GABA</b>	Ácido gama amino butírico.
<b>gf</b>	Gramos fuerza
<b>IASP</b>	Asociación internacional para el estudio del dolor (por sus siglas en inglés).
<b>LCN</b>	Núcleo cervical lateral (por sus siglas en inglés)
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>Mg<sup>+</sup></b>	Magnesio
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodio
<b>NC</b>	Nervio ciático
<b>NK-1</b>	Neuroquinina-1
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NO</b>	Óxido nítrico (por sus siglas en inglés)
<b>NOS</b>	Sintetasa del óxido nítrico (por sus siglas en inglés)
<b>OT</b>	Oxitocina
<b>PE10</b>	Cánula de polietileno número 10. Clay Adams, Parsippany, NJ, USA
<b>PLP</b>	Potenciación a largo plazo
<b>PV</b>	Núcleo paraventricular hipotalámico
<b>SAL</b>	Sistema anterolateral
<b>SGP</b>	Sustancia gris periacueductal
<b>VPL</b>	Núcleo ventral posterolateral talámico
<b>VPM</b>	Núcleo ventral posteromedial talámico
<b>WDR</b>	Amplio rango dinámico (por sus siglas en inglés)

## ÍNDICE

<b>Capítulo 1: Introducción</b>	
I. Dolor	1
II. Dolor crónico	3
<b>Capítulo 2: Antecedentes</b>	
I. Transmisión de la información nociceptiva	7
A. Bases neuroquímicas de la transmisión en información nociceptiva	7
B. Astas dorsales y relevo de información	12
C. Sistema anterolateral (SAL)	13
D. Otras vías ascendentes	14
II. Integración de información nociceptiva en centros superiores	15
III. Regulación de la información nociceptiva	15
A. Wind up	15
B. Potenciación a largo plazo	16
C. Electroestimulación del nervio ciático	18
IV. Vías descendentes y modulación de dolor	19
A. Periférica	19
B. Central	19
B.1 Modulación segmentaria	19
B.2 Modulación por vías descendentes	20
B.2.1 Sistema corticofugal	21
B.2.2 Sistema mesencéfalocefugalo	21
B.2.3 Sistema reticulofugal	22
V. Hipotálamo y oxitocina	23
<b>Capítulo 3. Planteamiento del problema</b>	26
<b>Capítulo 4. Hipótesis y objetivos</b>	
I. Hipótesis	27
II. Objetivo general	27
III. Objetivos particulares	27
A. Experimento Electrofisiológico	27
B. Experimento Conductual	28
<b>Capítulo 5. Material y métodos</b>	29
I. Estrategia experimental	29
A. Grupo electrofisiológico	29
I. Colocación del electrodo de estimulación en el núcleo PV	30
II. Registro extracelular en la médula espinal	30
III. Electrodo de estimulación en el nervio ciático	31

IV.	Estimulación del núcleo PV	31
V.	Administración de OT en la médula espinal	32
VI.	Localización de los sitios de estimulación y registro	32
VII.	Análisis de los registros de la actividad unitaria extracelular	32
VIII.	Análisis estadístico	33
B.	Grupo conductual	33
I.	Colocación de la cánula intratecal	34
II.	Colocación del electrodo de estimulación en el núcleo PV	34
III.	Estimulación en el nervio ciático	34
IV.	Estímulos mecánicos y térmicos	35
V.	Estimulación del núcleo PV y aplicación intratecal de OT	35
VI.	Localización de los sitios de estímulo y aplicación intratecal	36
II.	Histología	36
IV.	Análisis estadístico	36
<b>Capítulo 6. Resultados</b>		
I.	Grupo electrofisiológico	37
A.	Potenciación a largo plazo	37
B.	Efectos de la estimulación eléctrica del núcleo PV sobre las respuestas neuronales (subgrupo PLP + PV)	41
C.	Aplicación de OT posterior al desarrollo de una potenciación a largo plazo (subgrupo PLP + OT)	42
D.	Prevención de la potenciación a largo plazo	44
D1	Prevención por aplicación intratecal de OT	44
D2	Prevención por estimulación eléctrica en el núcleo paraventricular	47
II.	Grupo conductual	50
A.	Efecto de la vía oxitocinérgica en presencia de estímulos mecánicos	51
B.	Efecto de la vía oxitocinérgica en presencia de estímulos térmicos	53
C.	Prevención de la potenciación a largo plazo por medio de la aplicación intratecal de OT	55
C1.	Efecto de la OT previa a la estimulación del nervio ciático sobre la estimulación mecánica	55
C2.	Efecto de la OT previa a la estimulación del nervio ciático sobre la estimulación térmica	56
III.	Histología	58
<b>Capítulo 7. Discusión de resultados</b>		
I.	Experimento electrofisiológico	61
A.	Separación de respuestas nociceptivas de las no nociceptivas	61
B.	Potenciación a largo plazo	61
C.	Mecanismos de control descendentes en la PLP.	62
D.	Efectos de la vía oxitocinérgica hipotálamo-espinal	64
E.	Prevención de la PLP	65
II.	Experimento conductual	69
A.	Umbral de retirada frente a estímulos nociceptivos	69
B.	Estimulación de alta frecuencia del nervio ciático	70
C.	Efecto de la vía oxitocinérgica hipotálamo-espinal	

	en ratas con libre movimiento	70
D.	Acción de la oxitocina en procesos de dolor crónico	71
E.	Papel de la vasopresina y la oxitocina en la analgesia mediada por la estimulación del núcleo paraventricular	72
<b>Capítulo 8. Conclusiones</b>		74
<b>Capítulo 9. Referencias</b>		75

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

En primer lugar me gustaría hacer una breve descripción del dolor, sus mecanismos e implicaciones. Como médico cirujano conozco la trascendencia de este tema, que abarca los ámbitos tanto clínico como social, siendo el motivo de consulta más frecuente. El estudio y tratamiento del dolor implica un acercamiento complejo y multidisciplinario, la consideración analítica del dolor, desde un punto de vista clínico, ha sido un objetivo a través de la historia de la medicina que, a pesar del esfuerzo, sigue siendo difícil de alcanzar.

### I. DOLOR

El dolor es una experiencia común en el ser humano. Desde el nacimiento hasta la muerte, el individuo está sometido a una interacción constante entre el entorno y su medio interno, y de ambas vertientes puede provenir un estímulo que se traduzca en dolor. La vida revela esta experiencia incluso a los más afortunados, que limita nuestras actividades y empobrece nuestra calidad de vida.

Según la *Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP)*, éste se define como una sensación desagradable con experiencia emocional, asociada a un daño tisular real o potencial (Merskey y Bogduk, 1986). Así, esta sensación es un fenómeno complejo y subjetivo, provocado por un estímulo sensitivo, y cuya respuesta o percepción es modificable por la memoria, factores sociales, emocionales, fisiológicos y psicológicos (Merskey y Bogduk, 1986). De esta forma, el dolor es una entidad en la esfera de la percepción con características multifacéticas, pero probablemente es la subjetividad del dolor lo que provoca su carácter altamente individual y difícil de cuantificar. La mejor aproximación para su evaluación en el hombre, en la actualidad, es una *escala analógica visual* (Hiskisson, 1974) en la cual el paciente refiere la intensidad de su dolor en una escala del 1 al 10 y de la misma manera se clasifica cómo evoluciona a lo largo del tiempo. Desgraciadamente, esta escala no sirve para comparar la intensidad del dolor entre distintas personas. Al ser el dolor una manifestación que un observador es incapaz de apreciar directamente, es imprescindible considerar a éste como cierto cuando otro lo refiere, o en su

defecto buscar manifestaciones que nos indiquen su existencia. Estos factores, que nos permiten evaluar al dolor, son una forma de corroborar la evolución de un proceso nocivo.

El dolor se conoce por la experiencia y se describe por comparación, es el síntoma más común de enfermedad y es una modalidad de la amplia gama de sensaciones que experimentan los organismos, tal vez la más distintiva. Éste tiene una función protectora: advierte de daños que pueden ser evitados o corregidos. Su percepción se clasifica con base a su intensidad, duración y por las causas que lo originan (Merskey y Bogduk, 1986).

Los estímulos que generan dolor son de naturaleza mecánica, térmica, química o eléctrica (Almeida et al., 2004), lo cual ha generado cambios en cuanto a las teorías que tienden a explicarlo. De esta manera, se propuso originalmente al dolor como un componente cuantitativo de otras sensaciones. Sin embargo, la descripción de receptores específicos para el dolor (nociceptores), señala que se trata de una submodalidad específica dentro del sistema somatosensorial. En la teoría de la *especificidad del dolor*, propuesta por Goldscheider en 1885 y Von Frey en 1894, el dolor era considerado como el resultado final de un proceso de transmisión sensorial, por medio de las terminaciones libres, independiente de otras sensaciones cutáneas, que variaba según la magnitud del daño tisular o de la estimulación dolorosa (Weddel, 1945). Sin embargo, esta teoría fue incapaz de explicar una serie de fenómenos clínicos como el dolor crónico o el *miembro fantasma*. Tiempo después, en un modelo multidimensional del dolor, se tomó en cuenta una serie de elementos contextuales y personales que hacían del dolor crónico una experiencia algo más compleja que lo propuesto por la teoría de la especificidad.

Los estímulos nociceptivos que llegan a un organismo generan una compleja interacción entre los sistemas de entrada y los sistemas de modulación. El resultado entre estos dos componentes antagónicos es una experiencia definible más fácilmente de forma cualitativa que cuantitativa. Así, una lesión puede o no generar una sensación dolorosa, lo cual indica la multiplicidad de factores implicados en el proceso de percepción. También refleja que el dolor es una sensación compleja, donde el estado funcional del organismo es esencial para la correcta interpretación. De acuerdo con la definición de la IASP, la relación entre dolor y el grado de lesión no es directa. Incluso un fenómeno doloroso puede ocurrir espontáneamente, sin la presencia de un estímulo nociceptivo.

Se debe entonces hacer una distinción entre nocicepción y dolor, entendiendo por la primera la información registrada por receptores y transmitida a lo largo del sistema nervioso central, así como sus manifestaciones neurofisiológicas, que pueden dar o no como resultado una experiencia de dolor. Y por la segunda se entiende una experiencia consciente, emocional, afectiva y generalmente desagradable, producto de un estímulo nocivo.

Loeser y Black (1975) estimaban que la experiencia del dolor posee niveles jerárquicos que se apoyan, a su vez, en varios sustratos neurológicos. En el primero de éstos, la *nocicepción*, es entendida en el sentido clásico de respuesta nerviosa a la estimulación dolorosa o al daño tisular. Actuaría como un sistema de detección del daño periférico. El segundo nivel, el *sufrimiento*, es conceptualizado como la respuesta afectiva negativa, generada en los centros nerviosos superiores por la nocicepción, que provoca la experiencia de dolor. En un tercer nivel, la *conducta* es considerada indicativa de la presencia de sufrimiento, y guarda una relación directa con la aparición y el mantenimiento del dolor. Ahora bien, dicha respuesta de informe también estaría modulada por el contexto en el que se emite y por el entrenamiento social que con respecto al dolor el sujeto haya recibido. Es por ello que los mecanismos del condicionamiento y del aprendizaje social van a modificar la conducta final. En esta teoría, desgraciadamente, no se mencionan los mecanismos intrínsecos que participan en la percepción y modulación del dolor.

## **II. DOLOR CRÓNICO**

El dolor, como mecanismo de alarma, debe extenderse en el tiempo lo suficiente para advertir de la lesión, evitar un daño mayor y así dar protección al organismo, pero también debe extinguirse con la terminación o reparación del daño. Cuando no se cumple el proceso de extinción, se habla de dolor crónico. Éste se ha descrito como continuo, quemante o eléctrico, muestra una variabilidad de su intensidad en la esfera de la cognición, y muchas veces es una expresión patológica en respuesta a los estímulos nociceptivos. Es interesante señalar que la característica de alarma no tiene ningún significado funcional, debido a las alteraciones causadas en los sistemas neuronales encargados del normal procesamiento de la sensación del dolor (Torregrosa, 1994; Dagnino, 1994). Sería importante distinguir entre el dolor agudo recurrente y el dolor crónico agudizado. En el primero existen varios períodos de dolor de corta duración que se repiten

periódicamente durante toda la vida del sujeto o durante un período prolongado, como por ejemplo las cefaleas migrañosas. En el segundo caso el dolor es continuo, con periodos de exacerbación y remisión, puede durar meses o años, acabando en curación o prolongarse hasta la muerte del paciente.

Los cambios fisiopatológicos de larga duración en el dolor crónico son provocados tanto por lesiones en nervios como en el parénquima circundante, llegando a desvincularse de la lesión inicial y manteniéndose por periodos prolongados (Torregrosa, 1994). Entre las secuelas que dejan las lesiones del sistema nervioso, están las sensaciones dolorosas anormales, las cuales persisten por semanas, meses o incluso años después de la lesión. El dolor persistente se puede presentar debido al daño tisular, producido por activación directa de las terminaciones libres y frecuentemente se acompaña de inflamación. Por otro lado, también existe una modalidad neuropática, secundaria a una lesión directa de tejido nervioso con o sin afectación del parénquima circundante y el dolor es generalmente referido como sensación quemante o eléctrica.

La principal diferencia entre el dolor somático y el neuropático (Tabla 1), es que en el último no necesariamente existe un estímulo que provenga de los receptores encargados de recibir los estímulos dolorosos. Por ejemplo, en las neuropatías periféricas se ven involucradas fibras aferentes primarias por la sección o el daño de las mismas.

<i><b>Dolor somático</b></i>	<i><b>Dolor neuropático</b></i>
Estímulo nociceptivo usualmente evidente.	Ausencia de estímulo nociceptivo obvio.
Por lo general bien localizados; el dolor visceral puede ser referido.	A menudo mal localizado.
Similar a otros dolores somáticos en la experiencia del paciente.	Inusual, diferente al dolor somático.
Alivio por analgésicos, antiinflamatorios	Alivio parcial con analgésicos narcóticos.

Tabla 1: Características del dolor somático y neuropático. Modificado de Maciewicz y Martin (1991).

El dolor neuropático presenta algunas características especiales que a continuación se enumeran:

- Hiperalgnesia: Respuesta exagerada en presencia de estímulos dolorosos.
- Alodinia: Sensación dolorosa provocada por un estímulo inocuo.
- Presentación espontánea: El dolor se puede desencadenar sin un estímulo aparente.
- Cambio de tamaño del campo receptivo sensibilizado: La hiperalgnesia y la alodinia no solo se delimitan a la zona afectada, sino que se extienden abarcando un área diferente a la lesión original, al área sensibilizada se le conoce con el nombre de *zona de hiperalgnesia secundaria*.

Estos fenómenos se presentan posteriores al trauma y son ocasionados principalmente por un aumento en la sensibilidad de las neuronas del asta dorsal (Lewis, 1942).

Así, el dolor crónico es especialmente problemático debido a su severidad y resistencia a los analgésicos comunes, condición que afecta del 2 al 3% de la población mundial (Gilron et al., 2006). Se estima que en los Estados Unidos un paciente con dolor crónico puede tener costos en salud que varían de 500 a 35,000 dólares por año, sin tomar en cuenta los procedimientos quirúrgicos, lo que incrementaría los cálculos. El costo anual calculado en atender problemas de lumbalgia, migraña y artritis es de aproximadamente 40 billones de dólares. Además de los costos que genera su tratamiento, el dolor crónico es devastador para la calidad de vida personal, representa pérdidas de miles de horas-hombre al año, incapacita a la población económicamente activa y en mayor medida a personas de la tercera edad (Latham y Davis, 1994). Asimismo, no solo modifica la vida personal del paciente sino que también la dinámica familiar y social del individuo.

El diagnóstico de dolor neuropático está basado, principalmente, en los antecedentes del paciente, y el tratamiento es generalmente paliativo. Entre los tratamientos farmacológicos están los agentes que modifican la percepción del dolor, reduciendo la inflamación tisular: glucocorticoides, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) o inhibidores de la síntesis de prostaglandinas. También son usados los agentes que interfieren con la transmisión del dolor (narcóticos) o aumentando su regulación descendente (antidepresivos tricíclicos). Asimismo son ampliamente utilizados los inhibidores de la recaptura de ácido gamma-aminobutírico (GABA), como la gabapentina. Por otro lado, los anticonvulsivantes (fenitoína, carbamacepina) pueden modificar las sensaciones de

dolor aberrante procedentes de fuentes neurógenas, por ejemplo, desmielinización de nervios periféricos, al hiperpolarizar las membranas neuronales. Entre los tratamientos quirúrgicos están la neurectomía selectiva, la rizotomía, la talamectomía o la cingulotomía. La terapia es generalmente combinatoria (Glajchen, 2001). Su corrección depende de la determinación de su causa y del alivio de los factores favorecedores y desencadenantes.

Debido a la ineficacia en el tratamiento y rebeldía del dolor crónico, se busca una alternativa basada en la activación de mecanismos endógenos que al ser activados puedan suprimir el dolor. El conocimiento de ellos puede en un futuro llevar a la creación de un nuevo tratamiento del dolor neuropático y así mejorar la calidad de vida de millones de personas, además de evitar las pérdidas económicas que este padecimiento ocasiona.

Sería importante concluir que el dolor es una experiencia subjetiva, de etiología múltiple, que normalmente funciona como una alarma frente a estímulos nocivos, pero cuando se mantiene más tiempo de lo habitual pierde su significado funcional. Es por esto que se requieren diversos y más eficaces medios para solucionar el enorme problema de salud que representa. Así, en el presente estudio, se analiza la modulación de la información nociceptiva por medio de vías endógenas.

## CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES

### I. TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN NOCICEPTIVA

Los receptores sensoriales encargados de recibir los estímulos dolorosos se denominan nociceptores, los cuales son receptores celulares, estructuras u órganos sensoriales que transmiten esta información a las neuronas sensitivas de primer orden. Pueden encontrarse en el periostio, la superficie de la piel, articulaciones, vísceras, tendones y músculos (Bessou y Perl, 1969). Los que se encuentran en la piel se originan de nervios de pequeño calibre, los cuales al llegar a la epidermis pierden su mielina y se ramifican en plexos amplos (Almeida et al., 2004). El soma de estas neuronas se sitúa en los ganglios de las raíces dorsales, a lo largo de la médula espinal. En el caso de las terminaciones nerviosas correspondientes a la cara, el cuerpo celular se encuentra en el ganglio del trigémino.

El sistema de aferentes primarias implicado en captar los estímulos nociceptivos está conformado por fibras A-Delta ligeramente mielinizadas y fibras C amielínicas (Figura 1) (Fields, 1987), las cuales se clasifican de acuerdo a sus velocidades de conducción (Tabla 2); de esta forma, las primeras transmiten más rápidamente y son las responsables del dolor agudo y bien localizado; mientras que las fibras segundas, además de tener una velocidad de conducción más lenta, son responsables de un dolor duradero y mal localizado (Bishop, 1944; Dagnino, 1994).

<i>Estímulos</i>	<i>Tipo de fibra    Diámetro (micras)    Velocidad (m/s)</i>		
	<i>A-Beta</i>	<i>5-15</i>	<i>30-50</i>
Térmicos			
Mecánicos			
Químicos			
Eléctricos			

Tabla 2: Los nociceptores transmiten la información de los diferentes tipos de estímulos por fibras específicas. Las fibras rápidas A-Delta, mielinizadas, y las fibras lentas C, amielínicas son las que transmiten el dolor (modificación de Erlanger y Gasser, 1930).

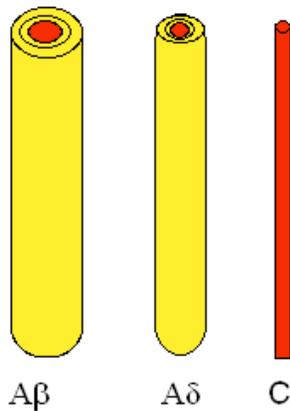


Figura 1: Tipos de fibras responsables de la transmisión de información aferente, nótese como las fibras A-Beta tienen mayor calibre y una gruesa capa de mielina, a diferencia de las fibras A-Delta en las cuales su capa de mielina es delgada, o las fibras C, completamente libres de mielina.

Los nociceptores son de diferentes tipos y se pueden clasificar, según su estímulo desencadenante, de la siguiente forma:

Unimodales:

- Térmicos: son terminaciones libres que se activan con una temperatura menor a 4°C o mayor a 42°C en mamíferos (Julious y McCleskey, 2006).
- Mecánicos: se estimulan mediante presión mayor a 75 milímetros de mercurio en mamíferos (Hamill y Martinac, 2001).

Polimodales:

- Activados por estímulos mecánicos, químicos, térmicos o eléctricos.

Los primeros dos tipos de nociceptores son las terminaciones libres de fibras A-Delta, de 2 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y con velocidades de 5 a 30 m/s. Éstas se clasifican en dos grupos, las de tipo I corresponden a fibras con mecanorreceptores de alto umbral, las tipo II tienen receptores mecanotérmicos. Ambas pueden ser sensibilizadas, como se describirá más adelante, respondiendo a estímulos con umbrales menores o incluso no nociceptivos (Millan, 1999).

Por su parte, las fibras C tienen de 0.3 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro y conducen a velocidades menores a 1 m/s (Gasser, 1950). Muchas fibras C con receptores de alto umbral responden igualmente a estímulos nociceptivos variados, esto fue descrito por Bessou y Perl (1969), quienes encontraron fibras que no presentaban actividad espontánea y se activaban igualmente por estímulos térmicos y mecánicos, por ello son llamados *polimodales*.

Otros nociceptores, conocidos como silentes (Tabla 3), se encuentran en órganos internos y no son activados normalmente ante un estímulo doloroso debido a su alto umbral, pero solo en presencia de inflamación o de estímulos químicos que disminuyen su umbral y generan potenciales de acción (Al-Chaer et al., 1997). Son aproximadamente el 14% de las fibras y con estimulación repetida tienen a decrementar su frecuencia de descarga hasta alcanzar periodos de total inexcitabilidad.

Nociceptores	}	Térmicos:	<4, >42°C	}	A-Delta (5-30m/s)
		Mecánicos:	Presión		
		Polimodales:	variable Fibras C		
		Silentes:	Alto umbral de disparo, c	uímico.	

Tabla 3: Tipos de nociceptores y formas de activación. Los nociceptores aparte pues no comparten las características de los térmicos, mecánicos o polimodales (Al-Chaer et al., 1997).

Las fibras A Beta no participan en la transmisión de los estímulos nociceptivos, pero son fundamentales en los mecanismos de inhibición nociceptiva a nivel de astas dorsales, como se verá más adelante en la *teoría de la compuerta* (Melzack y Wall, 1965).

## A. BASES NEUROQUÍMICAS DE LA TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN NOCICEPTIVA

En muchas ocasiones el estímulo nociceptivo, además de activar las terminaciones libres, produce una lesión tisular, que origina la liberación de diversas sustancias. Éstas incluyen bradiquinina, histamina y prostaglandinas, entre muchas otras (Almeida et al, 2004). Muchos neuropéptidos prolongan y potencian la información nociceptiva, y otros la antagonizan. Por ejemplo, a partir del ácido araquidónico liberado por daño tisular y mediante la enzima ciclooxigenasa, se producen prostaglandinas, las cuales son los mediadores de la inflamación y logran disminuir el umbral para

la activación de los nociceptores (Vane et al., 1998). En el caso de la histamina, por sí misma puede activar receptores polimodales, y es probablemente la responsable de la sensación de quemadura (Andrew y Craig., 2001). La generación de un potencial de acción en aferentes nociceptivas puede deberse a la distorsión mecánica en la terminación axonal, alteraciones estructurales en la proteínas de la membrana axonal o cambios en el microambiente del receptor que generan cambios en el potencial de membrana (Yaksh y Hammond, 1982).

La comunicación entre los nociceptores y las neuronas del asta dorsal (neuronas de segundo orden) es mediada por neurotransmisores excitatorios, como son el glutamato y la sustancia P. Cuando la aferente primaria en la vía nociceptiva es estimulada, libera de las terminales presinápticas el glutamato, que ejerce su acción solo en la neurona postsináptica, debido a la recaptura del neurotransmisor. En cambio, la sustancia P no es recapturada y difunde a distancias más grandes, pudiendo así influenciar más neuronas posinápticas del asta dorsal. Esto sugiere que, entre las acciones de la sustancia P, está la de modificar la excitabilidad de las neuronas del asta dorsal, logrando a la vez una inespecificidad en la localización de muchos tipos de dolor (Marx, 1979). La acción del glutamato en las neuronas postsinápticas está mediada en su mayor parte a través de receptores ionotrópicos, permitiendo el paso de cationes. Estos receptores son Kainato, N-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA). Por su parte, los receptores a neuroquinina (NK-1) son activados directamente por la sustancia P liberada en procesos de inflamación, lo que sugiere su participación en la transmisión de la información nociceptiva (Mantyh et al, 1995). Los receptores a estas sustancias se encuentran en las neuronas postsinápticas en las primeras cinco láminas de Rexed (1952) en el asta dorsal de la médula espinal, y están encargados de mediar la reacción generada por la descarga de fibras aferentes primarias nociceptivas.

La activación de los receptores provoca una serie de respuestas en la neurona postsináptica, por un lado el flujo de iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ) entrando por los canales dependientes de voltaje provoca una despolarización (Hodgkin y Katz, 1949) y por otro lado la activación de los receptores NMDA provoca un incremento del calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) intracelular, el cual favorece la formación del complejo  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulina la cual activa a la proteína cinasa C (PKC) (Figura 2). Esto provoca la activación de más receptores AMPA fosforilándolos, así como la activación de la enzima óxido

nítrico sintetasa (NOS) la cual sintetiza óxido nítrico (NO) (Yoon et al., 1998), el cual puede reactivar a la membrana presináptica para liberar más glutamato (ver más adelante).

