



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

---

---

IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS QUE  
EXPRESAN EL RECEPTOR DE OXITOCINA  
IMPLICADAS EN LA MODULACIÓN  
NOCICEPTIVA EN LA MÉDULA ESPINAL

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS  
(NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA

LIC. YUNUEN LETICIA MORENO LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. GERARDO ROJAS PILONI



CAMPUS UNAM-JURIQUILLA, QRO. 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Yunuen Leticia Moreno López, cuyo título es: “Identificación de células que expresan el receptor de oxitocina implicadas en la modulación nociceptiva en la médula espinal” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

**Presidente**

Dr. Manuel Salas Alvarado

**Secretario (Tutor)**

Dr. Gerardo Rojas Piloni

**Vocal**

Dr. Jorge Quevedo Duran

**Suplente**

Dr. Rogelio Arellano Ostoa

**Suplente**

Dra. Ma. Teresa Morales Guzmán

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador de programa

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo que me brindo para realizar mis estudios de Maestría en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma México. Numero de becario: 233849

Agradezco por el apoyo económico para la realización del presente proyecto al PAPIIT–DGAPA. N° de Proyecto: IN202610 y al CONACyT; N° de proyecto 78927.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gerardo Rojas Piloni por su dedicación, trabajo, buenas ideas para la realización de esta tesis y por ser un excelente tutor.

Al MVZ. Javier Rodríguez Jiménez por su asistencia en el manejo de animales durante los experimentos y en el laboratorio.

A la Dra. Ma. Guadalupe Martínez Lorenzana por su ayuda en el análisis histológico de la presente tesis.

Al Dr. Miguel Condés Lara por su apoyo durante la realización de esta tesis.

A la Ing. Elsa Nidia Hernández Ríos por su asistencia en el uso del microscopio confocal durante la realización de esta tesis.

*DEDICO ESTA TESIS*

*A toda mi familia, gracias por todo.*

*A mis padres Leticia López Hernández y Ernesto Moreno Villarreal, mi hermana Nancy E. Moreno López, mis sobrinos Armando Calderón Moreno y Adrián Calderón Moreno y Javier Rodríguez Jiménez por creer en mí, por su amor, comprensión y apoyo incondicional, muchas gracias por estar siempre conmigo.*

*A la memoria de mi tía Gloria A. Moreno y abuelito Vicente López.*

## RESUMEN

La estimulación del núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) o la aplicación intratecal de oxitocina (OT) selectivamente inhibe las respuestas evocadas de fibras A $\delta$  y C en neuronas de amplio rango dinámico del asta dorsal. Sin embargo, los mecanismos por los cuales están mediados estos efectos inhibitorios no se conocen por completo. Se han propuesto dos posibilidades para explicar los efectos inhibitorios del sistema NPV–OT en la médula espinal: la inhibición podría ser directa sobre las aferentes nociceptivas o mediada por interneuronas inhibitorias segmentales. Con la finalidad de explorar con mayor detalle los mecanismos a través de los cuales la OT ejerce sus efectos antinociceptivos en el asta dorsal, en este trabajo se identificó el receptor a oxitocina (ROT) mediante inmunofluorescencia en los segmentos lumbares de la médula espinal y ganglios de la raíz dorsal (DRG). Se investigó la colocalización del ROT con diferentes marcadores mediante inmunofluorescencia, trazado neuronal, microscopia de fluorescencia y confocal. Encontramos que en la médula espinal el 92% de las células que expresan el ROT son neuronas, ya que colocalizan con la proteína neuronal nuclear específica (NeuN), pero no con sustancia P (SP), GABA ni neuronas espinotalámicas. Por otro lado en el DRG, el ROT no colocaliza con SP ni la isolectina *griffonia simplicifolia* B4 (IB4). Estos resultados apoyan la hipótesis que sugiere que los efectos antinociceptivos producidos por el sistema NPV–OT en médula espinal son mediados presinápticamente a través de interneuronas excitatorias e inhibitorias.

Estos resultados nos dan evidencia de los mecanismos y los elementos celulares que participan en la modulación del dolor mediado por la vía NPV–OT en la médula espinal.

## SUMMARY

Paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) stimulation or intrathecal oxytocin (OT) administration selectively inhibited A $\delta$  and C fiber-evoked responses in dorsal horn wide dynamic range neuron; however the mechanism involved in that inhibition has not been fully elucidated. It has been proposed two possibilities for the antinociceptive effects of PVN-OT system on the spinal cord: the inhibition could be due to a direct effect on the primary nociceptive afferent or mediated by segmental inhibitory interneurons. In order to analyze with more detail the mechanisms mediating the OT antinociception in the dorsal horn, in this work we identified the ROT in lumbar segments of spinal cord and dorsal root ganglia. It was investigated the ROT colocalization with different markers using immunofluorescence, neuronal tracing, electrophysiological recording and confocal microscopy. Current results demonstrate that 92% of the cells that express ROT in the spinal cord are neurons since they colocalizes with NeuN, but not with, substance P (SP), GABA and spinothalamic neurons. On the other hand, in the DRG, ROT do not colocalize with SP neither IB4. Present results support the hypothesis that the antinociceptive effects produced by the PVN-OT system are mediated presynaptically activating both excitatory and inhibitory interneurons.

