



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

---

---

**INTERACCIÓN DE TERMINALES OXITOCINÉRGICAS  
E INTERNEURONAS GABAÉRGICAS CON NEURONAS  
ESPINO-TALÁMICAS EN EL ASTA DORSAL**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

**PRESENTA:**

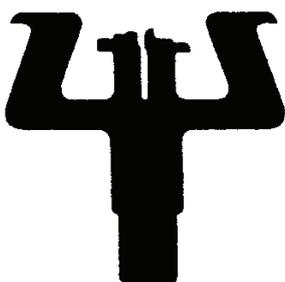
**YUNUEN LETICIA MORENO LÓPEZ**

**DIRECTOR:**

**Dr. MIGUEL CONDÉS LARA**

**REVISOR:**

**Dr. VÍCTOR RAMÍREZ AMAYA**



**MÉXICO, D.F.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **JURADO**

### **PRESIDENTE**

Dr. Miguel Condés Lara

### **VOCAL**

Dr. Antonio P. Zainos Rosales

### **SECRETARIO**

Dra. Irma Yolanda del Río Portilla

### **SUPLENTES**

Dr. Víctor Ramírez Amaya

Lic. Beatriz Gómez González

Agradezco al Consejo Nacional de  
Ciencia y Tecnología (CONACyT)  
por el apoyo que me brindo para  
realizar Tesis de Licenciatura.  
Numero de proyecto: 89423(GML)

## **DEDICATORIAS**

Dedico esta tesis a toda mi familia.

A mis padres Leticia López Hernández y Ernesto Moreno Villarreal por su apoyo incondicional, comprensión, ayuda y amor, muchas gracias por estar conmigo en todo momento.

A mi hermana Nancy E. Moreno López, a mis sobrinos Armando Calderón y Adrian Calderón, por todos los buenos momentos y por su apoyo, gracias.

A la memoria de mi tía Gloria Andrea Moreno Villarreal y abuelito Vicente López Villaseñor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los integrantes del laboratorio de “Dolor y Epilepsia experimental”:

A la Dra. Ma. Guadalupe Martínez Lorenzana, por sus consejos, enseñanzas, revisiones y sugerencias en la realización de esta tesis.

Al Dr. Miguel Condés Lara por sus revisiones, comentarios, y apoyo.

Al Dr. Gerardo Rojas Piloni por su tiempo y por las buenas ideas para la realización de esta tesis.

Al MVZ. Javier Rodríguez Jiménez por su asistencia y colaboración en el presente trabajo.

A los miembros del jurado por sus comentarios y sugerencias.

Dr. Miguel Condés Lara

Dr. Víctor Ramírez Amaya

Dr. Antonio P. Zainos Rosales

Dra. Yolanda del Río Portilla

Lic. Beatriz Gómez González

## ABREVIATURAS

NPV	Núcleo Paraventricular del hipotálamo
OT	Oxitocina
VGLUT1	Transportador Vesicular de Glutamato
N-NOC	Neuronas no nociceptivas
VPL	Núcleo Ventroposterolateral del tálamo
VPM	Núcleo Ventroposteromedial del tálamo
NS	Neuronas nociceptivas
WRD	Neuronas de amplio rango dinámico
ME	Médula espinal
PAG	Sustancia Gris Periacueductal

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES	9
I.    SENSACIÓN Y PERCEPCIÓN	9
II.   EL DOLOR COMO SISTEMA HOMEOSTÁTICO	10
III.  SENSACIÓN DEL DOLOR	11
IV.  TRANSMISIÓN DEL DOLOR	12
V.   MÉDULA ESPINAL Y PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN	13
VI.  VÍAS ASCENDENTES DE LA MÉDULA ESPINAL	16
VII. MODULACIÓN ESPINAL DEL DOLOR	20
a.  NEURONAS DE PROYECCIÓN DEL ASTA DORSAL	21
b.  ERNEURONAS EXCITATORIAS EN EL ASTA DORSAL	22
c.  INTERNEURONAS INHIBITORIAS EN EL ASTA DORSAL	24
VIII. MODULACIÓN DESCENDENTE EN EL ASTA DORSAL	24
a.  INHIBICIÓN DESCENDENTE	24
b.  FACILITACIÓN DESCENCENTE	26
IX.  MODULACIÓN CENTRAL DEL DOLOR	26
X.   HIPOTÁLAMO	27
a.  VIA HIPOTÁLAMO-ESPINAL	28
b.  OXITOCINA	30
c.  OXITOCINA Y DOLOR	31
CAPÍTULO 3: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
CAPÍTULO 4: OBJETIVOS E HIPOTESIS	36

I. OBJETIVOS	36
a. OBJETIVO GENERAL	36
b. OBJETIVOS PARTICULARES	36
II. HIPÓTESIS	37
CAPÍTULO 5: MÉTODO	38
I. INMUNOFLUORESCENCIA PARA OT, GABA, VGLUT1 Y VGLUT2	39
II. INMUNOFLUORESCENCIA PARA OT, GABA Y VGLUT1	41
III. INMUNOFLUORESCENCIA PARA NeuN	42
IV. ANÁLISIS HISTOLÓGICO	42
CAPÍTULO 6: RESULTADOS	43
I. LOCALIZACIÓN DE NEURONAS ESPINOTALÁMICAS	44
II. DISTRIBUCIÓN DE, VGLUT1, OT Y GABA EN EL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA ESPINAL	44
III. INTERACCIONES OT- VGLUT1, OT-GABA Y VGLUT1-GABA	45
CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN	53
CAPÍTULO 8: CONCLUSIÓN	61
CAPÍTULO 9. REFERENCIAS	62

## RESUMEN

En trabajos recientes se ha descrito que la estimulación del Núcleo Paraventricular Hipotalámico (NPV) y la aplicación tópica de Oxitocina (OT) inhiben selectivamente las respuestas de las fibras A $\delta$  y de las fibras C en neuronas de las capas superficiales del asta dorsal. Esta inhibición es revertida por un antagonista selectivo de OT. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos y los elementos espinales que participan en este fenómeno. Además, se ha demostrado que la aplicación tópica de bicuculina bloquea los efectos producidos por la estimulación eléctrica del NPV o aplicación de OT. La estimulación del NPV también activa una subpoblación de neuronas en la lámina II. Estas células NPV-on son responsables de la amplificación de la inhibición GABAérgica local. Estos resultados refuerzan la propuesta que indica que el control descendente supraespinal del dolor utiliza una vía neuronal específica en la Médula Espinal (ME) para producir antinocicepción la cual implica una interneurona GABAérgica. Sin embargo, un correlato morfológico no se ha descrito. Los objetivos principales de este trabajo fueron: dilucidar la posible interacción de terminales OT con interneuronas GABAérgicas y fibras aferentes primarias en el asta dorsal de la ME mediante técnicas de inmunofluorescencia y microscopia confocal, así como describir la localización de las neuronas de la ME que proyectan al VPL mediante la utilización del trazador retrogrado FG y dilucidar su posible interacción con fibras OT y neuronas GABAérgicas. Se utilizaron los segmentos lumbares de la ME de ratas macho Wistar. La incubación de los anticuerpos primarios se realizó mediante un cóctel: anti-OT desarrollado en ratón, anti-GABA desarrollado en conejo y anti-VGLUT1 desarrollado en conejillo de indias. Los sitios inmunoreactivos fueron revelados con los anticuerpos secundarios propios de cada especie acoplados a: Alexa 488, Alexa 555 y Alexa 647. Los resultados demuestran que de las interacciones observadas en las capas superficiales del segmento lumbar de la ME, que el 70-90% corresponde a OT-VGLUT1, del 0-16% a GABA-VGLUT1 y 0-15% para OT-GABA. Estos resultados apoyan la hipótesis

que indica un mecanismo de acción presináptico, implicado en la supresión del dolor mediante la acción de OT.

## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

Desde un punto de vista general, los organismos en su evolución adquieren y desarrollan un Sistema Nervioso (SN) más complejo que les permite interactuar con su medio ambiente, siendo una de sus principales funciones procesar la información que se obtiene a través de los sentidos y de esta forma les permite sentir, percibir y responder a gran variedad de estímulos. Además, el SN es un dispositivo que utiliza procesos complejos de codificación, transmisión, análisis y decodificación de la información del medio interno y externo; mediante estos procesos el SN crea una representación de la información, transformándola en un código que pueda utilizar, es decir, transforma los cambios del medio interno y externo en actividad neuronal para generar conductas y crear representaciones de la realidad.

Entre toda la información que llega y procesa el SN, se encuentran una serie de estímulos que particularmente atentan contra la integridad de los organismos y son los causantes de información nociceptiva y dolorosa.

El dolor representa un sistema sensorial y perceptual complejo de homeostasis compuesto de aspectos afectivos, motivacionales, cognitivos, genéticos y psicológicos, que está asociado con respuestas neurovegetativas y motoras que participan en la recepción, transmisión y procesamiento de los aferentes nociceptivos (Craig, 2002; Craig, 2003). Este sistema es uno de los más desarrollados y antiguos, tiene un papel importante como señalizador de peligro o daño a la integridad del organismo y por lo tanto para la adaptación y supervivencia del mismo (Condés-Lara, 1978). En los organismos el dolor refleja una condición adversa en el cuerpo que requiere una respuesta conductual, esto es, el dolor tiene un componente interoceptivo (el sentido de la condición fisiológica del cuerpo) y una motivación conductual específica (Craig, 2003). Además, la percepción del dolor se puede ver afectada por numerosos factores como el humor, el estado emocional y la anticipación del dolor, por ejemplo, estar ansioso sobre la experiencia de dolor puede exacerbarla. Estos componentes

pueden tener connotaciones adaptativas, bajo ciertas condiciones (Tracey & Mantyh, 2007).

De acuerdo con la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), el dolor es definido como “una sensación desagradable y experiencia emocional asociada con un daño tisular actual o potencial, o descrita en términos de tales daños” (Merskey & Bogduk, 1994). Sin embargo, en ocasiones, observamos que no siempre ocurre de esta forma en parte debido a que la relación entre dolor y el grado de lesión o daño no es directa. Es decir, el dolor como parte de una señal de alarma, genera respuestas encaminadas a suprimirlo, generando entre otras una analgesia como parte del componente homeostático que se le propone. Pero de esta forma, la manifestación de alerta aplica sólo en la manifestación aguda, es decir, dolor agudo, que se caracteriza por el hecho de estar limitado en el tiempo. Por otro lado, el dolor crónico es aquel que persiste por un periodo largo de tiempo y puede estar asociado con procesos patológicos crónicos (Almeida *et al.*, 2004). Pero es en esta condición de dolor crónico, en donde los mecanismos de homeostasis no están presentes. Adicionalmente se debe considerar que el dolor tiene una connotación individual lo que da lugar a una consideración de subjetividad de este fenómeno. Entonces, se observa que en el hombre, la experiencia de dolor se relaciona con componentes socio-culturales, ambientales y de aprendizaje que modulan sus manifestaciones (Condés-Lara, 1978).

El proceso sensorial y perceptual se inicia en los receptores, que son los encargados de seleccionar el tipo de información sensorial para que ingrese al Sistema Nervioso Central (SNC). La información continúa con el procesamiento neuronal que ocurre a medida que viaja de los receptores a lo largo del SNC, donde ocurre la modulación que se ejerce sobre la información sensorial. Particularmente, la sensación somatosensorial, comienza con la activación de las terminales periféricas de fibras aferentes primarias que responden a una variedad de estímulos (mecánicos, térmicos, químicos y dolorosos) y traducen esta información, la cual llega al asta dorsal de la médula espinal (ME) (Goldstein, 2005).

El dolor se inicia con la activación de receptores nociceptivos que se encuentran en la piel, mucosas, membranas, fascias profundas, tejido conectivo de órganos viscerales, ligamentos, músculos, tendones y arterias. Los receptores nociceptivos, al igual que todos los receptores sensoriales, representan las partes más distales de las neuronas aferentes de primer orden. Una vez que la información sensorial llega al asta dorsal de la ME por medio de varias vías ascendentes como los tractos espinotalámico, espino-reticular, espino-mescencefálico y columnas dorsales para el cuerpo y para la cara las vías trigeminales, la información sensorial alcanza diversas estructuras en el tallo cerebral, el diencefalo y la Corteza Cerebral (Almeida *et al.*, 2004).

De acuerdo a resultados experimentales parece que el dolor tiene tres componentes diferentes en la percepción y en la conducta. El primero es el componente sensorial, el segundo componente son las consecuencias emocionales inmediatas del dolor (desagrado) y el tercero es la implicación emocional a largo plazo del dolor crónico. Estos tres componentes del dolor parecen implicar a tres mecanismos cerebrales diferentes. El componente sensorial del dolor está caracterizado por ser un evento sensorial reconocible, discriminable, localizable en tiempo y espacio, ser aversivo y desagradable, el cual está mediado por el sistema ascendente asociado con la sensación de dolor en donde participa de manera importante la vía espinotalámica. El componente emocional inmediato parece estar mediado por vías que llegan a la corteza del cíngulo anterior y la corteza de la ínsula. El componente emocional a largo plazo parece estar mediado por vías que llegan a la corteza prefrontal (Price, 2000).

Una vez que la información llega a la ME alcanza al diencefalo (tálamo e hipotálamo), se divide en componentes laterales y mediales que están distribuidos en 3 regiones separadas: el grupo posterior, que tiene que ver con la definición de un estímulo como doloroso, grupo ventral donde se encuentran el VPL y en VentroPosteroMedial (VPM) talámicos que tiene que ver con la localización sobre la superficie corporal del estímulo y los núcleos intralaminares, que se relacionan con la elaboración del aspecto afectivo aversivo del estímulo nociceptivo.

Posteriormente la información nociceptiva llega a las cortezas somatosensorial primaria y secundaria (Albe-Fessard, Berkley, Kruger, Ralston & Willis, 1985; Carlson, 2006; Purves *et al.*, 2004; Augustine, Fitzpatrick, Hall, LaMantia, McNamara & Williams, 2004), de donde se envían proyecciones a diversas estructuras cerebrales y de la ME ejerciendo sobre ellas una modulación central en este caso particular, de la percepción del dolor, dando lugar al proceso de analgesia (Purves *et al.*, 2004).

Pero también la acción moduladora se da en todos y cada uno de los relevos sinápticos que hace la información codificada a lo largo de su recorrido por las vías nerviosas. Así se han identificado sistemas de neurotransmisión que poseen proyecciones descendentes al asta dorsal de la ME que regulan la transmisión de la información nociceptiva a centros superiores, es decir, el proceso de dolor y analgesia (Purves *et al.*, 2004). Entre estos sistemas se encuentran el Serotoninérgico, Opióide, Dopaminérgico, Histaminérgico, cuyos efectos sobre las neuronas del asta dorsal de la ME son inhibitorios o facilitatorios. Es indudable que no sólo participan estas estructuras en los componentes señalados, sino es toda una red de interacciones en la que participan más estructuras (Dickenson & D'Mello, 2008). Hay otros sistemas que también producen analgesia como es el de la Oxitocina (OT). La OT es un nanopéptido que se produce principalmente en los Núcleos Paraventricular (NPV) y Supraóptico del Hipotálamo. En el NPV se han identificado dos poblaciones de neuronas inmunorreactivas-OT: neuronas magnocelulares que terminan en la neurohipófisis y neuronas parvocelulares que terminan en varios lugares del SNC, entre ellos la ME (Sofroniew, Weindl, & Wetzstein, 1981; Gimpl & Fahrenholz, 2001; Sawchenko & Swanson, 1982). Así mismo, se ha encontrado una coincidencia en la localización de los receptores OT y terminales axónicas OT en la ME (Reiter, Kremarik, Freund, Stoeckel, Desaulles & Feltz, 1994) sugiriendo que la OT está involucrada en las funciones sensoriales y autonómicas (Sawchenko & Swanson, 1982). Por otro lado, hay fibras que contienen neurofisina en la región de células neurosecretoras del hipotálamo que proyectan a diversas del SNC entre ellas la ME y se ha encontrado que existe una

relación estrecha entre neurofisiología I y OT. Esto en su conjunto sugiere la posibilidad de que la OT pueda servir como neurotransmisor (Swanson, 1977).

La OT se ha involucrado en la regulación de ingesta de alimentos, la conducta materna, el parto, lactancia (Glimpl & Fahrenholz, 2001) y recientemente se ha descrito que la estimulación eléctrica del NPV y la OT están involucrados en la modulación del dolor (Condés-Lara, Rojas-Piloni, Martínez-Lorenzana, Rodríguez-Jiménez, López & Freund-Mercier, 2006), lo que sugiere un nuevo sistema descendente regulador del dolor que actúa a diferentes niveles del SNC. En este sentido, hay evidencia conductual y electrofisiológica del efecto analgésico de la OT endógena y exógena. (Miranda-Cárdenas, Rojas-Piloni, Martínez-Lorenzana, Rodríguez-Jiménez, López-Hidalgo, Freund-Mercier, y Condés-Lara, 2006; Martínez-Lorenzana, Espinosa-López, Carranza, Aramburo, Paz-Tres, Rojas-Piloni & Condés-Lara, 2008; Condés-Lara *et al.*, 2006; Rojas-Piloni, López-Hidalgo, Rodríguez-Jiménez, Martínez-Lorenzana y Condés-Lara, 2007; Condés-Lara, Rojas-Piloni, Martínez-Lorenzana, López-Hidalgo, y Rodríguez-Jiménez, 2009). Por otro lado, se ha reportado que la OT actúa inhibiendo la acción de glutamato (Condés-Lara, Marina-González, Martínez-Lorenzana, Luis-Delgado y Freund-Mercier, 2003), que es el principal neurotransmisor de las aferentes nociceptivas, de esta forma se ha sugerido que la OT indirectamente inhibe la transmisión sensorial en neuronas del asta dorsal, excitando interneuronas espinales inhibitorias. Además, la OT endógena y exógena así como la estimulación del NPV, suprimen selectivamente la actividad evocada de las aferentes A- $\delta$  y fibras C en las células del asta dorsal de la ME. Estos efectos inhibitorios de la OT y la estimulación eléctrica del NPV se pueden revertir mediante la aplicación del antagonista específico de OT (Condés-Lara, 2006, Rojas-Piloni, 2007). Además, de estas evidencias, mediante el registro de células del asta dorsal de la ME se ha mostrado que diferentes poblaciones celulares muestran patrones de descarga opuestos cuando se estimula eléctricamente en NPV, indicando la posible existencia de neuronas inhibitorias como del tipo de una interneurona GABAérgica

que pudiera estar mediando los efectos de la OT (Condés-Lara *et al.*, 2006; Rojas-Piloni *et al.*, 2007; Condés-Lara *et al.*, 2009).