Por un lado la despolarización de la célula nerviosa de segundo orden provoca la continuación de la información, que asciende por los diferentes tractos de la médula espinal, y por otro lado el NO, que tiene una vida media corta y no cuenta con un sistema de recaptura, difunde fácilmente desde la neurona de segundo orden hacia el espacio sináptico, llegando hasta la parte terminal del axón de la aferente primaria, donde activa la enzima guanilato ciclasa que sintetiza el GMPc, el cual actúa como segundo mensajero produciendo una nueva liberación de glutamato. Este efecto es probablemente uno de los responsables de la hiperalgesia (Haulica et al., 1995) así como de la persistencia del dolor. Esta sensibilización central es disparada y mediada por fibras A delta y C, causando una reducción de los umbrales y, en algunos casos, actividad espontánea (Mense, 1983).

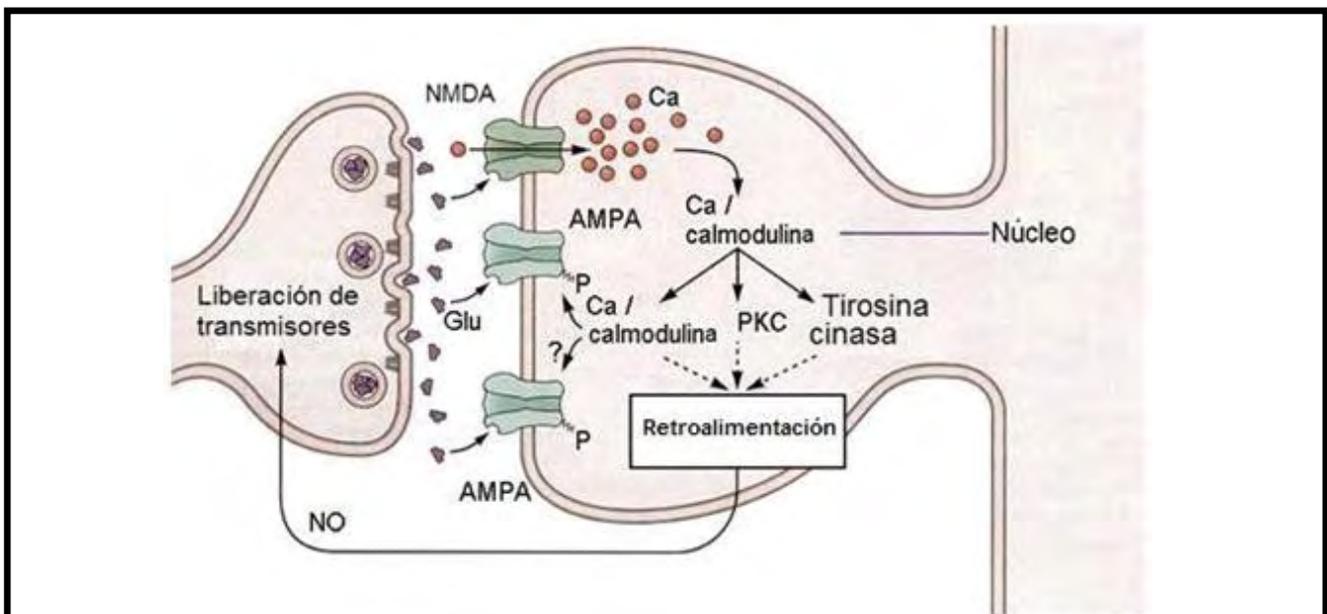


Figura 2: Paso de información nociceptiva entre aferente primaria y neurona de segundo orden. La sinapsis se lleva a cabo en las láminas superficiales del asta dorsal de la médula espinal. La liberación de glutamato por la neurona presináptica y su acoplamiento a los receptores ionotrópicos provoca la entrada de  $Ca^{++}$  intracelular. Éste se une a la calmodulina formando el complejo  $Ca^{++}$ -calmodulina, el cual además de enviar una señal al núcleo para la síntesis de ARN mensajero que se transformará en nuevos receptores, provoca la activación de la proteína cinasa C y una cinasa de tirosina. Estas proteínas activadas provocan la formación de la NOS la cual sintetiza NO que actuará como neurotransmisor retrógrado (Modificado de Kandel et al., 2000).

## B. ASTAS DORSALES Y RELEVO DE INFORMACIÓN

Para que la información nociceptiva se procese de forma adecuada en centros superiores, se necesitan vías de proyección. En la región dorsal de la médula espinal se realiza el relevo entre la aferente primaria y las neuronas de segundo orden.

Las fibras aferentes nociceptivas terminan predominantemente en las astas posteriores de la médula espinal, en las láminas I, II y V de Rexed (Millan, 1999). En la primera lámina de Rexed, denominada zona marginal, se releva el impulso tanto de neuronas nociceptivas específicas como de neuronas que reciben información de varios tipos de fibras. Estas neuronas, que reciben entrada sináptica convergente tanto de aferentes nociceptivas como no nociceptivas, son llamadas de amplio rango dinámico (WDR, por sus siglas en inglés. Mendell, 1966). La mayor característica de este tipo celular es la capacidad de responder según la intensidad del estímulo, debido a que muestran una frecuencia progresivamente incrementada de potenciales de acción, desde lo inocuo hasta lo nociceptivo (Willis, 1985).

La información que llega a la lámina II puede ascender por los diferentes tractos ascendentes o ser relevada por interneuronas y dirigirse hacia la lámina V, donde hacen relevo nuevamente. En la lámina V también existen neuronas de amplio rango dinámico, que reciben impulsos de las fibras A Delta, e indirectamente de fibras C por interneuronas excitatorias (Millan, 1999).

Después de sus interacciones directas o indirectas con las aferentes primarias, los axones de las neuronas cuyo soma se encuentra en las astas dorsales se proyectan por el funículo anterolateral o por el sistema de las columnas dorsales, formando vías aferentes que transmiten los impulsos nociceptivos a estructuras supraespinales (Mendell, 1966; Willis, 1985). Éstas son regiones pontinas, mesencefálicas, diencefálicas, y diferentes núcleos que se tratarán a continuación.

### C. SISTEMA ANTEROLATERAL (SAL)

Es un haz mixto que contiene fibras espinotalámicas, espinomesencefálicas, espinoreticulares, espinobulbares y espinohipotálamicas. Se les toma de forma conjunta, pues son los diversos tractos que viajan juntos por el funículo anterolateral contralateral, después de su decusación por la comisura blanca anterior. Clásicamente, se consideraba que las fibras descritas en el SAL solo conducían información térmica y dolorosa. Sin embargo, ahora se considera que los componentes del SAL transmiten todas las modalidades sensitivas (Almeida et al., 2004).

Por un lado la vía *neoespinotalámica* se toma como ruta directa de la médula espinal al tálamo, mientras que la vía *paleoespinotalámica* va de forma indirecta, a través de la formación reticular, antes de llegar a los núcleos talámicos (Kevetter y Willis, 1984).

El tracto *espinotalámico* del SAL nace de las láminas I, V y VI de Rexed (Kevetter y Willis, 1982), cruza inmediatamente por la comisura blanca anterior y asciende a través del funículo anterolateral. La información del tracto llega principalmente al núcleo ventral posterolateral (VPL), ventral posteriomedial (VPM) en caso de la cara y al complejo intralaminar del tálamo (Craig, 2003). El tracto *espinoreticular del SAL* inicia en las láminas V, VI, VII y VIII, ascendiendo también por el funículo anterolateral. Este tracto proyecta a las formaciones reticulares pontina y bulbar (Foreman et al., 1984; Cliffer et al., 1991). El tracto *espinomesencefálico del SAL* inicia principalmente de las láminas de Rexed I, II, V y VI, igualmente asciende contralateralmente por el funículo anterolateral proyectando a la sustancia gris periacueductal (SGP) y al colículo superior (Cliffer et al., 1991).

La información que se transmite en las vías espinoreticular y espinomesencefálica promueve la activación de sistemas endógenos de modulación de dolor, debido a que tanto la formación reticular como la pontina envían tractos descendentes directos e indirectos (Al-Chaer et al., 1997).

#### D. OTRAS VIAS ASCENDENTES

Además del SAL se encuentran otros tractos que reciben aferencias a nivel de las astas dorsales y comunican información nociceptiva a niveles superiores:

El tracto de las *columnas dorsales*, que transmite sensibilidad táctil, vibratoria o propioceptiva, en su mayor parte inicia desde la aferente primaria, y solo un 10% hace relevo (*tracto postsináptico de las columnas dorsales*) en las láminas III y V de Rexed (Wall, 1970). Ascende por los cordones posteriores (fascículos gracilis y cuneatus) ipsilaterales, proyectando hacia los núcleos homónimos, los que dan origen a fibras del lemnisco medio que se decusan para terminar en el tálamo contralateral. El núcleo gracilis recibe información de las regiones lumbro-sacras, por su parte el cuneatus recibe información de las regiones torácicas (Al-Chaer et al., 1997).

El tracto *espinoparabraquial* parece tomar parte en el componente afectivo y emocional del dolor por sus proyecciones al sistema límbico. Las neuronas de segundo orden, de las láminas I y II principalmente, convergen en el núcleo parabraquial, para proyectar después en la amígdala. El hipotálamo también recibe aferencias, participando en las respuestas autonómicas (simpáticas principalmente) al dolor (Almeida et al., 2004).

El tracto *espinocervicotalámico* transmite información nociceptiva que se derivará en los componentes afectivos y de localización. Inicia en las láminas III y V, se mantiene ipsilateral en sus proyecciones ascendentes, a través del fascículo dorsolateral, hasta las neuronas de segundo orden que se localizan en el núcleo cervical lateral (LCN). Después cruza por la comisura blanca anterior y envía proyecciones al VPL y al núcleo del tracto solitario (Downie et al., 1988).

## II. INTEGRACIÓN DE INFORMACIÓN NOCICEPTIVA EN CENTROS SUPERIORES

Los estímulos sensitivos cutáneos y viscerales nociceptivos activan las terminaciones nerviosas de las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales de la médula o del ganglio de Gasser del V par craneal. Tras una sinapsis en la médula (o el bulbo, en caso de provenir de la región de la cara o la cabeza) las vías ascendentes cruzadas alcanzan el tálamo y se proyectan hasta la corteza cerebral.

La información nociceptiva específicamente asciende por el SAL, converge en el núcleo ventral posterolateral (VPL) del tálamo, organizado de forma somatotópica. De ahí, a través de la *corona radiata*, envía proyecciones principalmente a corteza somatosensorial. Adicionalmente existe una red cerebral nociceptiva que incluye regiones como la corteza somatosensorial primaria y secundaria, la corteza cingular anterior, el lóbulo de la ínsula y estructuras subcorticales como amígdala, tálamo y ganglios basales (Hofbauer et al., 2001).

## III. REGULACIÓN DE LA INFORMACIÓN NOCICEPTIVA

La información somatosensorial es susceptible de modificación desde su generación en el receptor periférico y a todo lo largo de los centros superiores, en las diferentes sinapsis existen mecanismos que regulan la información ascendente. Esta regulación puede exacerbar o disminuir la información obtenida inicialmente en el receptor. A continuación daré algunos ejemplos de estos mecanismos neuronales.

### A. WIND UP

La estimulación repetitiva de fibras C, origina un aumento del tamaño de los campos receptivos, así como de la respuesta de las neuronas nociceptivas espinales a los estímulos periféricos. Este aumento progresivo en el número de potenciales de acción, provocados por estímulos repetitivos, es denominado *wind up* (Mendell y Wall, 1965 y Figura 3), y está mediado por la liberación de glutamato y sustancia P por medio de las aferentes primarias del tipo de fibras C, las cuales actúan sobre los receptores NMDA y NK-1 de las neuronas de segundo orden (Dickenson, 1990).

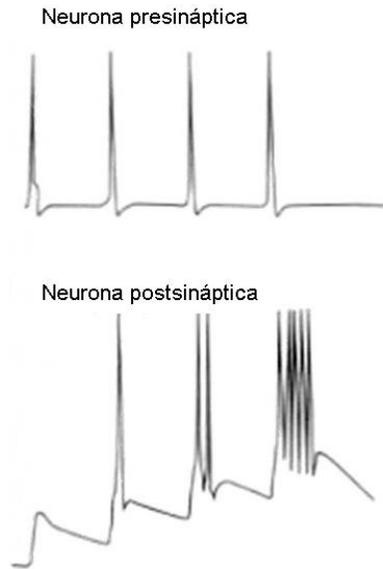


Figura 3. Fenómeno de wind up. Potenciales de acción en una aferente primaria y sus respuestas correspondientes en la neurona de segundo orden. Se observa un incremento gradual y progresivo de las respuestas postsinápticas provocadas por la neurona de primer orden.

El wind up es una característica que presentan ciertas neuronas del asta dorsal y se encuentra al realizar una estimulación repetida con frecuencias entre 0.3 y 3 Hz en las fibras C. Después de varios estímulos, el número de los potenciales de acción se incrementan progresivamente en las neuronas de las astas dorsales, pues sufren un efecto de sumación espacial y temporal. Los potenciales de acción extras después de varios estímulos pueden tener latencias superiores a lo esperado para fibras C, que son las fibras más lentas (Gasser, 1950). Es así que, después de ese periodo de latencia, aún se pueden encontrar potenciales de acción. Como su latencia no corresponde a ningún tipo de fibra, se le conoce como postdescarga. Es común encontrar un incremento en la postdescarga en neuronas que desarrollan wind up. Su existencia podría deberse a la activación sináptica recurrente provocada por el NO, tiempo después de la despolarización original (Stanfa et al., 1996). O bien a la acumulación de glutamato con la consecuente y progresiva activación de los receptores NMDA (Dickenson, 1995).

## B. POTENCIACION A LARGO PLAZO (PLP)

Si se realiza una estimulación a frecuencias mayores que las necesarias para desenmascarar las neuronas que generan *wind up* (>20 Hz), se puede provocar otro mecanismo que también facilita la transmisión de información en la médula espinal. Este mecanismo es denominado *potenciación a largo plazo*, la cual se define como la sumación temporal que produce la estimulación de altas frecuencias, que realiza modificaciones en las sinapsis resultando en un aumento de la eficacia

sináptica que persiste horas, días, e incluso se vuelve permanente (Bliss y Lømo, 1973). Esta larga duración es una de las características que distingue la PLP del *wind up*. (Tabla 4).

	wind up	Potenciación a Largo Plazo
<b>Inducción</b>	Estimulación de baja frecuencia.	Estimulación de alta frecuencia.
<b>Mecanismo</b>	Participación del NO y Glutamato.	Participación de NO y glutamato, Síntesis de nuevos receptores NMDA y AMPA.
<b>Aparición</b>	Inmediata, aumenta a cada nuevo estímulo.	Incremento después de varios minutos de la inducción.
<b>Mantenimiento</b>	Solo mediante estímulos continuos a baja frecuencia.	Autónomo, no necesita la continuación de estímulos.
<b>Duración</b>	Breve, desaparece segundos después de terminar la estimulación.	Larga, puede durar horas e incluso días.

Tabla 4: Diferencias entre wind up y PLP.

Esta facilitación se puede lograr en diferentes lugares del SNC, con un aumento en las respuestas, derivadas de la misma estimulación original. La PLP inicia con un incremento en la concentración de  $Ca^{++}$ , tanto en la célula presináptica como en la postsináptica. Después, en la neurona de segundo orden se sintetizan receptores NMDA y NK-1 adicionales, (Britton, 1996). También receptores NMDA y AMPA secuestrados en el citosol son llevados a la membrana celular con el consecuente incremento de sensibilidad al neurotransmisor. El NO participa igualmente como neurotransmisor recurrente (Zhuo et al., 1998).

Los receptores NMDA están asociados con el desarrollo de varios tipos de PLP. Procesos como aprendizaje y memoria (PLP en hipocampo: Bliss y Lømo, 1973), así como con estados de dolor crónico (PLP en astas dorsales de la médula espinal), son eventos que los incluyen. Así por ejemplo, los antagonistas de receptores NMDA, como el MK-801 o la ketamina bloquean la inducción pero no el mantenimiento de una PLP, previniendo, en caso de las astas dorsales, la hiperalgesia inducida por lesión de las fibras C (Ma y Woolf, 1995).

### C. ELECTROESTIMULACIÓN DEL NERVIO CIÁTICO

La estimulación eléctrica de alta frecuencia de las fibras A-Delta y C (de 20 a 200 ciclos por segundo), produce una PLP que puede ser registrada en neuronas de las astas dorsales. La realización y duración de la potenciación depende críticamente de la frecuencia e intensidad de la estimulación y de los fenómenos de inhibición (Sandkühler, 2000). La máxima expresión de una PLP puede tomar solo pocos minutos después de una electroestimulación tetánica o requerir más de 1 hora en estimulación nociceptiva normal, y puede durar de 8 a 12 horas presente en las astas dorsales o periodos más largos en hipocampo, en procesos relacionados con memoria (Lynch, 2004). Liu y Sandkühler (1997), realizando una estimulación eléctrica de alta frecuencia en el nervio ciático (NC), observaron un incremento gradual en la amplitud del potencial de campo intraespinal provocado por la activación de las fibras C, de hasta 200%. Este incremento inició aproximadamente a la media hora a partir de los trenes de pulsos y se mantuvo hasta la finalización del experimento, 8 horas después.

En experimentos conductuales se ha visto que después de una fuerte excitación en un pequeño número de fibras C se produce dolor intenso a los pocos minutos y con hiperalgesia que dura varias horas. Si se excita una cantidad mayor de fibras nociceptivas, se produce hiperalgesia que puede durar incluso semanas (Torregrosa, 1994; Dagnino, 1994). Asimismo Ying et al. (2006), estimulando eléctricamente el NC en animales con libre movimiento produjo un aumento del 150% en la sensibilidad, al estimular mecánicamente con filamentos de Von Frey. Esta hiperalgesia correlaciona con el incremento en el potencial de campo en fibras que transmiten la información nociceptiva observado en el grupo electrofisiológico de Sandkühler (2000).

## **IV. VÍAS DESCENDENTES Y MODULACIÓN DE DOLOR**

### **A. PERIFÉRICA**

Existen diversos sistemas o parareceptores encargados de modular la información aferente, es este tipo de regulación el que permite adaptar los órganos especiales sensoriales a diferentes intensidades de estímulos. Tal es el caso del párpado o de las células mioepiteliales del iris que regulan la cantidad de luz que incide en la retina. Igualmente lo es el músculo tensor del tímpano, que al contraerse disminuye la intensidad de la vibración en el oído medio.

El filtrado de la información sensorial en general, así como la nociceptiva, puede ocurrir antes del receptor: El grosor de la piel en diferentes zonas del cuerpo modifica la percepción del mismo. En la neurona de primer orden el impulso nociceptivo puede verse modificado por cambios en la temperatura, vascularización y alteraciones químicas del lugar donde se produce la activación nociceptiva. Así determinados estímulos, generalmente inocuos, pueden provocar dolor en ciertas circunstancias debido a la sensibilización de los correspondientes receptores o a la activación de un sustrato neuronal no involucrado habitualmente en la transmisión nociceptiva.

Evidencias recopiladas en los últimos 50 años han postulado a la médula espinal como un lugar importante para esta modulación de información nociceptiva. Clasificándola con base a su origen, la modulación puede ser segmentaria (local), o por vías descendentes.

### **B. CENTRAL**

#### **B.1 MODULACIÓN SEGMENTARIA**

Ocurre por circuitos intrínsecos de la médula espinal, confinados al mismo nivel o en niveles cercanos a donde se recibe la información nociceptiva.

Entre los mecanismos de control segmental se encuentra la *teoría de la compuerta* (Figura 4), descrita por Melzack y Wall (1965), la cual postula que la estimulación de fibras gruesas (no nociceptivas) excita interneuronas inhibitorias, las cuales actúan sobre las células de proyección al tálamo, modulando así los impulsos de las fibras delgadas (nociceptivas). Las fibras delgadas, por su parte, pueden inhibir a las interneuronas espinales generando la persistencia del dolor. Este sistema se postula a todos los niveles de la médula espinal.

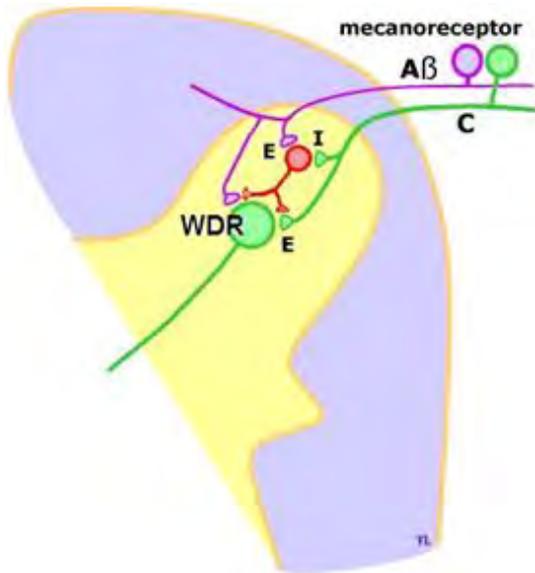


Figura 4: Esquema que ilustra la teoría de la compuerta (Melzack y Wall, 1965). El asta dorsal de la médula espinal presenta aferencias activadas por información mecánica no nociceptiva (fibras A-Beta), y nociceptivas (fibras C), las cuales realizan sinapsis con una interneurona (I) antes de hacer relevo con la neurona de segundo orden. Al estimular la fibra A-Beta, ésta activa (E) a la interneurona la cual a su vez inhibe la transmisión de información nociceptiva de la fibra C en la neurona WDR. Por otro lado la activación de las fibras C puede inhibir (I) a la misma interneurona y hacer persistente la activación de la neurona WDR.

## B.2 MODULACIÓN POR VÍAS DESCENDENTES

La teoría del *control central de la transmisión aferente* propuesta por Hernandez-Peon y Hagbarth (1955), se basa en la observación de que las funciones sensoriales podían ser deprimidas por estimulación de la formación reticular. Este descubrimiento generó una gran línea de investigación sobre los mecanismos neuronales capaces de modular la información sensorial. Así, en relación con el dolor, una de las primeras evidencias de esta modulación sobre la información nociceptiva fue dada por Reynolds (1969), quien describió cómo la estimulación eléctrica del mesencéfalo, particularmente de la sustancia gris periacueductal, producía analgesia en ratas. Este fenómeno fue posteriormente confirmado al observar que permanecen las respuestas a estímulos no nociceptivos (Mayer, 1971; Mayer y Lieberkind, 1974). La existencia de esta *Analgesia por estimulación* y el hecho de que invariablemente se producía a partir de la estimulación de regiones

cerebrales homólogas en diferentes especies animales, constituyó una poderosa evidencia a favor de la existencia de un sistema modulador del dolor. Más tarde, se comprobó que la administración de naloxona bloqueaba la analgesia producida por estimulación eléctrica y que la inyección de morfina en la sustancia gris periacueductal (SGP) daba lugar a la aparición de analgesia (Liebeskind y Besson, 1973).

A partir de estas y otras evidencias se puede clasificar dentro en varios grupos los distintos sistemas descendentes que modulan la información nociceptiva:

### B.2.1 SISTEMA CORTICOFUGAL

Formado por las proyecciones de las neuronas de las regiones paracentral y parietal inferior del córtex (*corticofugal directo*) que descienden, fundamentalmente, por la vía piramidal contralateral para terminar en el asta posterior de la médula (Miller 1987, Willis et al., 1997). Su mecanismo de modulación parece estar relacionado con la influencia presináptica sobre las aferencias primarias del tipo que describe la teoría de la compuerta. También por dos vías descendentes paralelas, una actuando a través de las neuronas reticuloespinales y otra a través de las neuronas endorfinicas de la SGP (*corticofugal indirecto*). Su efecto parece estar relacionado con modificaciones en la apreciación de la estimulación nociceptiva ligadas a cambios de atención.

### B.2.2 SISTEMA MESENCÉFALOFUGAL

Integrado por un conjunto de neuronas dispuestas alrededor del acueducto de Silvio, por ello llamada sustancia gris periacueductal. Ésta recibe impulsos que ascienden por el asta dorsal del SAL, además de los procedentes del sistema límbico y diencefalo, especialmente hipotálamo (Bandler y Keay, 1996). Las proyecciones de la SPG descienden y tienen un relevo a nivel bulbar, fundamentalmente en el núcleo magno del rafe. Desde allí los axones se proyectan a través de los cordones posterolaterales (fascículo dorsolateral) hasta el asta posterior medular, donde hacen sinapsis con las neuronas nociceptivas de las láminas I, II, V y VI, sobre las que ejercen una acción inhibitoria. Esta proyección está mediada por serotonina (Oliveras et al., 1984; Fields,

1987; Mogil et al., 1996), y activa interneuronas encefalinérgicas del asta dorsal, las cuales inhiben la transmisión de la información nociceptiva en este nivel.

### B.2.3 SISTEMA RETÍCULOFUGAL

Se origina en neuronas de gran tamaño, localizadas en la zona media de la formación reticular pontobulbar, que descienden a través de los haces dorsolaterales medulares y terminan en el asta posterior a nivel de las interneuronas. Estas interneuronas ejercen una acción inhibitoria sobre los aferentes nociceptivos periféricos a través de la liberación de adrenalina, dopamina y encefalinas. Se ha encontrado que este sistema de control descendente se activa ante la elevación de la concentración de catecolaminas en plasma, así como en la distracción. Su mayor eferencia se originada en el *locus coeruleus*, que en su proyección inicial utiliza noradrenalina para mediar sus efectos, para finalmente hacer sinapsis con interneuronas encefalinérgicas de la médula espinal.

Por otro lado, se ha descrito que un sistema descendente originado en neuronas oxitocinérgicas del núcleo paraventricular del hipotálamo (Magoun et al., 1940), también se encuentra participando en la modulación segmental de las respuestas neuronales nociceptivas (Shiraishi et al., 1995; Yirmiya et al., 1990; Condes-Lara et al., 2003; Miranda-Cardenas et al., 2006, Condes-Lara et al., 2006). Este sistema hipotálamo-medular es el objeto de estudio de la presente tesis.