These results give us evidence of the mechanisms and cellular elements involved in pain modulation mediated by the pathway of NPV-OT in the spinal cord.

## ABREVIATURAS

AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato
CGRP	Péptido relacionado al gen de calcitonina
DRG	Ganglio de la Raíz Dorsal
FG	Fluorogold
FR	Fluororuby
GABA	ácido gamma-aminobutírico
GDNF	factor neurotrófico derivado de la glía
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
IB4	Isolectina <i>griffonia simplicifolia</i> B4
IML	Núcleo intermedio lateral
IMM	Núcleo intemediomedial
LPb	Área lateral parabraquial
MRGPRD	receptor de membrana acoplado a proteína G Mas-related
NE	Neuronas nociceptivas específicas
NeuN	Proteína nuclear neuronal específica
NGF	Factor de crecimiento nervioso
N-NOC	Neuronas no nociceptivas
NPV	Núcleo Paraventricular Hipotalámico
NTS	Núcleo del tracto solitario

OT	Oxitocina
PAG	Área gris periacueductal
PKC $\gamma$	Subunidad $\gamma$ de la Proteína cinasa C
Po	Núcleo posterior talámico
PoT	Núcleo posterior triangular talámico
ROT	Receptor de Oxitocina
SNC	Sistema nervioso central
SP	Sustancia P
TrkA	Receptor de neurotrofina
VGLUT	Transportador vesicular de glutamato
VPL	Núcleo ventroposterolateral talámico
VPM	Núcleo ventroposteromedial talámico
WDR	Neuronas de amplio rango dinámico

## ÍNDICE

1. RESUMEN	I
2. SUMMARY	II
3. INTRODUCCIÓN	1
3.1. Sensación y percepción	1
3.2. Nocicepción	1
3.3. Dolor	2
4. ANTECEDENTES	3
4.1. Fibras aferentes primarias	3
4.2. Organización de la médula espinal	5
4.3. Transmisión de la información nociceptiva a centros supraespinales	8
4.4. Modulación descendente de la información nociceptiva	10
4.5. Hipotálamo y modulación de la información nociceptiva	11
4.6. Oxitocina y modulación nociceptiva	12
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
6. JUSTIFICACIÓN	18
7. HIPÓTESIS	19
8. OBJETIVO GENERAL	20
9. OBJETIVOS PARTICULARES	20
10. MÉTODO	21
10.1. Inyección de Trazadores	21
10.1.1. Fluororuby	21
10.1.2. Fluorogold	22
10.2. Localización de ROT en médula espinal y en el ganglio de la raíz dorsal	23
10.2.1. Inmunofluorescencia	23
10.3. Análisis histológico	25
11. RESULTADOS	26
11.1. Localización de ROT en el asta dorsal de la médula espinal	26
11.2. Localización de ROT en neuronas espinotalámicas en	

	el asta dorsal de la médula espinal	27
11.3.	Localización de ROT en neuronas GABAérgicas	30
11.4.	Localización de ROT en neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal	30
11.5.	DISCUSIÓN	
11.6.	Localización de ROT en el asta dorsal de la médula espinal	32
11.7.	Localización de ROT en neuronas espinotalámicas en el asta dorsal de la médula espinal	34
11.8.	Localización de ROT en neuronas GABAérgicas	35
11.9.	Localización de ROT en neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal	36
12.	CONCLUSIONES	39
13.	BIBLIOGRAFÍA	40
14.	ÍNDICE DE FIGURAS	45

## INTRODUCCIÓN

### *Sensación y percepción*

La sensación implica la codificación de información generada por estimulación del medio ambiente interno y externo. Para esto, los organismos cuentan con distintos sistemas sensoriales que comparten algunas características: tienen células nerviosas especializadas que actúan como sensores para estímulos específicos, estas células se denominan receptores y convierten la energía asociada con fuerza mecánica (mecanorreceptores), luz (fotorreceptores), ondas sonoras (mecanorreceptores), moléculas odorantes, químicos ingeridos (quimiorreceptores), etc. en señales neuronales (señales aferentes sensoriales) que contienen la información acerca del estímulo y la transmiten al cerebro.

La información sensorial aferente activa neuronas del sistema nervioso central capaces de representar los aspectos cualitativos y cuantitativos del estímulo (modalidad, intensidad y duración) y en algunas modalidades (somáticas, visión y audición) la localización del estímulo en el espacio (Purves, 2004; Frings, 2008).