Teniendo como base estos antecedentes los objetivos principales de este trabajo fueron: Trazar la vía espino-talámica y localizar las neuronas de la ME que proyectan al VPL. Así como dilucidar la posible interacción de interneuronas GABAérgicas, terminales oxitocinérgicas, terminales de fibras aferentes primarias en el asta dorsal de la ME, mediante técnicas de inmunofluorescencia y microscopia confocal. De tal forma que se pueda describir neuroanatómicamente un circuito celular implicado en la modulación y procesamiento de la información nociceptiva a nivel de la ME.

## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**

### *I. Sensación y percepción*

Los organismos en general y por lo tanto el ser humano, se desarrollan en un medio ambiente cambiante, del cual reciben estimulación sensorial y sobre el que deben actuar, adaptarse y sobrevivir. Para lo cual, los organismos en su evolución han desarrollado entre otros sistemas, un SN que les permite llevar a cabo estas funciones. La sensación implica la habilidad para traducir y codificar la información para finalmente percibirla. La mayor parte del cerebro se encarga de integrar la información de los distintos sistemas sensoriales y generar conducta, aunque los sistemas sensoriales son diferentes uno de otro, siguen procesos similares.

Los sistemas sensoriales en general constan de células sensoriales llamadas receptores periféricos que proveen al SN de información vital acerca del cuerpo, como información sobre la postura, la temperatura corporal, el estado del sistema cardiovascular, el sistema digestivo, la concentración iónica; e información de su ambiente externo como la forma, color, composición química, distancia y movimiento de los objetos. Cada célula sensorial detecta un estímulo específico, utilizando estructuras especializadas que operan como sensores para el estímulo adecuado y transducen la energía asociada con fuerza mecánica, luz, ondas sonoras, moléculas odorantes, químicos ingeridos, en un cambio en el potencial de membrana de cada receptor. Este evento eléctrico comienza el proceso por el cual, el SN construye una representación ordenada del cuerpo y del ambiente. Las señales aferentes sensoriales son transmitidas al Sistema Nervioso Central (SNC) y activan las neuronas centrales capaces de representar aspectos cualitativos y cuantitativos del estímulo (qué es y qué tan fuerte) y en algunas modalidades (somáticas, visión y audición) la localización del estímulo en el espacio. Este flujo

de información codificada es entonces integrado, percibido y utilizado para generar la conducta (Frings, 2008; Purves *et al.*, 2004; Hendry, Hsiao & Brown, 1999).

Por su parte, la percepción es un proceso que crea una representación del ambiente y nos permite actuar en él, para ello se requiere una interacción e integración de los estímulos ascendentes y descendentes. La percepción se puede estudiar a diversos niveles: psicofísico y fisiológico. El nivel psicofísico se concentra en la relación entre el estímulo y la percepción. El nivel fisiológico se enfoca en la relación entre el estímulo y la fisiología de la percepción. Sin embargo cada nivel de análisis (psicofísico y fisiológico) proporciona información específica acerca de aspectos diferentes del proceso perceptual y aunque se haga la distinción entre los dos niveles, existe un intercambio significativo entre ellos (Goldstein, 2005).

## *II. El dolor como sistema homeostático*

El dolor representa un sistema sensorial y perceptual complejo de homeostasis compuesto de aspectos afectivos, motivacionales, cognitivos, genéticos y psicológicos, que está asociado con respuestas neurovegetativas y motoras que participan en la recepción, transmisión y procesamiento de los aferentes nociceptivos (Craig, 2002; Craig, 2003). Este sistema es uno de los más desarrollados y antiguos, tiene un papel importante como señalizador de peligro o daño a la integridad del organismo y por lo tanto para la adaptación y supervivencia del mismo (Condés-Lara, 1978). En los organismos el dolor refleja una condición adversa en el cuerpo que requiere una respuesta, esto es, el dolor tiene un componente interoceptivo (el sentido de la condición fisiológica del cuerpo) y una motivación conductual específica (Craig, 2003). Además, la percepción del dolor se puede ver afectada por numerosos factores como el

humor, el estado emocional, la anticipación del dolor, por ejemplo, estar ansioso sobre la experiencia de dolor puede exacerbarla. Estos componentes pueden tener connotaciones adaptativas, bajo ciertas condiciones (Tracey & Mantyh, 2007).

Aunado a lo anterior, debemos considerar que el dolor es una experiencia subjetiva e individual, lo cual se ve reflejado en la definición de la Asociación para el Estudio del Dolor (Merksey & Bogduk, 1994), una experiencia sensorial y emocional asociada con un daño tisular real o potencial o descrito en términos de ese daño. Por lo que la relación entre dolor (incluyendo respuesta conductual, la cual puede variar según la situación) y la estimulación nociceptiva no es necesariamente directa (Tracey & Mantyh, 2007). Así, la señalización de alerta se refiere sólo a una manifestación de dolor agudo, que es caracterizado por el hecho de estar limitado en tiempo y que desaparece con la resolución del proceso patológico. Por otro lado, el dolor crónico persiste por un periodo largo de tiempo y esta asociado con procesos patológicos crónicos y en esta situación la señal de alarma carece de significancia. (Almeida *et al.*, 2004).

### *III. Sensación del dolor*

El dolor normalmente se origina de una condición fisiológica del cuerpo que un sistema homeostático sólo no puede rectificar automáticamente, así comprende una sensación y percepción con una motivación conductual con ajustes reflexivos autonómicos (Craig, 2003). La experiencia sensorial del dolor y su propagación se inicia con la activación de receptores periféricos llamados nociceptores por estimulación mecánica, térmica o química, quienes transducen esta información y la envían al SNC. Los nociceptores se encuentran en piel, mucosa, membranas, facias profundas, tejido conectivo de órganos viscerales, ligamentos, músculos,

tendones y arterias; corresponden a terminaciones nerviosas libres que representan las partes más distales de las neuronas aferentes de primer orden y terminan en el asta dorsal de la ME. En el Sistema Nervioso Periférico (SNP) hay 3 tipos principales de fibras, cada una tiene distintas propiedades que les permiten responder y transmitir diferentes tipos de información sensorial: Fibras A- $\beta$ , fibras A- $\delta$  y fibras C. Que son clasificadas en términos de su estructura, diámetro y velocidad de conducción. Las fibras A- $\beta$  tienen con un diámetro de más de 10 $\mu$ m y tienen una velocidad de conducción de 30-100m/s y son altamente mielinizadas, eso les permite una conducción rápida desde la periferia hasta el SNC. Estas fibras tienen umbrales de activación bajos, normalmente responden a estímulos mecánicos ligeros y son responsables de llevar la información táctil, propioceptiva y no participan en la propagación de los potenciales dolorosos en situaciones normales; sin embargo son fundamentales en los circuitos del dolor porque participan en los mecanismos de supresión del mismo. Las fibras A- $\delta$  tienen un diámetro de 2 a 6 $\mu$ m y una velocidad de conducción de 12-30 m/s y son poco mielinizadas, lo que las hace de conducción más lenta que las fibras A- $\beta$ , además poseen umbrales de activación altos y responden a estimulación mecánica, térmica y química. Las fibras C son no mielinizadas, tiene un diámetro de 0.4 a 1.2 $\mu$ m y tienen una velocidad de conducción de 0.5-2 m/s y se activan con estímulos mecánicos, térmicos y químicos. (Dickenson & D'Mello, 2008; Almeida *et al.*, 2004; Julius & Basbaum, 2001).

#### IV. *Transmisión del dolor*

La información nociceptiva es enviada por las fibras A- $\delta$  y C a las neuronas de la ME, estas fibras utilizan principalmente glutamato como neurotransmisor. El glutamato es un aminoácido excitatorio, que es esencial para la señalización del dolor en cada nivel anatómico. El glutamato ejerce un efecto excitatorio en un

número de receptores encontrados en neuronas postsinápticas espinales, dando lugar a la depolarización de la membrana vía tres distintas subclases de receptores, el AMPA, el NMDA y el receptor metabotrópico acoplado a una proteína G (mGluR). Adicionalmente un receptor presináptico kainato para glutamato se ha descrito en la ME (Millan, 1999).

El glutamato es liberado por las aferentes sensoriales en respuesta a la estimulación nociceptiva aguda y persistente, y es la activación rápida del receptor AMPA que es responsivo para el establecimiento de la respuesta base inicial de neuronas espinales del asta dorsal a estimulación nociva y táctil. Sin embargo si ocurre una estimulación repetitiva y de alta frecuencia de las fibras C, entonces hay una amplificación y prolongación de la respuesta de las neuronas espinales dorsales a subsecuentes entradas, lo que es llamado windup. Este fortalecimiento de la actividad o incremento de la actividad en respuesta a estímulos nocivos, resulta de la activación de los receptores NMDA. Si sólo hay entradas de baja frecuencia o entradas táctiles a la ME, entonces la activación de los receptores NMDA no es posible (Dickenson & D'Mello, 2008).

#### *V. Médula Espinal y procesamiento de la información*

La sustancia gris de la ME puede ser dividida en base a su citoarquitectura en 10 láminas (Rexed, 1952). De estas, la lámina I (zona marginal), lámina II (sustancia gelatinosa) y III (que corresponden a las capas superficiales); lámina IV (núcleo propio), V y VI (que corresponden a las capas profundas) comprenden el asta dorsal. La lámina VII corresponde a la sustancia gris intermedia, la lámina VIII y IX corresponden al asta medial y lateral ventral, respectivamente, mientras que la lámina X es la región que rodea el canal central. Las dos capas más superficiales I y II, junto con las láminas profundas V, VI y X, constituyen las regiones predominantes en la recepción, procesamiento y transmisión rostral de la

información nociceptiva. Cada lámina del asta dorsal esta organizada en el plano horizontal topográficamente para codificar la superficie del cuerpo (Millan, 1999).

Las fibras aferentes primarias llegan a la ME con una distribución definida: las fibras C proyectan principalmente a la lámina II y en menor densidad a la lámina I, V, VI y probablemente a la lámina X. Por otro lado, las fibras A- $\delta$  terminan predominantemente en la lámina I, y se esparcen en la lámina II, III, IV, V y VI. En contraste las fibras A- $\beta$  regulan información no-nociceptiva, arborizan abundantemente en las láminas III-IV, y en menor medida en las láminas V y VI. Dentro del asta dorsal todas las neuronas poseen un campo receptivo periférico. Para cada neurona, este corresponde a la región de la piel en la cual la estimulación incrementa su actividad por encima de los valores basales. Esto es, que la estimulación colectiva de aferentes periféricas nociceptivas dentro del campo receptivo se suman para evocar potenciales de acción (Millan, 1999).

En la ME hay distintos tipos de neuronas que promueven la interacción de estímulos aferentes y eferentes y son responsables de su trasmisión a estructuras supraespinales. Se pueden clasificar en: neuronas de proyección, que transmiten la información a centros supraespinales, las cuales se distribuyen en mayor cantidad en la lámina I y están dispersas en las láminas III a VI del asta dorsal; neuronas intersegmentales propioespinales, que integran varios niveles espinales y además de regiones ipsi y contralaterales, iniciando y mediando la inhibición descendente con implicación en mecanismos reverberantes de sensibilización; interneuronas que pueden ser divididas en interlaminares e intrasegmentales que tienen características inhibitorias o excitatorias (Millan, 1999).

Además, las neuronas del asta dorsal de la ME se diferencian con respecto al tipo de aferencia que reciben, de acuerdo a esto se clasifican en tres grupos distintos

(Millan, 1999; Almeida *et al.*, 2004): neuronas nociceptivas específicas, neuronas de Amplio Rango Dinámico (WDR) y neuronas no nociceptivas.

Las neuronas nociceptivas específicas (NS) responden exclusivamente a estimulación nociva y se encuentran en la lámina I, II, V y VI. Las fuentes de entrada para estas neuronas son las fibras A- $\delta$  de alto umbral y calor nociceptivo y fibras C polimodales nociceptivas, sus campos receptivos muestran organización somatotópica, principalmente en la lámina I. Las neuronas nociceptivas específicas presentan una limitación para la respuesta gradual a diferentes intensidades de estímulos pero están involucradas en codificar la localización y cualidad física del estímulo.

Las neuronas de Amplio Rango Dinámico (WDR) responden a estimulación mecánica, térmica y química que viene de fibras A $\delta$ , C y A- $\beta$ . Debido a la convergencia de las fibras dolorosas y no dolorosas, este grupo juega un papel fundamental en el mecanismo de supresión del dolor segmental involucrado en la teoría de la compuerta (Melzack & Wall, 1965). Se encuentran en las láminas I, II, IV, V, VI y X. Su principal característica es su capacidad para codificar la intensidad del estímulo porque muestran un incremento en la frecuencia de respuesta de la estimulación no nociva a la nociva. Las neuronas que responden a la estimulación de los campos receptivos periféricos están organizadas en las regiones más centrales del asta dorsal y muestran variaciones relacionadas con el área activada y a la intensidad del estímulo.

Las neuronas no nociceptivas (N-NOC) responden a estímulos mecánicos, térmicos y propioceptivos de baja intensidad, propagados por las fibras A- $\delta$  y A- $\beta$ . Están localizadas en las láminas II, III y IV y actúan indirectamente en mecanismos de supresión segmental (Figura 1) (Millan, 1999; Almeida *et al.*, 2004).

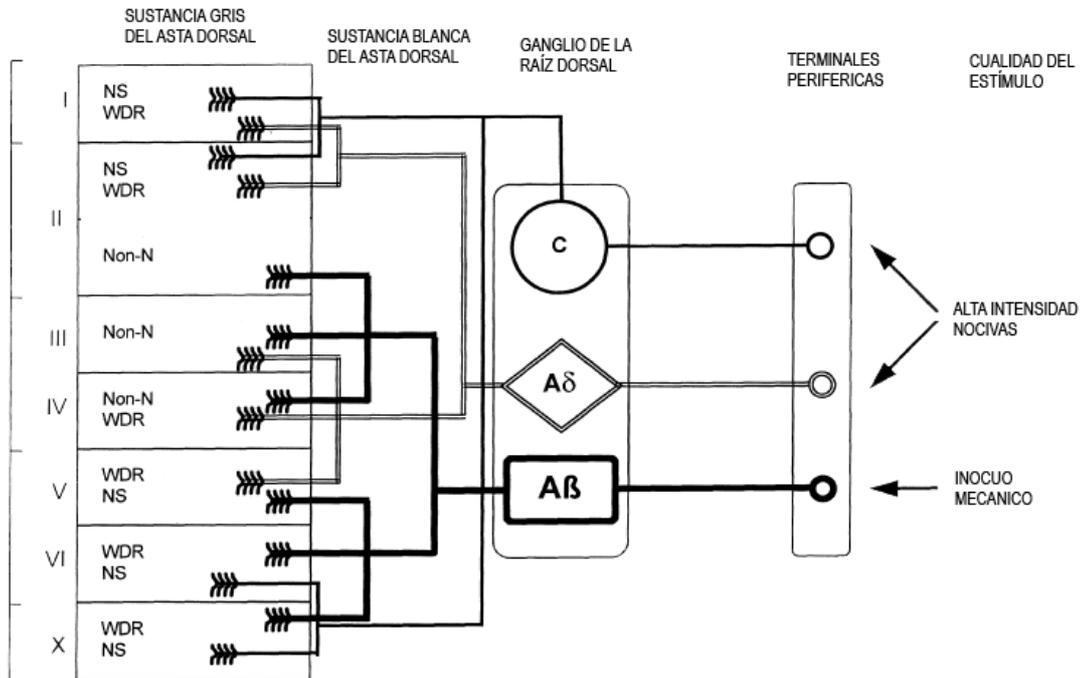


Fig. 1. La figura muestra un esquema de la organización anatómica de las estructuras involucradas en las entradas sensoriales en el asta dorsal de la ME (Modificado de Millan, 1999). WRD: Amplio Rango Dinámico, Non-N: No nociceptivas, NS: neuronas nociceptivas específicas.

## VI. Vías Ascendentes de la Médula Espinal

Una vez que la información nociceptiva es procesada en la ME, asciende por el Sistema Anterolateral de la ME, como se ilustra en la figura 2, que está conformado por tres vías: el tracto espino-talámico, que llega a los Núcleos Ventroposterolateral (VPL) para la información del cuerpo y al Núcleo Ventro Posteromedial (VPM) para la información de cuello y cara; el tracto espino-reticular y el tracto espino-mescencefálico. Estos tractos sirven a diferentes propósitos

según su origen en las distintas capas de la ME y su destino central (Tracey & Mantyh, 2007).

De acuerdo a resultados experimentales parece que el dolor tiene tres componentes diferentes en la percepción y en la conducta. El primero es el componente sensorial, el segundo componente son las consecuencias emocionales inmediatas del dolor (desagrado) y el tercero es la implicación emocional a largo plazo del dolor crónico. Estos tres componentes del dolor parecen implicar a tres mecanismos cerebrales diferentes. El componente sensorial del dolor está caracterizado por ser un evento sensorial reconocible, discriminable, localizable en tiempo y espacio, ser aversivo y desagradable, el cual está mediado por el sistema ascendente asociado con la sensación de dolor en donde participa de manera importante la vía espinotalámica. El componente emocional inmediato parece estar mediado por vías que llegan a la corteza del cíngulo anterior y la corteza de la ínsula. El componente emocional a largo plazo parece estar mediado por vías que llegan a la corteza prefrontal (Price, 2000).

El componente sensorial del dolor esta caracterizado por ser un evento sensorial reconocible, discriminable, localizable en tiempo y espacio, y ser aversivo y desagradable. El cual está mediado por el sistema ascendente asociado con la sensación de dolor en donde participa de manera importante la vía espinotalámica (Albe-Fessard *et al.*, 1985; Purves *et al.*, 2004)

Anatómicamente la vía espinotalámica se divide en un componente lateral y uno anterior. La vía espinotalámica lateral transmite impulsos nociceptivos y tienen un mayor número de fibras largas que proyectan directamente al tálamo. Las células que se encuentran en su mayoría en las láminas I, IV y V dan origen a la mayor parte de los axones que se decusan en la comisura blanca anterior y ascienden al tálamo. Se presume que fibras aferentes establecen contacto con células de las láminas IV y V. Por otro lado, la vía espinotalámica anterior tiene su origen en neuronas que constituyen una población celular heterogénea, que varían en forma, tamaño, y número en los diferentes segmentos y láminas medulares. Las

fibras de la vía espinotalámica anterior se cruzan en la comisura blanca anterior de la ME, ascienden contra lateralmente y transmiten impulsos de tacto ligero de la piel sin pelo. (Carpenter, 1994).