En resumen, se puede afirmar la existencia de un sistema endógeno capaz de activarse ante la presencia de estímulos nociceptivos, estimulación eléctrica, administración de opiáceos, situaciones de estrés y otros factores responsables de la modulación normal del dolor. Dicha modulación tendría lugar a varios niveles (bulbar, mesencefálico, cortical y medular) interviniendo en ella neurotransmisores como la oxitocina, serotonina, noradrenalina, encefalina y probablemente el sistema colinérgico.

## V. HIPOTÁLAMO Y OXITOCINA

Al hipotálamo se le relaciona mayormente con la integración y el control del sistema nervioso autónomo, así como al inicio de los ejes neuroendocrinos para mantener la homeostasis. Los mecanismos de modulación del dolor se pueden considerar una parte de la homeostasis, al permitir que la alarma, debida al daño, mantenga las dimensiones adecuadas.

El hipotálamo es una porción del diencefalo, localizada como lo dice su nombre, por debajo del tálamo. Forma el piso y parte de la pared lateral del tercer ventrículo en cada uno de sus lados y está protegido parcialmente por la silla turca. Está dividido en las regiones preóptica, supraóptica, tuberal y mamilar. La región supraóptica, denominada así por estar encima del quiasma óptico, es en la que se encuentran los núcleos paraventricular, supraóptico, supraquiasmático e hipotalámico anterior. El núcleo paraventricular (PV) consta de dos regiones: una parvocelular y otra magnocelular, que tienen características fisiológicas diferentes. Las neuronas de la región magnocelular, envían sus axones principalmente a la porción posterior de la hipófisis (Gimpl y Fahrenholz, 2001) donde la oxitocina (OT) y la vasopresina se almacenan y desde donde es liberada al torrente sanguíneo. Las neuronas de la región parvocelular envían axones a diferentes lugares como hipocampo, sistema límbico y tallo cerebral. También se ha demostrado una proyección directa a la médula espinal, con fibras predominantemente oxitocinérgicas (Saper et al., 1976). Estas proyecciones llegan a las láminas I y II principalmente, aunque también a la zona intermediolateral y medial o lámina VII de Rexed (Swanson y McKellar, 1979).

Por su parte, la OT es un neuropéptido de 9 aminoácidos, con un puente disulfuro entre dos cistinas en posición 1 y 6 (Du Vigneaud et al, 1953). Es un neuropéptido relacionado filogenéticamente con la vasopresina, en distintas especies, los genes de OT y vasopresina están en el mismo locus cromosómico pero son transcritos en direcciones opuestas. La distancia entre los genes varía, siendo de 3 a 12 kilobases en el ser humano y en la rata. Este tipo de arreglo genómico puede resultar de la duplicación de un gen común ancestral, para después tener la inversión de uno de los genes (Gimpl y Fahrenholz, 2001).

Se sabe que hay una gran homología entre los receptores de OT y vasopresina, pero la afinidad de la vasopresina en el receptor de la OT es muy baja: se necesita 100 veces la cantidad de vasopresina para mimetizar el efecto, por lo cual la vasopresina se considera un agonista parcial de la OT (Chini et al., 1996). El sitio de unión del agonista para los péptidos parece estar localizado en una invaginación estrecha, delimitada por un arreglo en forma de anillo en los dominios transmembranales (Barberis et al., 1998).

El gen humano que produce la OT es llamado OT-neurofisisina I, localizado en el cromosoma 20p13 en seres humanos (Rao et al., 1992), el cual transcribe 3 exones: en el primero se encuentra la hormona y los primeros nueve residuos de la neurofisisina, mientras que los otros dos exones contienen el resto de los residuos que después componen a la neurofisisina, es por ello que al ser transcrito el gen se produce una preprohormona.

Esta preprohormona es sujeta a cortes y modificaciones, mientras es transportada por los axones a la región donde será liberada. Entonces la OT y la neurofisisina son guardadas en vesículas en los axones terminales hasta que un impulso nervioso permite su liberación. Al parecer la principal función de la neurofisisina, una proteína de 93-95 aminoácidos, es servir de transporte antes de ser liberada. No se conocen otras funciones para este péptido (Renaud y Bourque, 1991).

La OT tiene una vida media de 20-30 minutos, dependiendo de la especie considerada. Es sintetizada por las neuronas del núcleo PV del hipotálamo principalmente, en donde dos poblaciones de neuronas oxitocinérgicas han sido identificadas:

- Neuronas de la región magnocelular, que liberan la OT a la circulación general.
- Neuronas de la región parvocelular envían axones a diferentes sitios del SNC.

Debido a que la OT no atraviesa la barrera hematoencefálica (Takagi et al., 1985), no hay relación entre la liberación de OT plasmática y su efecto a nivel central (Takagi et al., 1985; Harris et al., 1981). Así, las proyecciones de las neuronas oxitocinérgicas de la región parvocelular serían las

encargadas de modular la información nociceptiva a nivel de las astas dorsales superficiales (Rousselot et al., 1990).

Los receptores a OT se han detectado en todos los segmentos de la médula espinal (Reiter et al., 1994), restringidos a las láminas superficiales y a la zona intermedio lateral de las astas dorsales (Gimpl y Fahrenholz, 2001).

Existen diferentes vertientes en cuanto al mecanismo por el cual la OT actúa inhibiendo la información nociceptiva en las astas dorsales de la médula espinal: Yu et al., (2003) ha postulado que el mecanismo de acción de la OT está mediado por opioides. También existen evidencias de que la OT bloquea los efectos del glutamato liberado por las aferentes primarias (Condes-Lara et al., 2003) y de que la proyección descendente hipotálamo-espinal media sus efectos antinociceptivos a través de la activación de interneuronas inhibitorias gabaérgicas en el asta dorsal (Rojas-Piloni et al., 2007). Este sistema es difuso y proyecta a diferentes niveles de la médula espinal (Condes Lara, 2007).

Estas neuronas oxitocinérgicas, con proyecciones a las láminas superficiales del asta dorsal, han sido la preocupación desde hace varios años del laboratorio de mi adscripción y son las que ocupan mi trabajo de tesis de maestría.

### **CAPÍTULO 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El estudio del tratamiento del dolor neuropático es uno de los mayores desafíos en el manejo del dolor crónico y una de las áreas más prometedoras en la investigación biomédica. Esto es debido a su rebeldía al tratamiento y porque aún no se comprende bien su falta de regulación homeostática. Aunque el dolor neuropático es uno de los tipos de dolor más frecuentemente encontrado en la práctica clínica, el éxito en su tratamiento permanece aún distante en muchas ocasiones.

Diversos autores han propuesto a la PLP en la médula espinal como un modelo tanto conductual (Ying, 2006) como electrofisiológico (Liu y Sandkühler, 1997) de dolor neuropático. Por otro lado, estudios conductuales y electrofisiológicos (Condes et al., 2003; Miranda-Cardenas et al., 2006, Condes-Lara et al., 2006, Rojas-Piloni et al., 2007) muestran que tanto la administración de OT como la estimulación eléctrica del núcleo PV, inhiben selectivamente las respuestas nociceptivas en el asta dorsal de la médula espinal al activar la vía oxitocinérgica hipotálamo-espinal. Sin embargo, aún no se comprende perfectamente de que manera esta vía oxitocinérgica modula las respuestas nociceptivas en presencia de dolor crónico y neuropatía.

Con la intención de explorar los mecanismos endógenos que modulan la sensación de dolor, mediados por la vía descendente hipotálamo-espinal, se decidió estudiar los efectos de la estimulación eléctrica del núcleo PV, así como los de la aplicación de OT intratecal, en la fase máxima de una PLP realizada en las astas posteriores de la médula espinal. Además, en esta tesis también se han analizado las respuestas nociceptivas conductuales en animales con libertad de movimiento frente a un dolor neuropático y el efecto conductual que tiene en la PLP la presencia de OT intratecal y la estimulación eléctrica del PV.

## **CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **I. HIPÓTESIS**

- 1) La estimulación eléctrica del PV, así como la OT intratecal, provocarán una disminución en las respuestas nociceptivas durante la fase máxima de la PLP.
- 2) La estimulación eléctrica del PV, así como la OT intratecal previas a la electroestimulación del NC, prevendrán la aparición de la PLP.

### **II. OBJETIVO GENERAL**

Determinar los efectos de la administración de OT, así como de la estimulación eléctrica del núcleo PV, sobre el desarrollo de la PLP provocada por la electroestimulación del NC.

### **III. OBJETIVOS PARTICULARES**

#### **A. EXPERIMENTO ELECTROFISIOLÓGICO**

- a) Caracterizar los efectos de la PLP, provocada por la electroestimulación del NC, sobre las respuestas neuronales nociceptivas.
- b) Cuantificar los efectos de la estimulación del núcleo PV así como de la administración intratecal de OT una vez establecida la PLP, al valorar las respuestas neuronales de las astas dorsales de la médula espinal.
- c) Cuantificar los efectos de la estimulación del núcleo PV así como de la administración intratecal de OT previo al establecimiento en una PLP, valorando las respuestas neuronales de las astas dorsales de la médula espinal.

## B. EXPERIMENTO CONDUCTUAL

- a) Caracterizar los efectos de la PLP provocada por la electroestimulación del NC valorando las respuestas nociceptivas conductuales.
- b) Cuantificar los efectos de la aplicación intratecal de OT, así como la estimulación eléctrica del núcleo PV, una vez establecida la PLP, en las respuestas nociceptivas conductuales.
- c) Cuantificar los efectos de la aplicación intratecal de OT, así como la estimulación eléctrica del núcleo PV, antes de establecer una PLP, en las respuestas nociceptivas conductuales.

## CAPÍTULO 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### I. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Los experimentos se llevaron a cabo con ratas macho de la cepa Wistar, de 250 a 300 g, mantenidos en un ambiente a temperatura constante y con un ciclo de luz-oscuridad 12-12 hrs (luces encendidas de 7 a 19 hrs), así como agua y comida sin restricción. Se utilizó esta cepa debido a que en ella tanto la vía oxitocinérgica hipotálamo-espinal, como los efectos antinociceptivos de la OT se han descrito con anterioridad (Condes et al., 2003; Miranda-Cardenas et al., 2006, Condes-Lara et al., 2006, Rojas-Piloni et al., 2007).

Los experimentos se dividieron como se expone en la Tabla 5, a continuación:

Grupo Electrofisiológico	}	a) Curativo	}	Aplicación de OT
		Estimulación del núcleo PV		
b) Preventivo	}	}	Aplicación de OT	
			Estimulación del núcleo PV	
Grupo Conductual	}	a) Curativo	}	Aplicación de OT
		Estimulación del núcleo PV		
b) Preventivo	}	}	Aplicación de OT	

Tabla 5: Descripción de los diferentes paradigmas experimentales.

#### A. GRUPO ELECTROFISIOLÓGICO

En este grupo se estudiaron 45 ratas macho de la cepa mencionada y se analizaron el mismo número de neuronas en registros extracelulares con la finalidad de conocer los efectos de la estimulación del NC sobre las células en estudio. De la misma forma, esta situación permitió

valorar los efectos de la aplicación tópica de OT o de la activación de la vía hipotalámica espinal sobre las respuestas a la estimulación del campo receptivo periférico que activa a las neuronas registradas. Los experimentos se realizaron en animales anestesiados con una mezcla de 1.5% de halotano, 66% de óxido nitroso y el resto de oxígeno. Durante todo el procedimiento experimental se verificaron los gases y mediante una bomba acoplada a una cánula y por medio de una traqueotomía, la respiración fue asistida. La temperatura corporal se mantuvo constante por medio de un serpentín circulante de agua a 37° C. También se verificó durante toda la sesión experimental la frecuencia cardiaca, y el electrocorticograma permitió valorar la profundidad de la anestesia y el estado general de las ratas.

## I. COLOCACIÓN DEL ELECTRODO DE ESTIMULACIÓN EN EL NÚCLEO PV

Después de colocar a la rata anestesiada en el aparato estereotáxico, se retiró la piel y el tejido celular subcutáneo de la parte superior del cráneo. Se usó un taladro dental para realizar dos pequeños agujeros donde se colocaron electrodos de plata con punta roma para registrar el electrocorticograma. La sutura *lambda* fue tomada como punto de referencia externo para verificar las coordenadas basadas en el atlas estereotáxico para la rata de Paxinos y Watson (1998. Eje AP: 7.2 mm, lateral: 0.45 mm, altura: 2.0 mm), establecidas para realizar la craneotomía y colocar un electrodo bipolar en el núcleo PV izquierdo. Durante un breve periodo de tiempo, el electrodo bipolar fue posicionado 1 mm por arriba del PV y se colocó en su lugar cuando la preparación experimental estuvo lista, es decir, en el momento en que se caracterizó la actividad eléctrica de una célula de la médula espinal en registro.

## II. REGISTRO EXTRACELULAR EN LA MÉDULA ESPINAL

Los animales de experimentación fueron fijados de la columna vertebral por medio de un sujetador metálico y se expuso la médula espinal por medio de una laminectomía en el ensanchamiento lumbar (L4 – L5). Los registros de la actividad unitaria extracelular se realizaron por medio de micropipetas de vidrio con una resistencia de 8 a 12 M $\Omega$ , conteniendo azul de pontamina al 4% en una solución de KCl 1M. Se estudiaron únicamente neuronas de amplio rango dinámico, registrando y amplificando las señales electrofisiológicas, al tiempo en que se filtraban

las frecuencias por debajo de 300 y superiores a 3000 Hz. Las micropipetas se colocaron en el asta dorsal izquierda, descendiendo lentamente por medio de un micromanipulador, hasta que fueron registrados los potenciales de acción correspondientes a una neurona. Entonces se procedió a buscar la zona periférica que al ser estimulada provocara respuestas neuronales que fueran registradas en la micropipeta. Cuando se determinó el campo receptivo de la neurona registrada, se colocaron dos electrodos en la piel y el tejido subcutáneo de la región plantar y se estimuló el campo periférico correspondiente, por medio de pulsos eléctricos de 1 milisegundo de duración a 0.5 Hz, provenientes de una unidad de aislamiento. La estimulación eléctrica fue determinada dando pulsos progresivamente más intensos, entre 0.1 y 1.5 mA con un intervalo de 0.1 mA cada vez, hasta alcanzar el umbral de activación de las fibras C. Una vez alcanzado ese umbral, se aplicaron 20 estímulos, con una intensidad 3 veces mayor a la necesaria para activar las fibras C, cada 10 minutos. Entonces se clasificaron las respuestas electrofisiológicas de neuronas de amplio rango dinámico de las astas dorsales de la médula espinal con base a sus latencias.

### III. ELECTRODO DE ESTIMULACIÓN EN EL NERVIO CIÁTICO

Se realizó una incisión en la parte lateral del muslo izquierdo, se disecó por planos hasta visualizar el nervio ciático, el cual se cubrió con aceite mineral y se colocó en la región media del NC un electrodo bipolar de plata para realizar la electroestimulación, cerrando posteriormente por planos y conectando el electrodo bipolar a una unidad de aislamiento. Después de realizar 3 series de estimulación en el campo periférico, se realizó una estimulación eléctrica del NC utilizando 20 trenes de estímulos con pulsos de 1ms a 100 Hz y con una duración de 2 segundos, con un intervalo de 10 segundos entre cada tren. Estos mismos parámetros fueron utilizados por Ying et al (2006) para generar una PLP de las respuestas nociceptivas en la rata.

### IV. ESTIMULACIÓN DEL NÚCLEO PV

Para cuantificar los efectos de la estimulación del núcleo PV una vez establecida la PLP, se estimuló eléctricamente este núcleo 90 minutos después de la estimulación eléctrica del NC, con un tren de pulsos de 1ms a una frecuencia de 60 Hz y 6 segundos de duración. Por otra parte, para cuantificar los efectos de la estimulación del núcleo PV previos al establecimiento en una PLP se

procedió a estimular este núcleo durante un segundo a 60 Hz con pulsos de 1 milisegundo, previo a cada uno de los 20 trenes de estimulación del NC. En ambos casos se realizó la electroestimulación por medio de un electrodo bipolar y con una intensidad de 300  $\mu$ A (Yirmiya et al., 1990; Condes-Lara et al., 2006; Rojas-Piloni et al, 2007). De esta forma, se cuantificó el número de respuestas obtenidas al estimular el campo periférico 1 minuto después de la estimulación del núcleo PV y se continuó estimulando el campo periférico cada 10 minutos con los mismos parámetros.

## V. ADMINISTRACIÓN DE OT EN LA MÉDULA ESPINAL

Con el objeto de conocer los efectos de la OT en la fase máxima de la PLP se administró ésta de forma intratecal (50  $\mu$ L, 10  $\mu$ M) a los 90 minutos de la estimulación eléctrica del nervio ciático. También se estudió el efecto de la OT previo a la estimulación del NC, al administrar la misma cantidad de OT intratecal después de las 3 series de estimulación control y 15 minutos antes de la estimulación eléctrica del NC. En ambos casos, posterior a la administración intratecal de OT se continuó estimulando el campo periférico cada 10 minutos, finalizando el registro 130 minutos después de la estimulación del NC.

## VI. LOCALIZACION DE LOS SITIOS DE ESTIMULACIÓN Y REGISTRO

Al final de cada experimento se realizó una lesión electrolítica en el núcleo PV por medio de la aplicación de corriente directa (100  $\mu$ A por 10 segundos). Además se realizó un marcaje iontoforético en los sitios de registro de las astas posteriores con el azul de pontamina contenido en la micropipeta, la cual fue conectada a una fuente de corriente directa (15-20 $\mu$ A por 15 minutos), para su posterior verificación histológica.

## VII. ANÁLISIS DE LOS REGISTROS DE LA ACTIVIDAD UNITARIA EXTRACELULAR

Las señales electrofisiológicas registradas se digitalizaron utilizando el sistema *Spike 2* para almacenar y analizar las respuestas obtenidas en el grupo electrofisiológico. De esta forma se construyeron histogramas de frecuencias periestímulo. Las respuestas se separaron por su

velocidad de conducción, y se valoraron los potenciales de acción que ocurrieron en una latencia específica (A-Beta 0-20 ms; A-Delta 20-90 ms; fibras C, 90-300 ms; y postdescarga, 300-800 ms). Se contabilizó el número de respuestas correspondientes a la activación de las diferentes fibras a intervalos de 10 minutos, para analizar sus variaciones a través del tiempo.

## VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se cuantificó el número de respuestas neuronales correspondientes a cada tipo de fibra, y se comparó el número de potenciales de acción según el tipo de fibra, se consideró como diferencia estadísticamente significativa una  $p < 0.05$ . Debido a que los datos son continuos y cumplen con una distribución normal, se utilizaron en los grupos electrofisiológicos dos tipos de pruebas estadísticas, para comparar las diferencias en los puntajes de los distintos grupos experimentales: un test de Student no pareado, para comparar entre grupos experimentales y controles, y una ANOVA de una vía con *post-hoc* de Tukey cuando fue necesario comparar entre más de dos grupos. Los resultados fueron mostrados como porcentaje de cambio  $\pm$  error estándar (EE), se consideró como diferencia estadísticamente significativa una  $p < 0.05$ .

### **B. GRUPO CONDUCTUAL**

En este grupo se estudiaron 64 ratas macho de la cepa Wistar, en las cuales se analizaron los efectos conductuales (reflejo de retirada por estimulación en las patas posteriores) frente a estímulos nociceptivos térmicos y mecánicos, antes y después de la estimulación del NC. La preparación de los animales se apegó a los lineamientos recomendados por la IASP (Zimmermann, 1983) y por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Además, este grupo contó con los siguientes subgrupos de falsos operados:

- 1) Con exposición del NC pero sin realizar la electroestimulación.
- 2) Colocación de la cánula intratecal, pero únicamente administrando solución salina a través de ella.
- 3) Colocación del electrodo bipolar en el núcleo PV, pero sin realizar la electroestimulación.

## I. COLOCACIÓN DE LA CÁNULA INTRATECAL

Se realizaron mediciones control de las latencias a los estímulos nociceptivos en todos los animales durante tres días. Posteriormente, se eligieron al azar los animales control, experimentales y falsos operados, en estos dos últimos subgrupos los animales se anestesiaron por medio de la aplicación intraperitoneal de ketamina-xilacina 7:1. Cada una de las ratas se colocó en el aparato estereotáxico, para hacer una incisión en la región posterior del cuello y así visualizar el espacio atlantooccipital, por donde se introdujo una cánula de polietileno (PE10) en el espacio subaracnoideo hasta llegar al nivel del ensanchamiento lumbar (L4-L5), dicha cánula tuvo la finalidad de efectuar inyecciones intratecales en este nivel. Se verificó la posición de la cánula de forma funcional, aplicando 8  $\mu$ L de lidocaína simple al 2% y observando el déficit motor temporal en los miembros inferiores. Posteriormente, al momento de la perfusión, se verificó la posición de la punta de la cánula de forma visual.

## II. COLOCACIÓN DEL ELECTRODO DE ESTIMULACIÓN EN EL NÚCLEO PV

5 días posteriores a la colocación de la cánula intratecal se anestesiaron nuevamente los animales con ketamina-xilacina 7:1, se colocaron en el aparato estereotáxico y se realizó una incisión a lo largo de la sutura interparietal. Se usaron las mismas coordenadas que en el grupo electrofisiológico para realizar una craneotomía y colocar un electrodo bipolar en el núcleo PV izquierdo. El electrodo fue posteriormente fijado con acrílico dental y se realizó el cierre de la piel y tejido subcutáneo alrededor del electrodo.

## III. ESTIMULACIÓN EN EL NERVIO CIÁTICO

Al día siguiente de la colocación del electrodo en el núcleo PV, los animales se anestesiaron de forma gaseosa y se realizó la misma intervención quirúrgica para la exposición del nervio ciático y la misma electroestimulación que con grupo electrofisiológico. Después se suturaron por planos los diferentes músculos, y en la piel se utilizó sutura no absorbible.

#### IV. ESTÍMULOS MECÁNICOS Y TÉRMICOS

A partir de la estimulación eléctrica del NC se cuantificaron diariamente, por espacio de 10 días, las respuestas de retirada a estímulos nociceptivos en la superficie plantar de las patas posteriores, provocadas por la estimulación mecánica, por medio de filamentos de Von Frey, o térmica por medio de la evaporación de acetona (alodinia por frío). Los resultados de las pruebas fueron comparados con los obtenidos en animales control o falsos operados.

Se colocó a los animales en experimentación en cubículos individuales de acrílico con piso de malla metálica la cual permite acceso a las patas posteriores. Después de un periodo de habituación (10 minutos) se procedió a estimular las plantas de las patas posteriores con los diferentes filamentos de Von Frey graduados en gramos fuerza (g) en al menos seis ocasiones con intervalos de cinco segundos entre cada aplicación, o se aplicó una gota de acetona en el dorso de las patas posteriores para después evaluar la reacción al estímulo, permitiendo así observar el desarrollo de la alodinia y de la hiperalgesia en los animales neuropáticos y comparar los valores con los obtenidos al administrar en forma intratecal OT, antagonistas específicos de la OT o la estimulación del núcleo PV.

#### V. ESTIMULACIÓN DEL NÚCLEO PV Y APLICACIÓN INTRATECAL DE OT

Se realizaron dos sesiones de estimulación nociceptiva por día, siendo utilizada la primera para registrar el curso temporal. En la segunda sesión, aproximadamente 30 minutos después, en un subgrupo se aplicó OT intratecal (8 $\mu$ L, 10 $\mu$ M) o fue estimulado el núcleo PV previo a los estímulos térmicos y mecánicos con los mismos parámetros utilizados en el grupo electrofisiológico. También se utilizó *vasotocin tirosilamida*, un antagonista específico de la OT (AOT) (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>[Tyr(Me)<sub>2</sub>, Thr<sub>4</sub>,Tyr-NH<sub>2</sub>], el cual es un péptido que no compite con el sitio de unión de la OT (Elands et al., 1998).

Para conocer los efectos de la aplicación de OT previo a la electroestimulación del NC, se aplicó ésta por medio de la cánula intratecal (8 $\mu$ L, 10 $\mu$ M), 15 minutos antes de electroestimar el NC. Posteriormente en este subgrupo solo se aplicaron los estímulos mecánicos y térmicos, sin estimular eléctricamente el núcleo PV o la aplicación de fármacos intratecales.

## VI. LOCALIZACIÓN DE LOS SITIOS DE ESTÍMULO Y APLICACIÓN INTRATECAL

Transcurridos los 10 días de experimentos se aplicó una sobredosis de pentobarbital a los animales de experimentación. Al entrar éstos en anestesia profunda se realizó una lesión electrolítica en el núcleo PV por medio de la aplicación de corriente directa (100 $\mu$ A por 10 segundos), para su posterior fijación, extracción de encéfalo y su verificación histológica. El lugar de aplicación intratecal fue verificado visualmente en la médula espinal por medio de la inyección de 5 $\mu$ L de azul de pontamina posterior a la perfusión.

### C. HISTOLOGÍA

Una vez realizadas en los grupos electrofisiológico y conductual las lesiones electrolíticas en el núcleo PV y/o los marcajes con azul de pontamina en las astas posteriores de médula espinal, se realizó la fijación de los tejidos con formaldehído al 10%, para después efectuar cortes histológicos de cerebro y médula espinal (40 micras). Así, se realizaron las reconstrucciones de los sitios de estimulación y registro.

### D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se cuantificaron las respuestas a estímulos mecánicos y térmicos. En los primeros se midió el umbral en gramos hasta el retiro de la pata. En el caso de los estímulos térmicos se analizó el porcentaje de respuestas positivas. Esta retirada puede manifestarse levantando la pata lenta o rápidamente, acompañado o no de sacudidas, lamidas de la pata, conducta de escape o vocalización. Debido a que los datos son discretos y que no cumplen con una distribución normal, se utilizaron en los grupos conductuales dos tipos de pruebas estadísticas: un test de Mann-Whitney para comparar entre grupos experimentales y controles, y una ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis con *post-hoc* de Dunn's cuando fue necesario comparar entre más de dos grupos.

## CAPÍTULO 6. RESULTADOS

### I. GRUPO ELECTROFISIOLÓGICO

Se cuantificaron los registros electrofisiológicos obtenidos en 45 neuronas de amplio rango dinámico, en las cuales se registraron sus respuestas y se analizó el efecto de la estimulación del núcleo PV o la aplicación de OT en diferentes paradigmas experimentales.