Por otro lado la percepción crea una experiencia del ambiente y nos permite actuar en él. La percepción implica un procesamiento de información ascendente (procesamiento de información sensorial) y descendente (procesamiento de información del sujeto como aprendizajes, memorias, etc.) (Golstein, 2005).

### *Nocicepción*

La nocicepción es el proceso por el cual estímulos intensos térmicos, mecánicos o químicos son detectados por una subpoblación de fibras aferentes primarias llamadas nociceptores (como revisión ver Basbaum et al., 2009). Los nociceptores son terminaciones nerviosas libres de neuronas aferentes de primer orden, se localizan en piel, mucosa, órganos viscerales, ligamentos, músculos, tendones y arterias. Los cuerpos celulares de los nociceptores se localizan en los ganglios de la raíz dorsal (DRG por sus siglas en inglés) para el cuerpo y en el ganglio (Gasser) trigeminal para la cara (Basbaum et al., 2009), constituyen fibras de diámetro pequeño (fibras C) no mielinizadas (A $\delta$ ). Los nociceptores tienen umbrales altos y responden progresivamente de acuerdo a la intensidad del estímulo.

## *Dolor*

El dolor es un proceso homeostático que refleja una condición adversa en el cuerpo que requiere una respuesta conductual. Así, la estimulación nociva produce sensaciones no placenteras, que activan y mantienen conductas que llevan al organismo a un estado motivacional que le permite generar respuestas autónomas y motoras, como conductas de escape, defensa, vocalizaciones, resguardo, etc.; que además le permitan evitar situaciones que en el pasado han causado algún daño (Craig, 2003; Fields, 2004).

Por otro lado, el dolor también es una experiencia consciente, que se ve influenciada por factores como la memoria, emociones, patologías y genética. Normalmente la percepción del dolor es considerada como una consecuencia invariante de la activación de nociceptores periféricos por un estímulo potencialmente dañino. Sin embargo, hay reportes sobre pacientes con lesiones severas (por ejemplo las fracturas de huesos) bajo condiciones de emociones fuertes que reportan poco o nada de dolor. La acción de las drogas también puede ser variable, por lo tanto el dolor es una experiencia subjetiva y particular de cada sujeto (Fields, 2004).

## ANTECEDENTES

### *Fibras aferentes primarias*

Las fibras aferentes primarias pueden ser clasificados por sus blancos periféricos (cutáneos, articulares, viscerales, etc.), velocidad de conducción (está relacionado con su diámetro y la mielinización), propiedades de respuesta (incluye modalidad sensorial e intensidad del estímulo necesaria para activarlas) y fenotipo neuroquímico (expresión de péptidos) (Todd, 2010).

Las fibras aferentes primarias también se clasifican de acuerdo a su estructura, diámetro y velocidad de conducción. Las fibras C son no mielinizadas, tienen un diámetro de 0.4 a 1.2  $\mu\text{m}$  y tienen una velocidad de conducción de 0.5–2.0 m/s. Las fibras  $A\delta$  son poco mielinizadas, tienen un diámetro de 2.0 a 6  $\mu\text{m}$  y una velocidad de conducción de 12–30 m/s. Las fibras  $A\beta$  son mielinizadas con un diámetro de más de 10 $\mu\text{m}$  y tienen una velocidad de 30–100m/s; a diferencia de las fibras  $A\delta$  y C, éstas no transmiten la información nociceptiva en situaciones normales.

Las fibras C son receptores termosensitivos, mecanorreceptores y receptores específicos para sustancias algógenas; estos receptores son polimodales pues pueden responder igual a estimulación mecánica, térmica y química.

Las fibras  $A\delta$  se clasifican en dos: El tipo I corresponde a fibras de mecanorreceptores de umbrales altos que responden principalmente a estímulos mecánicos de alta intensidad y responden débilmente a estímulos térmicos o químicos. El grupo II son receptores mecanotérmicos para altas temperaturas (>45°–53° C) y para bajas temperaturas (<15°C).

Los nociceptores se activan cuando la intensidad del estímulo alcanza el rango nocivo. Hay dos clases de nociceptores: aferentes medianamente mielinizadas  $A\delta$  que median el dolor agudo, bien localizado y rápido; y fibras de diámetro pequeño no mielinicas C que transmiten dolor lento, de localización difusa o secundario (Basbaum et al., 2009).

Las fibras C no mielínicas son heterogéneas, como las fibras mielinizadas, son polimodales, es decir que son sensibles a estímulos térmicos y mecánicos. Además no todas las fibras C son nociceptores, algunos responden a frío, al movimiento del pelo en la piel pero no a calor ni estímulos mecánicos. Estas fibras parecen mediar el tacto suave (Basbaum et al., 2009).