Se han demostrado (en la rata, el gato y el mono) las proyecciones de la lámina I al tálamo. Así mismo que el tracto espinotalámico en la rata se origina de varias partes de la sustancia gris de la ME y termina en varias regiones del tálamo que incluyen los núcleos VPL, Posterior (Po), mediodorsal, centrolateral y parafascicular. Un estudio reciente, con un marcador anterogrado confirma que las neuronas cervicales superficiales del asta dorsal proyectan al Po y al VPL, y además demostraron una proyección sustancial al núcleo caudado (Gauriau & Bernard, 2004). Sin embargo en otro estudio se indica que la inyección de un trazador retrogrado en el núcleo talámico Po puede marcar la mayoría de neuronas espinotalámicas en la lámina I del asta dorsal, y se sugiere que la mayoría de neuronas espinotalámicas de la lámina I tienen axones que pasan por o cerca del PoT. Algunas de ellas continúan rostralmente para terminar en el VPL y Po, mientras que otras terminan en PoT (Al-Khater, Kerr & Todd, 2008). Esta vía ascendente provee el componente sensorial del dolor (Dickenson & D'Mello, 2008).

Una vez que la información alcanza al diencéfalo (tálamo e hipotálamo), se divide en componentes laterales y mediales que están distribuidos en 3 regiones separadas: el grupo posterior, que tiene que ver con la definición de un estímulo como doloroso, el grupo ventral donde se encuentran el VPL y el VentroPosteroMedial (VPM) talámicos, que tiene que ver con la localización sobre la superficie corporal del estímulo; y los núcleos intralaminares que se relacionan con la elaboración del aspecto afectivo aversivo del estímulo nociceptivo (Albe-Fessard *et al.*, 1985; Carlson, 2006; Purves *et al.*, 2004).

Del tálamo la información nociceptiva es transmitida a regiones corticales. Ahí no existe un centro único de dolor, más bien, hay varias regiones corticales la cuales pueden o no ser activadas durante una experiencia particular de dolor. Estas regiones componen lo que comúnmente es referido como “matriz de dolor” e incluyen las cortezas somatosensorial primaria y secundaria, insular, cingular anterior y prefrontal (Dickenson & D’Mello, 2008).

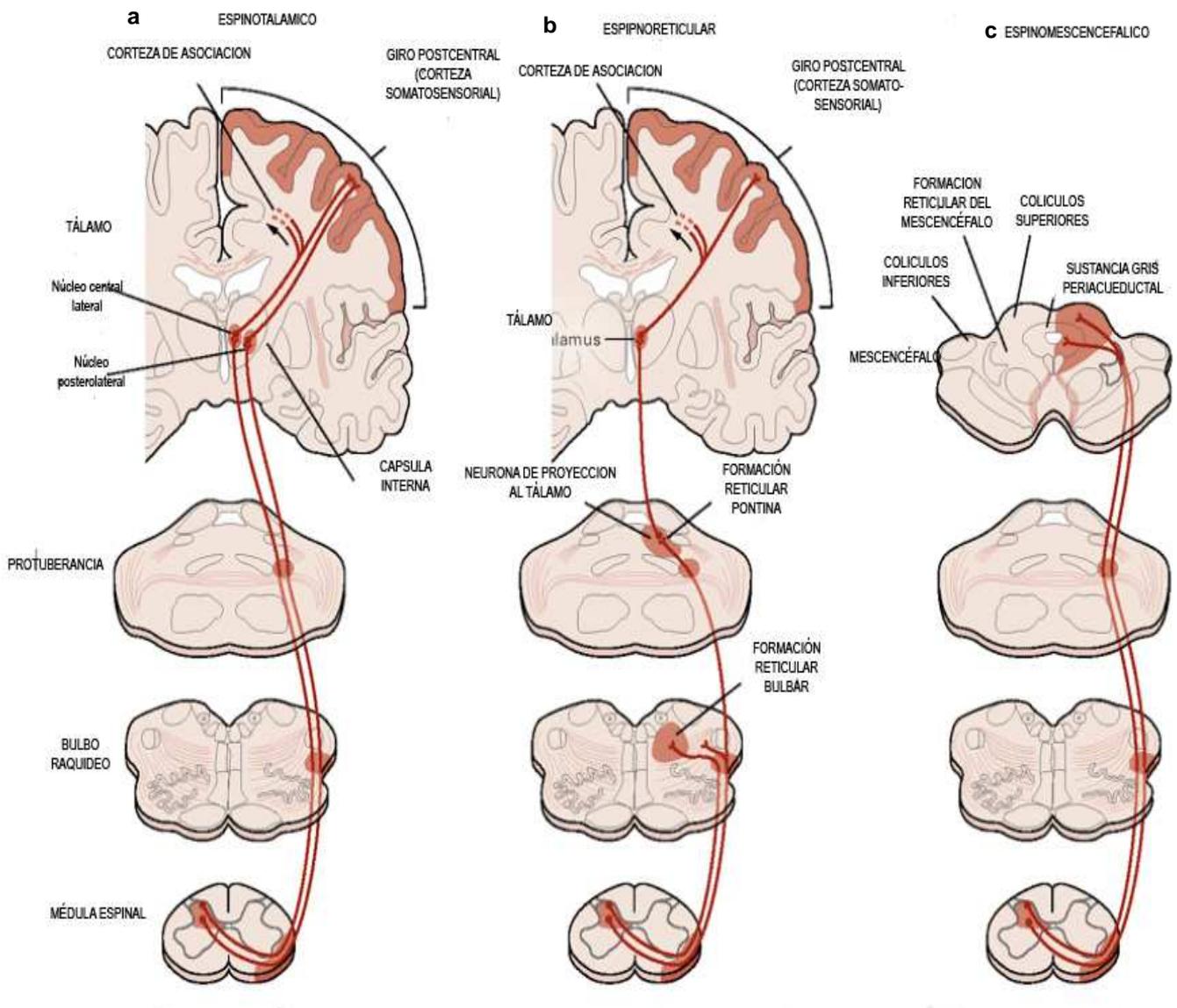


Figura 2. Muestra los tractos a. espinotalámico, b. espinoreticular y c. espinomesencefálico que componen el sistema anterolateral de la ME. (Modificada de Kandel *et al.*, 2000)

## VII. Modulación espinal del dolor

En 1965 Melzack & Wall, propusieron la teoría de la compuerta, en la cual se propone, que un sistema de compuerta modula la entrada sensorial de la piel en la ME antes de que ocurra la percepción de dolor y su respuesta. Así, la estimulación de la piel evoca impulsos nerviosos que son transmitidos a tres sistemas en la ME:

1. Las células en la sustancia gelatinosa en el asta dorsal, y que esta funciona como un sistema de control de compuerta que modula las entradas aferentes antes de que estimulen a las células de transmisión.
2. La columna dorsal de fibras que proyectan al cerebro que actúan como un sistema de control central desencadenante el cual activa selectivamente procesos cerebrales que influyen las propiedades moduladores del sistema de control de compuerta
3. Células de transmisión o proyección en el asta dorsal, que activan mecanismos neurales que comprenden el sistema de acción responsable de la respuesta y percepción del dolor.

Dando lugar a la propuesta que indica que el dolor esta determinado por la interacción de estos tres sistemas. Ver figura 3

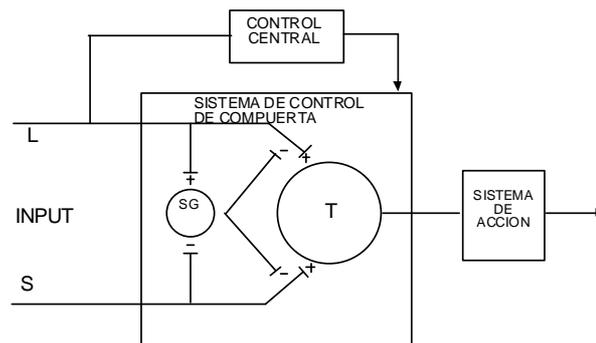


Figura 3. Esquema de la Teoría de la Compuerta. L: fibras de grueso calibre; S: fibras de pequeño calibre; SG: Sustancia Gelatinosa; T: Células Transmisoras (modificado de Melzack & Wall, 1966).

*a. Neuronas de Proyección del asta dorsal*

Las neuronas de proyección comprenden neuronas WDR, NS y N-NOC; y son activados por las entradas sensoriales de las fibras aferentes primarias nociceptivas. Como se mencionó antes, por definición, las neuronas de proyección transmiten información nociceptiva a niveles supraespinales y se encuentran predominantemente en las láminas I, V y VI, y algunas pocas se encuentran en las láminas II y X.

Las neuronas de proyección pueden ser activadas directamente (monosinápticamente) por fibras C, A- $\delta$  y A- $\beta$ , por otro lado pueden ser activadas indirectamente por interneuronas excitatorias (polisináptica) activadas por fibras aferentes periféricas. Por lo que confiere a las neuronas de proyección NS y WDR en las capas superficiales, muchas están directamente inervadas por fibras A- $\delta$  y C, algunas interneuronas excitatorias en la lámina II, cuyos blancos son neuronas de proyección nociceptivas en la lámina I, están involucradas en su acción. Las fibras A- $\beta$  no inervan marcadamente la lámina I y II; es razonable suponer que las interneuronas excitatorias contribuyen a la influencia de las fibras A- $\beta$  en aquellas neuronas WDR y N-NOC localizadas ahí.

Las interneuronas excitatorias pueden además mediar acciones de retroalimentación en las terminales de las fibras aferentes primarias.

Con respecto a las láminas profundas, algunas neuronas WDR y NS en la lámina V reciben una entrada directo de fibras C. Además algunas de estas neuronas de proyección poseen dendritas que proyectan a las capas superficiales permitiendo su activación monosináptica. Sin embargo es ampliamente asumido que muchas neuronas de proyección de las láminas profundas están indirectamente activadas (polisinápticamente) por fibras C vía interneuronas excitatorias en la lámina II o vía procesos de transmisión. Por otro lado, las neuronas WDR y N-NOC de las láminas profundas están directamente inervadas por fibras A- $\beta$ . Esto además de

que las fibras C y A- $\beta$  directamente llegan a ciertas poblaciones de neuronas de proyección (Millan, 1999).

*b. Interneuronas excitatorias en el asta dorsal*

Las interneuronas pueden ser subdivididas en excitatorias e inhibitorias. Aunque ésta subdivisión es útil, debemos tener presente que ciertas clases de interneuronas interactúan con neuronas del asta dorsal intrínsecas y con terminales periféricas y pueden ejercer acciones inhibitorias y excitatorias, mediadas por diferentes mecanismos (Millan, 1999). Un papel importante de las interneuronas excitatorias es transmitir la información de las fibras aferentes primarias. Los transmisores involucrados en mediar las acciones de las interneuronas excitatorias no están completamente caracterizados, es posible que participen los aminoácidos excitatorios y péptidos como neurotensina (Millan, 1999).

*c. Interneuronas Inhibitorias en el asta dorsal*

En contraste, las interneuronas inhibitorias (particularmente la población en la lámina II) están involucradas en la transmisión, integración y modulación de las aferentes primarias inter e intralaminares. Como se discutió anteriormente, las interneuronas excitatorias y las neuronas de proyección forman una red (en serie y son activadas por fibras A $\delta$  y C) y subrayan la transferencia de información nociceptiva de las aferentes primarias a las neuronas de proyección y subsecuentemente a centros supraespinales. En contraste, las interneuronas inhibitorias, juegan un papel modulador limitando el flujo de información nociceptiva. Sin embargo ciertas clases de interneuronas inhibitorias pueden atenuar la actividad de las interneuronas excitatorias, a este respecto hay poca información disponible (Millan, 1999).

Probablemente muchas interneuronas inhibitorias regulan la transmisión nociceptiva innervando directamente neuronas de proyección WDR y NS y las

terminales nociceptivas y no nociceptivas. Así se tienen, mecanismos pre y postsinápticos para la inhibición de las entradas nociceptivas de las aferentes primarias y diferentes tipos neuroquímicos de interneuronas:

Interneuronas inhibitorias colinérgicas: las cuales actúan vía receptores muscarínicos y probablemente nicotínicos localizados en las terminales periféricas aferentes y en neuronas del asta dorsal intrínsecas.

Interneuronas inhibitorias opioides: contienen encefalinas o dinorfinas, las cuales ejercen su acción vía receptores  $\mu$ -,  $\delta$  y  $\kappa$ -opioides.

Interneuronas inhibitorias ácido gamma-amino-butírico (GABA) los cuales actúan vía receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. Los receptores GABA<sub>A</sub> están compuestos por diferentes subunidades organizadas en forma de pentámero para formar un canal permeable al cloro, su activación usualmente hiperpolariza las células. En el SNC hay muchas isoformas heteroméricas del receptor GABA<sub>A</sub>. El receptor GABA<sub>B</sub> esta asociado a una proteína G y reduce e incrementa las corrientes de Ca<sup>++</sup> y K<sup>+</sup>, respectivamente, así hiperpolarizan las neuronas y disminuyen la liberación de transmisores. Existen múltiples subtipos del receptor GABA<sub>B</sub>. Las interneuronas inhibitorias GABAérgicas muestran una variedad de patrones de colocación con muchos otros neurotransmisores involucrados en la modulación de la nocicepción. Esto es, una población GABAérgica colocaliza con acetilcolina, otra con encefalinas y una población adicional con otro neurotransmisor inhibitorio, Glicina, el cual ejerce su acción vía receptores sensibles-estricnina (receptores Glicina<sub>A</sub>). Los receptores de glicina están compuestos por dos unidades que forman un canal iónico pentámero permeable a cloro, su activación hiperpolariza a las neuronas. Son predominantemente postsinápticos a las fibras aferentes primarias, y hay muchas isoformas (Millan, 1999).

Las interneuronas inhibitorias por sí mismas, son blanco de fibras nociceptivas A- $\delta$  y C, así como también de fibras A- $\beta$ . Esto sugiere que las fibras C y A- $\delta$  pueden ejercer una forma de "conteo regulatorio", retroalimentación inhibitoria sobre la

excitación paralela de las neuronas de proyección WDR y neuronas nociceptivas. Consecuentemente el dolor provocado por la estimulación directa de neuronas de proyección de fibras A- $\delta$  y C puede estar limitado por la activación simultánea de interneuronas inhibitorias, al menos cuando la duración de la estimulación nociva es de corta estimulación e intensidad submáxima (Millan, 1999).

Es entonces en la ME donde varias entradas sensoriales y señales nociceptivas convergen y son moduladas. Las neuronas espinales, están bajo control de entradas periféricas, interneuronas y control descendente. Una consecuencia de ésta modulación es que la relación entre el estímulo y la respuesta al dolor no es directa. La respuesta de salida de las células puede ser alterada vía la interacción de varios sistemas de neurotransmisores en la ME, todos los cuales están sujetos a plasticidad y alteraciones, particularmente durante condiciones patológicas (Dickenson & D'Mello, 2008).

### *VIII. Modulación Descendente en el Asta Dorsal*

Las vías descendentes ejercen su modulación vía una interacción con varios elementos neuronales en el asta dorsal: terminales aferentes primarias, neuronas de proyección, interneuronas inhibitorias y excitatorias y terminales de otras vías descendentes. Estas vías descendentes pueden tener efectos facilitadores e inhibitorios (Millan, 1999).

#### *a. Inhibición Descendente*

Las vías descendentes se originan en la Sustancia Gris Periacueductal (PAG), los núcleos del Rafé, entre otras estructuras cerebrales y tienen un papel importante en la modulación e integración de los mensajes nociceptivos en el asta dorsal. Los mayores componentes de estas redes neuronales están compuestos por mecanismos serotoninérgicos, noradrenérgicos, dopaminérgicos (Millan, 1999).

Estas vías descendentes tienen un papel antinociceptivo, es decir, actúan modulando (generalmente reducen) la liberación de neurotransmisores de las terminales nociceptivas (Millan, 1999).

La activación de las vías descendentes puede actuar de diversas maneras sobre las neuronas del asta dorsal: Directamente sobre las neuronas de proyección inhibiendo su respuesta y vía interneuronas excitatorias e inhibitorias.

Ciertos estudios (cf. Millan, 1999) han indicado que las vías descendentes preferencialmente inhiben la excitación de las neuronas WDR a la estimulación nociceptiva comparada con la estimulación inocua. En este sentido hay varios mecanismos posibles que pueden permitir esta interferencia selectiva con las fibras A- $\delta$  y C vs interferencia con A- $\beta$ :

- Inhibir presinápticamente la liberación del transmisor nociceptivo de las fibras A- $\delta$  y C, pero no de A- $\beta$  en las neuronas WDR.
- Inhibir indirectamente la actividad de las fibras A- $\delta$  y C vs A- $\beta$  vía interneuronas inhibitorias que pueden ser GABAérgicas; pueden inhibir la actividad de las interneuronas excitatorias selectivamente innervando a las fibras A- $\delta$  y C pero no las A- $\beta$ .
- Ejercer efectos en neuronas de proyección sobre segundos mensajeros de transducción.
- Tener influencia selectiva sobre neuronas excitatorias WDR por fibras C y A- $\delta$  vs A- $\beta$  que podría ser posible debido a una contigüidad y a que las A- $\beta$  estén separadas (Millan, 1999).

### *b. Facilitación Descendente*

Las vías descendentes no ejercen acciones inhibitorias exclusivamente en el asta dorsal. Es más, los transmisores individuales pueden ejercer acciones múltiples en el asta dorsal en función del tipo de neurona blanco (por ejemplo interneurona inhibitoria vs neurona de proyección) y el receptor activado (receptores serotoninérgicos inhibitorios vs excitatorios). Algunas de estas vías descendentes se originan en diversos centros cerebrales como la corteza y ejercen acciones excitadoras sobre las terminales nociceptivas aferentes primarias, así como también sobre las neuronas intrínsecas del asta dorsal (Millan, 1999).