<b>Subgrupo</b>	<b>n</b>	<b>Descripción</b>
<i>PLP + PV</i>	15	La estimulación eléctrica del núcleo PV se realizó 90 minutos después de la electroestimulación del NC.
<i>PLP + OT</i>	9	La administración de OT intratecal se realizó 90 minutos después de la electroestimulación del NC.
<i>PV previo a NC</i>	7	La estimulación eléctrica del núcleo PV, precedió a la electroestimulación del NC.
<i>OT previo a NC</i>	7	La administración de OT intratecal se realizó 15 minutos previa a la electroestimulación del NC
<i>Control</i>	7	Se colocaron electrodos, pero no se realizó estimulación eléctrica del NC ni del núcleo PV, tampoco se administró OT intratecal.

#### A. POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO

La caracterización de la PLP con registros electrofisiológicos, se realizó con el primer subgrupo (*PLP + PV*), en donde se analizó el número de potenciales de acción unitarios obtenidos como respuesta de 20 estímulos al campo receptivo neuronal. De esta manera, cada secuencia de 20 estímulos constituyó una serie; para calcular las respuestas control se promediaron las 3 series de estimulaciones al campo periférico con un intervalo de 10 minutos entre cada serie. Este valor promedio fue normalizado al 100%. Después se realizó la evaluación de los efectos causados por la electroestimulación del NC, estimulando el campo periférico cada 10 minutos, durante 80 minutos (Figura 5). Los datos así obtenidos fueron almacenados para su posterior análisis.

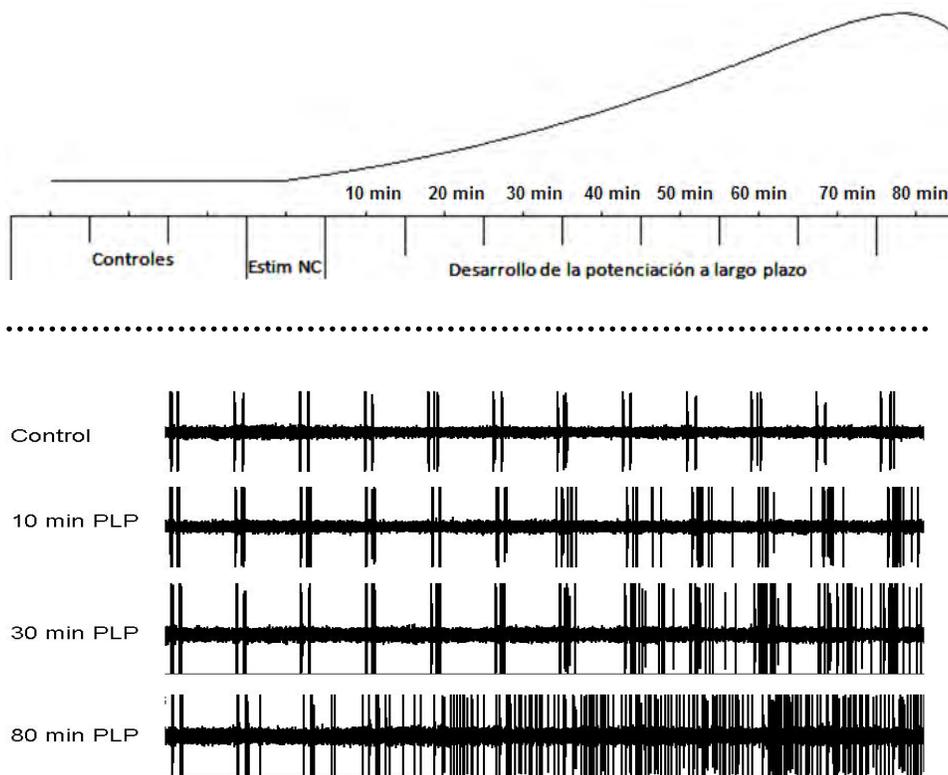


Figura 5. Arriba: Línea de tiempo del grupo electrofisiológico: realización de 3 controles, para posteriormente estimular el NC y continuar con registros en astas dorsales cada 10 minutos, a la vez que se estimula el campo periférico. Abajo: Registros en momentos diferentes del desarrollo de una PLP mostrando 12 respuestas provocadas por la estimulación del campo periférico. Se puede observar un incremento gradual y uniforme en el número de estas respuestas.

Se pudo observar que posterior a la estimulación eléctrica de alta frecuencia del NC, hubo un incremento gradual en el número de respuestas neuronales provocadas por la estimulación del campo receptivo periférico en todas las neuronas registradas. Este incremento fue del 74.70% al minuto 80, en contraste con el subgrupo control que mantuvo sus respuestas cercanas a los niveles basales (Figura 6), encontrándose una diferencia significativa desde el minuto 40 posterior a la estimulación del nervio ciático.

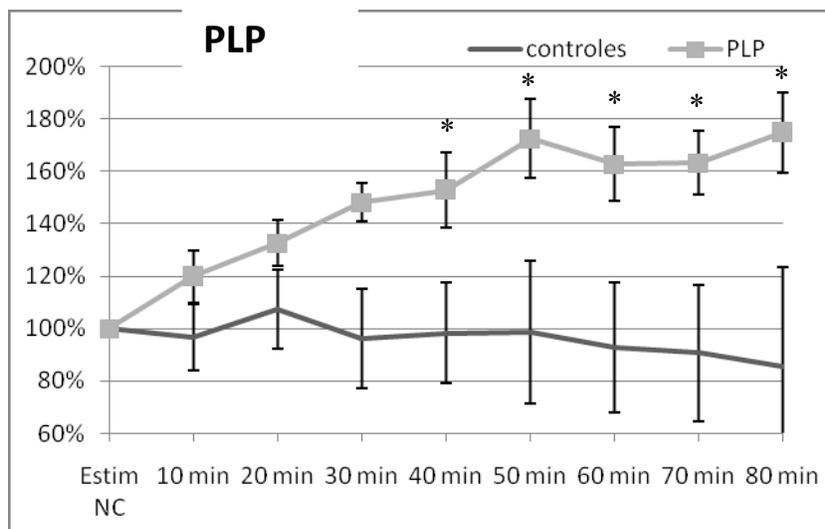


Figura 6: Porcentaje de cambio, respecto al basal (100%), del total de las respuestas registradas en médula espinal después de la electroestimulación del NC (rojo), comparada contra los experimentos controles (azul). Media±EE. \*p<0.05, T de Student no pareada.

El análisis fuera de línea permitió separar las respuestas neuronales de acuerdo a su velocidad de conducción, y se valoró el número de potenciales de acción que ocurrieron en las latencias correspondientes a la activación de las fibras A-Beta, A-Delta y C, además de la postdescarga. De esta manera, se compararon las respuestas provocadas por la estimulación de cada tipo de fibra antes y después de la estimulación del NC.

Las respuestas provocadas por la estimulación de las fibras A-Beta no sufrieron un incremento con respecto a su nivel basal, a los 80 minutos de la electroestimulación del NC. En el caso de las respuestas provocadas por la estimulación de las fibras A-Delta se encontró un incremento gradual y progresivo, después de la estimulación del NC, el cual fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) a partir del minuto 40; este aumento progresivo en el porcentaje de respuestas fue de  $60.01 \pm 31.64\%$ , a los 80 minutos de la estimulación del NC. En las respuestas provocadas por la activación de fibras C se observó un aumento del  $44.28 \pm 13.10\%$  con respecto a su nivel basal, la diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) se encontró desde el minuto 30 después de la estimulación del NC. En la postdescarga el incremento fue de  $184 \pm 98\%$  al minuto 80 y la diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) se observó a partir del minuto 30 posterior a la estimulación del NC (Figura 7).

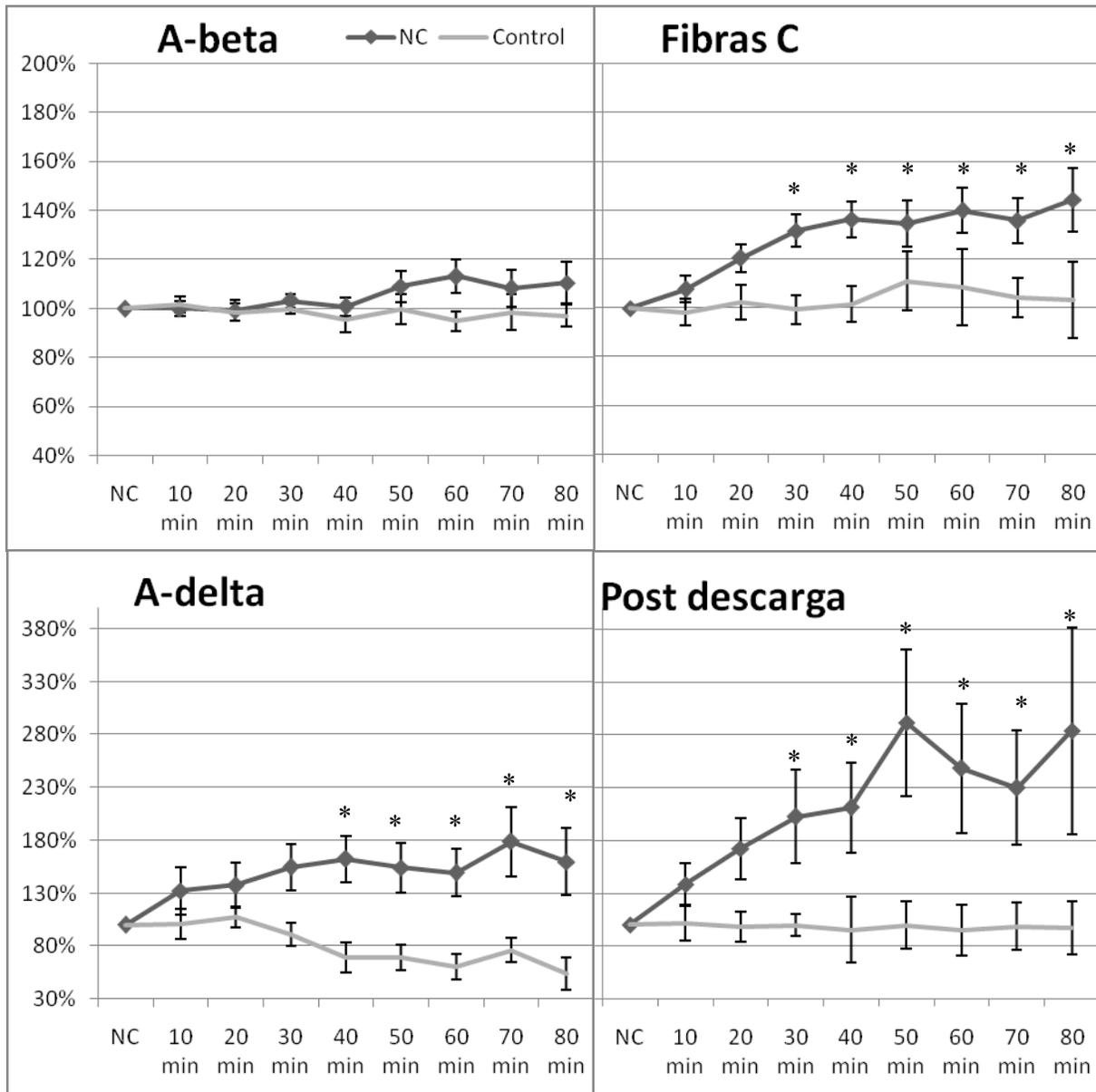
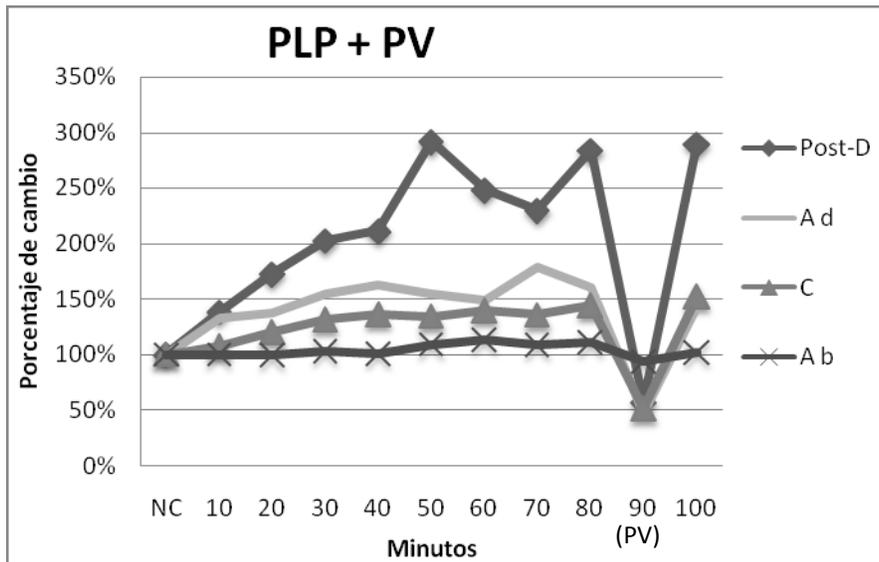


Figura 7: Comparación porcentual de las respuestas provocadas por la estimulación de las diferentes fibras (A-Beta, A-Delta y C, así como postdescarga). Nótese que, en el caso de las fibras A-Beta, no existen cambios significativos, a diferencia de las fibras A-Delta (cambio significativo desde el minuto 40), C (significancia desde el minuto 30) y postdescarga (diferencia significativa desde el minuto 30). Media±EE. \*p<0.05, T de Student no pareada.

## B. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL NÚCLEO PV SOBRE LAS RESPUESTAS NEURONALES (SUBGRUPO *PLP + PV*)

En el subgrupo *PLP + PV* ( $n=15$ ) una vez transcurridos 90 minutos desde la electroestimulación del NC, se estimuló eléctricamente el núcleo PV ipsilateral. De esta manera comparamos el número de respuestas 10 minutos antes, 1 minuto y 10 minutos después de la estimulación del núcleo PV. Así, encontramos un decremento transitorio en el número de potenciales de acción correspondientes a las respuestas provocadas por la estimulación de fibras aferentes nociceptivas, sin modificar las respuestas no nociceptivas (Figura 8).



La estimulación eléctrica del núcleo PV provocó un decremento transitorio, estadísticamente significativo ( $p<0.05$ ):  $70.33\pm 7.73\%$  en las respuestas provocadas por la estimulación de fibras A-Delta,  $64.55\pm 7.60\%$  en las respuestas secundarias a la activación de fibras C, y  $79.96\pm 29.4\%$  en la postdescarga. No se encontró diferencia estadística en las respuestas provocadas por estimulación de fibras A-Beta. Sin embargo, 10 minutos posteriores a la estimulación del núcleo PV, el número de respuestas provocadas por la estimulación de las fibras nociceptivas regresaron al nivel que presentaban al minuto 80 (Figura 9).

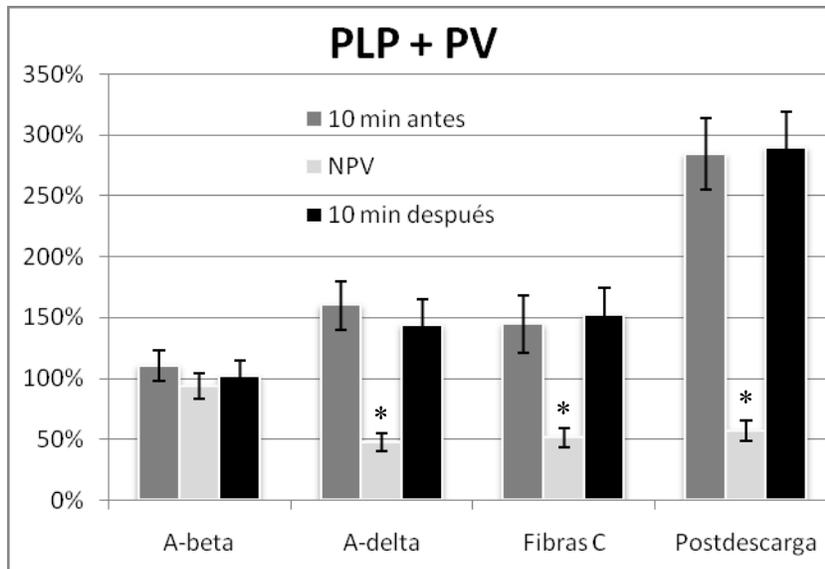


Figura 9: Respuestas neuronales 10 minutos antes, 1 minuto y 10 minutos después de la estimulación del núcleo PV, realizada 90 minutos después de la estimulación del NC. Media $\pm$ EE, \* $p < 0.05$ . ANOVA, Tukey *post-hoc*.

### C. APLICACIÓN DE OT POSTERIOR AL DESARROLLO DE UNA POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO (SUBGRUPO *PLP + OT*)

En el subgrupo (*PLP + OT*;  $n=9$ ) el efecto de la OT ( $50 \mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ) fue analizado al aplicarlo intratecalmente 90 minutos después de la estimulación al NC. De esta forma, se observó decremento en las respuestas de las fibras que transmiten información nociceptiva el cual se revirtió completamente 40 minutos después de la aplicación de OT (Figura 10).

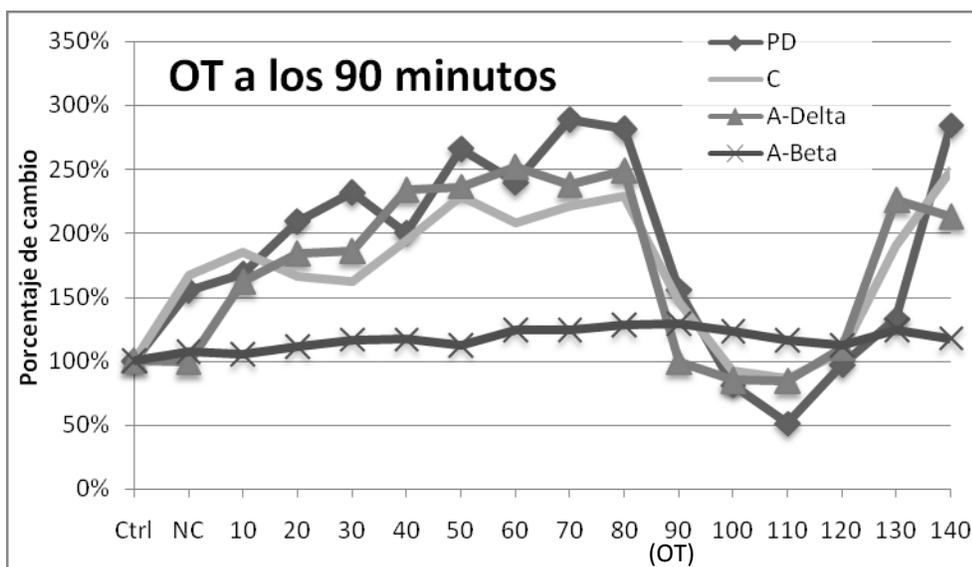


Figura 10: Curso temporal de la PLP por tipo de fibra. Al minuto 90 se aplicó OT intratecal. Se observa un decremento en todas las fibras por debajo de los valores encontrados antes de estimular el NC, exceptuando las fibras A-Beta.

Hasta el minuto 80 posterior a la electroestimulación del NC, no se registró un incremento en las respuestas provocadas por la estimulación de las fibras A-Beta, a diferencia de las respuestas secundarias a la activación de las fibras A-Delta, con un incremento de  $148.8 \pm 72.6\%$ , C ( $129.4 \pm 51\%$ ) y en la postdescarga ( $181.8 \pm 75.5\%$ ) en donde se encontró una franca diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).

Después de la aplicación de la OT se observó un decremento gradual en el porcentaje de las respuestas, llegando a su punto mínimo 20 minutos después de la aplicación de OT. Las respuestas provocadas por la estimulación de las fibras A-Beta no presentaron disminución, mientras que en las respuestas de las fibras A-Delta, C y en la postdescarga el decremento fue de  $164.8\%$ ,  $143.2\%$  y  $230.6\%$  respectivamente ( $p < 0.05$ ). 60 minutos después de la aplicación de la OT, se recuperaron los valores observados antes de la aplicación de OT (Figura 11).

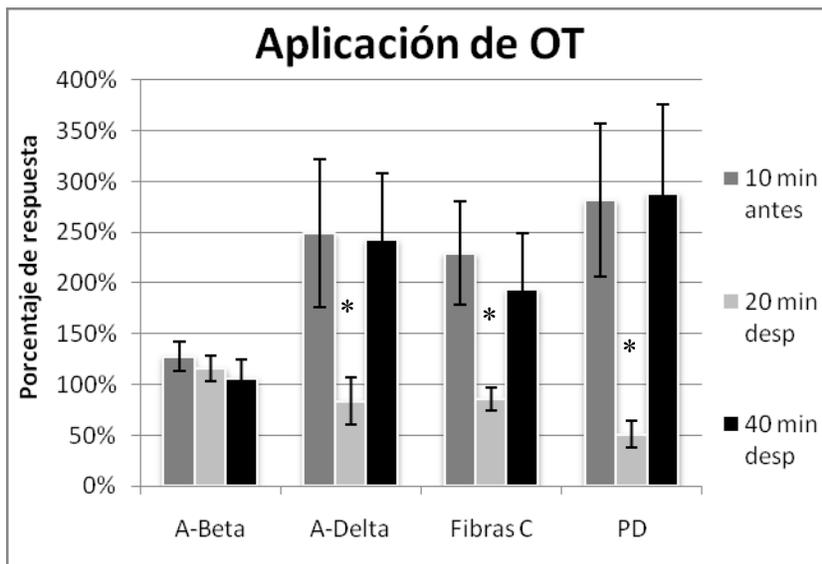


Figura 11: Comparación de las respuestas 10 minutos antes de aplicar la OT, así como 20 minutos y 40 minutos después. Se aprecia una diferencia significativa en las respuestas de las fibras A-Delta, C y en la postdescarga. Media $\pm$ EE, \* $p < 0.05$  al comparar 20 minutos después vs 10 minutos antes y 40 minutos después. ANOVA, Tukey *post-hoc*.

## D. PREVENCIÓN DE LA POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO

En esta parte se englobaron los resultados de los subgrupos *OT previo a NC* y *PV previo a NC*. En el primer subgrupo la aplicación de OT se realizó de forma intratecal 15 minutos antes de realizar la PLP. Así mismo en el segundo la electroestimulación del NC fue precedida por un estímulo eléctrico en el núcleo PV ipsilateral.

### D1. PREVENCIÓN POR APLICACIÓN INTRATECAL DE OT

Se analizaron los registros electrofisiológicos de 7 neuronas de amplio rango dinámico, realizando 3 series de estimulación control para obtener el nivel basal. Posteriormente, se aplicó intratecalmente 50  $\mu$ L de OT (10  $\mu$ M) 15 minutos antes de realizar la electroestimulación del NC. De esta manera, se estimuló el campo periférico a intervalos de 10 minutos de la misma forma que los grupos anteriores, para posteriormente realizar un análisis fuera de línea de las respuestas neuronales obtenidas.

Se observó que, en presencia de OT, posterior a la estimulación eléctrica de alta frecuencia del NC las respuestas totales provocadas por la estimulación del campo receptivo se mantuvieron iguales a los valores encontrados en el subgrupo control (Figura 12) encontrando una diferencia significativa al comparar el subgrupo PLP contra el subgrupo OT previo a NC a partir del minuto 20 posterior a la electroestimulación del NC.

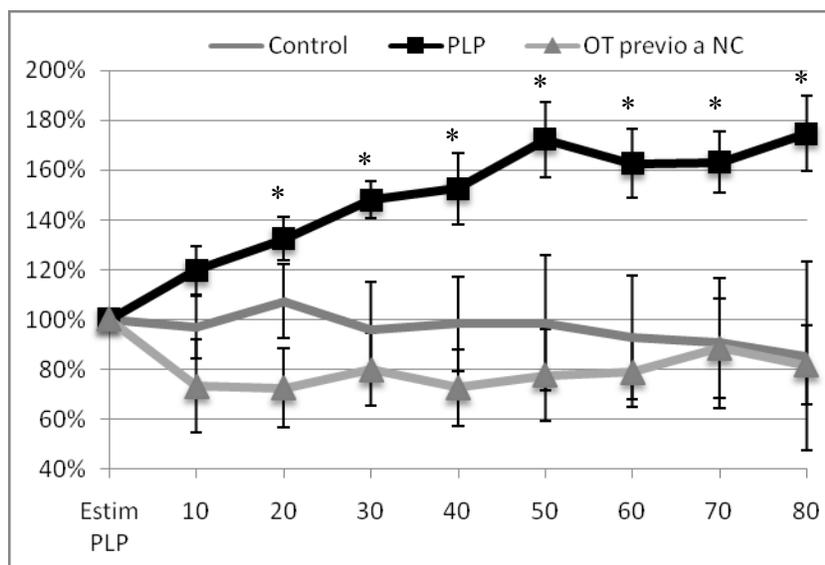


Figura 12: Porcentaje del total de las respuestas registradas en médula espinal al realizar una PLP, comparada contra el subgrupo control y al aplicar OT intratecal 15 minutos antes de realizar una electroestimulación del NC. Media $\pm$ EE. \* $p < 0.05$  en PLP vs. OT previo a NC. ANOVA, Tukey *post-hoc*.