La información nociceptiva se transmite por fibras A $\delta$  y C a neuronas en la médula espinal, estas fibras utilizan glutamato como neurotransmisor principal y tienen efectos excitatorios en sus blancos postsinápticos (Todd, 2010; Millan, 1999). Sin embargo, los nociceptores C también se han caracterizado neuroanatómicamente y molecularmente en dos tipos: por un lado, los nociceptores peptidérgicos que terminan exclusivamente en las láminas superficiales. Liberan los neuropéptidos sustancia P y péptido relacionado al gen-calcitonina (CGRP), además expresan el receptor de neurotrofina A (TrkA) que responde al factor de crecimiento nervioso (NGF). Estos nociceptores contactan directamente con neuronas de proyección que transmiten la información nociceptiva al tallo cerebral y/o tálamo, así como a interneuronas en la parte externa de la lámina II. Por otro lado, los nociceptores no peptidérgicos expresan el receptor de neurotrofina c-Ret (que une la isolectina IB4) cuyo ligando es el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), así como neurturina, artemina. En el ratón, se ha mostrado una población de fibras C no peptidérgicas que expresan el receptor de membrana acoplado a proteína G Mas-related (MRGPRD), un receptor acoplado a proteína G específico de neuronas sensoriales (Todd, 2010). Los nociceptores no peptidérgicos contactan con interneuronas de la lámina II interna y proyectan principalmente a regiones límbicas del cerebro (Todd, 2010; Basbaum et al., 2009; Braz et al., 2005). Además, las fibras C no peptidérgicas inervan la epidermis, mientras que las peptidérgicas inervan otros tejidos y regiones profundas de la piel (Figura 1).

Las diferencias en la distribución periférica y central de estas aferentes sugieren que son diferentes en su función. En la rata se ha estimado que alrededor del 80% de las aferentes primarias cutáneas son no mielínicas y aproximadamente la mitad de las células lumbares del DRG que dan lugar a fibras C son peptidérgicas (Todd, 2010).

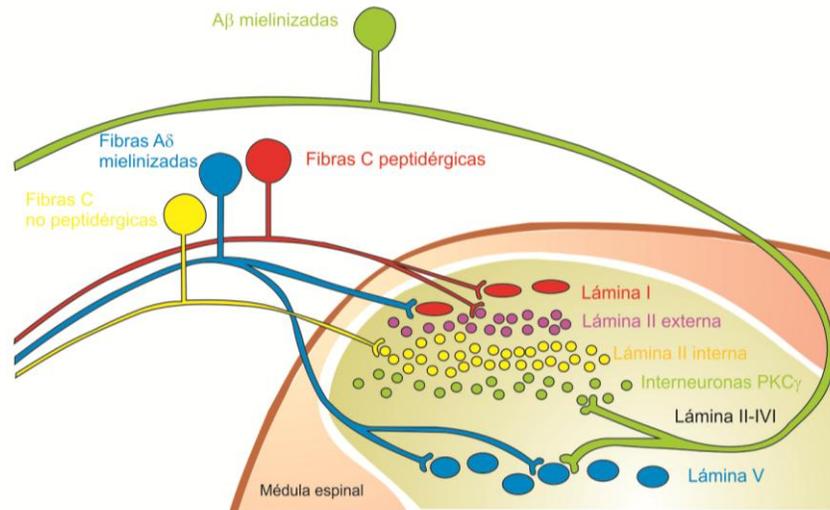


Figura 1. Organización laminar del asta dorsal de la médula espinal. Se pueden observar los blancos de las fibras aferentes primarias. Las fibras C no mielínicas peptidérgicas (rojo) y las fibras mielínicas Aδ (azul) terminan en neuronas de las láminas I (rojo) y IIo (morado). Las fibras C no peptidérgicas (amarillo) terminan en neuronas de la lámina IIi (amarillo) y las fibras mielínicas Aβ (verde) terminan en las láminas III–V. Esquema modificado de Basbaum et al., 2009.

### *Organización de la médula espinal*

La sustancia gris de la médula espinal puede ser dividida con base en su citoarquitectura en 10 láminas: lámina I (zona marginal), lámina II externa e interna (sustancia gelatinosa), III y IV (núcleo propio), V y VI (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 (Millan, 1999).

Las láminas superficiales I y II externa (IIo), junto con las láminas profundas V, VI y X, son los sitios en la médula espinal donde se recibe, procesa y se transmite la información nociceptiva (Millan, 1999). De esta manera, las fibras C proyectan densamente a la lámina IIo y menos a la lámina I, V y X. Sin embargo, las fibras Aδ terminan predominantemente en la lámina I y en menos densidad en las láminas IIo y X. Por otro lado, las fibras Aβ que transmiten información no-nociceptiva, llegan densamente a las láminas III–IV y menos a las láminas V–VI y no inervan la lámina IIo (figura 2) (Millan, 1999).