### *IX. Modulación Central del Dolor*

De las diversas estructuras cerebrales a donde llega la información nociceptiva se envían proyecciones a otras regiones del SNC, ejerciendo sobre ellas una modulación central en este caso particular, de la percepción del dolor, dando lugar al proceso de analgesia. Pero también la acción moduladora se da en todos y cada uno de los relevos sinápticos que hace la información codificada a lo largo de su recorrido por las vías nerviosas. Así se han identificado sistemas de neurotransmisión de proyección descendente al asta dorsal de la ME que regulan la transmisión de la información nociceptiva a centros superiores, es decir, el proceso de dolor y analgesia (Purves *et al.*, 2004).

El sistema descendente de modulación del dolor es una red anatómica bien caracterizada que permite regular el procesamiento del dolor (en gran medida dentro del asta dorsal de la ME) en varias circunstancias para producir ya sea facilitación (pronocicepción) o inhibición (antinocicepción). Investigaciones recientes (cf, Millan, 1999) han demostrado que la excitabilidad de la ME es influenciada directamente por la acción descendente originada en centros

cerebrales y que esta modulación descendente puede ser de naturaleza inhibitoria o facilitadora (Tracey & Mantyh, 2007).

En los circuitos de inhibición del dolor participan diversas estructuras, entre ellas la PAG, los núcleos del Rafe, el lóbulo frontal, la corteza del cíngulo anterior, la corteza insular, la amígdala, el bulbo raquídeo rostromedial, el núcleo cuneiforme y el hipotálamo (Tracey & Mantyh, 2007).

Es indudable que no sólo participan estas estructuras en los componentes señalados, sino es toda una red de interacciones en la que participan más estructuras. En este sentido hay otros sistemas que también producen analgesia como es el sistema hipotálamo espinal que actúa utilizando Oxitocina (OT).

## *X. Hipotálamo*

Las necesidades biológicas primarias de los organismos son en primer lugar asegurar su supervivencia y en segundo su progenie. Para satisfacer estos requerimientos un ser vivo debe coordinar procesos fisiológicos complejos con las condiciones medioambientales y así elaborar las respuestas adaptativas a señales sensoriales específicas. Para lo cual mantener la homeostasis representa un proceso adaptativo muy importante que depende de una integración apropiada de los mecanismos motores, viscerales y somatosensoriales. Para el mantenimiento de la homeostasis el hipotálamo representa un componente biológico clave. El hipotálamo se localiza en la base del encéfalo debajo del tálamo. Controla el sistema nervioso neurovegetativo y el sistema endocrino, organiza conductas relacionadas con la supervivencia de las especies: ingesta, huida, defensa y apareamiento. Adicionalmente, la función del hipotálamo-glándula pituitaria es de suma importancia y tiene conexiones con sistemas ascendentes y descendentes que le permiten interactuar la ME (Carlson, 2006; Paxinos, 1995).

El dolor visto como un sistema homeostático en el que participa el hipotálamo involucra diversos procesos de los que destacan la señalización de alarma para obtener una respuesta apropiada del organismo y que permita mantener la integridad del mismo.

El hipotálamo está dividido en la región preóptica, anterior, tuberal y mamilar. En la parte anterior se localiza el núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) el cual tiene neuronas que proyectan a regiones que contienen neuronas autonómicas preganglionares, así como con la glándula pituitaria, la eminencia media y a diversas regiones del encéfalo (Carlson, 2006; Paxinos, 1995). En el NPV se han identificado dos poblaciones de neuronas OT: neuronas magnocelulares que terminan en la neurohipófisis y neuronas parvocelulares que terminan en varios lugares del SNC, entre ellos la ME (Sofroniew *et al*, 1981; Sawchenko & Swanson, 1982; Gimpl & Fahrenholz, 2001).

#### a. *Vía hipotálamo-espinal*

Mediante la utilización de trazadores retrógrados y técnicas de inmunohistoquímica para la detección de OT se encontró que las fibras descendentes del NPV son ipsilaterales y tienen colaterales a las regiones cervicales y lumbares (Figura 4). Así mismo, esta vía también involucra diferentes neurotransmisores como la vasopresina y orexinas pero es principalmente OT y se ha sugerido que está implicada en funciones autonómicas y en particular se ha mostrado que forma parte de un sistema endógeno difuso involucrado en los procesos de dolor y analgesia (Condés-Lara *et al.*, 2007).

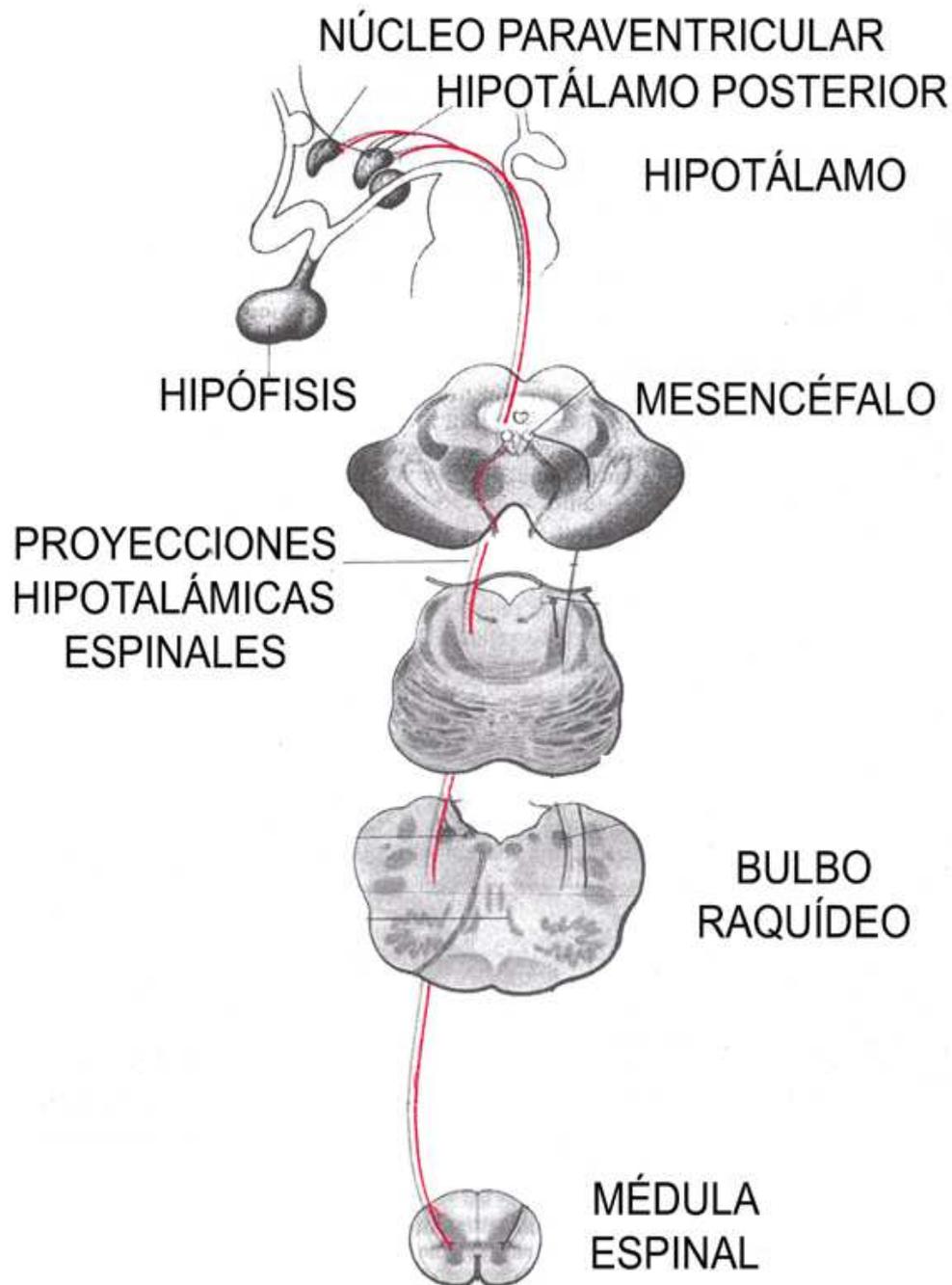


Figura 4. Vía hipotálamo-espinal. Modificado de Carpenter, 1994.

## b. *Oxitocina*

La OT es un nanopéptido constituido por 9 aminoácidos que se relaciona filogenéticamente con la vasopresina. En todas las especies animales, los genes de la OT y la vasopresina están en el mismo locus cromosómico pero se transcriben en direcciones opuestas. Este arreglo genómico podría ser resultado de la duplicación de un gen común ancestral que fue seguido de la inversión de uno de los genes. Los productos peptídicos maduros OT y su molécula transportadora neurofisina, son unidades básicas funcionales. Por un lado, la neurofisina parece estar relacionada con el empaquetamiento y el almacenamiento de la OT antes de ser liberadas de las terminales axónicas al torrente sanguíneo y como neurotransmisor; y con que la OT llegue al blanco correcto (Gimpl & Fahrenholz, 2001).

Las fibras OT y sus terminales se han descrito en varias áreas cerebrales en la rata: el núcleo dorsomedial hipotalámico, corteza entorrinal, núcleo central medial y lateral, amígdala, bulbo olfatorio, núcleo gris central mesencefálico, sustancia negra, locus coeruleus, núcleo del rafé, núcleo del tracto solitario y el núcleo dorsal del vago. Las fibras OT además llegan a la glándula pineal, al cerebelo y muchas de ellas continúan a lo largo de la ME (Gimpl & Fahrenholz, 2001). Se ha encontrado que hay fibras que contienen neurofisina en la región de células neurosecretoras del hipotálamo que proyectan a diversas estructuras del SNC entre ellas la ME, además se ha encontrado que existe una relación estrecha entre neurofisina I y OT. Lo anterior sugiere la posibilidad de que la OT pueda servir como neurotransmisor (Swanson, 1977).

Por otro lado, los receptores de OT están presentes abundantemente en muchas regiones del cerebro: áreas corticales, en el sistema olfatorio, en los ganglios basales, el sistema límbico, el tálamo, hipotálamo, el tallo cerebral y la ME. El receptor de OT tiene 7 dominios transmembranales  $\alpha$ -hélice y están acoplados a una proteína  $G_{q/11}$ , proteínas de unión GTP que promueven la activación de una fosfolipasa C, que da lugar a la generación de inositol trifosfato (IP3) y 1,2

diacilglicerol (DAG). El IP3 desencadena la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  de los almacenes intracelulares, mientras que el DAG estimula proteínas cinasas C, que fosforilan proteínas blanco no identificadas (Gimpl & Fahrenholz, 2001).

Aunado a lo anterior, se ha encontrado una coincidencia en la localización de los receptores OT identificados mediante técnicas de histoautoradiografía y terminales axónicas OT en la ME. Los receptores OT están presentes en las capas superficiales del asta dorsal, la sustancia gris central, Intermedio medial (IMM) e Intermedio lateral (IML) o núcleo sacro parasimpático, en niveles torácicos y lumbares T8-L2 y torácicolumbares y lumbosacros T12-S1 (Reiter *et al.*, 1994). Además observaciones con microscopía electrónica muestran sinapsis OT axodendríticas principalmente con neuronas de las lámina I y II (Rousselot, Merighi, Poulain & Theodosios, 1990). De esta forma se ha demostrado que la proyección descendente llega al asta dorsal de la ME a una localización que correlaciona bien con los sitios de unión de OT, sugiriendo que la OT esta involucrada en las funciones sensoriales y autonómicas (Sawchenko & Swanson, 1982).

### *c. Oxitocina y Dolor*

En los organismos, la OT esta implicada en la regulación de ingesta de alimentos, la conducta materna, el parto, lactancia y recientemente se han reportado efectos analgésicos, en ratón, rata, perro y humanos (Gimpl & Fahrenholz, 2001). Particularmente se ha descrito que el NPV y la OT están involucrados en la modulación del dolor (Condés-Lara *et al.*, 2006; Miranda-Cárdenas *et al.*, 2006; Rojas-Piloni, López-Hidalgo, Rodríguez-Jiménez, Martínez-Lorenzana & Condés-Lara, 2008; Martínez-Lorenzana *et al.*, 2008; Condés-Lara, Martínez-Lorenzana, Rojas-Piloni, Rodríguez-Jiménez, 2008) lo que sugiere un nuevo sistema descendente regulador del dolor que actúa a diferentes niveles del SNC. En este sentido hay evidencia del efecto analgésico de la OT endógena y exógena. En pruebas conductuales en ratas con un modelo de dolor neuropático se ha

observado una disminución significativa en la respuesta de retirada de la pata producida por la administración intratecal de OT indicando un efecto analgésico producido por OT exógena y como resultado de la estimulación eléctrica del NPV, indicando un efecto central analgésico. Así como un bloqueo de los efectos de la estimulación eléctrica del NPV por la previa aplicación intratecal (a los niveles L3-L5 de la ME) de un antagonista de OT, indicando un efecto central analgésico. Por otro lado, también se observa una reducción significativa de las respuestas de retirada de la pata por la estimulación eléctrica del NPV después de la administración intratecal de naloxona, indicando una nula o poca participación de los opioides (Miranda-Cárdenas *et al.*, 2006).

Otro hecho importante es que la estimulación del NPV modifica las concentraciones de OT en plasma, líquido cefalorraquídeo e incrementa la concentración de OT en tejido de ME, teniendo una correlación directa entre la concentración de OT y los efectos analgésicos encontrados en la prueba conductual con filamentos von Frey, frío y calor en la planta del pie en ratas, lo que sugiere la participación de este sistema en la modulación del dolor (Martínez-Lorenzana *et al.*, 2008).

Los efectos de la OT también se han estudiado sobre las neuronas espinales mediante registros electrofisiológicos, en lo que se ha encontrado que la OT puede modificar la tasa de disparo de neuronas espinales *in vivo*, lo que indica que sus receptores son funcionales. Los efectos de la OT sobre el glutamato, que es el principal neurotransmisor excitador de las fibras aferentes primarias, son principalmente inhibitorios, además de ser selectivos y tener especificidad de acción, pues no todas las neuronas que se registran en la ME responden a OT lo que sugiere que actúa sobre una población particular (Condés-Lara *et al.*, 2003). Además en registros de cultivos de neuronas se ha encontrado un subconjunto de neuronas del asta dorsal que poseen receptores OT, la activación de los cuales facilita los receptores tipo AMPA, que median la transmisión sináptica glutamatergica mediante un mecanismo presináptico (Young-Hwan, Stoeckel, Freund-Mercier, & Schlinder, 1998). En concordancia con esto, un estudio en

rebanadas mostró que solo una subpoblación de neuronas glutamatérgicas posee receptores funcionales a OT los cuales facilitan la liberación sináptica de glutamato. Esa subpoblación de neuronas glutamatérgicas excitan una gran población de interneuronas GABAérgicas, resultando en un incremento generalizado de la inhibición sináptica en la lámina II; lo que sugiere que la OT indirectamente inhibe la transmisión sensorial en neuronas del asta dorsal excitando interneuronas espinales inhibitorias GABAérgicas. (Breton, Vinante, Uhl-Bronner, Vergnano, Freund-Mercier, Schlilchter, & Poisbeau, 2008)

Aunado a esto se ha encontrado que la estimulación eléctrica del NPV tiene diversos efectos en las neuronas espinales registradas en las láminas III-V. Por un lado, reduce las respuestas neuronales nociceptivas sin afectar las respuestas no nociceptivas, es decir, inhibe selectivamente las respuestas de las fibras A- $\delta$  y C en neuronas WDR y no afecta la activación de las fibras A- $\beta$ , lo que sugiere que la inhibición causada por la vía descendente OT ocurre a nivel presináptico; la magnitud de la inhibición está relacionada con la intensidad, duración e intervalo de tiempo entre la estimulación del NPV y el campo receptivo de la neurona espinal (Condés-Lara *et al.*, 2008).

Además cuando se estimula el NPV se ha mostrado que diferentes poblaciones celulares se activan. Por un lado, una población se activa que no tiene relación con la estimulación en el campo receptivo de la neurona espinal y por otro lado, otra población se inactiva, indicando la posible existencia de interneuronas inhibitorias. Debido a que los efectos de la estimulación del NPV pueden ser bloqueados por la administración de bicuculina, se genera la posibilidad de que una interneurona GABAérgica pudiera estar mediando los efectos de la OT. (Rojas-Piloni *et al.*, 2007; Condés-Lara *et al.*, 2009), dado que diversos estudios han implicado al GABA en la inhibición de la transmisión de la información nociceptiva en el asta dorsal y que las neuronas GABAérgicas de la ME han sido descritas predominantemente en la lámina I – II donde inhiben la información

nociceptiva actuando a nivel presináptico y postsináptico. Todo esto y dada esta ubicación que corresponde a la localización de las fibras y receptores OT se refuerza la idea de que la OT pudiera ejercer sus efectos mediante una interneurona GABAérgica (Rojas-Piloni, 2007).

De la misma forma, las respuestas electrofisiológicas a estímulos nociceptivos registrados en neuronas identificadas que proyectan por el sistema espino-talámico al núcleo VPL y el sistema postsináptico de las columnas dorsales, son moduladas por la activación de la vía oxitocinérgica hipotálamo espinal (Rojas-Piloni *et al.*, 2008). Las neuronas espinotalámicas clásicamente están implicadas en la transmisión de información cutánea nociceptiva (Carpenter, 1994). Se ha encontrado que las neuronas WDR y todas las neuronas nociceptivas proyectan al VPL, no así las neuronas N-NOC. Las respuestas nocivas evocadas en todas las neuronas de proyección al VPL fueron inhibidas después de la estimulación ipsilateral del NPV (Rojas-Piloni *et al.*, 2008).

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

Estudios recientes sugieren que la participación de la parte parvocelular del NPV sobre neuronas espinales forma parte de un sistema endógeno inhibitorio del dolor. No obstante los elementos que participan en el mecanismo descendente de inhibición no se conocen en su totalidad. El propósito de este estudio es contribuir desde un punto de vista neuroanatómico en la descripción de los elementos de este circuito que participan a nivel de la ME, estableciendo la localización de las neuronas espinales que proyectan al VPL y su posible interacción con interneuronas GABAérgicas, terminales OT y fibras aferentes primarias. Utilizando técnicas de inmunofluorescencia, de trazado de vías y de microscopia confocal con la intención de visualizar las interacciones descritas.