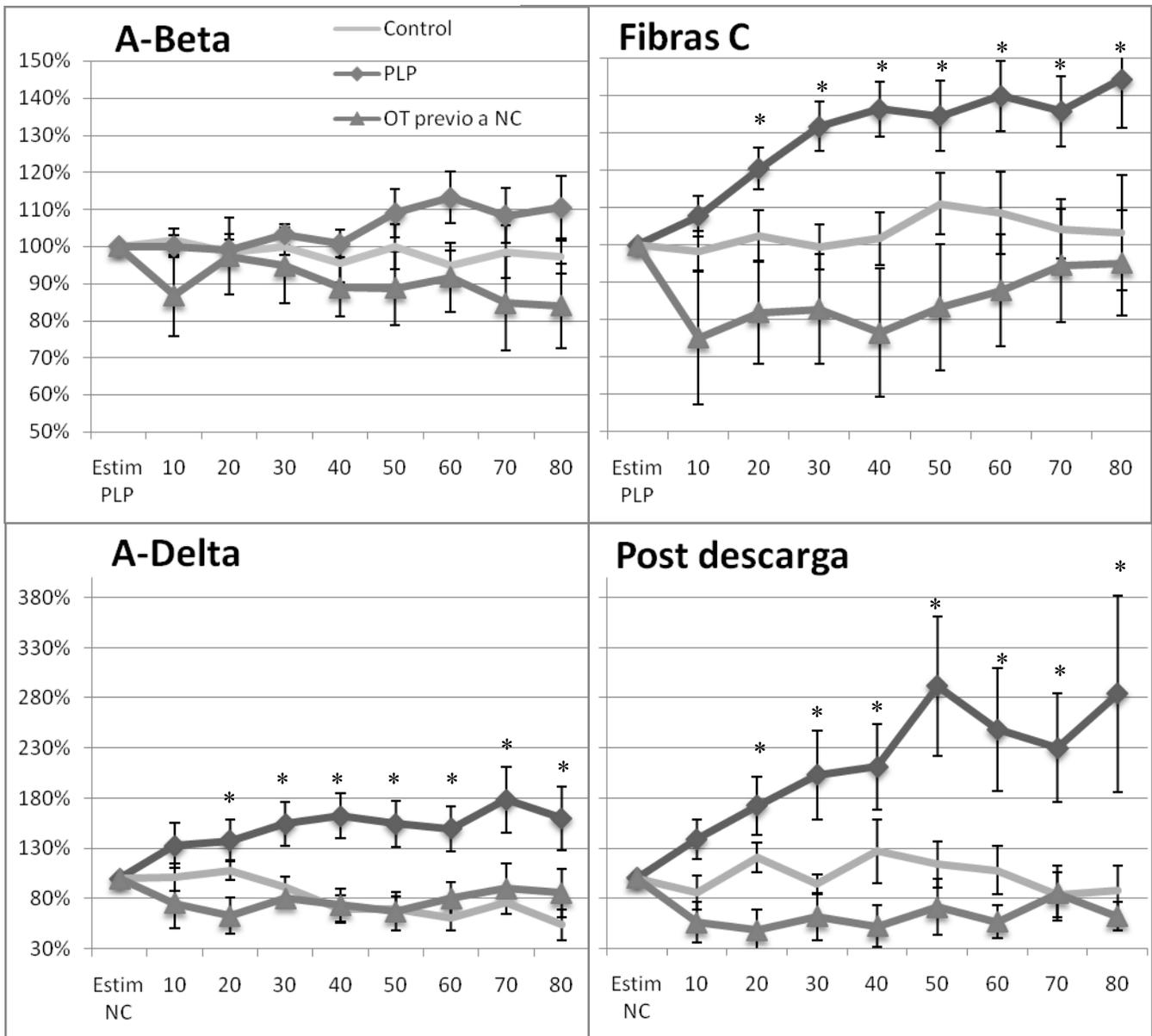


Figura 13: Comparación en porcentaje de las respuestas provocadas por la activación de las fibras A-Beta, A-Delta y C, además de la postdescarga, al aplicar OT intratecal antes de la estimulación eléctrica al NC. Nótese que no hay una diferencia entre los grupos en las fibras A-Beta, sin embargo, se encuentra diferencia significativa a partir del minuto 20 en las respuestas provocadas por la activación de las fibras A-Delta y C y a partir del minuto 10 en la postdescarga. Media±EE, \* $p < 0.05$  en subgrupo NC vs. NC + OT. ANOVA, Tukey *post-hoc*.

Al realizar una separación de los diferentes componentes de las respuestas a los estímulos del campo periférico, según su velocidad de conducción, (fibras A-Beta, A-Delta y C, así como

postdescarga) y comparar las respuestas de cada tipo de fibra con los datos obtenidos con los subgrupos *PLP + PV* y *control* (Figura 13), se encontró que las respuestas provocadas por la activación de las fibras A-Beta no se modificaron. Sin embargo, las respuestas correspondientes a la activación de las fibras A-Delta y C mostraron un decremento significativo ( $p < 0.05$ ) desde el minuto 20 de la estimulación del NC, al comparar con el subgrupo que desarrolló la PLP. En la postdescarga encontramos una disminución significativa desde el minuto 10 posterior a la estimulación eléctrica del NC. Al comparar el subgrupo *OT previo PLP* con el subgrupo *control* se encontró una diferencia en los minutos 10 y 20 para las respuestas provocadas por la estimulación de a las fibras A-Delta, y para el minuto 20 en el caso de la postdescarga.

Si se observa el porcentaje de respuestas obtenidas 90 minutos después de la estimulación del NC, podemos apreciar una diferencia de los subgrupos *OT previo NC* y *Control*, contra el subgrupo donde se desarrolló la PLP, excepto en las respuestas secundarias a la activación de las fibras A-Beta. No se observó diferencia alguna entre los subgrupos *control* y *OT previo NC* (Figura 14).

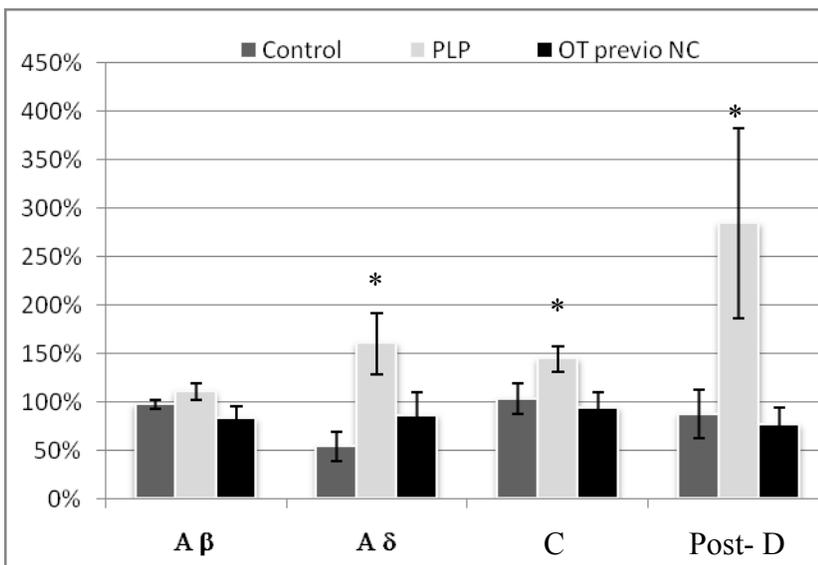


Figura 14: Gráfica en porcentaje de los cambios ocurridos en el número de potenciales de acción 90 minutos después de estimular el NC. Nótese que en el subgrupo donde se aplicó OT, previa a la estimulación del NC, las respuestas no se incrementaron. Se aprecia una diferencia significativa en el porcentaje de respuestas entre el subgrupo que desarrolló la PLP y en el que se aplicó OT. Media±EE, \* $p < 0.05$  en PLP vs OT previo NC. ANOVA, Tukey *post-hoc*.

## D2. PREVENCIÓN POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EN EL NÚCLEO PARAVENTRICULAR

En el subgrupo *PV previo NC* (n=7) se analizaron los registros electrofisiológicos, tomando las 3 primeras secuencias de estímulos como control y comparándolos contra las respuestas obtenidas después de estimular eléctricamente el NC condicionado por la estimulación eléctrica en el núcleo PV (ver métodos). De esta forma se realizaron series de estimulación del campo periférico a intervalos de 10 minutos durante 130 minutos, y se contabilizó el número de respuestas neuronales obtenidas en cada serie.

Se observó que las respuestas totales provocadas por la estimulación del campo receptivo no se incrementaron respecto a los grupos control, pero sí se encuentra una diferencia significativa al comparar el subgrupo PLP contra el subgrupo PV previo a NC desde el minuto 20 posterior a la estimulación del NC (Figura 15).

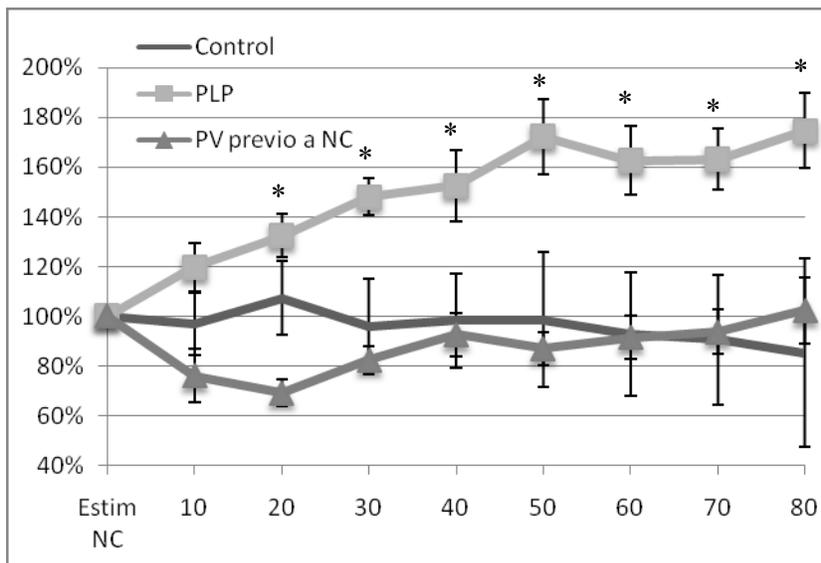


Figura 15 Porcentaje de cambio respecto al control (100%), del total de las respuestas registradas en médula espinal al realizar una PLP, comparada contra el subgrupo control y al realizar una estimulación eléctrica del PV justo antes de la electroestimulación del NC. Media±EE. \*p<0.05 en PLP vs. PV previo a NC . ANOVA, Tukey *post-hoc*

También se realizó una separación de los diferentes tipos de respuestas según su velocidad de conducción y se compararon las respuestas de cada tipo de fibra contra el subgrupo que desarrolló la PLP y el subgrupo control. En las respuestas provocadas por la activación de las fibras A-Beta no se encontró una diferencia. Sin embargo, en las respuestas secundarias a la estimulación de las

fibras A-Delta y C así como en la postdescarga, se obtuvo una diferencia ( $p < 0.05$ ) a partir del minuto 10, al comparar el subgrupo *PV previo PLP* con el subgrupo que desarrolló la PLP (Figura 16).

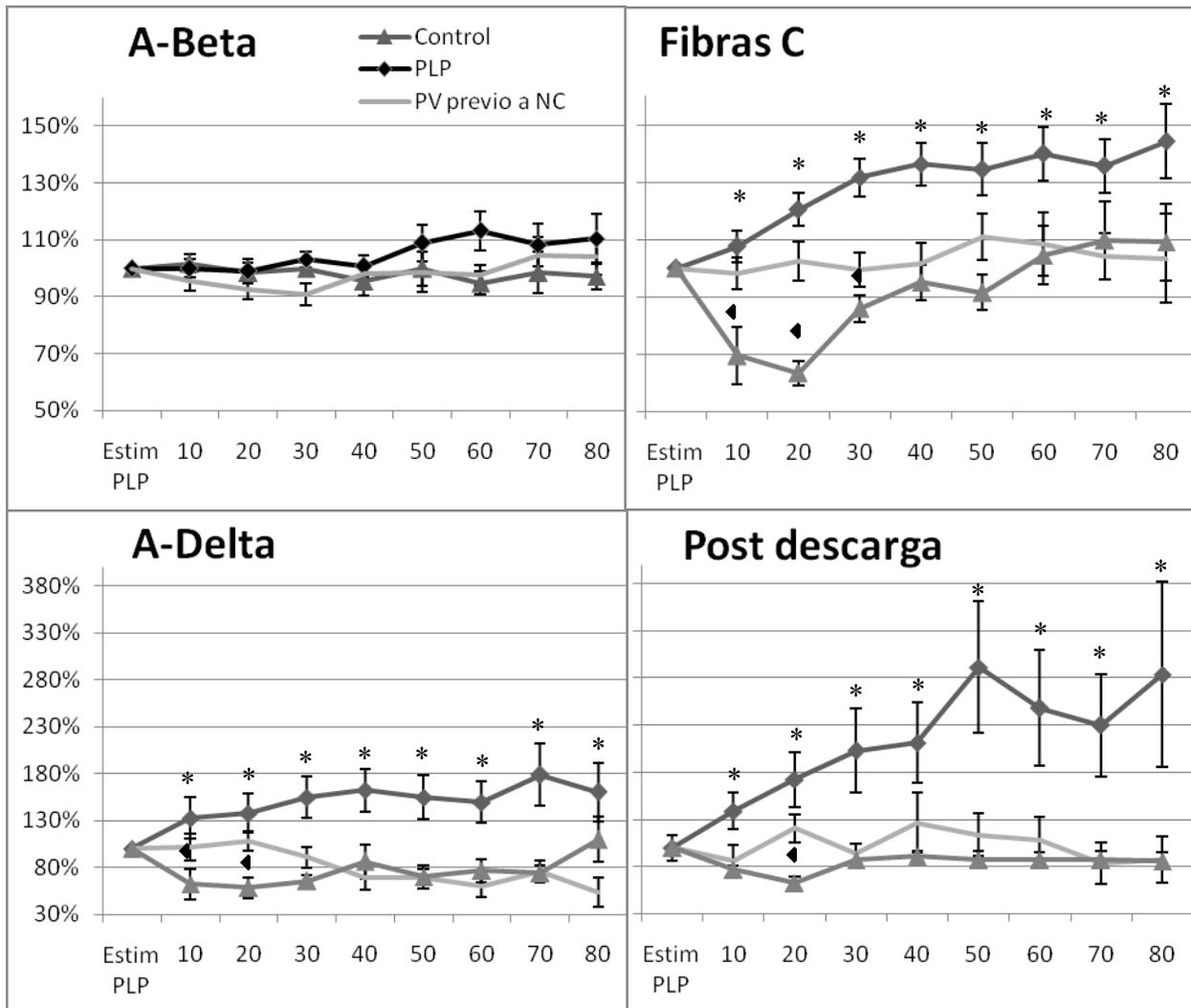


Figura 16: Comparación en porcentaje de las respuestas provocadas por la activación de las fibras A-Beta, A-Delta, C y postdescarga, al estimular eléctricamente el núcleo PV antes de electroestimar el NC. Nótese que no hay una diferencia entre los grupos control y experimentales en el caso de las fibras A-Beta, a diferencia de lo encontrado en las respuestas provocadas por la estimulación de las fibras A-Delta y C, además de la postdescarga. Media $\pm$ EE, \* $p < 0.05$  en Control vs. PLP. ◆ $p < 0.05$  en Control vs. PV previo a NC. ANOVA, Tukey *post-hoc*.

Asimismo se encontró una diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) al comparar el subgrupo *PV previo NC* contra el subgrupo *control*. En el caso de las respuestas secundarias a la activación de las fibras A-Delta esta diferencia fue significativa los minutos 10 y 20 posterior a la estimulación del NC, en las respuestas de las fibras C, se mantuvo la diferencia del minuto 10 al 30, y en la postdescarga solo se vio en el minuto 20.

Al observar el número de respuestas obtenidas 90 minutos después de la estimulación del NC, podemos apreciar una diferencia estadística entre los subgrupos *PV previo NC* y *Control*, contra el subgrupo que desarrolló la PLP, exceptuando las fibras A-Beta. No se observa diferencia entre los subgrupos *PV previo NC* y *Control* (Figura 17).

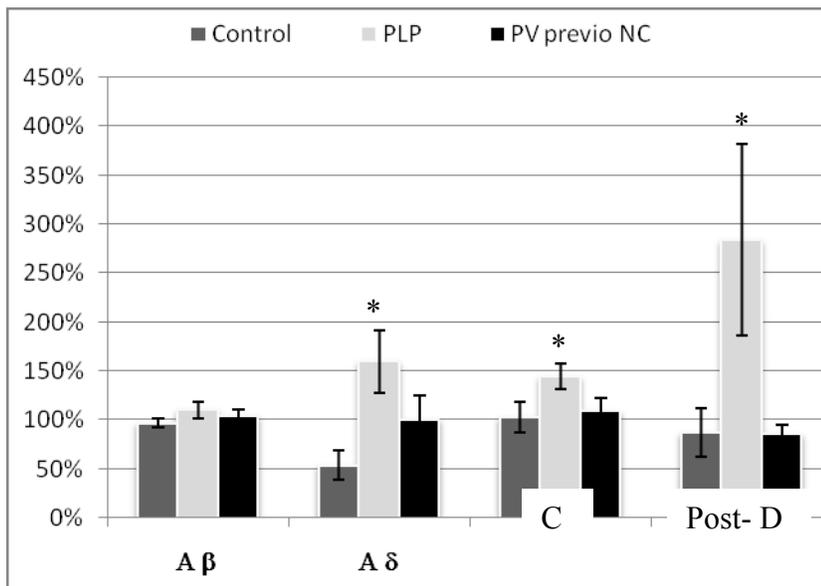


Figura 17: Gráfica de porcentaje de cambio 90 minutos después de estimular el NC con respecto a los niveles encontrados antes de estimular el NC. Nótese que en el subgrupo *PV previo NC* las respuestas no se incrementaron. Media±EE, \* $p < 0.05$ . PLP vs *PV previo NC* y *Control*. ANOVA, Tukey *post-hoc*.

## II. GRUPO CONDUCTUAL

Los análisis se realizaron con distintos paradigmas, separando los subgrupos experimentales:

Subgrupo	n	Descripción
PLP-mec	16	Medición del umbral de respuesta provocado por estímulos mecánicos utilizando filamentos de Von Frey, posterior al estímulo eléctrico del NC.
Exp-mec	8	Medición del umbral de respuesta provocado por estímulos mecánicos posterior al estímulo eléctrico del NC, y se analizaron los efectos de la aplicación de OT o estimulación del núcleo PV con y sin AOT.
Sham-mec	8	Medición de umbrales de respuesta provocados por estímulos mecánicos, sin la estimulación del NC.
PLP-term	16	Medición del umbral de respuesta provocado por estímulos térmicos con acetona, posteriores al estímulo eléctrico del NC.
Exp-term	8	Medición del umbral de respuesta provocado por estímulos térmicos, posterior al estímulo eléctrico del NC, analizando los efectos de la aplicación de OT, o la estimulación del núcleo PV con y sin AOT.
Sham-term	8	Medición de umbrales de respuesta secundarios a la estimulación térmica, sin estimulación del NC.
OT-mec	16	Medición del umbral a estímulos mecánicos, con aplicación intratecal de OT previa a la estimulación del NC.
Vehículo-mec	8	Medición del umbral a estímulos mecánicos, con aplicación de solución fisiológica previa a la estimulación del NC.
OT-term	16	Medición del umbral a estímulos térmicos, con aplicación intratecal de OT previa a la estimulación del NC.
Vehículo-term	8	Medición del umbral a estímulos térmicos, con aplicación de solución fisiológica previa a la estimulación del NC.
Control	8	Medición del umbral a estímulos térmicos y mecánicos sin aplicación de sustancias o estimulación eléctrica.

En este modelo de potenciación a largo plazo en ratas con libre movimiento, el desarrollo y la evolución de la neuropatía secundaria a la estimulación del NC incluyen un incremento en la sensibilidad a la estimulación nociceptiva, además de alodinia, dolor espontáneo, decremento de la temperatura en la piel y atrofia muscular. Se evaluó la intensidad necesaria para producir una retirada de las patas posteriores (umbral de respuesta) bajo estimulaciones mecánicas por medio de filamentos de Von Frey y térmicas por el frío causado debido a la evaporación de acetona. Las mediciones se realizaron siempre a la misma hora y bajo las mismas condiciones. En cada sesión se aplicaron ambos tipos de estimulación con un intervalo aproximado de 30 minutos entre cada tipo de estímulo.

La PLP se provocó por la estimulación eléctrica del NC, utilizando los mismos parámetros que para el grupo electrofisiológico. Los animales permanecieron implantados crónicamente con electrodos para la estimulación del núcleo PV, así como con cánulas intratecales para la aplicación de fármacos directamente al líquido cefalorraquídeo (LCR). De esta manera, se compararon las respuestas de los subgrupos *PLP-mec* y *PLP-term* contra los subgrupos de falsas operadas (*Sham-mec* y *Sham-term*), y con las de los subgrupos experimentales (*Exp-mec* y *Exp-term*), a los cuales se le aplicó OT intratecal, estimulación eléctrica del PV, o estimulación eléctrica del PV en presencia de AOT.

#### A. EFECTO DE LA VÍA OXITOCINÉRGICA EN PRESENCIA DE ESTÍMULOS MECÁNICOS

Los estímulos mecánicos se aplicaron con filamentos de Von Frey, con 1, 6 y 10 g. El umbral de retirada fue muy semejante en los subgrupos evaluados con  $6.3 \pm 1$  g en el subgrupo *Sham-mec*,  $6.6 \pm 1.9$  g en el subgrupo *PLP-mec* y  $6.0 \pm 0.8$  g en el subgrupo *Exp-mec*. Posterior a la estimulación del NC, el umbral de retirada descendió tanto en el subgrupo *Exp-mec* ( $1.6 \pm 0.62$  g) como en el subgrupo *PLP-mec* ( $1.6 \pm 0.34$  g), en contraste el subgrupo *Sham-mec*, donde solo se simuló la electroestimulación del NC, el umbral de retirada se mantuvo sin cambios.

El umbral de retirada en el subgrupo *Exp-mec* se modificó, debido a la estimulación del núcleo PV o a la administración de OT, encontrando un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en el umbral de retirada en  $8.0 \pm 2.63$  y  $8.8 \pm 2.18$  g respectivamente. Sin embargo, en el subgrupo *Sham-mec* no se encontró diferencia, teniendo valores de  $6 \pm 0.94$  y  $5.7 \pm 1.1$  g fuerza respectivamente (Figura 18).

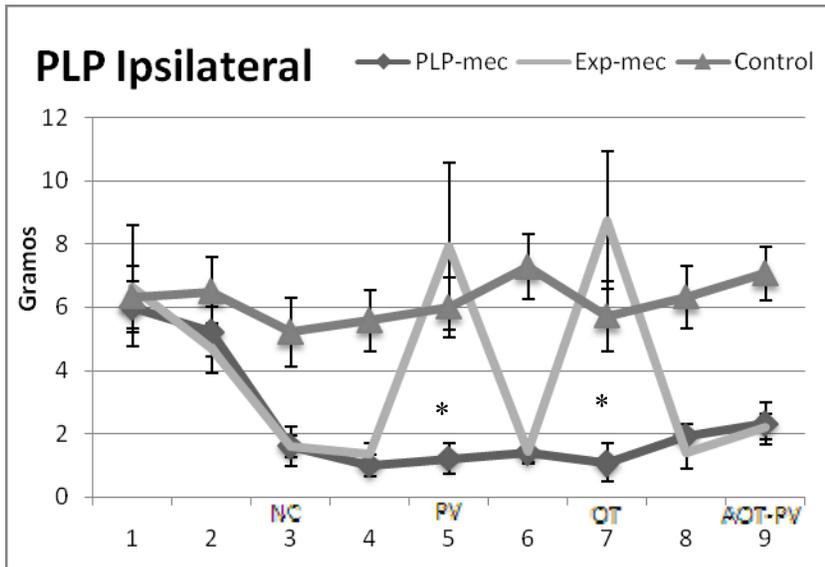


Figura 18: Comparación de los umbrales de retirada entre el subgrupo PLP-Mec y el subgrupo *Exp-Mec*, al estimular con filamentos de Von Frey la pata ipsilateral a la estimulación del NC. Media $\pm$ EE. \* $p < 0.05$  en subgrupo *Exp-mec* vs. Control, ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis, *post-hoc* Dunn's.

Al evaluar las respuestas de que la disminución del bilateral, pero con menor aplicación de OT intratecal o la estimulación eléctrica del núcleo PV provocó un incremento significativo en el umbral de retirada ( $p < 0.05$ , Figura 19).

retirada de las patas contralaterales se encontró umbral provocado por la estimulación del NC fue efecto en la pata contralateral; no obstante, la

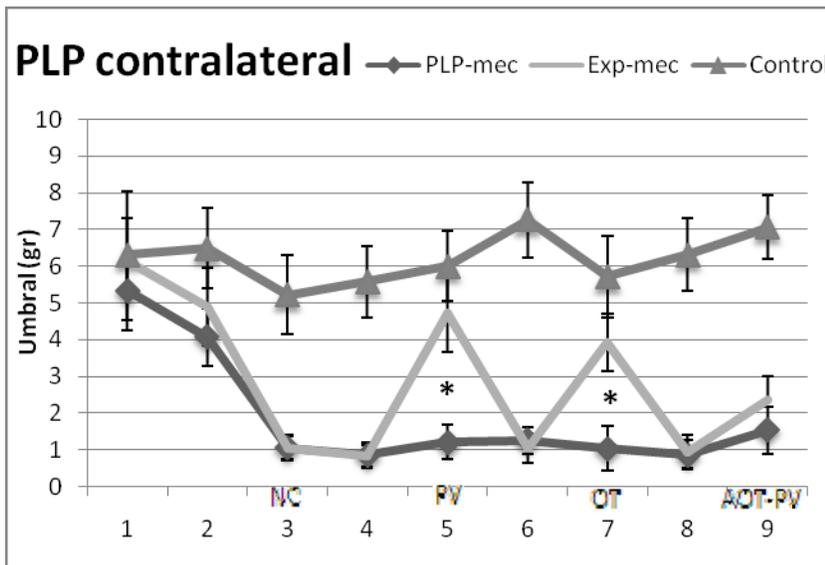


Figura 19: Comparación de los umbrales al estimular con filamentos de Von Frey la pata contralateral a la estimulación del NC. Nótese que tanto la estimulación del PV como la OT intratecal provocan un incremento en el umbral de retirada y este efecto se bloquea al aplicar AOT en el subgrupo experimental. Media $\pm$ EE. \* $p < 0.05$ , ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis, *post-hoc* Dunn's.