En el asta dorsal las neuronas procesan y transmiten la información aferente y eferente. De acuerdo a la aferencia que reciben las neuronas del asta dorsal de la médula espinal se clasifican en tres grupos:

- Neuronas nociceptivas específicas (NE) responden exclusivamente a estimulación nociva y se encuentran en la lámina I, IIo, IV y VI. Reciben aferencias de fibras A $\delta$  de alto umbral, y fibras C polimodales nociceptivas. Estas neuronas participan en la codificación de la localización y cualidad física del estímulo (Almeida et al., 2004).
- Neuronas de amplio rango dinámico (WDR por sus siglas en inglés) responden a estimulación mecánica, térmica y química de fibras nociceptivas A $\delta$ , C así como no nociceptivas A $\beta$ . Se encuentran en la lámina I, II, IV, V, VI, X. Estas neuronas codifican la intensidad del estímulo ya que muestran un incremento en la frecuencia de respuesta conforme aumenta la intensidad de la estimulación nociva (Almeida et al., 2004).
- Neuronas no nociceptivas (N–NOC) responden a estímulos mecánicos, térmicos y propioceptivos de baja intensidad, transmitidos por fibras A $\delta$  y A $\beta$ . Se localizan en las láminas I, II y IV y actúan indirectamente en mecanismos de modulación de información sensorial a nivel segmental (Almeida et al., 2004).

Las neuronas de proyección comprenden neuronas NE, WDR y N–NOC y transmiten información nociceptiva a niveles supraespinales y se encuentran principalmente en las láminas I, V y VI; pocas se encuentran en la lámina II y X.

Las neuronas propioespinales intersegmentales tienen un papel integrativo y comunican varios segmentos espinales y las astas contralaterales e ipsilaterales. Adicionalmente, éstas neuronas están involucradas en iniciar y mediar los mecanismos de inhibición en el asta dorsal seguidos de la activación por estimulación nociva heterosegmental (Millan, 1999).

Las interneuronas están involucradas en la transmisión, integración y modulación de las aferencias sensoriales periféricas (Millan, 1999), se localizan en las láminas I–III y tienen axones que terminan en la médula espinal que se ramifican localmente, incluyen virtualmente todas las neuronas en la lámina II y la mayoría de neuronas en la lámina I y

III; comprenden neuronas NE, WDR y N–NOC y reciben aferencias sensoriales directas (Todd, 2010).

Las interneuronas pueden dividirse en dos clases principales: excitatorias (glutamatérgicas) e inhibitorias. Las interneuronas inhibitorias utilizan GABA y o glicina como su neurotransmisor principal. Además, mediante técnicas inmunocitoquímicas se ha mostrado que la expresión de algunos neuropéptidos es exclusiva de diferentes tipos de neuronas, teniendo así que las neuronas glutamatérgicas expresan somatostatina, neurotensina, sustancia P (SP) y neurokinina B. La neuronas GABAérgicas expresan neuropeptido Y y galanina. Por otro lado, también hay neuropéptidos como encefalinas y dinorfinas que se expresan en ambos tipos de neuronas (Todd, 2010). Es importante considerar que las interneuronas interactúan con neuronas intrínsecas del asta dorsal, con fibras aferentes primarias, etc., y pueden ejercer acciones inhibitorias o excitatorias (Millan, 1999).

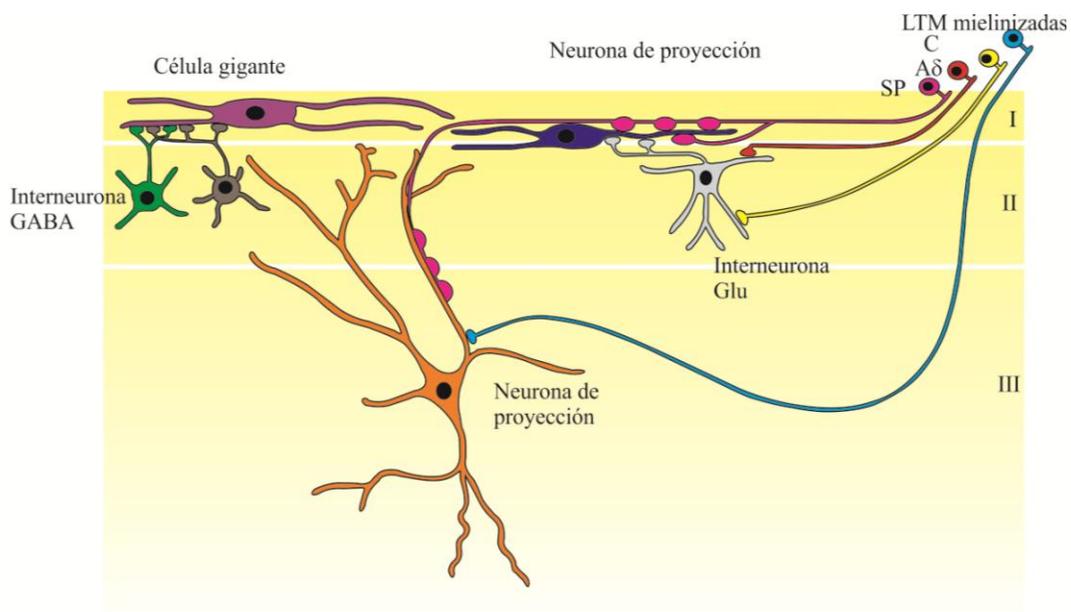


Figura 2. Tipos de neuronas del asta dorsal de la médula espinal. Se pueden observar los distintos tipos de neuronas, así como las aferencias que reciben de los distintos tipos de fibras aferentes primarias. Esquema modificado de Todd, 2010.