De tal forma que se pueda describir neuroanatómicamente un circuito celular implicado en la modulación y procesamiento de la información nociceptiva a nivel de los diversos componentes de la ME.

## **CAPÍTULO 4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **I. OBJETIVOS**

#### **a. OBJETIVO GENERAL**

Identificar mediante triple marcaje las posibles interacciones entre las interneuronas GABAérgicas, terminales oxitocinérgicas y terminales aferentes primarias en las capas superficiales del asta dorsal de la ME, mediante microscopia confocal.

#### **b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Trazar las neuronas de la vía espino-talámica particularmente al VPL, mediante el trazador neuronal retrógrado FG y caracterizar la localización de estas neuronas en el asta dorsal a nivel del segmento lumbar de la ME, mediante microscopia de fluorescencia.
  
- 2) Identificar con triple marcaje las posibles interacciones entre las interneuronas GABAérgicas, terminales oxitocinérgicas y terminales aferentes primarias con neuronas espinales de proyección al VPL en las capas superficiales del asta dorsal de la ME. Mediante anticuerpos contra el Transportador Vesicular de Glutamato (VGLUT1) como marcador de fibras aferentes primarias que contienen glutamato; para las interneuronas GABAérgicas con anticuerpos contra GABA y para la detección de terminales OT por medio de anticuerpos OT-neurofisisina; mediante microscopia confocal.

## II. HIPÓTESIS

1. El sistema NPV-OT actúa inhibiendo selectivamente la actividad evocada de fibras A- $\delta$  y C en neuronas de proyección espinotalámicas presinápticamente, de acuerdo a los resultados obtenidos mediante técnicas electrofisiológicas, farmacológicas y conductuales. Se propone que el mecanismo es el siguiente y se esquematiza en la figura 5 :
  - a. mediante una interneurona de tipo GABAérgica que actúan sobre las fibras aferentes primarias.
  - b. directamente sobre las aferentes primarias
2. La OT ejerce su acción inhibiendo selectivamente la actividad evocada de fibras A- $\delta$  y C postsinápticamente.

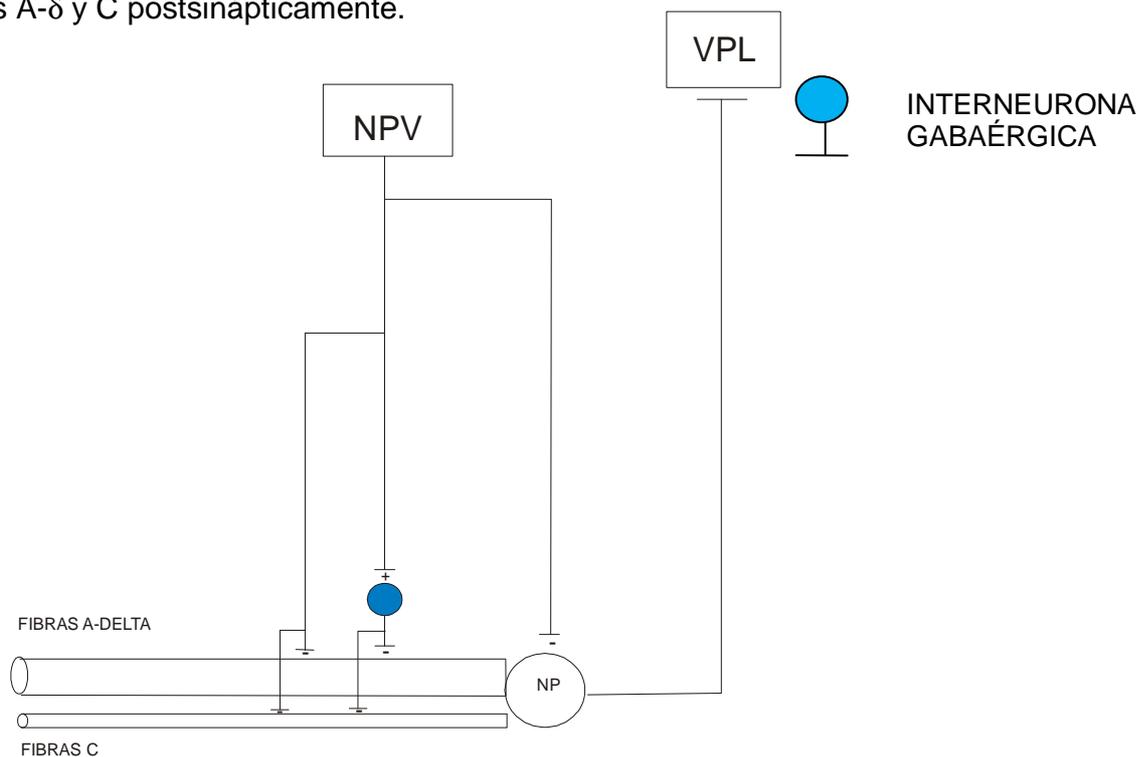


Figura 5. Posible mecanismo de acción analgésica del sistema NPV-OT en la ME. NP: Neurona de proyección; VPL: núcleo Ventroposterolateral Talámico; NPV: núcleo paraventricular hipotalámico.

## CAPÍTULO 5. MÉTODO

Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a las normas del Comité de Bio-ética del Instituto de Neurobiología y a los lineamientos para experimentación en animales de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) (Zimmerman, 1983).

### *Sujetos*

Se utilizaron 5 ratas Macho Wistar con peso de 280-300 gramos con agua y alimento *ad libitum*, y se mantuvieron en un ciclo luz – oscuridad (12-12 hrs), con temperatura (23°C +/- 1°C) y humedad controladas.

### *Inyección de trazador neuronal retrogrado FG*

Para la inyección del trazador neuronal retrogrado Fluoro-Gold (FG), con el animal previamente anestesiado con ketamina/xilacina (70/6 mg/kg, i.p), se colocó en un aparato estereotáxico. Se expuso el cráneo y se realizó un trépano en las coordenadas Antero Posterior 5.70 mm; Lateral derecho 3.10 mm; altura 3.40mm de acuerdo al atlas de Paxinos & Watson, 1998 para localizar el VPL. La inyección del trazador se realizó por el método de presión manual, con una micropipeta de borosilicato unida a una jeringa Hamilton acoplada a un vernier manual y todo esto acoplado a una torre milimétrica de estereotáxico.

La inyección se hizo conforme el siguiente procedimiento: Primero se llenó la micropipeta con petrolato con el fin de sacar el aire, posteriormente se tomaron 30nl de pontamina la cual sirvió como indicador visual de la inyección del FG, seguido de 30nl de petrolato y finalmente 60nl de FG. Una vez completado este proceso, se inyectó el trazador en 3 diferentes profundidades (h= 3.2, 3.4 y 3.6) con el fin de abarcar todo el núcleo, la pipeta se dejó por 15 seg en la última posición después de este tiempo se retiró la pipeta, se colocó cera para hueso en el trepano y se procedió a suturar piel y músculo con hilo quirúrgico estéril.

A los animales operados se les dio un período de sobrevivencia de 13 días, para que se realizara el transporte del trazador. Posterior a este tiempo, los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico y se fijaron por perfusión intracardíaca con solución salina 0.9%, seguida de solución fijadora (paraformaldehído 4% en Buffer Fosfatos (BF) 0.1M pH 7.4). Posteriormente se extrajeron el cerebro y la ME (segmentos lumbares); y se colocaron en la solución fijadora. Se les dio un periodo de post fijación de 2h y posterior a este se colocaron en solución de sacarosa al 30% en BF.

Para la verificación del sitio de inyección en el VPL se realizaron 5 series de cortes coronales de cerebro cada 200  $\mu\text{m}$  con un espesor de 40  $\mu\text{m}$  por corte, en un micrótomó de congelación. La serie 1 se montó inmediatamente en portaobjetos gelatinizados, se procedió a deshidratar utilizando alcoholes (70%, 80%, 96%, 100%,) y aclarar (Xilol). La serie 2 se monto y proceso con violeta de cresilo, con la finalidad de verificar el sitio de inyección. Las series 3 y 4 se almacenaron en buffer fosfatos 0.1M, pH 7.4 (diluido 1:3 en agua destilada) a una temperatura de 4°C para reserva.

Por otro lado, con los segmentos lumbares de la ME se hicieron 4 series cada 400  $\mu\text{m}$  con cortes de 100  $\mu\text{m}$  de espesor en un vibratomo ó 4 series cada 200 $\mu\text{m}$  de cortes con un espesor de 50  $\mu\text{m}$ , en un micrótomó de congelación. Los cortes fueron depositados en Buffer Fosfatos Salino (PBS), 0.1M, pH 7.4 (diluido 1:3 en agua destilada), y almacenados a 4°C para su posterior procesamiento con inmunofluorescencia, violeta de cresilo o para cuantificar y localizar las neuronas de proyección al VPL.

#### *I. Inmunofluorescencia para OT, GABA, VGLUT1 y VGLUT2*

Para realizar la inmunofluorescencia se seleccionó la serie 1 de los cortes ME y se almacenaron en PBS para proseguir con la incubación.

Para la incubación de los cortes en los anticuerpos, se utilizó el kit de inmunodetección Vector M.O.M. que permite detectar dos o más anticuerpos monoclonales de ratón, ya que se contaba con dos anticuerpos monoclonales anti-ratón GABA y OT. Se procedió de la siguiente manera:

1. Los cortes se incubaron por 1 hora en suero de cabra y en la solución de trabajo de M.O.M. Mouse Ig Blocking Reagent (Agente Bloqueante Ratón Ig).
2. Lavado de los cortes: Un lavado de 5 minutos en PBS
3. Incubación de los cortes durante 5 minutos en la solución de trabajo M.O.M. diluyente, y se retiró el exceso de líquido.
4. Primera incubación con el anticuerpo primario para OT y VGLUT1 por 24h: se diluyó el anticuerpo primario en la solución M.O.M. diluyente a una concentración de [1:250] anti-OT desarrollada en ratón y [1:5000] anti-VGLUT1 desarrollado en conejillo de indias.
5. Lavado de los cortes, un lavado de 5 minutos en PBS.
6. Incubación con el anticuerpo secundario por 24h con Fluoresceina Avidina DCS a la concentración indicada en el kit M.O.M. y Alexa 647 Cabra anti-conejillo de indias [1:300].
7. Lavado de los cortes durante 5 minutos
8. Incubación de los cortes por una hora en la solución de trabajo M.O.M.
9. Lavado de los cortes durante 5 minutos en PBS.
10. Los cortes se incubaron durante 20 minutos en la solución de trabajo M.O.M. diluyente y se retiró el exceso de líquido.
11. Segunda incubación de anticuerpo primario para GABA y VGLUT2 por 24h: se diluyeron los anticuerpos primarios a las concentraciones: anti-GABA

desarrollado en ratón [1:500] y anti-VGLUT1 desarrollado en conejo [1:2000] en M.O.M. diluyente.

12. Lavado de los cortes durante 5 minutos en PBS.

13. Se aplicó la solución de trabajo de M.O.M. Reagente Biotinilado antiratón Ig por 10 minutos.

14. Lavado de los cortes durante 5 minutos en PBS.

15. Incubación anticuerpo secundario por 24h: aplicar Rojo Texas Avidina DCS a la concentración que indica el kit y Alexa 350 cabra anti-conejo [1:300] en 2.5ml de PBS.

16. Lavado de los cortes durante 5 minutos en PBS.

17. Montado de los cortes en un portaobjetos gelatinizado y utilizando como medio de montaje Vectashield

## *II. Inmunofluorescencia para OT, GABA Y VGLUT1*

Para la inmunofluorescencia se seleccionó la serie 2 de cortes de ME, los cuales se almacenaron en PBS a 4°C.

Se procedió a retirar el PBS y a preincubar los cortes en suero de cabra al 5% en PBS tritón por 20 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo se quitó el exceso de líquido de suero.

Incubación del anticuerpo primario OT, GABA Y VGLUT1 por 24h a 4°C: los anticuerpo primarios se diluyeron en 5ml de PBS a las siguientes concentraciones: anticuerpo primario anti-OT desarrollada en ratón proporcionada por Dr. H. Gainer [1:250], anti-GABA desarrollada en conejo, Sigma [1:2000], anti-VGLUT1 desarrollada en conejillo de indias Chemicon [1:5000].

Se realizó un lavado de 5 minutos en PBS 0.1M.

Incubación del anticuerpo secundario por 24h a 4°C: Alexa 488 cabra anti-ratón [1:300], Alexa 647 cabra anti-conejo [1:300] y Alexa 555 cabra anti-conejillo de indias [1:300]

Lavado de los cortes por 5 minutos en PBS

Montado de los cortes en un portaobjetos gelatinizado y utilizando como medio de montaje glicerol 1:1 con PB

### *III. Inmunofluorescencia para NeuN*

Se utilizó el kit MOM, siguiendo los pasos que se indicaron arriba. El anticuerpo primario utilizado fue anti-NeuN desarrollado en ratón 1:1000 y el anticuerpo secundario Fluoresceína Avidina DCS a la concentración indicada en el kit M.O.M.

### *IV. Análisis Histológico*

Para cuantificar las neuronas positivas a FG se utilizó un microscopio Leica DMLB con un sistema de fluorescencia acoplado utilizando el filtro UV y una cámara digital Leica DFC320 a color, para la obtención de imágenes.

Para verificar el sitio de inyección se utilizó un microscopio Leica DMLB óptico.

Para la inmunofluorescencia, los cortes fueron observados en un microscopio confocal invertido Zeiss LSM 510 Meta que cuenta con 4 láseres: un Argon/2 que trabaja con 4 longitudes de onda, 458, 477, 488 y 515nm que se utilizó para detectar el anticuerpo secundario Alexa 488, un DPSS de 561nm que se utilizó para detectar el anticuerpo secundario Alexa 555, un HeNe de 633nm que se utilizó para detectar el anticuerpo secundario Alexa 647; y finalmente un mecanismo multifotónico coherent-XR entonable que trabaja desde el rango UV al Infrarojo.

## CAPÍTULO 6. RESULTADOS

Los sitios de inyección con el trazador retrógrado FG en todos los animales se localizó en el núcleo VPL Talámico derecho como lo señala la flecha en la figura 6.

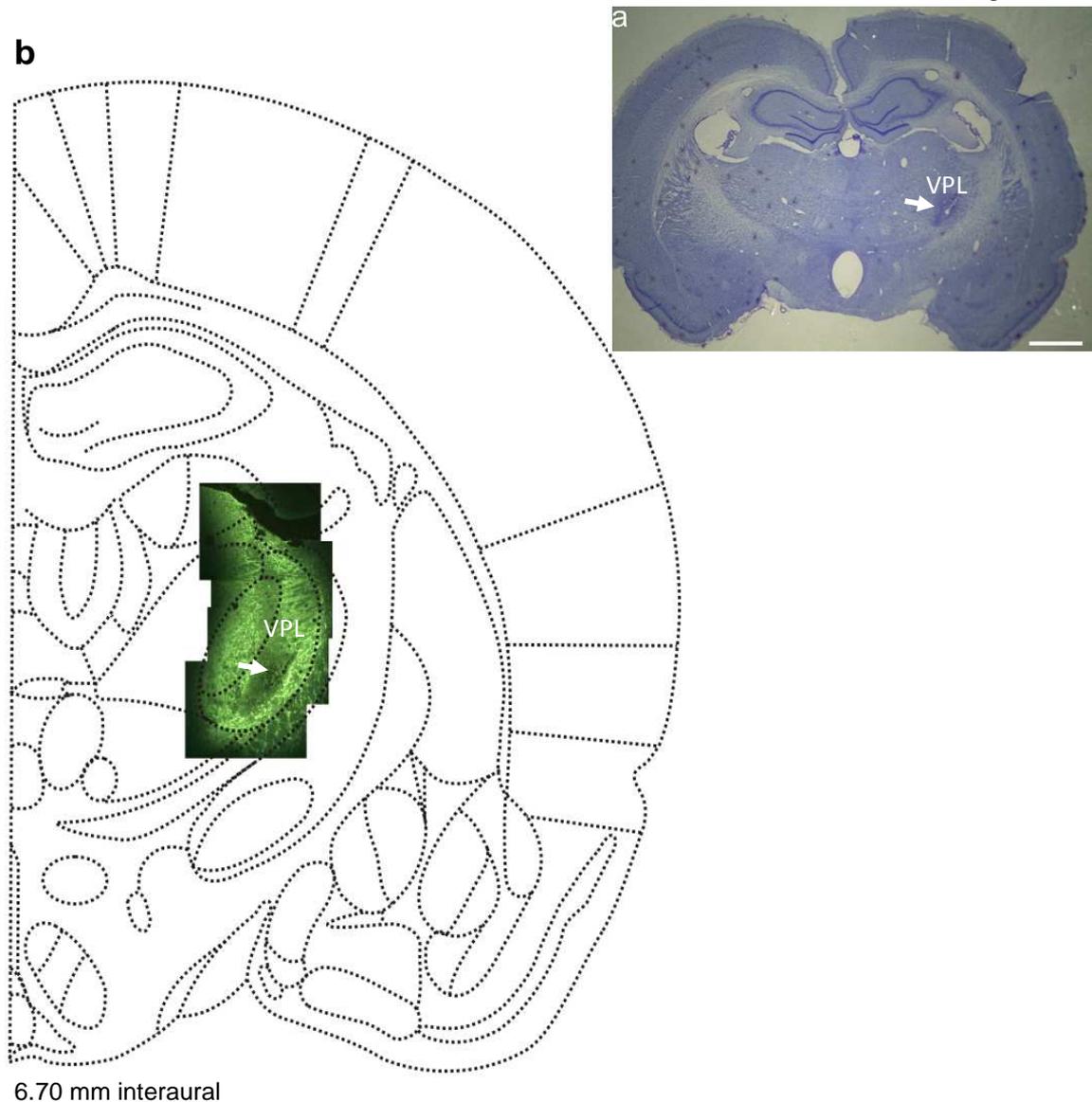


Figura 6. Sitio de inyección. En **a** se muestra una fotomicrografía de un corte coronal de cerebro teñido con violeta de cresilo en el que se observa el sitio de inyección en el VPL derecho, la barra de calibración equivale a 20mm. En **b** se muestra una reconstrucción fotográfica del sitio de inyección del VPL talámico, tomadas mediante fluorescencia utilizando el filtro UV a un aumento de 50X. Abreviación: VPL: núcleo Ventroposterolateral talámico. La flecha señala el sitio de inyección en ambos casos.