Los datos obtenidos mostraron un incremento en el porcentaje de sensibilidad (1/umbral en g) de  $378.1 \pm 101\%$ . Se aprecia una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparando el subgrupo *PLP-mec* contra el subgrupo *Exp-mec* al momento de realizar una estimulación eléctrica del núcleo PV, o al aplicar OT, pero no al aplicar el AOT conjuntamente con el estímulo eléctrico en el PV (Figura 20).

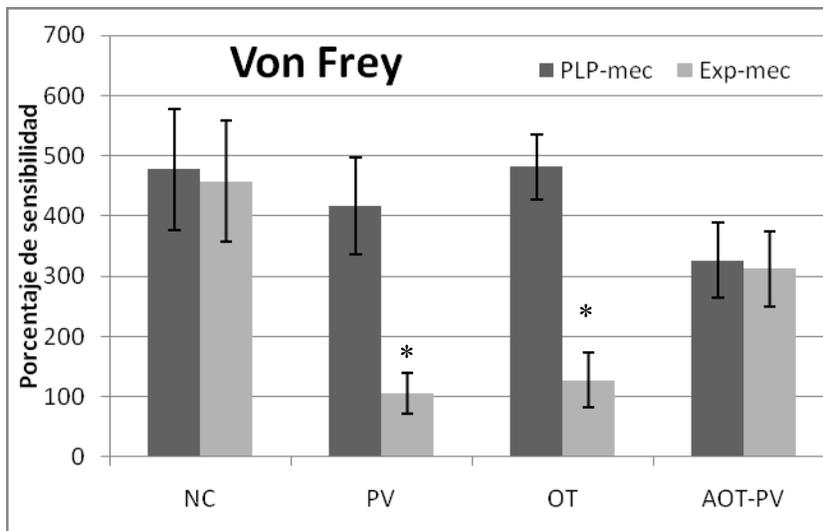


Figura 20: Comparación del porcentaje de sensibilidad entre el \* $p < 0.05$  entre grupos PLP-mec y Exp-mec, Test de Mann-Whitney.

#### A. EFECTO DE LA VÍA OXITOCINÉRGICA EN PRESENCIA DE ESTÍMULOS TÉRMICOS.

Se analizaron las respuestas de retirada por la rápida evaporación de acetona al contacto con el dorso de las patas posteriores. Después de realizar la PLP, se observó incremento en el porcentaje de respuestas positivas en las patas ipsilaterales, en el subgrupo *PLP-term* y *Exp-term*. Sin embargo, la estimulación del núcleo PV o la administración de OT provocaron un decremento en el porcentaje de respuestas positivas en éste ultimo subgrupo, encontrándose una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Al aplicar el AOT bloqueamos el efecto encontrado al estimular únicamente el núcleo PV (Figura 21).

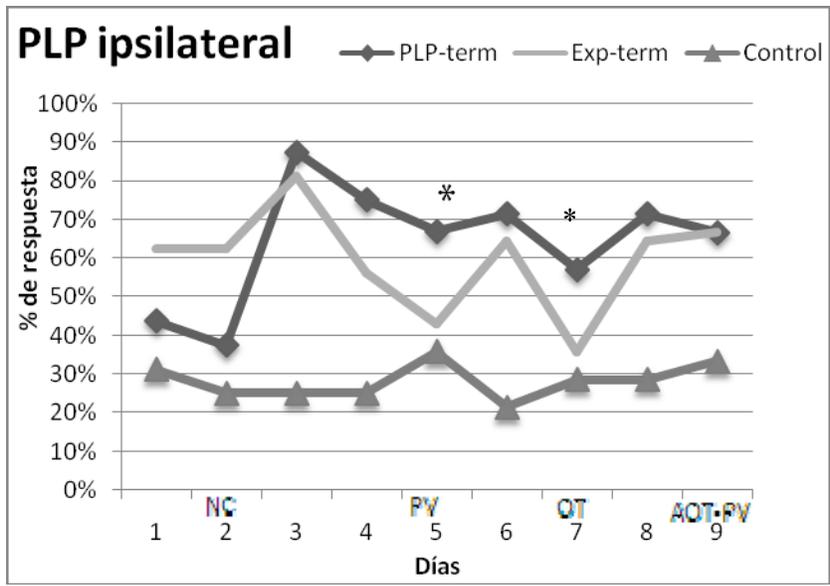


Figura 21: Comparación del porcentaje de respuesta entre el subgrupo *PLP-term* y el subgrupo *Exp-term*, al estimular con acetona la pata ipsilateral a la estimulación del NC. Nótese que tanto la estimulación del PV como la OT intratecal provocan un decremento en la magnitud de las respuestas de retirada y este efecto se bloquea al aplicar AOT. Media±EE. \* $p < 0.05$ , ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis, *post-hoc* Dunn's.

En las respuestas provocadas en las patas contralaterales, encontramos que el incremento en las respuestas fue menor en el lado contralateral en los grupos control y experimental. Sin embargo, la estimulación del núcleo PV o la administración de OT provocaron un decremento en las respuestas, encontrándose una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) al aplicar OT intratecal, pero no al estimular el núcleo PV. La aplicación intratecal de AOT previa a la estimulación del núcleo PV previno el efecto observado al estimular el núcleo PV únicamente (Figura 22).

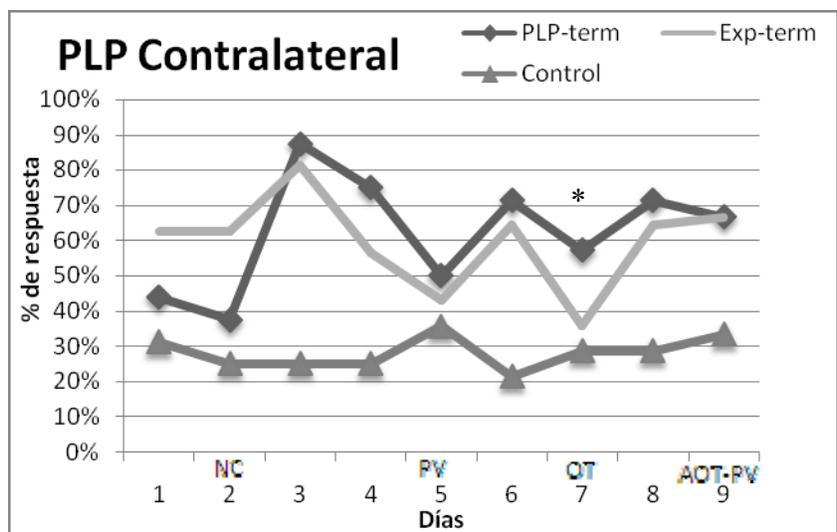


Figura 22: Comparación de la magnitud de respuesta entre el subgrupo *PLP-term* y el subgrupo *Exp-term*, al estimular con acetona la pata contralateral a la estimulación del NC. Media±EE. \* $p < 0.05$  en el subgrupo PLP term vs. Exp-term, ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis, *post-hoc* Dunn's.

### C. PREVENCIÓN DE LA POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO POR MEDIO DE LA APLICACIÓN INTRATECAL DE OT

Al igual que en el grupo electrofisiológico, se evaluó el efecto de la aplicación intratecal de OT previo a la estimulación del NC. Por medio de cánulas intratecales se aplicó 50  $\mu$ L de OT (10  $\mu$ M) 15 minutos antes de realizar la electroestimulación del NC. Todas las mediciones se realizaron siempre a la misma hora y bajo condiciones similares. Ambos tipos de estimulación se aplicaron con un intervalo aproximado de 30 minutos entre cada uno, y se compararon las respuestas de los subgrupos *OT-mec* y *OT-term* contra los subgrupos *vehículo* respectivos, que recibieron 50  $\mu$ L de solución fisiológica intratecal 15 minutos previos a la electroestimulación del NC.

#### C1. EFECTO DE LA OT PREVIA A LA ESTIMULACIÓN DEL NERVIO CIÁTICO SOBRE LA ESTIMULACIÓN MECÁNICA.

El umbral de retirada, obtenido en el lado ipsilateral, fue de  $6.89 \pm 0.59$  y  $8.29 \pm 0.81$  g en los subgrupos *OT-mec* y *Vehículo-mec* respectivamente. En el subgrupo *Vehículo-mec* se aprecia una disminución significativa en el umbral de retirada al comparar contra el subgrupo *OT-mec*, llegando a su punto mas bajo el quinto día después de la electroestimulación del NC con  $3.71 \pm 1.38$  g, y regresando a valores semejantes a los controles al noveno día después de la instauración de la PLP. En el subgrupo *OT-mec* no se encontró una diferencia en el umbral de respuesta, con  $8.67 \pm 0.67$  5 días después de la electroestimulación del NC (Figura 23).

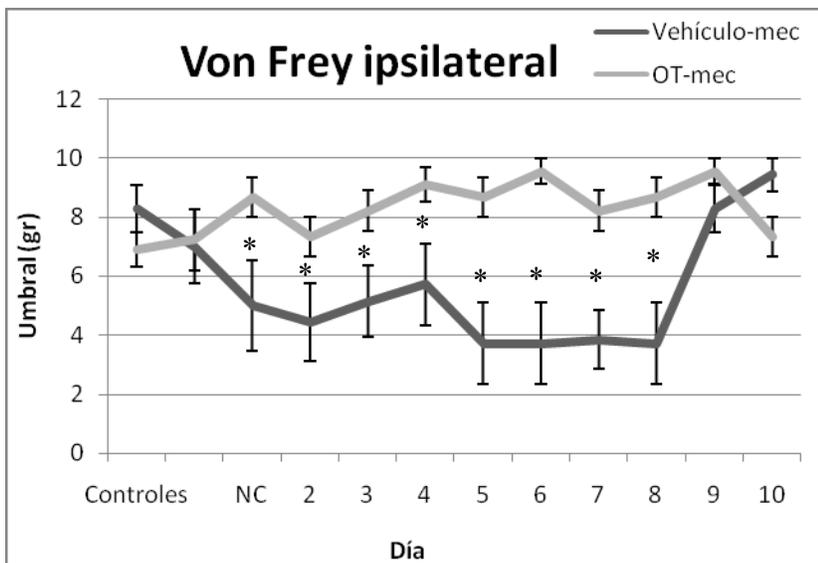


Figura 23: Curso temporal que muestra el umbral en g necesarios para lograr una reacción de evitación del lado ipsilateral a la estimulación eléctrica del NC. \* $p < 0.05$  en subgrupo *OT-mec* vs *Vehículo-mec*. Media $\pm$ EE, Test de Mann-Whitney.

Las respuestas del lado contralateral mostraron un umbral previo a la estimulación eléctrica del NC de  $7.22 \pm 1.02$  y  $8.86 \pm 0.74$  g en los subgrupos de *OT-mec* y *Vehículo-mec*. A partir del día de la electroestimulación del NC se apreció un decremento significativo ( $p < 0.05$ ) en el subgrupo que recibió el vehículo, llegando su umbral hasta  $3.14 \pm 1.01$  g el sexto día posterior a la estimulación del NC. Por su parte, el subgrupo *OT-mec* mantuvo un umbral cercano a los 8 g durante los 10 días de seguimiento del experimento sin diferencia significativa. Al décimo día posterior a la estimulación del NC se encontró un retorno a los niveles originales en el subgrupo *Vehículo Von Frey*, con  $9.56 \pm 0.44$  g de umbral (Figura 24).

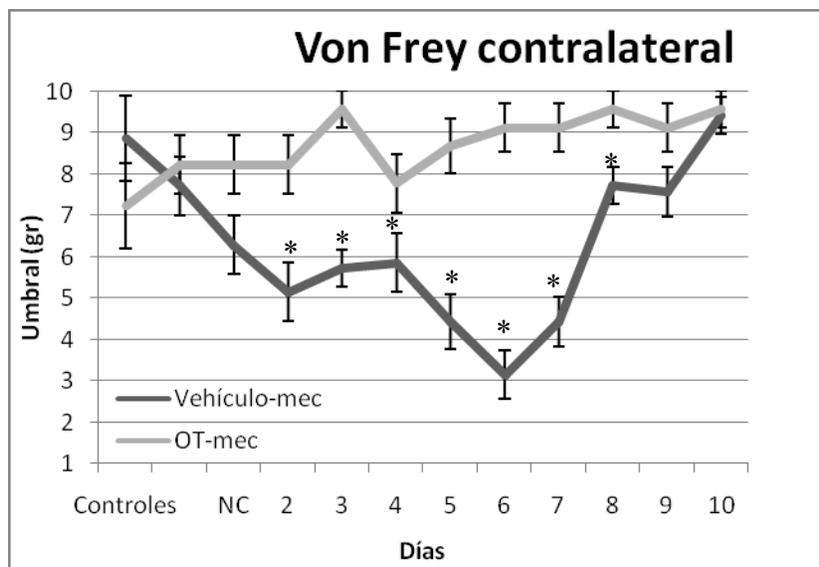


Figura 24: Curso temporal que muestra el umbral de retirada provocado por la estimulación mecánica del lado contralateral a la estimulación eléctrica del NC. \* $p < 0.05$  entre subgrupos Vehículo-mec y OT-mec. Media $\pm$ EE, Test de Mann-Whitney.

## B. EFECTO DE LA OT PREVIA A LA ESTIMULACIÓN DEL NERVIPO CIÁTICO SOBRE LA ESTIMULACIÓN TÉRMICA.

Las respuestas de retirada secundarias a la estimulación térmica en las patas ipsilaterales se incrementaron por la evaporación de acetona, al contacto con el dorso de las patas posteriores en el subgrupo que recibió solución salina intratecal. Sin embargo, en el subgrupo *OT-term*, se encontró un porcentaje menor de respuestas positivas, con una diferencia significativa de los días 1 a 8 posteriores a la electroestimulación del NC ( $p < 0.05$ , Figura 25).

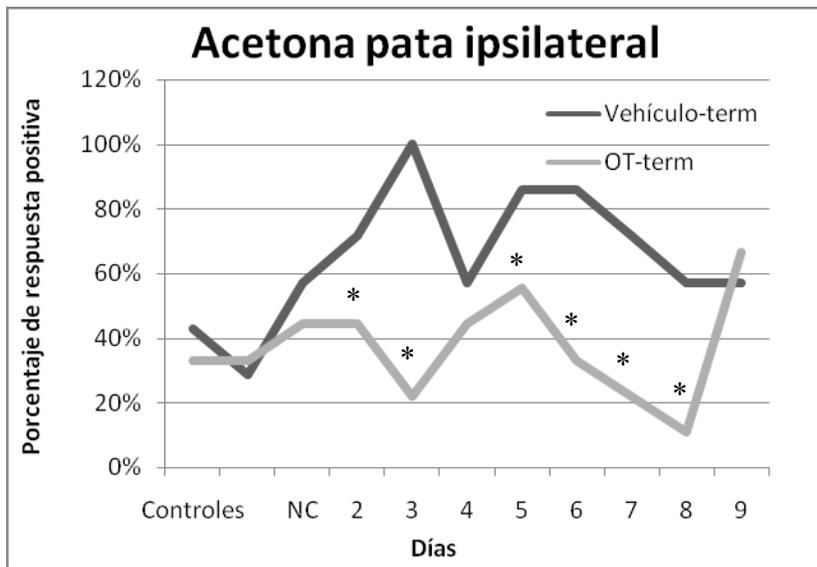


Figura 25: Curso temporal que muestra el porcentaje de respuesta de evitación positiva provocada por la evaporación de acetona del lado ipsilateral a la estimulación eléctrica del NC. \* $p < 0.05$  entre subgrupos Vehículo-term y OT-term. Media $\pm$ EE, Test de Mann-Whitney.

No se encontraron diferencias significativas en las respuestas de retirada en las patas contralaterales (resultados no mostrados).

### III. HISTOLOGÍA

Al finalizar cada experimento se marcaron los sitios de estimulación y registro, posteriormente se realizó la reconstrucción histológica de la localización de las lesiones electrofólicas en 33 de los 38 encéfalos (86.84%) en los que se llevó a cabo la implantación de los electrodos de estimulación. Las lesiones se encontraron en el eje AP entre 6.88 y 7.40 mm anterior al punto de referencia interaural. Se tomó el punto medio de las lesiones como lugar en donde se encontraba el electrodo de estimulación.

Las regiones que al estimular eléctricamente mostraron un efecto depresor sobre las respuestas provocadas por la estimulación de las fibras nociceptivas, se encontraron circunscritas a la región parvocelular medial del núcleo PV hipotalámico (Figura 26). En contraste, no se encontraron efectos al estimular la parte anterior del núcleo PV, ni en sitios marcados fuera de este núcleo. (Figura 27).

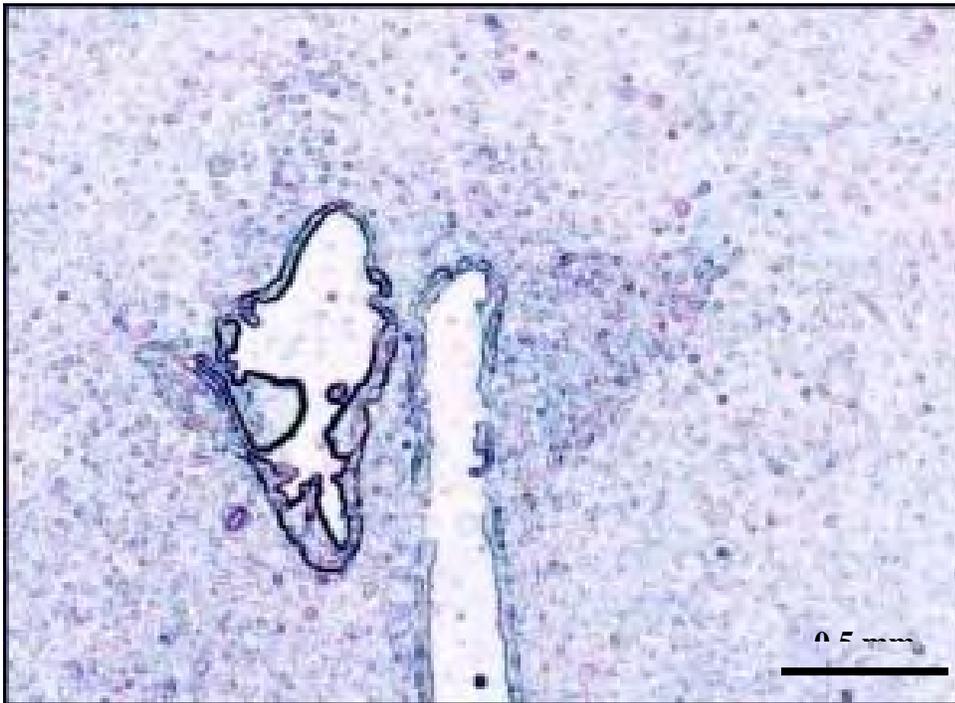


Figura 26:  
Fotomicrografía de un corte coronal teñido con violeta de cresilo, en donde se aprecia una lesión electrofólica en el núcleo PV izquierdo.

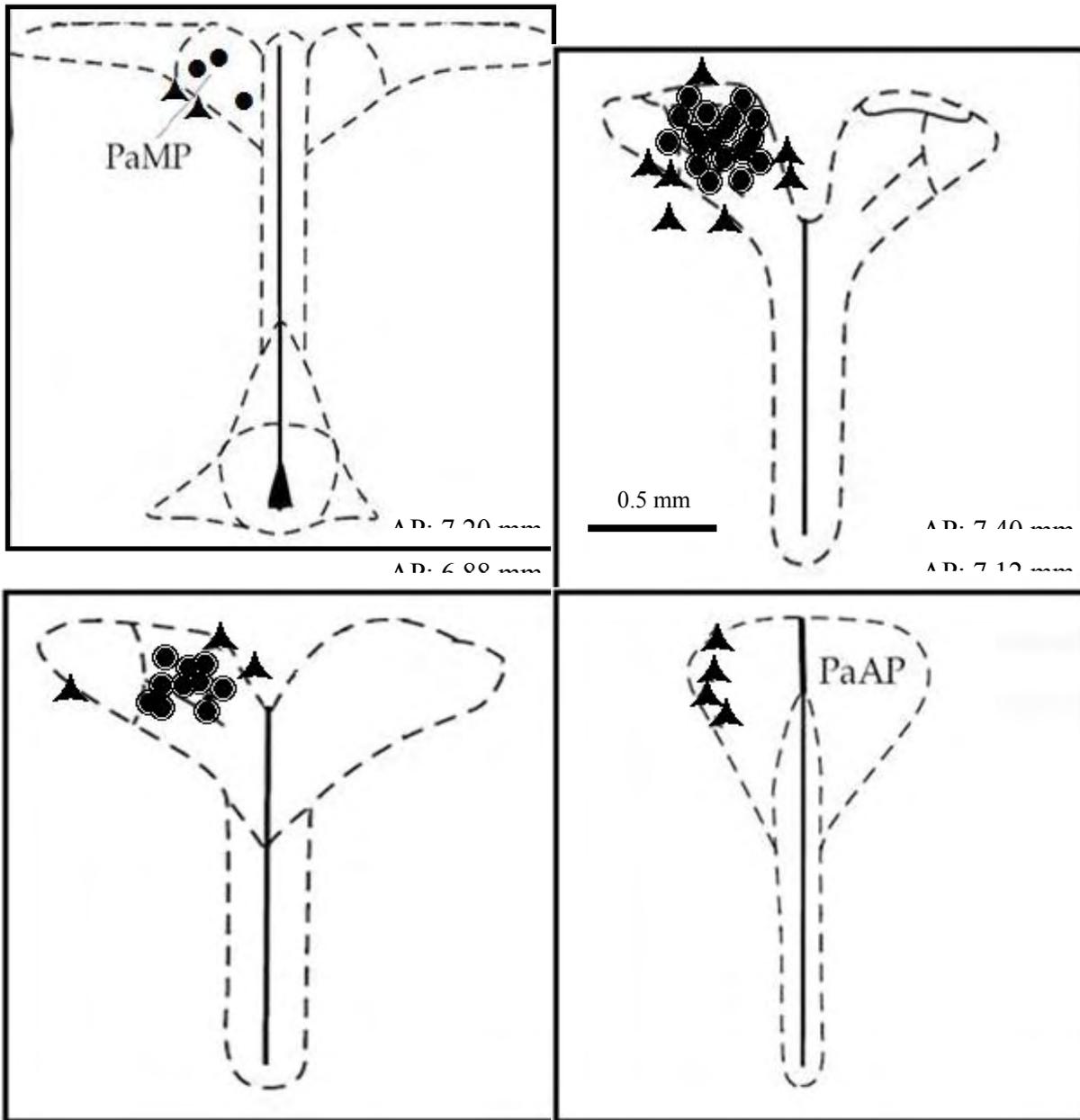


Figura 27: Sitio de estimulación con electrodos bipolares (el tamaño de las figuras corresponde al tamaño de la punta del electrodo).

Círculos: lugares en los que se obtuvo un decremento en el número de potenciales de acción registrados en la astas dorsales.

Triángulos: lugares donde no se obtuvo respuesta al estimular eléctricamente.

Nótese como los primeros se circunscriben a la región parvocelular del núcleo PV hipotalámico.

PaMP: región medial parvicelular del núcleo PV, PaAP región anterior parvicelular del núcleo PV.

Se realizaron las reconstrucciones histológicas en 21 de los 45 registros electrofisiológicos en las astas posteriores de la médula espinal (46%), en los que por medio de iontoforesis se aplicó azul de pontamina por medio de los electrodos de registro. Los sitios marcados se encontraron distribuidos en el asta dorsal ipsilateral a la zona periférica en donde se aplicaron los estímulos (Figura 28).

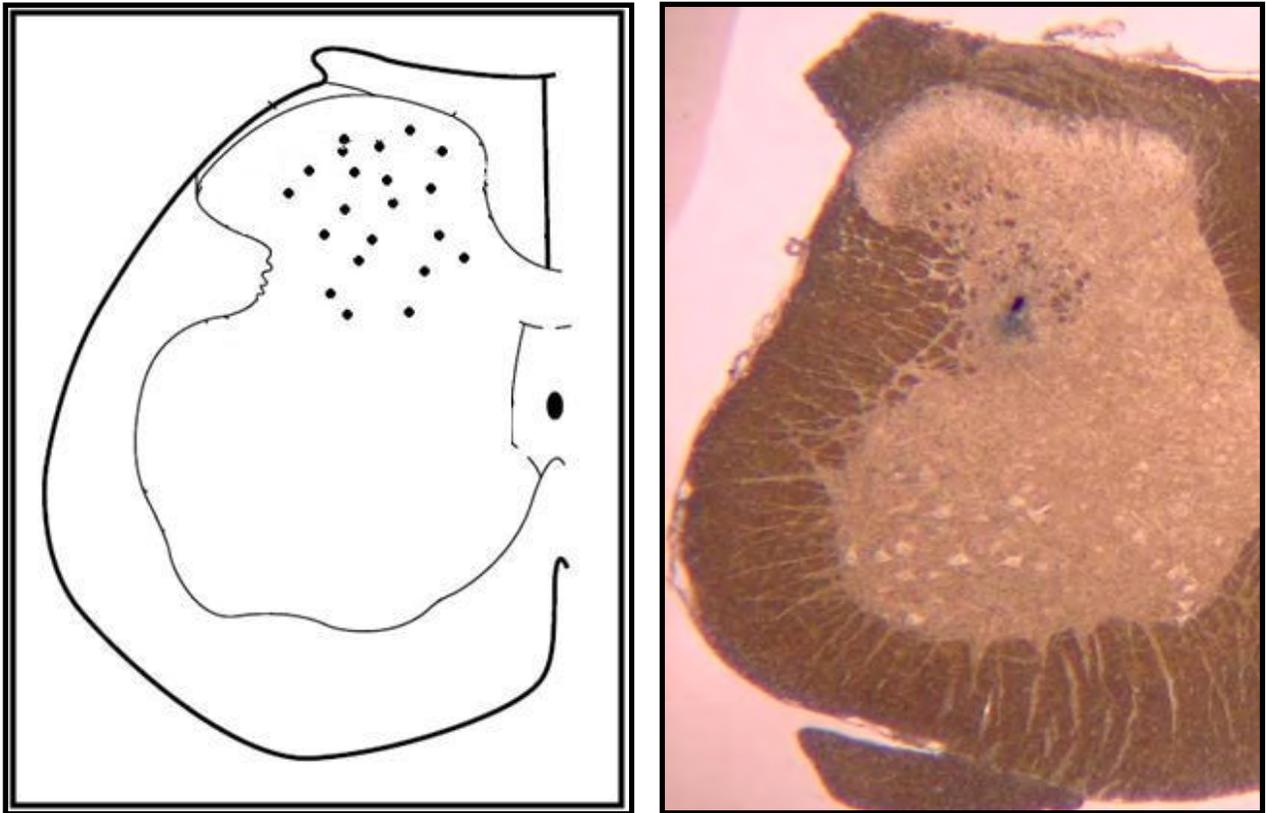


Figura 28: Izquierda: Ubicación de los sitios de registro con microelectrodos de vidrio en las astas dorsales de la médula espinal. Se aprecia que las neuronas de amplio rango dinámico registradas se encuentran distribuidas en la región dorsal de la médula espinal.