### *Transmisión de la información nociceptiva a centros supraespinales*

Una vez que la información nociceptiva es procesada en la médula espinal se transmite a través de neuronas de proyección a centros cerebrales supraespinales. Las neuronas de proyección se concentran en la lámina I, III–VI, con pocas en la lámina II a niveles lumbares. Muchas neuronas de proyección tienen axones que cruzan la línea media y ascienden rostralmente por la sustancia blanca formando cinco vías ascendentes: la vía espinohipotálamica, espinoreticular, espinomescencefálica, cervicotalámica y espinotalámica (Kandel et al., 2000; Purves et al., 2004).

La vía espinoreticular comprende axones de neuronas en las láminas VII y VIII. Asciende por el cuadrante anterolateral de la médula espinal y termina en la formación reticular y el tálamo. En contraste con la vía espinotalámica muchos de los axones de esta vía no cruzan la línea media.

El tracto espinomescencefálico está formado por los axones de neuronas de las láminas I y V que ascienden por el cuadrante anterolateral y el funículo lateral de la médula espinal a la formación reticular mescencefálica y la sustancia gris periacueductal (PAG) y a través del tracto espinoparabraquial proyectan al núcleo parabraquial. Las neuronas de este núcleo proyectan a la amígdala, un componente del sistema límbico, el cual contribuye al componente afectivo del dolor.

El tracto cervicotalámico tiene su origen en neuronas del núcleo cervical lateral, localizado en la sustancia blanca de los dos segmentos cervicales superiores de la médula espinal, recibe aferentes nociceptivas de neuronas de las láminas III y IV. La mayoría de los axones de este tracto se decusan y ascienden en el lemnisco medial al núcleo ventroposterolateral (VPL) y ventroposteromedial (VPM) talámicos. Algunos axones de la lámina III y IV proyectan por las columnas dorsales de la médula espinal y terminan en los núcleos cuneatus y gracilis del bulbo raquídeo.

El tracto espinohipotálamico comprende axones de neuronas de la lámina I, V y VII. Proyecta directamente a centros supraespinales autonómicos y activa respuestas neuroendocrinas y cardiovasculares.

La vía espinotalámica comprende los axones de neuronas nociceptivas específicas y WDR de la lámina I y V–VII del asta dorsal. Estos axones proyectan al lado contralateral de la médula espinal y ascienden por la sustancia blanca anterolateral terminando en el tálamo (Kandel et al., 2000). La vía espinotalámica se divide en lateral y 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. 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 de la médula espinal. Las fibras de la vía espinotalámica anterior se cruzan en la comisura blanca anterior de la médula espinal, ascienden contra lateralmente y transmiten impulsos de tacto ligero de la piel sin pelo (Carpenter, 1994).

Se ha demostrado (en la rata, el gato y el mono) que lámina I tiene proyecciones al tálamo, sin embargo estudios de trazado retrógrado en la rata sugieren que en L4 del segmento lumbar las neuronas de proyección de la lámina I constituyen ~5%, de las cuales 95% proyectan al área lateral parabraquial (LPb), un tercio a la PAG, 25% al núcleo del tracto solitario (NTS) y <5% al tálamo. Esto parece ser una característica del ensanchamiento lumbar de la rata debido a que en el ensanchamiento cervical de ésta y en los ensanchamientos lumbar y cervical del gato y el mono estas neuronas son más numerosas, figura 3 (Todd, 2010).

Así mismo, el tracto espinotalámico en la rata se origina de varias partes de la sustancia gris de la médula espinal y termina en varias regiones del tálamo que incluyen los núcleos VPL, Posterior (Po), mediodorsal, centrolateral y parafascicular. Un estudio reciente, con un marcador anterógrado indica que neuronas cervicales de la lámina I del asta dorsal proyectan al Po, VPL, VPM y Posterior triangular (PoT) y además al núcleo caudado (Gauriau y Bernard, 2004). Esta vía ascendente lleva primordialmente información sensorial y provee el componente sensorial del dolor. Del tálamo la información nociceptiva es transmitida a las cortezas somatosensorial primaria, somatosensorial secundaria, insular, cingulada anterior y prefrontal (Dickenson et al., 2008).