## I. *Localización de neuronas espinotalámicas*

Mediante el análisis de los cortes histológicos se pudo establecer la localización de neuronas positivas FG que proyectan desde el segmento lumbar de la ME (L1-L5) al VPL. La localización de los cuerpos celulares se ubicó principalmente en las láminas III-VI del asta dorsal contralateral al sitio de inyección. Únicamente se encontraron dos neuronas positivas FG en la lámina I (zona marginal), teniendo en total 105 neuronas FG positivas.

La morfología y orientación de éstas neuronas fue variada, sin embargo cabe resaltar que algunas neuronas mostraron tener proyecciones que llegaban o provenían desde las capas superficiales (I, II y III).

En la Figura 7, se observan 6 ejemplos de neuronas espinotalámicas que se localizaron en las láminas III-IV.

## II. *Distribución de VGLUT 1, OT Y GABA en el asta dorsal de la ME*

El objetivo principal de este trabajo fue establecer los diferentes tipos de interacciones entre el VGLUT1 (transportador vesicular del glutamato, el cual se ha descrito que se encuentra en las fibras aferentes primarias), OT (oxitocina, que se genera en el NPV y se describe como un neuromodulador o neurotransmisor inhibitorio de las fibras que conducen la información del dolor) y el GABA (aminoácido con funciones inhibitorias).

Los resultados muestran que la inmunofluorescencia para VGLUT1 se detectó mediante el anticuerpo secundario alexa 555 y se observó como un punteo en color rojo que se distribuyó densamente de la lámina II a la lámina VI del asta dorsal de la ME, OT se detectó mediante el anticuerpo secundario alexa 488 y se observó un punteo de color verde que se distribuyó en las capas superficiales con mayor densidad y en las láminas V y VI con menor densidad. En cuanto a GABA,

la distribución de neuronas con marcaje inmunofluorescente se detectó con el anticuerpo secundario alexa 647 y se localizaron en las láminas I-III principalmente (Figura 8).

### III. *Interacciones OT- VGLUT1, OT-GABA Y VGLUT1-GABA*

Para analizar las interacciones en el asta dorsal de la ME se observaron las imágenes obtenidas mediante microscopia confocal (ver Método) a un aumento de 100x utilizando la proyección tridimensional (Figura 9, 10 y 11). En la figura 10 se observa el ejemplo de una interacción OT-VGLUT1 y en la figura 11 un ejemplo de una interacción OT-GABA. Para realizar el análisis, el asta dorsal se dividió en tres campos: MEDIAL, INTERMEDIO Y LATERAL; se contabilizaron las interacciones OT-VGLUT1, OT-GABA y VGLUT1-GABA en cortes de los segmentos lumbares desde L1 a L5 (figura 12).

Las interacciones OT-VGLUT1 en todos los segmentos lumbares correspondieron del 70% al 90% del total de interacciones encontradas en este estudio. Las interacciones OT-VGLUT1 se distribuyeron diferencialmente a lo largo del segmento lumbar. En el campo 1 el mayor número de interacciones se localizó en L2. En el campo 2 se localizaron en L1, L4 y L5. En el campo 3 la mayor densidad de interacciones se localizó en L1, disminuyendo esta gradualmente rostrocaudalmente a lo largo del segmento lumbar (figura 12).

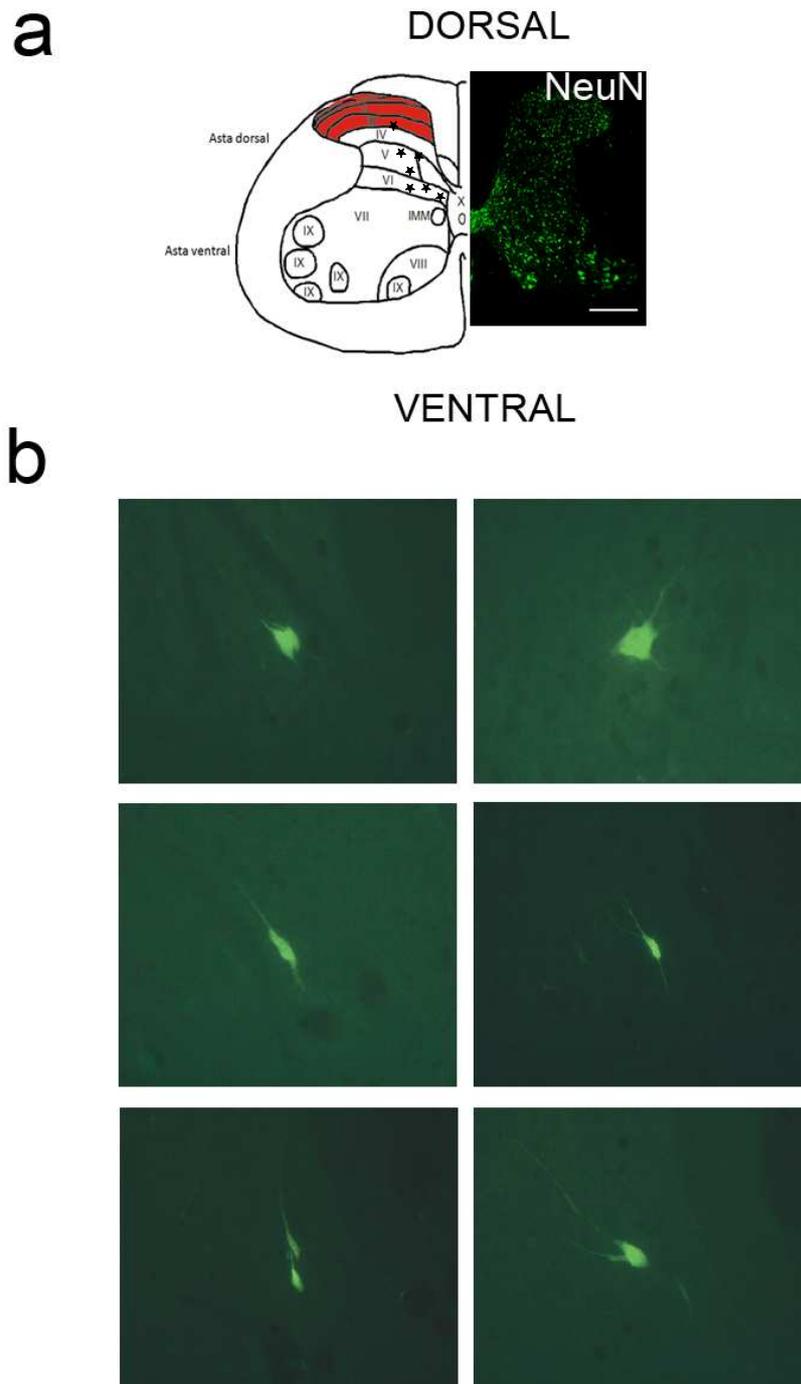


Figura 7. **a** Del lado derecho se muestra una imagen de microscopia confocal en la que se muestra un corte histológico de la ME y su proyección a partir de 100 cortes de 1  $\mu$ m. Esta imagen ilustra la localización de neuronas en el nivel L4. Esta imagen fue realizada utilizando NeuN (anticuerpo específico contra la proteína nuclear neuronal), con la finalidad de mostrar la distribución neuronal en la ME barra de calibración= 200 $\mu$ m. Del lado izquierdo se esquematiza la localización de las neuronas de proyección espinotalámicas FG positivas al VPL ★ en las láminas III-VI. **b** fotomicrografías mediante microscopia de fluorescencia a un aumento de 200X que ilustra la morfología de neuronas espinotalámicas y se observa que envían proyecciones a capas superficiales. Abreviatura: NeuN: Proteína Nuclear Neuronal Específica; VPL: núcleo Ventroposterolateral talámico.

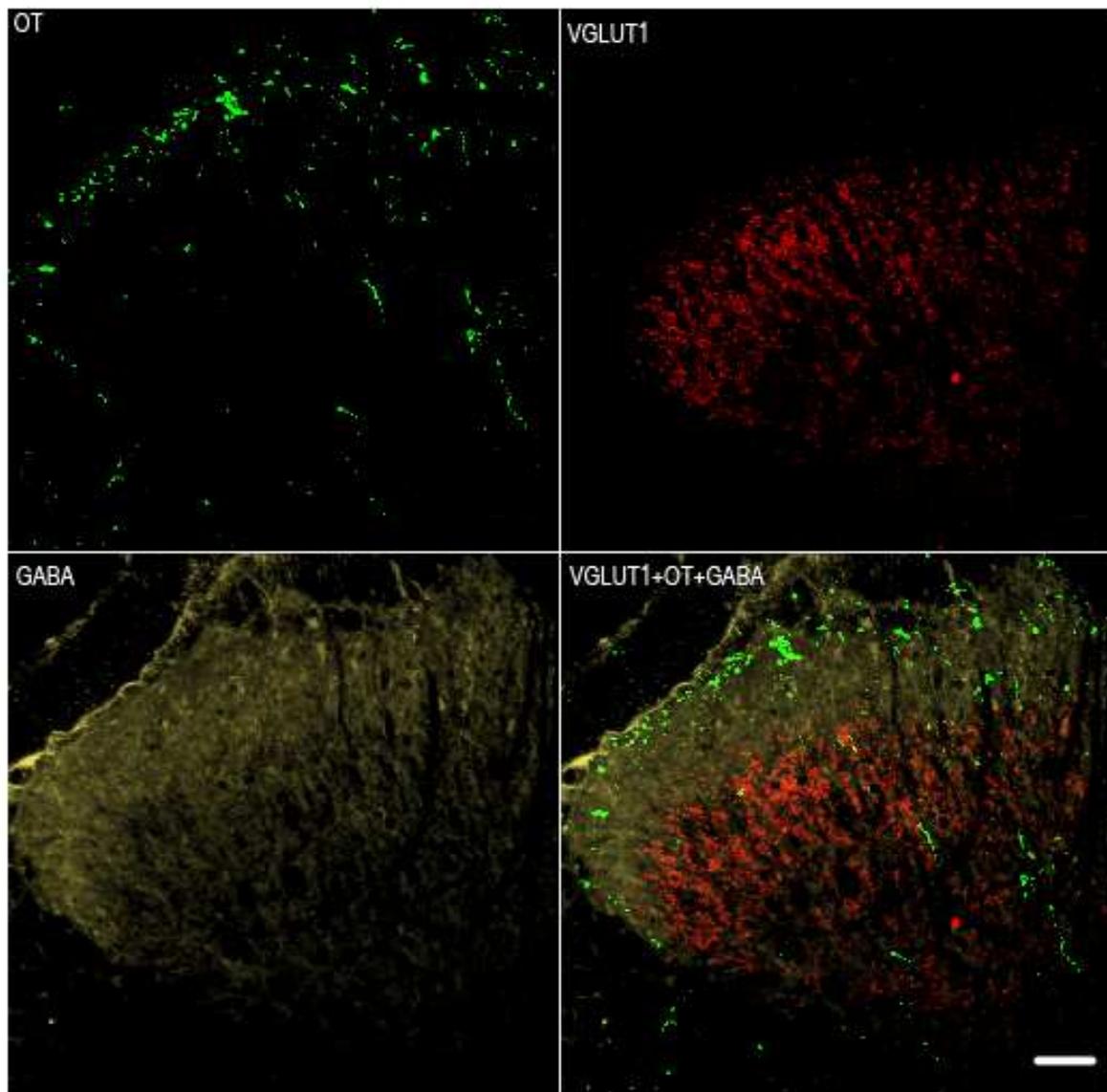


Figura 8. Fotografías en microscopia confocal donde se muestran las proyecciones de 40 cortes de  $1\mu\text{m}$ , en la que se puede observar la distribución laminar de OT, GABA, VGLUT1, en el asta dorsal de la ME (L2). Barra de escala =  $50\mu\text{m}$

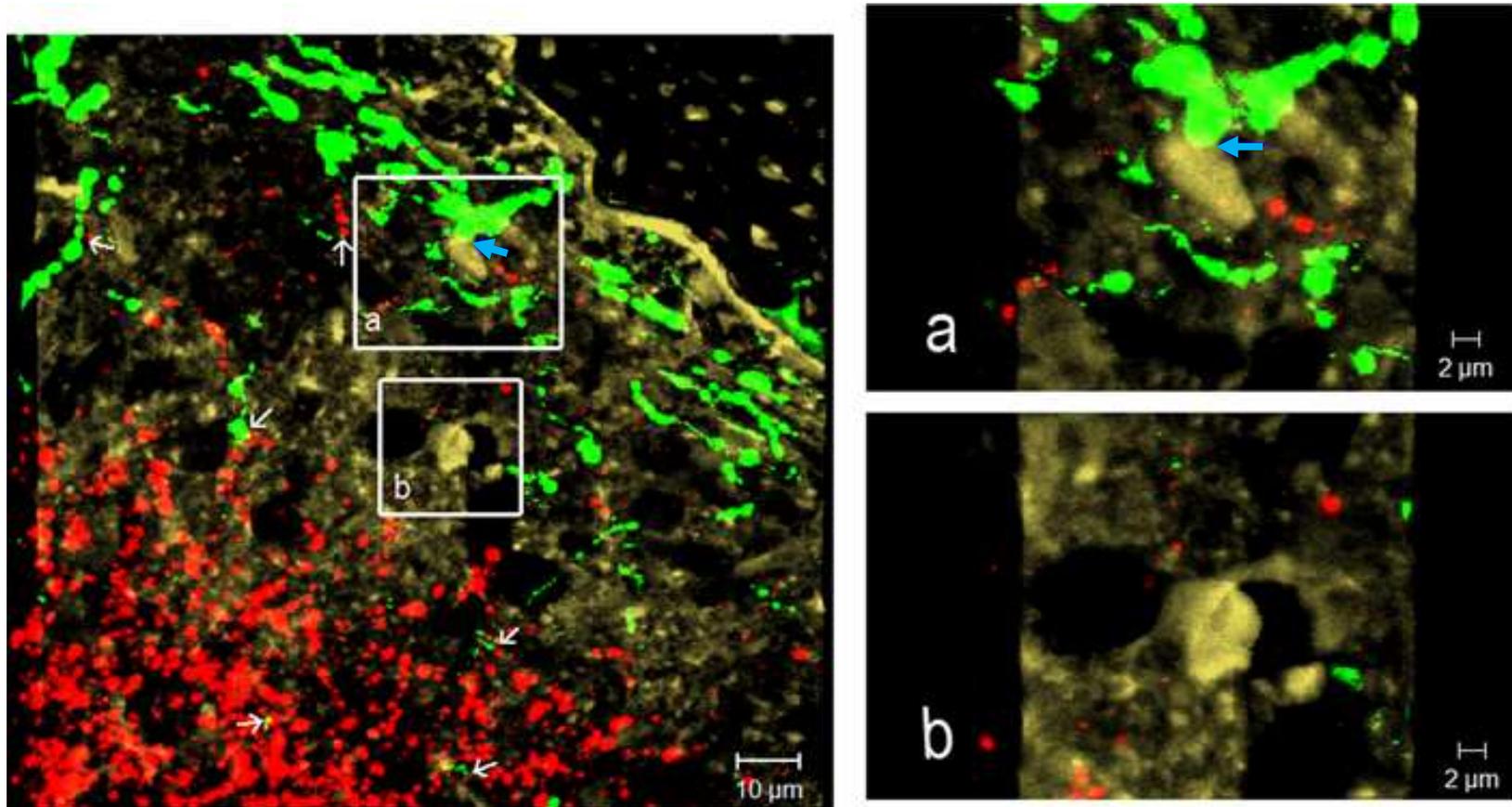


Figura 9. Fotomicrográficas de microscopia confocal en tercera dimensión de 50 cortes de 1 $\mu$ m que ilustra las interacciones en las capas superficiales del asta dorsal, las flechas blancas señalan interacciones OT-VGLUT1 y la flecha azul ilustra la interacción OT-GABA. **a** ilustra un acercamiento de interacción entre una fibra OT y una interneurona GABAérgica. **b** ilustra un acercamiento de una interneurona GABAérgica que no muestra interacción con OT o VGLUT1.

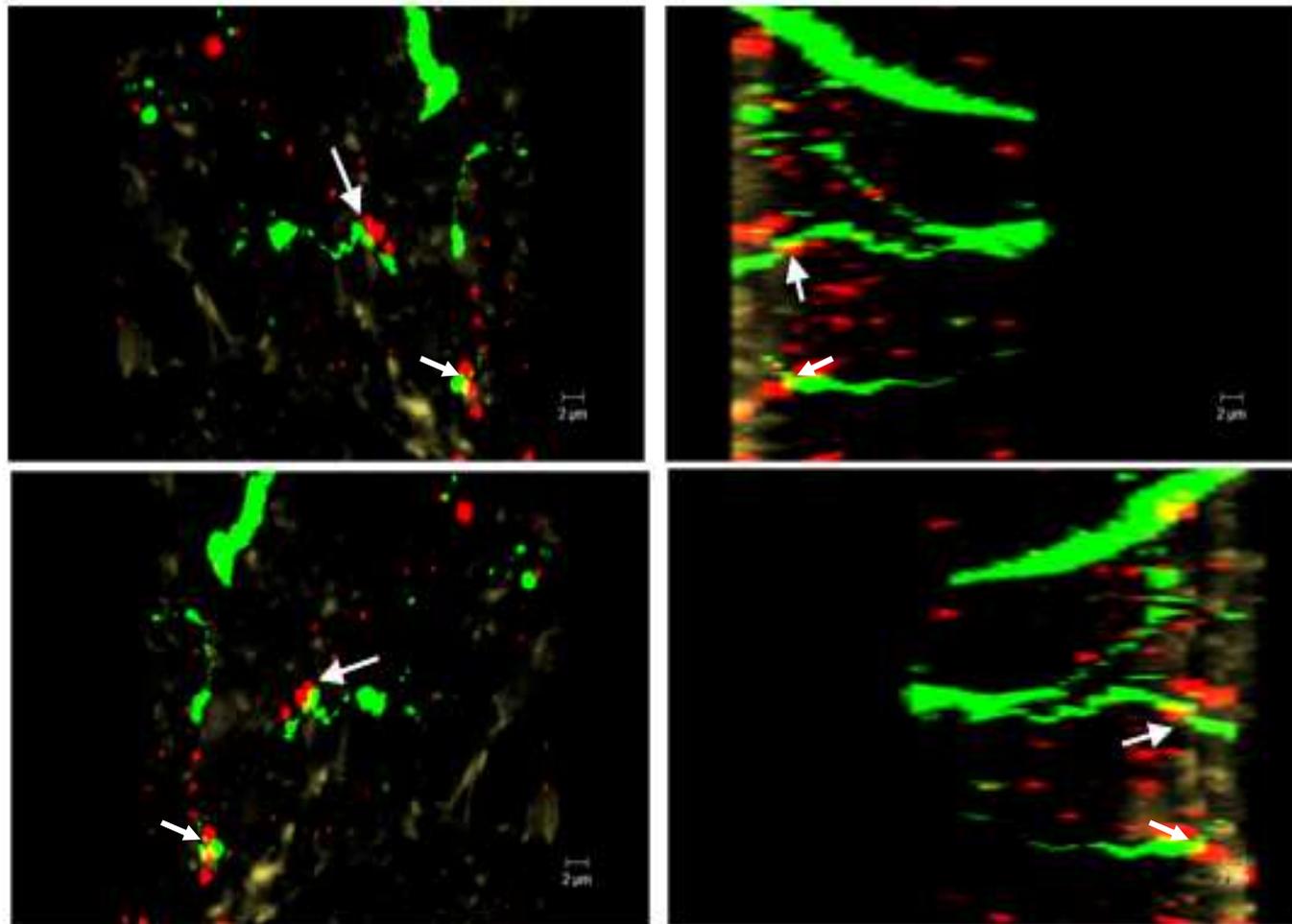


Figura 10. Reconstrucción tridimensional de microscopía confocal de 50 cortes de 1μm. La flecha blanca ilustra la interacción OT-VGLUT1 a diferentes ángulos.