Derecha: Fotomicrografía de un corte a nivel de L4 – L5, en donde se aprecia el marcaje con azul de pontamina.

## CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En esta sección serán discutidos los resultados más relevantes de este estudio, las cuales se dividieron en experimentos electrofisiológicos y conductuales.

### I. EXPERIMENTO ELECTROFISIOLÓGICO

#### A. SEPARACIÓN DE RESPUESTAS NOCICEPTIVAS DE LAS NO NOCICEPTIVAS

Erlanger y Gasser (1930) al separar por sus velocidades de conducción las respuestas nerviosas, demostraron que las respuestas provocadas por la activación de los diferentes tipos de fibras se pueden agrupar en grupos distinguibles entre sí. En el presente estudio, se realizó esta clasificación de las respuestas neuronales con base en las latencias correspondientes a la velocidad de conducción. De esta manera, es posible distinguir entre las respuestas provocadas por la activación de aferentes nociceptivas (lentas) y no nociceptivas (rápidas). Así, fue posible demostrar que debido a la PLP se incrementa el número de las respuestas nociceptivas únicamente, y que la estimulación eléctrica del núcleo PV o la aplicación intratecal de OT decrementa el número de potenciales de acción transmitidos por las fibras A-Delta y C.

#### B. POTENCIACION A LARGO PLAZO

Antes de la descripción de la PLP, realizada en 1973 por Bliss y Lømo, existen referencias de mecanismos por los cuales se puede lograr la facilitación en la transmisión sináptica. Según datos de Hebb (1949) un grupo interconectado de neuronas que son excitadas por un estímulo que ocurre repetidas veces, tendrá una interconexión sináptica más eficiente *a posteriori* que la que tenía originalmente. En otras palabras, las sinapsis entre las neuronas se harían más “conductivas” a los impulsos generados por potenciales de acción, y los estímulos que antes necesitaban una sumación espacial o temporal podrían excitar por sí solos una neurona.

La PLP refleja un incremento en la excitabilidad neuronal, la cual es provocada por impulsos aferentes a frecuencias altas. Este fenómeno ha sido extensamente estudiado como un modelo de

aprendizaje y memoria. Desde las descripciones de Bliss y Lømo en el hipocampo, en 1973, la PLP se convirtió en una nueva estrategia experimental para explicar fenómenos de facilitación sináptica de larga duración. En la médula espinal, la PLP sucede como respuesta a la estimulación intensa de aferentes primarias, las cuales hacen relevo con neuronas del asta dorsal de la médula espinal. La PLP provoca un incremento en las respuestas provocadas por estímulos nociceptivos en neuronas de amplio rango dinámico, es por eso que en la médula espinal, la PLP se utiliza desde hace varios años como modelo de dolor neuropático pues está asociada al dolor de larga duración provocado por lesiones de este tipo (Rygh et al., 2000).

La PLP en las astas dorsales de la médula espinal alcanza su fase máxima después de los 60 minutos de iniciada y se mantiene así durante varias horas o incluso días (Liu y Sandkühler, 1997; Ying et al, 2006). En el presente estudio, analizamos los efectos de la estimulación eléctrica del núcleo PV o la aplicación de OT intratecal 90 minutos después de realizar el estímulo eléctrico en el NC.

En el presente estudio, la PLP no parece afectar a las respuestas provocadas por la activación de las fibras A-Beta, y únicamente se observan cambios en las respuestas neuronales provocadas por la activación de fibras A-Delta, C y la postdescarga, lo cual correlaciona con estudios previos (Svendsen et al., 1997; Liu y Sandkühler, 1997; Rygh et al., 1999; Kim et al., 2003) en los que se ha descrito un incremento el cual no afecta a las respuestas de las fibras no nociceptivas. Estos autores también señalan que el incremento en la tasa de disparo al realizar una PLP se aprecia especialmente en neuronas de amplio rango dinámico, posiblemente debido a que recibe aferencias de fibras nociceptivas de fibras A-Delta y C.

### C. MECANISMOS DE CONTROL DESCENDENTES EN LA PLP

La noción de que la PLP en la médula espinal puede modificarse por medio de un control supraespinal inicia con los trabajos de Svendsen et al., (1999) los cuales realizaron una PLP por electroestimulación del NC en ratas adultas. Estos autores describieron el incremento posterior a la espinalización en la excitabilidad de las neuronas de las astas dorsales. Además, estos autores mostraron que es posible generar la PLP en ratas ya espinalizadas, lo que sugiere que los

mecanismos para generar la PLP no dependen de estructuras supraespinales y que probablemente estos mecanismos están localizados en las astas dorsales de la médula espinal. Una vez ya establecida la PLP tampoco son necesarias las aferencias intactas o los receptores cutáneos para mantenerla, pues ésta no es afectada si los nervios son seccionados o se bloquea el paso de potenciales de acción con lidocaína. Así mismo, el estímulo nociceptivo natural puede producir la PLP, sin la necesidad de la estimulación de alta frecuencia, siempre y cuando se inhiba el efecto tónico de vías descendentes (Svendsen, 1999), las cuales se pueden suprimir por lesión o por frío (Gjerstad et al., 2001). El incremento en la excitabilidad neuronal se revierte al cesar el bloqueo espinal.

No se ha descrito una vía en particular responsable de inhibir tónicamente la PLP, sin embargo diferentes estudios han demostrado que la serotonina liberada por proyecciones descendentes podría lograr una modulación de la excitabilidad neuronal en las neuronas de las astas dorsales de la medula espinal (Rygh et al., 2006). Así mismo los agonistas de los receptores  $\mu$  opioides (Liu y Sandkühler, 1998; Terman et al., 2001) o incluso el elemento inerte Xenón (Benrath et al., 2007) pueden inhibir de forma contundente la PLP. Independientemente de las vías descendentes, la inhibición tónica que está presente en animales intactos previene de un incremento espontáneo en la tasa de disparo, y este equilibrio se rompe a consecuencia de la sumación temporal que existe en los estímulos de alta frecuencia utilizados en éste y otros modelos de PLP en la médula espinal.

En este trabajo de investigación, se postula que la vía oxitocinérgica hipotálamo-espinal puede ser parte de un sistema descendente capaz de modular la PLP a nivel de las astas dorsales, pues la OT previa al estímulo desencadenante de la PLP puede prevenir la generación de este fenómeno. En correspondencia, los datos descritos anteriormente nos sugieren la existencia de un sistema descendente que en forma tónica inhibe la aparición de la PLP, del cual podría ser parte la proyección hipotálamo espinal.

No se sabe de forma específica cuál es el mecanismo de acción de la OT en la PLP, pero las evidencias apuntan hacia su selectividad en inhibir los impulsos de las fibras que transmiten información nociceptiva (Condes-Lara, 2003). Asimismo, otras sustancias que también pueden

bloquear la PLP se puede apreciar cómo los agonistas  $\mu$  opioides que ejercen sus efectos inhibitorios de forma presináptica (Liu y Sandkühler, 1998; Terman et al, 2001).

La interacción entre opioides y OT no es clara, pues Yirmiya et al. (1990) y Shiraishi et al. (1995) indican que la analgesia inducida por la estimulación del núcleo PV no es mediada por opioides, en contraste con el trabajo de Lopez-Hidalgo et al., (2006) que muestra que al estimular el núcleo PV al tiempo en que se administra por picoinyección en la vecindad de la neurona registrada un antagonista opioide (naloxona), se reduce el efecto de la OT sobre las respuestas nociceptivas. Además, Reeta et al. (2006), observaron como el efecto antinociceptivo de la OT era atenuado significativamente con naloxona, naltrindol o funaltrexamina. Éste y otros resultados apoyarían la existencia de un sinergismo entre los diferentes sistemas moduladores del dolor, como los trabajos de Hara et al., (1999) donde la aplicación de benzodiazepinas (agonistas GABA A) potencian el efecto antinociceptivo de los opiáceos en astas dorsales.

#### D. EFECTOS DE LA VÍA OXITOCINÉRGICA HIPOTÁLAMO-ESPINAL

El hipotálamo está relacionado con la regulación de la homeostasis y las respuestas autonómicas. Se ha sugerido que el núcleo PV participa, entre otras funciones, en la modulación de la información nociceptiva. En este sentido, Miranda-Cardenas et al, en el año 2006, utilizando un modelo de dolor neuropático producido por la ligadura floja del NC, observó que la aplicación intratecal de OT, así como la estimulación eléctrica del núcleo PV, disminuyen el número de respuestas de retirada de las patas posteriores al ser estimuladas mecánicamente con filamentos de Von Frey. Asimismo, evidencias electrofisiológicas sobre el tema fueron expuestas en el 2006 por Condes-Lara et al., observando que al estimular el núcleo PV se producía decremento en el número de respuestas producidas por la activación de fibras A-Delta y C, sin afectar las respuestas correspondientes a la activación de las fibras A-Beta. En concordancia con estudios electrofisiológicos anteriores (Condes-Lara et al., 2006; Rojas-Piloni et al., 2007), en este trabajo se observó que, a los 90 minutos de la PLP, la estimulación eléctrica del núcleo PV disminuyó las respuestas producidas por la activación de fibras A-Delta y C, sin afectar las respuestas de las fibras A-Beta. Es interesante notar que la disminución en las respuestas es proporcional al

incremento obtenido en la PLP, con lo cual el porcentaje de disminución con y sin PLP es muy semejante (Tabla 6).

<i>Fibra</i>	<i>Con PLP</i>	<i>Sin PLP</i>
A-Beta	15.19±12.92	12.6±6.6
A-Delta	70.33±21.07	55±10.2
C	64.55±22.31	73.1±6.7
Postdescarga	79.96±29.40	75.0±8.9

Tabla 6: Comparación entre resultados del trabajo actual (utilizando la PLP) y el obtenido por Rojas-Piloni (2007), sin utilizar la PLP, sobre el porcentaje de disminución de las respuestas provocadas por la activación de diferentes fibras, después de estimular el núcleo PV.

En el presente trabajo se encontró que las respuestas correspondientes a la activación de las fibras A-Delta y C, además de la postdescarga, fueron reducidas significativamente después de la estimulación eléctrica del núcleo PV, sin embargo, esta disminución solo fue temporal y hasta el momento en la literatura no hay datos del efecto de esta vía sobre la potenciación. Debido a los resultados de este trabajo de investigación podemos afirmar que la PLP no se revierte por medio de la aplicación de OT intratecal, o de la estimulación del núcleo PV, una vez que se ha desarrollado.

#### E. PREVENCIÓN DE LA PLP

En la clínica existen diferentes niveles de atención según el grado de afectación de la patología, y dependiendo de ellos el tratamiento y especialmente el pronóstico varían considerablemente. Estos niveles son la prevención, curación, limitación del daño y los cuidados paliativos. En el caso del dolor neuropático, el poder actual a nivel de la prevención y no solo a nivel paliativo evitaría el deterioro emocional y económico de los pacientes, así como el costo laboral y social que implica la atención de éstos. Cabe recordar que el dolor neuropático es especialmente rebelde al tratamiento convencional con el consecuente mal pronóstico.

La PLP, como modelo de dolor neuropático, es un fenómeno que involucra aumento en la cantidad de neurotransmisores liberados por la terminal presináptica, así como en el número de

receptores postsinápticos (Liu y Sandkühler, 1997). En este modelo, hasta el momento no existe evidencia de algún mecanismo que bloquee la PLP de forma permanente una vez que se ha establecido. Sin embargo, fármacos antagonistas de los receptores NMDA, inhibidores de NK-1 y de la NOS, además de los agonistas  $\mu$  opioides, pueden bloquear el inicio de una PLP si se administran justo antes de la estimulación de alta frecuencia del NC (Liu y Sandkulher, 1997; Ying, 2006; Rygh et al., 2006, Ruscheweyh et al., 2006). La activación de la vía oxitocinérgica hipotálamo-espinal abre una nueva puerta en el tratamiento del dolor neuropático, pues hasta el momento no se ha descrito en la literatura una vía descendente cuya actividad sea capaz de prevenir la PLP.

En un reporte anterior (Condes-Lara et al., 2007), se ha mostrado que el efecto de la OT en la médula espinal alcanza un máximo entre los 15 y 20 minutos después de su aplicación. Debido a ello, en este proyecto se administró la OT 15 minutos antes de realizar la estimulación de alta frecuencia del NC. De esta manera se observó que el número de potenciales de acción provocados por la estimulación periférica no aumenta, infiriendo por ello que el efecto mediado por la OT antes de la electroestimulación del NC es el que previene la aparición de la PLP.

El efecto analgésico mediado por la OT es dependiente de la dosis (Yu et al, 2003; Reeta et al., 2006). Para dosis intratecales se demostró que la concentración a 10  $\mu$ M utilizada en este trabajo de investigación es suficiente para inhibir las respuestas provocadas por estímulos nociceptivos térmicos y mecánicos, y su efecto se desvanece completamente a los 60 minutos posteriores a la aplicación.

Al comparar los datos en donde se utiliza OT contra vehículo, previo a la estimulación del NC en experimentos electrofisiológicos (Figura 29), podemos apreciar como el efecto preventivo de la OT provoca una distribución de datos inversa a la observada en el grupo vehículo donde sí se desarrolla la PLP: En ambos casos, son las respuestas de las fibras A-Beta las que sufren menor cambio, seguidas por las fibras C, después las fibras A-Delta y por último es la postdescarga la que se ve más afectada.

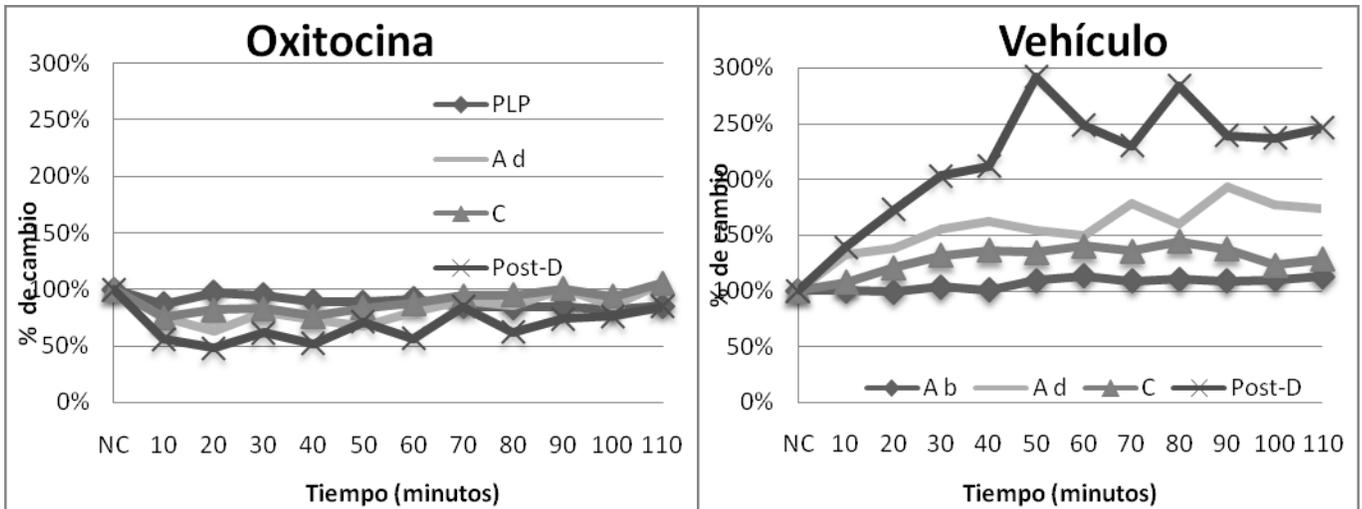


Figura 29: Comparación en el porcentaje de potenciales de acción cuando se realiza una electroestimulación del NC en presencia y ausencia de OT intratecal.

El punto donde hay menor porcentaje de respuestas, al aplicar la OT o al estimular eléctricamente el núcleo PV previamente, es a los 20-30 minutos después de la electroestimulación del NC. Es donde se puede apreciar una diferencia estadística entre los subgrupos experimentales y control, esta diferencia se pierde en las estimulaciones subsecuentes, infiriendo con ésto que el efecto inicial es la acción directa de la OT y que la falta de incremento en el porcentaje de las respuestas en los minutos siguientes es el efecto de haber prevenido la potenciación.

Experimentos posteriores aportarán más información al tema, revelando los mecanismos por los cuales la OT es capaz de prevenir los cambios que ocurren en la PLP. Por el momento se puede afirmar en base a los resultados expuestos, que esta vía descendente previene el incremento en el número de respuestas neuronales producidas por la electroestimulación de alta frecuencia del NC. Esto es probablemente debido a la disminución del número de potenciales de acción necesarios para lograr una estimulación de alta frecuencia, factor desencadenante de la PLP. Además, se ha demostrado que la inhibición gabaérgica presináptica en la médula espinal disminuye los potenciales post sinápticos excitatorios, y una disminución del glutamato liberado por la aferente primaria (Schmidt, 1971). En el caso de ser presináptico el mecanismo por el cual actúa la vía oxitocinérgica hipotálamo-espinal, se evitaría la descarga de alta frecuencia de la aferente primaria, el reclutamiento de receptores NMDA, que continuarían bloqueados por  $Mg^{+}$  en la

neurona de segundo orden, la fosforilación de los receptores AMPA, la síntesis del NO y la activación de genes de respuesta inmediata y tardía característicos de una PLP.

## II EXPERIMENTO CONDUCTUAL

### A. UMBRAL DE RETIRADA FRENTE A ESTÍMULOS NOCICEPTIVOS

Los filamentos de Von Frey han sido utilizados desde hace más de 100 años para determinar el umbral de sensación en seres humanos (Gaylord, 1898) así como en animales (Lombard, 1913). La alodinia por frío fue descrita por primera vez en la literatura por Boring (1916) con el nombre de “dolor protopático por frío”. Los datos recabados en experimentos conductuales frente a la PLP (Ying et al., 2006) solo utilizan un tipo de estímulo nociceptivo para cuantificar las respuestas del mismo. En este trabajo hemos decidido confrontar la PLP frente a los estímulos que más aquejan en el dolor neuropático: agentes mecánicos y térmicos.

En el presente trabajo, el umbral de retirada frente a estímulos mecánicos antes de producir una potenciación, en los animales de libre movimiento, se encontró en  $6\pm 0.94$  g. Esto, además de trabajos como el de Ying et al., (2006) con un umbral y error estándar semejante, demuestra una relativa uniformidad frente a estímulos mecánicos. Se puede decir lo mismo en los estímulos térmicos, con aproximadamente 30% de respuestas positivas frente al estímulo de la alodinia por frío. Los umbrales se mantienen constantes al paso de los días si no se modifica el curso temporal.

A pesar de que se presentó una reducción en la magnitud de las respuestas nociceptivas al administrar OT y estimular el PV tanto en estímulos mecánicos como térmicos, se encontró que estos efectos antinociceptivos son diferentes según el tipo de estímulo nociceptivo, disminuyendo de forma más contundente las respuestas secundarias a estímulos nociceptivos mecánicos que las secundarias a estímulos térmicos. Hasta el momento no se ha descrito en la literatura la distribución de las aferencias según el tipo información nociceptiva que las activa, igualmente desconocemos la distribución de sinapsis en las astas dorsales. Los datos obtenidos en este trabajo de investigación sugieren un mayor efecto analgésico frente a estímulos mecánicos al activar esta vía hipotálamo-espinal.

## B. ESTIMULACIÓN DE ALTA FRECUENCIA DEL NERVIO CIÁTICO

Se pudo observar que posterior a la estimulación eléctrica de alta frecuencia del NC, los animales experimentales mostraron aumento en su sensibilidad frente a los diferentes estímulos nociceptivos, que se mantuvo durante 10 días, lo cual concuerda con datos encontrados por Ying et al., (2006). Esta hiperalgesia bilateral, como también fue descrito en el trabajo de Ying, tiene efectos de sensibilización, pero menos intensos, en la pata contralateral a la estimulación del NC. Este efecto se debe probablemente al decusamiento de colaterales de neuronas de segundo orden, que se contactan con neuronas del asta dorsal contralateral.

Experimentos de Hutchinson et al., (2004) y Yang et al., (2005) también han demostrado un decremento en el umbral al estimular el campo periférico con Filamentos de Von Frey varias horas después de realizar una PLP, dicho decremento duraba por espacio de días. En el caso de alodinia por frío en los trabajos de Moss et al., (2002) igualmente se encontró un aumento en la sensibilidad. Esto correlaciona con los resultados obtenidos en este trabajo, que demuestran que el aumento en la sensibilidad es progresivo y temporal, antes de regresar a sus niveles basales.

En el subgrupo que recibió el vehículo en lugar de la OT se apreció una disminución en el umbral de retirada de las patas traseras, llegando a su punto más bajo el quinto día después de la electroestimulación del NC, regresando a valores semejantes a los controles al noveno día después de la instauración de la PLP. No existen evidencias reportadas en la literatura de prevención de esta potenciación por medio de la activación de otra vía endógena.

## C. EFECTO DE LA VÍA OXITOCINERGICA HIPOTÁLAMO-ESPINAL EN RATAS CON LIBRE MOVIMIENTO

Al igual que en los experimentos electrofisiológicos, la estimulación del núcleo PV o la aplicación de OT intratecal solo redujo la magnitud de las respuestas conductuales de forma temporal, sin modificar el desarrollo de la PLP. Esto pudo constatarse al analizar el umbral de retirada 30

minutos después de realizar la estimulación eléctrica del núcleo PV o la aplicación intratecal de OT.

Como efecto secundario de la estimulación del núcleo PV, así como la aplicación de OT intratecal se encontraron frecuentemente oscilaciones pélvicas y/o eyaculaciones, además de la analgesia ya descrita. La participación de la oxitocina como promotor de la conducta sexual se ha probado al aplicarla en el LCR obteniendo lordosis en hembras ovariectomizadas (Arletti y Bartolini, 1985). A su vez, trabajos de Komisaruk y Whipple (1986) demostraron que la estimulación vaginal en ratas producía analgesia, de manera paralela a un incremento en la cantidad de OT en el LCR. Otro trabajo realizado en mujeres (Komisaruk et al., 2004) demostró utilizando la resonancia magnética funcional que la autoestimulación vaginal provocaba la activación del núcleo PV. Al parecer la OT no juega un único papel en el sistema nervioso central, como también parecen indicar los estudios de Truesdell y Bodnar (1987) y Robinson et al. (2002), donde la vía descendente oxitocinérgica hipotálamo espinal es activada por estrés.

Es muy probable también que la misma información nociceptiva sea la que active esta vía descendente hipotálamo-espinal, experimentos aún en curso, en este laboratorio, parecen confirmar que un grupo de neuronas del núcleo PV inicia una descarga de potenciales de acción segundos después de aplicar estímulos nociceptivos térmicos y mecánicos en diferentes regiones del cuerpo de la rata.

Los estímulos mencionados hasta ahora (estrés, estimulación genital, dolor) suceden de forma fisiológica en el momento del parto, donde también se sabe que la OT plasmática, liberada por la neurohipófisis juega un papel trascendental en el parto. Es cierto que la OT no pasa la barrera hematoencefálica (Takagi et al., 1985), pero es probable que la OT se libere en ambos espacios a la vez, actuando así como analgésico y promotor de la contracción uterina.

#### D. ACCION DE LA OXITOCINA EN PROCESOS DE DOLOR CRÓNICO

Se ha demostrado que la OT aumenta en el LCR en procesos de dolor crónico. En este sentido, Brown y Perkowski (1998), midió la concentración de la OT en perros con compresión radicular a

nivel lumbar en diferentes momentos del curso temporal de esta patología, los cuales tuvieron significativamente más OT en el LCR que la encontrada en los controles. Si el dolor era crónico (mayor a 7 días) las cifras eran aún mayores que las encontradas en perros con dolor agudo.

En ratas, se incrementan los niveles de OT en el plasma y en el LCR, mientras reciben estimulación nociceptiva. Después de un estímulo térmico nociceptivo (plato caliente). Sin embargo, la administración de un antagonista de la OT provoca un decremento en el umbral al dolor (Uvnäs y Moberg, 1993).

Se ha propuesto que en seres humanos (Brown y Perkowski, 1998), las inyecciones intratecales de OT son efectivas para el tratamiento del dolor en patologías de las raíces dorsales mayores a 5 horas y que las inyecciones intratecales de OT podrían ser la elección lógica para una analgesia perioperatoria. En este trabajo se propone que el efecto de la OT podría prevenir la aparición de dolor neuropático secundario a procesos fisiológicos que involucren el inicio de una PLP.

#### E. PAPEL DE LA VASOPRESINA Y LA OXITOCINA EN LA ANALGESIA MEDIADA POR LA ESTIMULACIÓN DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR

En este trabajo, al comparar el porcentaje de disminución de las respuestas de retirada de una extremidad al utilizar la estimulación del núcleo PV y la aplicación intratecal de OT, contra el efecto provocado por la estimulación del núcleo PV en presencia del AOT, se aprecia un bloqueo del efecto antinociceptivo en este último caso, lo cual nos sugiere que es la OT la que media el efecto. Por otro lado, el AOT que utilizamos es no competitivo (Elands et al., 1998), lo cual da la ventaja de no importar si la afinidad de la OT es mayor, pues utiliza un sitio alostérico diferente.