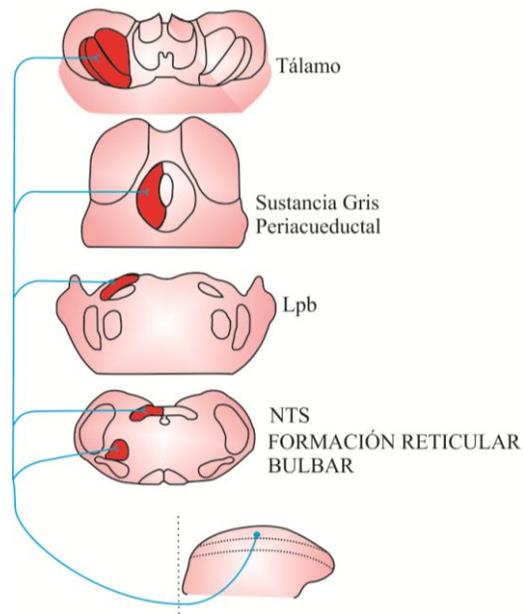


Figura 3. Neuronas de proyección de las láminas superficiales y sus blancos supraespinales. Se observan los principales blancos de las neuronas de proyección del asta dorsal de la médula espinal, estos comprenden el la formación reticular rostral del bulbo raquídeo, NTS, LPb, sustancia gris periacueductal, y el tálamo (VPL y VPM). NTS: núcleo del tracto solitario; LPb: área lateral parabraquial. Imagen modificada de Todd, 2010.

### *Modulación descendente de la información nociceptiva*

El sistema de control central 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 médula espinal) en varias circunstancias para producir ya sea facilitación (pronocicepción) o inhibición (antinocicepción). (Como revisión ver Millan, 2002; Tracey y Mantyh, 2007).

La excitabilidad de la médula espinal es influenciada directamente por aferentes descendentes originadas en diferentes centros cerebrales, como son el lóbulo frontal, la corteza cingular, la ínsula, la amígdala, la formación reticular bulbar rostral, la PAG, el núcleo cuneiforme y el hipotálamo (Tracey y Mantyh, 2007). Estas vías descendentes pueden modular la información nociceptiva a través de diversos mecanismos:

Postsinápticos: inhibiendo directamente las respuestas de neuronas del asta dorsal de proyección directamente o vía interneuronas excitatorias e inhibitorias.

Presinápticos: inhibiendo la liberación de neurotransmisor en las fibras aferentes primarias.

Los sistemas de modulación descendente utilizan diferentes neurotransmisores: serotonina, noradrenalina, dopamina, opiáceos, oxitocina, etc (Millan, 2002; Millan, 1999; Fields, 2004; Condés–Lara et al., 2009)

En particular, el sistema descendente originado en el NPV hipotalámico participa en la modulación de la información nociceptiva a nivel segmental, utilizando como neurotransmisor principal a la Oxitocina (OT). Este sistema constituye el objeto de estudio de la presente tesis.

### *Hipotálamo y modulación de la información nociceptiva*

El hipotálamo controla al sistema nervioso neurovegetativo y al sistema endócrino y 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 con la médula espinal (Carlson, 2006; Paxinos, 1995). En este sentido, el dolor visto como un sistema homeostático en el que participa el hipotálamo, involucra diversos procesos entre los que destacan la señalización de alerta, que permiten al organismo generar respuestas neurovegetativas o motoras para mantener su integridad. En la parte anterior del hipotálamo se localiza el 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 oxitocinérgicas: neuronas magnocelulares que terminan en la neurohipófisis y neuronas parvocelulares que terminan en varios lugares del sistema nervioso central (SNC), entre ellos la médula espinal (figura 4). Las áreas que contienen OT incluyen zonas autonómicas, áreas involucradas en la nocicepción en el tallo cerebral y la médula espinal, el sistema límbico y la neocorteza (Swanson, 1977; Sofroniew et al., 1981; Sawchenko y Swanson, 1982; Gimpl y Fahrenholz, 2001).

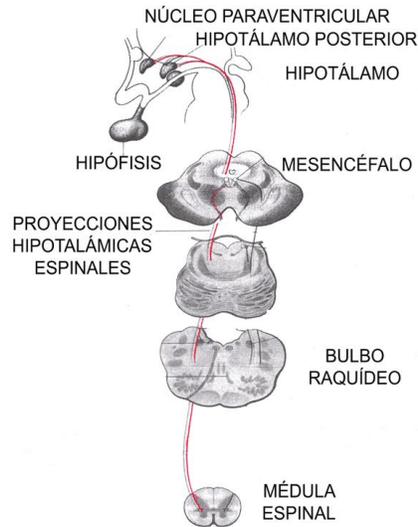


Figura 4. Esquema de la vía NPV–Espinal, donde se señala en rojo la proyección directa del NPV al asta dorsal de la médula espinal. Imagen modificada de Carpenter (1994).