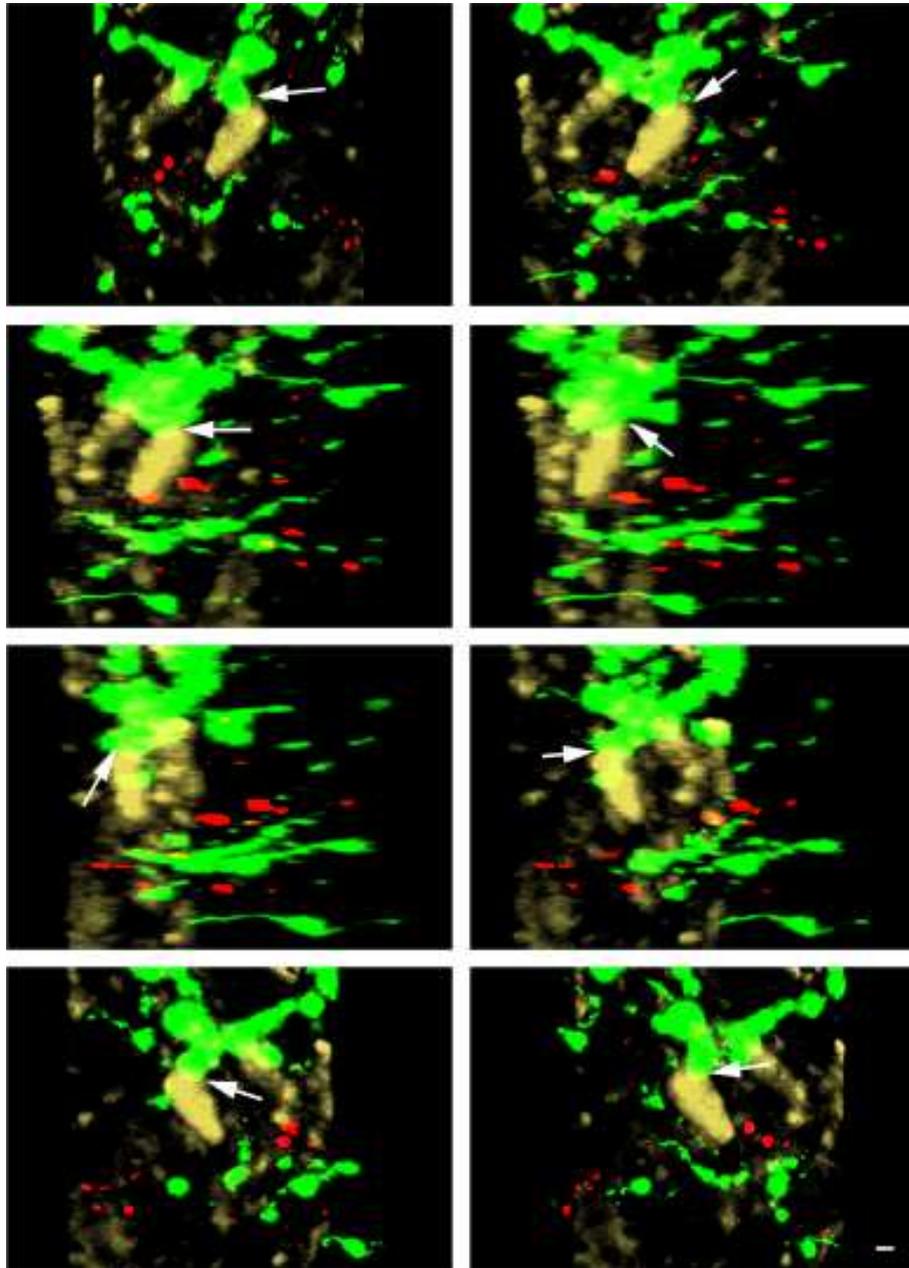


Figura 11. Reconstrucción tridimensional de microscopía confocal de 50 cortes de  $1\mu\text{m}$ . La flecha blanca señala una interacción OT-GABA, la cual se muestra en diferentes ángulos. Barra de escala =  $2\mu\text{m}$ .

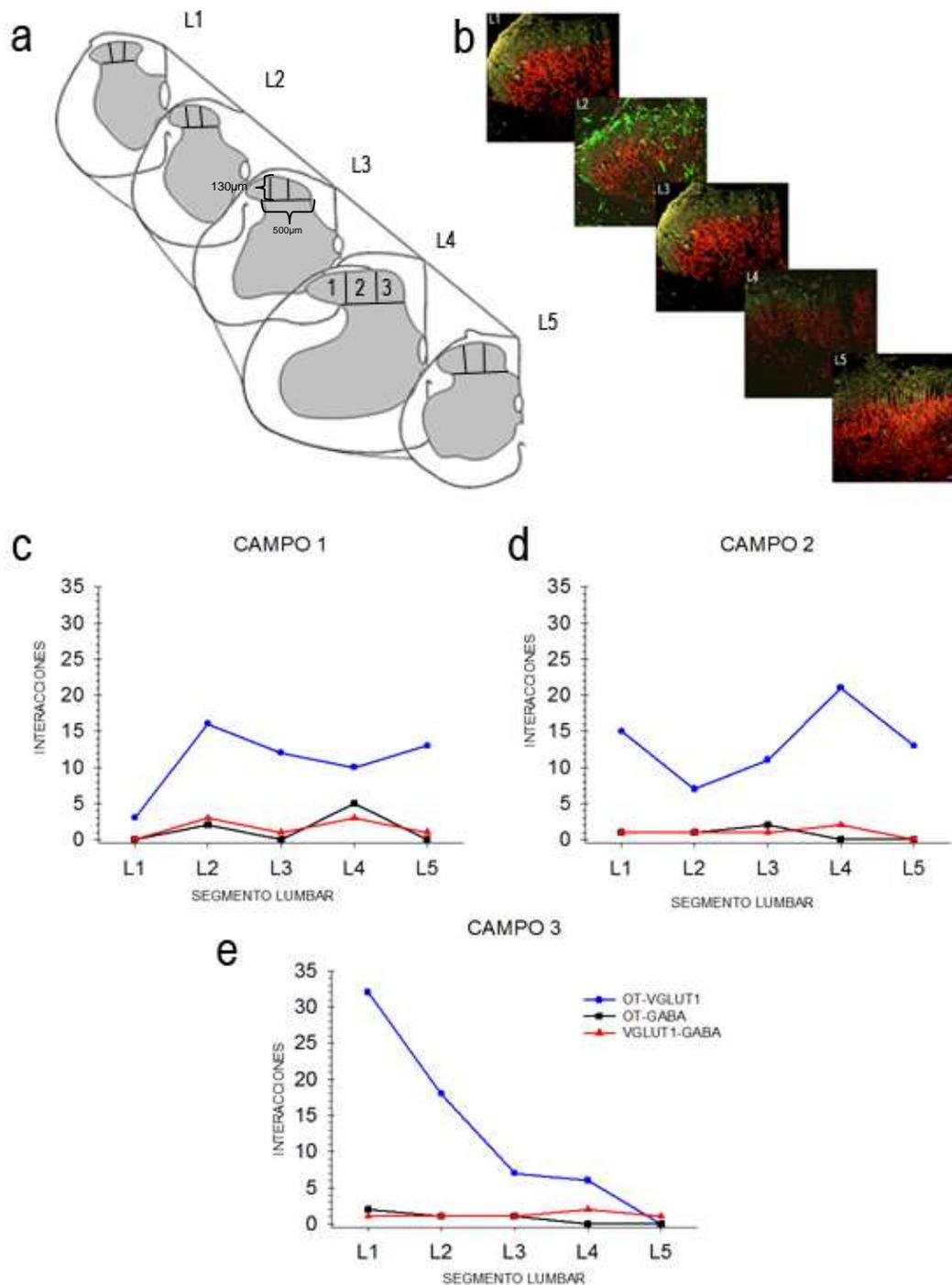


Figura 12. Densidad de interacciones OT-VGLUT1, OT-GABA, y GABA-VGLUT1. **a** esquema que ilustra los segmentos lumbares a lo largo de la ME y la división de las astas dorsales en los campos 1-lateral, 2-intermedio y 3-medial; **b**. imágenes en proyección de microscopia confocal que muestran la distribución de OT, GABA y VGLUT1 de cada segmento lumbar (L1-L5); **c**, **d**, **e** gráficos en los que se representa el número y la distribución de las interacciones. Barra de calibración igual a 50µm.

El número de interacciones OT-GABA fue del 0-15% y se distribuyeron uniformemente a lo largo de los segmentos lumbares (figura 12). El número de interacciones VGLUT1-GABA representó del 0-16% de las interacciones y se distribuyeron de manera uniforme en todos los segmentos y campos (ver tabla 1).

Tabla 1. Se muestran la cantidad y los porcentajes de las interacciones por campo en las capas superficiales en el segmento lumbar de la ME.

LATERAL

					%		
	OT-VLGUT1	OT-GABA	VGLUT1-GABA	TOTAL	OT-VLGUT1	OT-GABA	VGLUT1-GABA
L1	3.00	0.00	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00
L2	16.00	2.00	3.00	21.00	76.19	9.52	14.29
L3	12.00	0.00	1.00	13.00	92.31	0.00	7.69
L4	10.00	5.00	3.00	18.00	55.56	27.78	16.67
L5	13.00	0.00	1.00	14.00	92.86	0.00	7.14

INTERMEDIO

					%		
	OT-VLGUT1	OT-GABA	VGLUT1-GABA	TOTAL	OT-VLGUT1	OT-GABA	VGLUT1-GABA
L1	15.00	1.00	1.00	17.00	88.24	5.88	5.88
L2	7.00	1.00	1.00	9.00	77.78	11.11	11.11
L3	11.00	2.00	1.00	14.00	78.57	14.29	7.14
L4	21.00	0.00	2.00	23.00	91.30	0.00	8.70
L5	13.00	0.00	0.00	13.00	100.00	0.00	0.00

MEDIAL

					%		
	OT-VLGUT1	OT-GABA	VGLUT1-GABA	TOTAL	OT-VLGUT1	OT-GABA	VGLUT1-GABA
L1	32.00	2.00	1.00	35.00	91.43	5.71	2.86
L2	18.00	1.00	1.00	20.00	90.00	5.00	5.00
L3	7.00	1.00	1.00	9.00	77.78	11.11	11.11
L4	6.00	0.00	2.00	8.00	75.00	0.00	25.00
L5	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	100.00

Los resultados encontrados muestran que la interacción localizada con mayor frecuencia es OT-VGLUT1 en las capas superficiales del asta dorsal de la ME en los segmentos L1-L4.

## CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se muestran mediante microscopia confocal evidencias neuroanatómicas que en el asta dorsal de la ME las fibras inmunomarcadas para la OT tienen interacción con fibras aferentes primarias inmunomarcadas mediante VGLUT1 (transportador vesicular de glutamato). De la misma manera se muestra que hay interacción entre fibras que contienen OT e interneuronas GABAérgicas inmunomarcadas y finalmente interacciones de neuronas que contienen GABA y VGLUT1. Siendo la interacción OT-VGLUT1 la de mayor ocurrencia con un porcentaje del 70 al 90%, la interacción OT-GABA y GABA-VGLUT1 con una ocurrencia del 0-15% y 0-16% respectivamente.

El sistema descendente de modulación del dolor es una red anatómica que permite regular el procesamiento del dolor en el asta dorsal de la ME, para producir ya sea facilitación (pronocicepción) o inhibición (antinocicepción), modificando la excitabilidad de las neuronas de la ME. En este sistema se ha involucrado estructuras como la Sustancia Gris Periacueductal (Tracey, & Mantyh, 2007) y recientemente la vía hipotálamo espinal (Condés-Lara, 2006, Miranda-Cárdenas *et al.*, 2006; Martínez-Lorenzana *et al.*, 2008; Condés-Lara *et al.*, 2006; Rojas-Piloni *et al.*, 2007; Condés-Lara *et al.*, 2009).

Según la teoría de la compuerta de Melzack & Wall, (1960), el dolor está representado centralmente y en particular en la ME por una actividad somatosensorial convergente. En este sistema la sustancia gelatinosa actúa como un sistema de compuerta de la información sensorial, la que puede ser transmitida a células WDR en las capas profundas del asta dorsal de la ME. De esta forma éstas son susceptibles de ser influenciadas por los sistemas descendentes y modificar su excitabilidad. Así, las células WDR son influenciadas por la actividad aferente sensorial y están bajo control central.

Utilizando trazadores retrógrados e inmunohistoquímica, se ha demostrado que las proyecciones descendentes del NPV representan un sustrato bioquímico y

anatómico para el mecanismo propuesto involucrado en la modulación del dolor, como parte de un sistema difuso endógeno a nivel de la ME y que la OT participa como neuromodulador de esta vía (Condés-Lara *et al.*, 2007). En este trabajo se encontró que las fibras que contienen OT se localizaron en las láminas I-III con mayor densidad y en las V-VI en menor densidad; lo cual está en acuerdo con los estudios donde reportan que las fibras OT y sus terminales continúan y penetran en las capas superficiales y profundas a lo largo de la ME (Swanson, 1977; Gimpl & Fahrenholz, 2001).

Además esta localización de la OT se correlaciona con los sitios de unión OT reportados por Reiter *et al.*, (1994). Así mismo con los sitios de innervación de las fibras aferentes primarias y con las interneuronas GABAérgicas.

Las interacciones OT-VGLUT1 que aquí encontramos con mayor número representaron del 70-90% del total de interacciones y lo cual refuerza la hipótesis que indica que los efectos de la OT son mediados en forma presináptica. Esta hipótesis ha sido propuesta debido a que en investigaciones electrofisiológicas se ha encontrado que la estimulación del NPV inhibe selectivamente las respuestas de A- $\delta$  y fibras C sin afectar A- $\beta$  que llegan a la misma neurona, lo que indica que esta neurona todavía responde a la estimulación periférica.

Sin embargo, se ha propuesto otro mecanismo mediante el cual el sistema OT ejerce su modulación como resultado de que la aplicación tópica de bicuculina bloquea los efectos de la estimulación del NPV y de la aplicación tópica de OT. Esto ha sugerido la participación de interneuronas GABAérgicas en la inhibición ejercida por este sistema; por otro lado, cuando se aplica naloxona hay una reducción parcial de la acción inhibitoria de la estimulación del NPV o la aplicación de OT, por lo que se ha sugerido una participación limitada de un mecanismo opiáceo (Condés-Lara *et al.*, 2009).

En éste estudio se encontró que las fibras OT interactúan con interneuronas GABAérgicas del 0-15%; este resultado es interesante, debido a que no obstante el número de estas interacciones sean menores que las OT-VGLUT1,

fisiológicamente podrían ser interacciones que contribuyan de manera importante con la inhibición selectiva de fibras A- $\delta$  y C como resultado de la estimulación del NPV y de la aplicación de OT, así mismo este resultado concuerda con la hipótesis de que esta inhibición sea resultado de un mecanismo presináptico.

La OT tiene especificidad de acción debido a que ejerce un efecto sólo sobre ciertas células y fibras aferentes (Condés-Lara *et al.*, 2003). Así en este estudio se observó que la OT tuvo interacción solo con algunas interneuronas GABAérgicas. Se ha estudiado además que los sitios OT son funcionalmente activos porque la aplicación de OT modifica el patrón de disparo de neuronas espinales. Así mismo, se ha reportado que la OT tiene efectos tanto inhibitorios como excitatorios sobre neuronas espinales (Condés-Lara *et al.*, 2003), lo cual podría explicar que tenga interacción con las terminales aferentes primarias y con interneuronas GABAérgicas, y así inhibir a las primeras y excitar a las segundas.