Por otro lado, existen diferentes trabajos de investigación (Yang et al., 2005, 2006) los cuales afirman que la vasopresina y no la OT media un efecto analgésico. Al estimular eléctricamente el núcleo PV existe un aumento en la cantidad de vasopresina in situ, además de que la estimulación nociceptiva aumenta la cantidad de vasopresina y de RNA mensajero en el núcleo PV (Yang et al., 2006). Sin embargo, el mismo grupo afirma no encontrar un aumento en la cantidad de vasopresina en médula espinal (Yang et al., 2005). También Yirmiya et al. en 1990, afirman que la

vasopresina no es necesaria para inducir analgesia por estimulación del núcleo PV, al observar una disminución en el umbral en las respuestas de retirada en una extremidad al estimular eléctricamente el núcleo PV en ratas Brattleboro que no sintetizan vasopresina. Dosis de 500 ng administradas por vía intracerebro-ventriculares de vasopresina (Kordower et al, 1982; Kordower y Bodnar, 1984) han demostrado que se eleva el umbral al dolor en pruebas de reflejo de retirada de la cola, pero no podemos afirmar que la vasopresina media sus efectos a través su receptor o el de OT ya que la vasopresina se considera un agonista parcial de los receptores a OT.

Evidencias de un efecto analgésico conjunto de la OT y vasopresina son señalados por Tamarova et al. (1985a) quienes observaron que la tasa de disparo espontánea de las neuronas del asta dorsal de la rata se inhibía en 2/3 partes de las neuronas, y el 1/3 restante se activaba al aplicar tanto OT como vasopresina, siendo estos efectos reversibles con antagonistas y dosis dependientes. En otro experimento (Tamarova, 1985b) observó que la amplitud de los potenciales evocados secundarios a la estimulación de las raíces dorsales disminuía al aplicar intratecalmente OT así como vasopresina.

Hasta el momento no se ha explorado la posibilidad de analgesia por una vía descendente vasopresinérgica hipotálamo espinal que mediaría sus efectos a la par de la vía oxitocinérgica, tampoco se puede descartar una coliberación en la misma sinapsis. Experimentos posteriores aportarán más información al tema, revelando los mecanismos por los cuales la vía hipotálamo-espinal media su efecto antinociceptivo.

## CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

La relevancia de los hallazgos expuestos en este trabajo está contenida en varios puntos, y se deriva de la descripción, por primera vez en la literatura, de una vía endógena capaz de inhibir y prevenir la potenciación a largo plazo.

### **Potenciación a largo plazo:**

- Es posible cuantificar los efectos de la PLP en la médula espinal, provocada por la electroestimulación del NC, por medio del registro de potenciales de acción y no únicamente por potenciales de campo.
- La PLP es comprobable de forma conductual y se pueden cuantificar sus respuestas por medio de diferentes estímulos nociceptivos periféricos.

### **Interrupción de la potenciación a largo plazo:**

- La PLP en astas dorsales se mantiene al desaparecer los efectos de la vía oxitocinérgica hipotálamo-espinal.
- La reducción temporal de las respuestas nociceptivas por estimulación del PV y por administración de OT, indican la participación de la vía oxitocinérgica hipotálamo-espinal en un mecanismo endógeno descendente inhibitorio de la información nociceptiva.
- El bloqueo del efecto de la estimulación eléctrica del núcleo PV con un AOT nos indica que es la OT la que está mediando el efecto antinociceptivo en la médula espinal.

### **Prevención de la potenciación a largo plazo:**

- La aplicación de OT intratecal, así como la estimulación del núcleo PV previo a la estimulación eléctrica del NC previene la generación de la PLP.
- La prevención de los efectos característicos de la PLP es comprobable en estudios electrofisiológicos, así como en experimentos con ratas en libre movimiento.

## CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

1. Al-Chaer E.D., Westlund K.N. y Willis W.D. 1997. Sensitization of postsynaptic dorsal column neuronal responses by colon inflammation. *Neuroreport*. 15, 3267-3273.
2. Almeida T.F., Roizenblatt S. y Tufik S. 2004. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res.* 1000, 40-56.
3. Andrew D. y Craig A.D. 2001. Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat. Neurosci.* 4, 9 – 10.
4. Arletti R. y Bertolini A. 1985. Oxytocin stimulates lordosis behavior in female rats. *Neuropeptides* 6, 247-253.
5. Bandler R. y Keay K.A. 1996. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. *Prog. Brain Res.* 107, 285 – 300.
6. Barberis C., Mouillac B. y Durroux T. 1998. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J. Endocrinol.* 156, 223-229.
7. Benrath J., Kempf C., Georgieff M. y Sandkühler J. 2007. Xenon blocks the induction of synaptic long-term potentiation in pain pathways in the rat spinal cord in vivo. *Anesth. Analg.* 104, 106 - 111.
8. Bessou P. y Perl E. R. 1969. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J. Neurophysiol.* 32, 1025-1043.
9. Bishop G.H. 1944. The peripheral unit for pain. *J. Neurophysiol.* 7, 71 - 80.
10. Bliss T.V. y Lømo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 331 - 356.
11. Boring E.G. 1916. Cutaneous sensation after nerve-division. *Q. J. Exp. Physiol.* 10, 95-99.
12. Britton A. 1996. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in wind-up: a mathematical model. *Math. Med. Biol.* 13, 193-205.
13. Brown D.C. y Perkowski S. 1998. Oxytocin content of the cerebrospinal fluid of dogs and its relationship to pain induced by spinal cord compression. *Vet. Surg.* 27, 607-611.
14. Chini B., Mouillac B., Balestre M.N., Trumpp K.S., Hoflack J., Hibert M., Andriolo M., Pupier S., Jard S. y Barberis C. 1996. Two aromatic residues regulate the response of the

- human oxytocin receptor to the partial agonist arginine vasopressin. *FEBS Lett.* 397, 201-206.
15. Cliffer K.D., Burstein R. y Giesler G. 1991. Distributions of spinothalamic, spinohypothalamic and spinotelencephalic fibers revealed by anterograde transport of PHA-L in rats. *J. Neurosci.* 11, 852–868.
  16. Condes-Lara M., Gonzalez N. M., Martinez-Lorenzana G., Delgado O. L. y Freund-Mercier M. J. 2003. Actions of oxytocin and interactions with glutamate on spontaneous and evoked dorsal spinal cord neuronal activities. *Brain Res.* 976, 75 – 81.
  17. Condes-Lara M., Martinez-Lorenzana G, Rojas-Piloni G. y Rodriguez-Jimenez J. 2007. Branched oxytocinergic innervations from the paraventricular hypothalamic nuclei to superficial layers in the spinal cord. *Brain Res.* 1160, 20-29.
  18. Condes-Lara M., Rojas-Piloni G., Martinez-Lorenzana G., Rodriguez-Jimenez J., Lopez-Hidalgo M. y Freund-Mercier M.J. 2006. Paraventricular hypothalamic influences on spinal nociceptive processing. *Brain Res.* 1081, 126-137.
  19. Craig A.D. 2003. Distribution of trigeminothalamic and spinothalamic lamina I terminations in the cat. *Somatosens. Mot. Res.* 20, 209-222.
  20. Dagnino S.J. 1994. Mecanismos y vias del dolor. *Boletin Esc. de Medicina, P. Universidad Catolica de Chile*, 23, 148 -151.
  21. Dickenson A.H. 1990. A cure for wind up: NMDA receptor antagonists as potential analgesics. *Trends. Pharmacol. Sci.* 11, 307-309.
  22. Dickenson A.H. 1995. Spinal cord pharmacology of pain *Br. J. Anesth.* 75, 193 - 200.
  23. Downie J.W., Ferrington D.G., Sorkin L.S. y Willis W.D, 1988. The primate spinocervicothalamic pathway: responses of cells of the lateral cervical nucleus and spinocervical tract to innocuous and noxious stimuli. *J. Neurophysiol.* 59, 861–885.
  24. Du Vigneaud V., Ressler C. y Trippett S. 1953. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J. Biol. Chem.* 205, 949–957.
  25. Elands J., Barberis C., Jard S., Tribollet E., Dreifuss J.J., Bankowski K., Manning M. y Sawyer W.H. 1988. 125I-labelled d(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>[Tyr(Me)<sub>2</sub>, Thr<sub>4</sub>, Tyr-NH<sub>2</sub>(9)]OVT: a selective oxytocin receptor ligand. *Eur. J. Pharmacol.* 147, 197-207.
  26. Erlanger J. y Gasser H. S. 1930. The action potential in fibers of slow conduction in spinal roots and somatic nerves. *Am. J.* 92, 43 - 82.

27. Fields H. 1987. En: Pain. McGraw-Hill, New York. Pp 13-16.
28. Foreman R.D., Blair R.W. y Weber R.N. 1984. Viscerosomatic convergence onto T2–T4 spinoreticular, spinoreticular –spinothalamic, and spinothalamic tract neurons in the cat. *Exp. Neurol.* 85, 597– 619.
29. Gasser H.S. 1950. Unmyelinated fibers originating in dorsal root ganglia. *J. Gen. Physiol.* 33, 651 - 690.
30. Gaylord P. 1898. On certain characteristics of the pressure sensations of the human skin. *Am. J. Physiol.* 1, 346 - 358.
31. Gilron I., C. Watson P. N., Cahill C. M. y Moulin D. E. 2006. Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. *Can. Med. Assoc. J.* 175, 265 - 275.
32. Gimpl G. y Fahrenholz F. 2001. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 81, 629-683.
33. Gjerstad J., Tjølsen A. y Hole K. 2001. Induction of long-term potentiation of single wide dynamic range neurones in the dorsal horn is inhibited by descending pathways. *Pain* 91, 263-268.
34. Glajchen M. 2001. Chronic pain: treatment barriers and strategies for clinical practice. *J. Am. Board. Fam. Pract.* 14, 211-218.
35. Hamill O. P. y Martinac B. 2001. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol. Rev.* 81, 685-740.
36. Hara K., Saito Y., Kirihara Y., Yamada Y., Sakura S. y Kosaka Y. 1999. The interaction of antinociceptive effects of morphine and GABA receptor agonists within the rat spinal cord. *Anesth. Analg.* 89, 422-428.
37. Harris M.C., Jones P.M. y Robinson I.C. 1981. Differences in the release of oxytocin into the blood and cerebrospinal fluid following hypothalamic and pituitary stimulation in rats. *J. Physiol.* 320, 109-110.
38. Haulica I., Busuioc A. y Neamtu C. 1995. Possible involvement of the L-arginine-nitric oxide pathway in the modulation of stress-induced analgesia. *Funct. Neurol.* 10, 169-173.
39. Hebb D.O. 1949. En: The organization of behavior: A neuropsychological theory. Wiley, New York. Pp 231-247.
40. Hernandez-Peon R. y Hagbarth K.E. 1955. Interaction between afferent and cortically induced reticular responses. *J. Neurophysiol.* 18, 44 - 55.

41. Hiskisson E.C. 1974. Measurement of pain. *Lancet*. 2, 1127.
42. Hodgkin A.L. y Katz B. 1949. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* 108, 37-77.
43. Hofbauer R., Rainville P., Duncan G.H. y Bushnell M.C. 2001. Cortical representation of the sensory dimension of pain. *J. Neurophysiol.* 86, 402-411.
44. Hutchinson K. J., Gomez-Pinilla F., Crowe M., Ying Z. y Basso B. 2004. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain*. 127, 1403-1414.
45. Julious D. y McCleskey E.W. 2006. Cellular and molecular properties of primary afferent neurons. En: *Textbook of pain*. Mellzack R. y Wall P. Elsevier, USA.
46. Kandel E.R., Schwartz J.H. y Jessell T.M. 2000. Cellular Mechanisms of Learning and the Biological Basis of Individuality. En: *Principles of Neural Science*, Kandel E.R. New York. McGraw-Hill. Pp 1262.
47. Kevetter G.A. y Willis W.D. 1982. Spinothalamic cells in the rat lumbar cord with collaterals to the medullary reticular formation. *Brain Res.* 238, 181-185.
48. Kevetter G.A. y Willis W.D. 1984. Collateralization in the spinothalamic tract: new methodology to support or deny phylogenetic theories. *Brain Res.* 319, 1-14.
49. Kim D.K., Jung S.J., Kim S.J. y Kwak J. 2003. Dependence of long-term potentiation on the interval between A- and C-responses of the spinal dorsal horn neurons in rats. *Neurosci. Lett.* 384, 33-36.
50. Komisaruk B.R. y Whipple B. 1986. Vaginal-stimulation produced analgesia in rats and women. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 467, 30-39.
51. Komisaruk B.R., Whipple B., Crawford A., Liu W.C., Kalnin A. y Mosier K. 2004. Brain activation during vaginocervical self-stimulation and orgasm in women with complete spinal cord injury: fMRI evidence of mediation by the vagus nerves. *Brain Res.* 1024, 77-88.
52. Kordower J.H. y Bodnar R.J. 1984. Vasopressin analgesia: specificity of action and non-opioid effects. *Peptides.* 5, 747-756.
53. Kordower J.H., Sikorsky V. y Bodnar R.J. 1982. Central antinociceptive effects of lysine-vasopressin and an analogue. *Peptides.* 4, 613-617.

54. Latham J. y Davis B.D. 1994. The socioeconomic impact of chronic pain. *Disabil. Rehabil.* 16, 39-44.
55. Lewis T. 1942. *Pain*. Macmillan, New York. Pp 51-67.
56. Liebeskind J.C. y Besson J.M. 1973. Analgesia from electrical stimulation of periaqueductal gray matter in the cat: behavioral observations and inhibitory effects on spinal cords interneurons. *Brain Res.* 50, 441-446.
57. Liu X. y Sandkühler J. 1997. Characterization of long term potentiation of C-fiber evoked potential in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors. *J. Neurophysiol.* 78, 1973-1982.
58. Liu X. y Sandkuhler J. 1998. Activation of spinal N-methyl-D-aspartate- or neurokinin-receptors induces long-term potentiation of C-fiber-evoked field potentials in spinalized rats. *Neuroscience.* 86, 1209-1216.
59. Loeser J.D. y Black R.G. 1975. A taxonomy of pain. *Pain.* 1, 81-84.
60. Lombard W. P. 1913. The surface tickle sense. *Am. J. Physiol.* 11, 31-33.
61. Lopez-Hidalgo M., Rojas-Piloni, G., Rodriguez-Jimenez, J., Martinez-Lorenzana, G. y Condes-Lara M. 2006. Role of Gaba and enckephalines in the modulation of nociceptive dorsal horn neuronal responses mediated by oxitocin in the rat. 2nd International Forum of Pain Medicine. Guadalajara, Mexico.
62. Lynch M.A. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol. Rev.* 84, 87-136.
63. Ma Q.P. y Woolf C.J. 1995. Noxious stimuli induce an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent hypersensitivity of the flexion withdrawal reflex to touch: implications for the treatment of mechanical allodynia. *Pain* 61, 383-390.
64. Maciewicz R. y Martin J.B. 1991. Pain: pathophysiology and management. En: Wilson J.D., Braunwald E., Isselbacher K.J., Petersdorf R.G., Martin J.B., Fauci A.S., Root R.K. (Eds) *Principles of Internal Medicine*. 12th edition. McGraw-Hill, New York. Pp 2035-2040.
65. Magoun H.W. 1940. Descending connections from the hypothalamus. *Res. Publ. Ass. Nerv. Ment. Dis.* 20, 270 – 285.
66. Mantyh P.W., Takatsuji K., Senba E. y Tohyama M. 1995. A relationship between substance P receptor and retinal fibers in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 698, 53-61.

67. Marx J.L. 1979. Brain peptides: is substance P a transmitter of pain signals? *Science*. 205, 886 - 889.
68. Mayer D.J. 1971. Analgesia from electrical stimulation in the brain stem of the rat. *Science*. 174, 1351-1354.
69. Mayer D.J. y Lieberkind J.C. 1974. Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: an anatomical and behavioral analysis. *Brain Res*. 68, 73-93.
70. Melzack R. y Wall P. 1965. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 699, 971 – 979.
71. Mendell L.M. y Wall P.D. 1965. Responses of single dorsal cord cells to peripheral cutaneous unmyelinated fibres. *Nature*. 206, 97-99.
72. Mendell. L.M. 1966. Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Exp. Neurol*. 16, 316-332.
73. Mense S. 1983. Basic neurobiologic mechanisms of pain and analgesia. *Am. J. Med*. 75, 4– 14.
74. Merskey H. y Bogduk N. 1986. En: Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Seattle. IASP Press. Pp 1-226.
75. Millan M.J. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol*. 57, 1 – 164.
76. Miller M.W. 1987. The origin of corticospinal projection neurons in rat. *Brain Res*. 67, 339–351.
77. Miranda-Cardenas Y., Rojas-Piloni G., Martinez-Lorenzana G., Rodriguez- Jimenez J., Lopez-Hidalgo M. Freund-Mercier M. J. y Condes-Lara M. 2006. Oxytocin and electrical stimulation of the paraventricular hypothalamic nucleus produce antinociceptive effects that are reversed by an oxytocin antagonist. *Pain* 122, 182 – 189.
78. Mogil J.S., Sternberg W.F., Balian H., Liebeskind J.C. y Sadowski B. 1996. Opioid and nonopioid swim stress-induced analgesia: a parametric analysis in mice. *Physiol. Behav*. 59, 123-132.
79. Moss A., Blackburn-Munro G., Garry E.M., Blakemore J.A., Dickinson T., Rosie R., Mitchell R. y Fleetwood-Walker. 2002. A role of the ubiquitin-proteasome system in neuropathic pain. *J. Neurosci*. 22, 1363-1372.
80. Oliveras J.L., Fardin V. y Besson J.M. 1984. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat II: Differential

- characteristics of the analgesia induced by ventral and dorsal PAG stimulation. *Brain Res.* 306, 125-139.
81. Paxinos G. y Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th Ed. Elsevier academic press. San Diego. Pp 24-28.
  82. Rao V.V., Loffler C., Battey J. y Hansmann I. 1992. The human gene for oxytocin-neurophysin I (OXT) is physically mapped to chromosome 20p13 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell. Genet.* 61, 271-273.
  83. Reeta K.H., Mediratta P.K., Rathi N., Jain H., Chugh C. y Sharma K.K. 2006. Role of kappa-opioid and delta-opioid receptors in the antinociceptive effect of oxytocin in formalin-induced pain response in mice. *Regul. Pept.* 135, 85-90.
  84. Reiter M.K., Kremarik P., Freud-Mercier M.J., Stoeckel M.E., Desaulles E. y Feltz P. 1994. Localization of oxytocin binding sites in the thoracic and upper lumbar spinal cord of the adult and postnatal rat: a histoautoradiographic study. *Eur. J. Neurosc.* 6, 98-104.
  85. Renaud L.P. y Bourque C.W. 1991. Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog. Neurobiol.* 36, 131-169.
  86. Rexed B. 1952. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp. Neurol.* 96, 415-495.
  87. Reynolds D.V. 1969. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science.* 164, 444-445.
  88. Robinson D.A., Wei F., Wang G.D., Li P., Kim S.J., Vogt S.K., Muglia L.J. y Zhuo M. 2002. Oxytocin mediates stress-induced analgesia in adult mice. *J. Physiol.* 540, 593-606.
  89. Rojas-Piloni G., Lopez-Hidalgo M., Martinez-Lorenzana G., Rodriguez-Jimenez J. y Condes-Lara M. 2007. GABA-mediated oxytocinergic inhibition in dorsal horn neurons by hypothalamic paraventricular nucleus stimulation. *Brain Res.* 1137, 69-77.
  90. Ruscheweyh R., Goralczyk A., Wunderbaldinger G., Schober A. y Sandkuhler J. 2006. Possible sources and sites of action of the nitric oxide involved in synaptic plasticity at spinal lamina I projection neurons. *Neuroscience.* 141, 977-988.
  91. Rousselot P., Papadopoulos G., Merighi A., Poulain D.A. y Theodosis D.T. 1990. Oxytocinergic innervation of the rat spinal cord. An electron microscopic study. *Brain Res.* 529, 178-184.

92. Rygh L.J., Svendsen F., Hole K. y Tjolsen A. 1999. Natural noxious stimulation can induce long-term increase of spinal nociceptive responses. *Pain*. 82, 305-310.
93. Rygh L.J., Kontinen R. y Dickenson A.H. 2000. Different increase in C-fibre evoked responses after nociceptive conditioning stimulation in sham-operated and neuropathic rats. *Neurosci. Lett*. 288, 99-102.
94. Rygh L.J., Suzuki R., Rahman W., Wong Y., Vonsy J.L., Sandhu H., Webber M., Hunt S. y Dickenson A.H. 2006. Local and descending circuits regulate long-term potentiation and zif268 expression in spinal neurons. *Eur. J. Neurosci*. 24, 761-772.
95. Sandkühler J.C. 2000. Learning and memory in pain pathways. *Pain*. 88, 113-118.
96. Saper C.B., Loewy A.D., Swanson L.W. y Cowan W.M. 1976. Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res*. 117, 305-312.
97. Schmidt R.F. 1971. Presynaptic inhibition in the vertebrate central nervous system. *Ergeb. Physiol*. 63, 20-101.
98. Shiraishi T., Onoe M., Kojima T., Sameshima Y. y Kageyama T. 1995. Effects of hypothalamic paraventricular nucleus: electrical stimulation produce marked analgesia in rats. *Neurobiology*. 3, 393-403.
99. Stanfa L.C., Misra C. y Dickenson A.H. 1996. Amplification of spinal nociceptive transmission depends on the generation of nitric oxide in normal and carrageenan rats. *Brain Res*. 737, 92-98.
100. Svendsen F., Tjolsen A. y Hole K. 1997. LTP of spinal A beta and C-fibre evoked responses after electrical sciatic nerve stimulation. *Neuroreport*. 16, 3427-3430.
101. Svendsen F., Tjolsen A., Gjerstad J. y Hole K. 1999. Long term potentiation of single WDR neurons in spinalized rats. *Brain Res*. 816, 487-492.
102. Swanson L.W. y McKellar S. 1979. The distribution of oxytocin- and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. *J. Comp. Neurol*. 188, 87-106.
103. Takagi T., Tanizawa O., Otsuki Y., Sugita N., Haruta M. y Yamaji K. 1985. Oxytocin in the cerebrospinal fluid and plasma of pregnant and nonpregnant subjects. *Horm. Metab. Res*. 17, 308-310.
104. Tamarova Z. A. 1985a. Effect of vasopressin and oxytocin on spontaneous unit activity of dorsal horn cells in the isolated spinal cord of young rats. *Neurophysiology*. 17, 456-461.

105. Tamarova Z. A. 1985b. Effects of vasopressin and oxytocin on evoked dorsal horn cell activity in an isolated segment of spinal cord. *Neurophysiology*. 16, 221-226.
106. Terman G. W., Eastman C.L. y Chavkin C. 2001. Mu opiates inhibit long-term potentiation induction in the spinal cord slice. *J. Neurophysiol.* 85, 485 - 494.
107. Torregrosa Z.S. 1994. Mecanismos y vías del dolor. *Boletín esc. de Medicina P. Universidad Católica de Chile*. 23, 202 – 206.
108. Truesdell L. y Bodnar R. 1987. Reduction in cold-water swim analgesia following hypothalamic paraventricular nucleus lesions. *Physiol Behav.* 39, 727-731.
109. Uvnäs-Moberg K., Bruzelius G., Alster P. y Lundeberg T. 1993. The antinociceptive effect of non-noxious sensory stimulation is mediated partly through oxytocinergic mechanisms. *Acta. Physiol. Scand.* 149, 199-204.
110. Vane, J.R., Bakhle S. y Botting R.M. 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 97-120.
111. Wall P.D. 1970. The sensory and motor role of impulses travelling in the dorsal columns towards cerebral cortex. *Brain* 93, 505-524.
112. Weddel G. 1945. The anatomy of the cutaneous sensibility. *Br. Med. Bull.* 3, 167-172
113. Willis W.D. 1985. Pain pathways in the primate. *Prog. Clin. Biol. Res.* 176, 117– 133.
114. Yaksh T.L. y Hammond D.L. 1982. Peripheral and central substrates involved in the rostral transmission of nociceptive information. *Pain.* 13, 1-85.
115. Yang H.W., Zhou L., Hu N., Xin W.J. y Liu X.G. J. 2005. Activation of spinal D1/D5 receptors induces late-phase LTP of C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *Neurophysiol.* 94, 961 - 967.
116. Yang J., Liu W.Y., Song C.Y. y Lin B.C. 2006. Through central arginine vasopressin, not oxytocin and endogenous opiate peptides, glutamate sodium induces hypothalamic paraventricular nucleus enhancing acupuncture analgesia in the rat. *Neurosci. Res.* 54, 49-56.
117. Ying B., Lu N., Zhang Y.Q. y Zhao Z.Q. 2006. Involvement of spinal glia in tetanically sciatic stimulation-induced bilateral mechanical allodynia in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 1264-1272.

118. Yirmiya R., Ben-Eliyahu S., Shavit Y., Marek P. y Liebeskind J.C. 1990. Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus produces analgesia not mediated by vasopressin or endogenous opioids. *Brain Res.* 537, 169-174.
119. Yoon Y.W., Sung B. y Chung J.M. 1998. Nitric oxide mediates behavioral signs of neuropathic pain in an experimental rat model. *Neuroreport.* 9, 367-372.
120. Yu S.Q., Lundeberg T. y Yu L.C. 2003. Involvement of oxytocin in spinal antinociception in rats with inflammation. *Brain Res.* 983, 13-22.
121. Zhuo M., Jarmo T., Li X.C. y Hawkins A. 1998. On the respective roles of nitric oxide and carbon monoxide in long-term potentiation in the hippocampus. *Learn. Mem.* 5, 467 - 480.
122. Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 16, 109-110.