En un estudio reciente, en rebanadas transversales de ME mediante la técnica electrofisiológica de patch clamp (Breton *et al.*, 2008) se mostró que una subpoblación de neuronas glutamatérgicas poseen receptores funcionales a OT; los cuales facilitan la liberación sináptica de glutamato y excitan una gran población de interneuronas GABAérgicas, resultando en un incremento generalizado de la inhibición sináptica en la lámina II de la ME. Esta facilitación de la inhibición GABAérgica representa probablemente la base de los efectos antinociceptivos espinales de la OT y de la estimulación del NPV. Este efecto podría incluir una inhibición directa de interneuronas superficiales del asta dorsal, neuronas de proyección y una reducción selectiva en la excitación mediada por fibras A- $\delta$  y C de neuronas WDR del asta dorsal. En este mismo estudio mostraron que las neuronas OT-activas nunca fueron positivas a GAD por lo que sugieren la presencia de receptores funcionales OT en terminales presinápticas de una sub población de neuronas glutamatérgicas y la ausencia de estos receptores en las terminales sinápticas de interneuronas GABAérgicas del asta dorsal. Sin embargo en el presente trabajo se encontró que si hay interacción de fibras OT con neuronas GABAérgicas aunque en menor cantidad que con las

fibras aferentes primarias, lo cual no concuerda con lo reportado por Breton *et al.*, (2008), donde señalan que las neuronas que se activan cuando se estimula el NPV nunca fueron GAD positivas y que consecuentemente si hubiera neuronas GABAérgicas que se activaran como resultado de la estimulación del NPV su activación sería insuficiente para incrementar directamente la probabilidad de liberación de GABA, o inducir una descarga de potenciales de acción significantes en estas neuronas. Cabe mencionar que la metodología empleada en el estudio mencionado es distinta de la utilizada aquí, ya el análisis que se realizó fue de todas las fibras OT y de todas las neuronas GABAérgicas localizadas en el asta dorsal de la ME y no sólo de las células que se activan al estimular el NPV. En registros electrofisiológicos de cultivos de neuronas (Young-Hwan, 1998), encontraron que la activación de los receptores OT nunca indujo una corriente de membrana detectable en la neurona postsináptica, pero desencadenó en un subgrupo de neuronas un incremento marcado de  $Ca^{++}$  dependiente de la frecuencia de los potenciales excitadores postsinápticos miniatura (EPSCs) mediados por el receptor AMPA, indicando un sitio de acción presináptico. Este efecto persistió en la presencia de tetrodoxina (TTX), sugiriendo que los receptores OT estaban localizados cerca de la terminal presináptica. Sin embargo estos autores señalan que sus resultados no excluyen la presencia de sitios de unión OT en las terminales aferentes primarias, pues Rousselot *et al.*, reportaron en (1990) que en el asta dorsal, las fibras que contienen OT no forman sinapsis axoaxónicas con las terminales aferentes primarias, pero establecen contactos sinápticos axodendríticos con neuronas de la lámina I y II. Ahora bien, en este trabajo se encontró que las fibras OT tienen interacciones con las fibras aferentes primarias, aunque con esta metodología no pudimos determinar a que tipo de interacción corresponde.

En el presente trabajo empleamos VGLUT1 como marcador de fibras aferentes primarias que contienen glutamato. Se espera que VGLUTs que transportan al glutamato a la vesícula sináptica se localicen selectivamente en neuronas glutamatérgicas, lo cual se ha investigado mediante inmunofluorescencia e inmunohistoquímica donde los transportadores VGLUT1 y VGLUT2 colocalizan

con sinaptofisina (proteína que se localiza en las vesículas sinápticas) indicando que se encuentran en las vesículas sinápticas, lo que fue observado mediante microscopia confocal y electrónica.

En una investigación reciente (Li, Fujiyama, Kaneko, & Mizuno, 2003) VGLUT1 es intenso en las láminas II (profunda), III y VGLUT2 fue más intenso en las láminas I y la parte superficial de la lámina II, así mismo la rizotomía lateral dorsal indicó que VGLUT1 y VGLUT2 se localizan en fibras aferentes primarias dentro del asta dorsal. Además VGLUT1 y VGLUT2 fueron expresados en las fibras aferentes primarias que contienen Sustancia P y también en las terminales axónicas IB4, que se sabe que en los ganglios de la raíz dorsal dan lugar a fibras no mielinizadas.

Por otro lado en otro trabajo en el que analizaron distintos aspectos de VGLUT1s con marcadores para distintos tipos de fibras aferentes, se reporta que las isoformas del transportador vesicular de glutamato tiene una expresión diferencial en la sustancia gris de la ME. VGLUT1 se localiza con mayor densidad en las láminas II, IV, V, VI y por otro lado VGLUT2 se localiza en las láminas I, II, V y X. Sin embargo las diferencias funcionales entre VGLUT1 y VGLUT2 son inciertas, existe la hipótesis que VGLUT1 se exprese en las terminales sinápticas de mecanorreceptores cutáneos, musculares y viscerales. En contraste con los bajos niveles de expresión de VGLUT2 en los mecanorreceptores, en las aferentes nociceptivas positivas GSA-IB4. VGLUT2 espinal parecen intrínsecas de la ME (Álvarez, Villalba, Zerda & Schneider, 2004).

De todos estos resultados contradictorios no se puede asegurar que VGLUT1 sea un marcador de fibras aferentes glutamatérgicas y VGLUT2 sea un marcador de interneuronas espinales. No obstante nuestros resultados señalan que la acción de OT sobre fibras aferentes primarias es selectiva de fibras A- $\delta$  y C. esta posible controversia será discutida en los párrafos siguientes.

En este estudio encontramos que la OT interactúa con las fibras VGLUT1-positivas, aunque existan resultados controversiales sobre el origen y función asociada a las fibras que contienen este transportador, los resultados encontrados en este estudio indican que la OT interactúa con fibras aferentes primarias y existe la posibilidad de que se trate de terminales nociceptivas como ha reportado Li *et al.*, (2003). Además la investigación electrofisiológica realizada por nuestro grupo de trabajo ha mostrado que la estimulación del NPV y la aplicación tópica de OT no afecta la respuesta evocada de fibras A- $\beta$  (Rojas-Piloni *et al.*, 2008; Condés-Lara *et al.*, 2009), por lo que aunque no podemos descartar que VGLUT1 esté asociado a terminales sinápticas de mecanoreceptores, los resultados electrofisiológicos son evidencia que indica que se trata de fibras aferentes primarias A- $\delta$  y C sobre las que actúa la OT y estas pudieran contener VGLUT1.

En general la activación del sistema nociceptivo se acompaña de reacciones autonómicas como incremento en la frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca, presión arterial o sudoración las cuales están reguladas por el hipotálamo (Jo *et al.*, 1998). Estas conductas están asociadas a las necesidades biológicas primarias de los organismos que son su supervivencia y su reproducción. Para esto los organismos coordinan procesos fisiológicos complejos con las condiciones medioambientales y elaboran las respuestas adaptativas a señales sensoriales específicas; mediante las cuales un organismo mantiene la homeostasis que depende de una integración apropiada de los mecanismos motores, viscerales y somatosensoriales, proceso en el cual el hipotálamo participa controlando el sistema nervioso neurovegetativo y el sistema endocrino; y organiza conductas relacionadas con la supervivencia de las especies: ingesta, huida, defensa y apareamiento; además tiene conexiones con sistemas ascendentes y descendentes que le permiten interactuar con la actividad cerebral y la ME (Carlson, 2005).

El dolor visto como un sistema homeostático, en el cual la señalización de alarma y la respuesta apropiada del organismo son procesos en los que intervienen mecanismos de dolor y analgesia, que permiten mantener la integridad del

organismo (Craig, 2003) y que la vía hipotálamo espinal, en particular la proyección del NPV a la ME ejerce modulación sobre las respuestas evocadas de las fibras aferentes primarias A- $\delta$  y C, este trabajo muestra que las fibras OT tienen interacciones directas con las fibras aferentes primarias. De tal forma que a través de estas interacciones NPV-ME se pudiera estar mediando la inhibición de la información nociceptiva de forma presináptica. De esta forma el hipotálamo participa en la regulación homeostática desencadenando respuestas autonómicas y conductuales apropiadas para recuperar el equilibrio cuando ocurre una estimulación capaz de activar los receptores nociceptivos y alertar al individuo de que estímulos atentan contra su integridad.

Las neuronas espinales de proyección reciben información aferente de fibras primarias: A- $\beta$ , A- $\delta$  y C y algunas de estas son neuronas WDR que responden a estimulación mecánica, térmica y química que viene de fibras A $\delta$ , C y A- $\beta$ , que proyectan al VPL. Debido a la convergencia de las fibras dolorosas y no dolorosas, este grupo juega un papel fundamental en el mecanismo de supresión del dolor segmental involucrado en la teoría de la compuerta; las neuronas WRD se encuentran en las láminas I, II, IV, V, VI y X (Millan, 1999). Recientemente nuestro grupo de trabajo ha propuesto como mecanismo de acción inhibitorio, una vía directa OT que activa interneuronas inhibitorias GABAérgicas y que estas a su vez inhiben presinápticamente a las fibras nociceptivas que llegan a neuronas WDR y NS que proyectan al VPL ya que las respuestas nocivas evocadas en las neuronas de proyección al VPL fueron inhibidas después de la estimulación del NPV. Además, se señala que la modulación es presináptica porque selectivamente se inhiben las respuestas de las fibras A- $\delta$  y C sin afectar las respuestas A- $\beta$  (Rojas-Piloni *et al*, 2008). Aunque en el presente trabajo se encontraron interacciones directas OT-GABA, son menores en número en comparación con las interacciones OT-VGLUT1, cabe mencionar que el sistema de inhibición GABAérgico es muy potente y que aunque sean pocas interacciones su activación podría mediar los efectos inhibitorios observados después de la estimulación del NPV y de la aplicación de OT.

Sin embargo las interacciones de las neuronas espinotalámicas de las capas profundas y la OT no han sido descritas a detalle en este trabajo no obstante no se descarta que exista dicha interacción, sin embargo la evidencia experimental electrofisiológica, aunado a los datos aquí mostrados señala que la inhibición mediada por este sistema sea principalmente presináptica pero no podemos excluir que la modulación de la OT sea directamente sobre las neuronas espinotalámicas que proyectan al VPL ya que se ha observado que estas envían proyecciones a las capas superficiales, sitio en donde se localiza la mayor inervación de fibras aferentes primarias y OT.

En resumen estos resultados muestran evidencia morfológica que permite dilucidar en parte, un circuito a nivel de ME que regula los efectos inhibitorios de la vía descendente hipotálamo-espinal utilizando OT como neurotransmisor.

Para finalizar el presente trabajo abre una serie de perspectivas experimentales que conducirán a descifrar el mecanismo o los mecanismos de acción de la OT y así mismo más posibles interacciones con neuronas GABAérgicas, glutamatérgicas, aferentes primarias y neuronas de proyección como las WDR.

## **CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES**

1. Las fibras OT interactúan con fibras aferentes primarias que contienen VGLUT1 en los niveles L1 a L5.
2. Las fibras OT interactúan con neuronas GABAérgicas en el asta dorsal de la ME en los niveles L1 a L5.

## CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

1. Albe-Fessard, D., Berkley, K., Kruger, L., Ralston, H. & Willis, D. (1985) Diencephalic Mechanisms of Pain Sensation. *Brain Research*, 9, 217 – 296.
2. Al-Khater, K., Kerr, R. & Todd, A. (2008) A quantitative study of spinothalamic neurons in laminae I, III, and IV in lumbar and cervical segments of the rat spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*, 511, 1-18.
3. Almeida, T., Roizenblatt, S. & Tufik, S. (2004) Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research*, 1000, 40-56.
4. Alvarez, F., Villalba, R., Zerda, R. & Schneider, S. (2004) Vesicular Glutamate Transporters in the Spinal Cord, with Special Reference to Sensory Primary Afferent Synapses. *Journal of Comparative Neurology*, 472, 257-280.
5. Breton, J., Vinante, P., Uhl-Bronner, S., Vergnano, A., Freund-Mercier, M., Schlilchter, R. & Poisbeau, P. (2008) Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. *Molecular Pain*, 4:19, 1-12.
6. Carlson, N. (2006) Fisiología de la conducta. Pearson. 8°ed. pp 251 – 255.
7. Carpenter, M. (1994) Neuroanatomía. Fundamentos. Editorial Médica Panamericana 4ta ed. Buenos Aires, 93, 94, 110,111.
8. Condés-Lara, M. (1978) Estimulación nociceptiva experimental. *Tesis de Licenciatura*. pp 1-4, 20.
9. Condés-Lara, M., Marina-González, N., Martínez-Lorenzana, G., Luis-Delgado, O. & Freund-Mercier, M. (2003) Actions of oxytocin and interactions with glutamate on spontaneous and evoked dorsal spinal cord neuronal activities. *Brain Research*, 976, 75-81.

10. Condés-Lara, M., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J. & Rojas-Piloni, G. (2008) Paraventricular hypothalamic nucleus stimulation modulates nociceptive responses in dorsal horn wide dynamic range neurons. *Neuroscience Letters* 444, 199-202.
11. Condés-Lara, M., Martínez-Lorenzana, G., Rojas-Piloni, G. & Rodríguez-Jiménez, J. (2007) Branched oxytocinergic innervations from the paraventricular hypothalamic nuclei to superficial layers in the spinal cord. *Brain Research* 1160, 20-29.
12. Condés-Lara, M., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., López, M. y Freund-Mercier, M. (2006) Paraventricular hypothalamic influences on spinal nociceptive processing. *Brain Research*, 1081, 126-137.
13. Condés-Lara, M., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., López-Hidalgo, M., y Rodríguez-Jiménez, J. (2009) Hypothalamospinal oxytocinergic antinociception is mediated by GABAergic and opiate neurons that reduce A-delta and C fiber primary afferent excitation of spinal cells. *Brain Research*, 1247, 38-49.
14. Craig, A. (2002) Pain Mechanisms: Labeled Lines Versus Convergence in Central Processing. *Review in Advance. Annual. Review. Neuroscience*, 26, 1-30.
15. Craig, A. (2003) A new view of pain as a homeostatic emotion. *Trends in Neuroscience* 25, 6, 303-307.
16. Dickenson, A. & D'Mello, R. (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *British Journal of Anesthesia* 101, 1, 8-16.
17. Frings, S. (2008) Primary process in sensory cells: current advances. *J Comp Physiol A* DOI 10.1007/s00359-008-0389-0.

18. Gauriau, C. & Bernard, J. (2004) A comparative Reappraisal of Projections from the superficial laminae of the dorsal horn in the rat: the forebrain. *Journal of Comparative Neurology*. 468, 24-56.
19. Gimpl, G. & Fahrenholz, F. (2001) The oxytocin Receptor System: structure, function and regulation. *Physiological Reviews*, 81, N2, 629 – 683.
20. Goldstein, B. (2005) Sensación y Percepción. Cengage Learning Editores 6ªed. pp 2-30.
21. Hendry, H., Hsiao, S. & Brown, M. (1999) Fundamentals of Sensory Systems. En Zigmond, M., Bloom, F., Landis, S., Roberts, J. & Squire, L. Fundamental of Neuroscience. *Academic Press*. 657,658.
22. Julius, D. & Basbaum, A. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 413, 203-210.
23. Kandel, E., Schwartz, J. & Jessell, T. (2000) Principles of Neural Science. McGrawHill. Cuarta edicion.
24. Li, J., Fujiyama, F., Kaneko, T. & Mizuno. (2003) Expression of Vesicular Glutamate Transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in Axon Terminals of Nociceptive Primary Afferent Fibers in the Superficial Layers of the Medullary and Spinal Dorsal Horns of the Rat. *Journal of Comparative Neurology* 457, 236-249.
25. Martínez-Lorenzana, G., Espinosa-López, L., Carranza, M., Aramburo, C., Paz-Tres, C., Rojas-Piloni, G. & Condés-Lara, M. (2008).PVM stimulation prolongs withdrawal latencies and release oxytocin in cerebrospinal fluid, plasma and spinal cord tissue in intact and neuropathic rats. *Pain*, 140, 2, 265-273.
26. Melzack, R. & Wall, P. (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150, 971 – 979.

27. Merskey, H., & Bogduk, N. (1994) Classification of chronic pain. IASP Press, Seattle. 222 pp.
28. Millan, M. (1999) The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57, 1-164.
29. Miranda-Cardenas, Y., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., López-Hidalgo, M., Freund-Mercier, M. y Condés-Lara, M. (2006) Oxytocin and electrical stimulation of the paraventricular hypothalamic nucleus produce antinociception effects that are reversed by an oxytocin antagonist. *Pain*, 122, 182-189.
30. Paxinos, G. (1995) The Rat Nervous System. 2° E dition. Academic Press. USA pp. 253-256.
31. Paxinos, G., & Watson, C. (1998) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, New York.
32. Price, D. (2000) Psychological and neural Mechanisms of the affective dimension of pain. *Science*, 288, 1769 – 1772.
33. Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A., McNamara, J. & Williams, M. (2004) *Neuroscience. Sinauer Associated, Inc. 3° ed. pp 209 – 228.*
34. Reiter, M., Kremarik, P., Freund, M., Stoeckel, M., Desaulles, E. & Feltz, L. (1994) Localization of oxytocin binding sites in the thoracic and upper lumbar spinal cord of the adult and postnatal rat: a histoautoradiographic study. *European Journal of Neuroscience* 6: 98–104.
35. Rexed, B (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *Journal of Comparative Neurology* 96, (3): 414–95.
36. Rojas-Piloni, G., López-Hidalgo, M., Rodríguez-Jiménez, J., Martínez-Lorenzana, G. y Condés-Lara, M. (2007) GABA-mediated oxytocinergic

inhibition in dorsal horn neurons by hypothalamic paraventricular nucleus stimulation. *Brain Research*, 1137, 69-77.

37. Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., Dela Torre, S. & Condés-Lara, M. (2008) Nociceptive spinothalamic tract and postsynaptic dorsal column neurons are modulated by paraventricular hypothalamic activation. *European Journal of Neuroscience*. 28, 546-558.
38. Rousselot, P., Merighi, A., Poulain, D., Theodosis, D. (1990) Oxytocinergic innervations of the rat spinal cord. An electron microscopic study. *Brain Research*, 529, 178-184.
39. Sawchenko, P. & Swanson, L. (1982) Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or the spinal cord in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 205, 260 – 272.
40. Sofroniew, M., Weindl, A., & Wetzstein, R. (1981) Immunohistochemistry of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the human and brain primate. *Acta Histochemica, Suppl-Band. XXIV, S. 79-95*.
41. Swanson, L. (1977) Immunohistochemical evidence for a neurophysin-containing autonomic pathway arising in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Research*, 128, 346-353.
42. Tracey, I. & Mantyh, P. (2007) The Cerebral Signature for Pain Perception and its Modulation. *Neuron Cell Press*, 55, 377-391.
43. Young-Hwan, J., Stoeckel, M., Freund-Mercier, M. & Schlinder, R. (1998) Oxytocin modulates glutamatergic Synaptic Transmission between cultured neonatal spinal cord dorsal horn neurons. *The Journal of Neuroscience*, 18(7) 2377-2386.

44. Zimmermann, M. (1983) Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. *Pain*, 16, 109-110.