### *Oxitocina y modulación nociceptiva*

La OT es un nonapéptido que se sintetiza en forma de un complejo OT–neurofisina. La neurofisina es la molécula transportadora de la OT que además está relacionada con el empaquetamiento y el almacenamiento de la OT dentro de la vesícula, antes de ser liberada al torrente sanguíneo y como neurotransmisor (Gimpl y Fahrenholz, 2001).

Las fibras oxitocinérgicas y sus terminales han sido descritas en varias áreas cerebrales en la rata: el núcleo dorsomedial hipotalámico, subículo, la corteza entorrinal, la amígdala, el bulbo olfatorio, el núcleo gris central mesencefálico, la sustancia negra, el locus coeruleus, los núcleos del rafe, el núcleo del tracto solitario y el núcleo dorsal del vago (Gimpl y Fahrenholz, 2001). Las fibras oxitocinérgicas, además, llegan a la glándula pineal y al cerebelo, y muchas de ellas continúan a lo largo de la médula espinal (Sofroniew et al., 1981; Sawchenko y Swanson, 1982; Gimpl y Fahrenholz, 2001). Además, en un estudio de microscopía electrónica se mostró que las fibras oxitocinérgicas se encuentran en todos los niveles segmentales de la médula espinal, principalmente en las láminas I–II del asta dorsal, en la lámina X alrededor del canal central y en el funículo dorsolateral. Adicionalmente, algunas fibras inmunopositivas a OT–neurofisina fueron vistas a niveles cervicales en la columna intermediomedial a nivel torácico y lumbar. Es importante señalar que no se han encontrado cuerpos neuronales OT–neurofisina positivos en la médula

espinal (Rousselot et al., 1990). Por otro lado, en un trabajo donde se combinaron dos trazadores retrógrados y técnicas de inmunohistoquímica se detectaron neuronas oxitocinérgicas en el NPV que proyectan ipsilateralmente a las láminas superficiales de la médula espinal (Condés-Lara et al., 2007). Además, mediante electrofisiología, trazado de vías e inmunofluorescencia, Condés-Lara et al., (2009) mostraron que células del NPV que responden a estimulación nociva tienen proyecciones ipsilaterales directas a la médula espinal lo que permitió sugerir la participación de fibras descendentes oxitocinérgicas como parte de un sistema homeostático descendente de modulación del dolor.

Por otro lado, los receptores a OT (ROT) se han estudiado mediante técnicas de histoautoradiografía (figura 5). De esta forma se ha mostrado que se encuentran presentes 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 médula espinal. En la médula espinal los ROT se localizan 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. La distribución del ROT tiene coincidencia de localización con las fibras OT (Reiter et al., 1994).

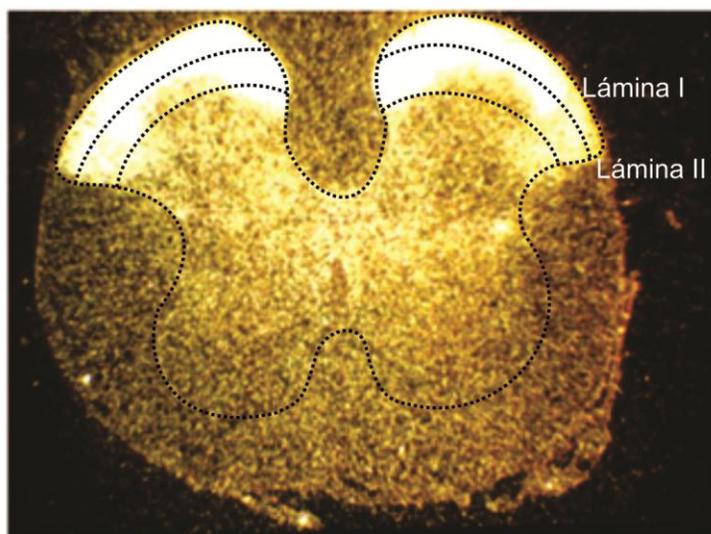


Figura 5. Localización del ROT en médula espinal mediante histoautoradiografía. El ROT se localiza de forma densa en las láminas superficiales y de forma menos densa cerca del canal central. Estos sitios de localización del ROT tienen coincidencia de localización con las fibras OT inmunopositivas. Imagen modificada de Reiter et al., 1994

En los mamíferos la OT tradicionalmente se ha relacionado con el parto y la lactancia. Sin embargo, recientemente se han reportado efectos analgésicos de la OT en estudios en ratón, rata, perro y humanos (como revisión ver Gimpl y Fahrenholz, 2001). En un estudio donde utilizaron ratones knock out para el gen que codifica para la OT demostraron que este péptido es esencial para la antinocicepción inducida por estrés, mientras que las respuestas nociceptivas en los animales wild type no se alteraron (Robinson et al., 2002). Aunado a esto, en un modelo animal de artritis se encontró que la estimulación química del NPV induce antinocicepción (Pinto–Ribeiro et al., 2008).

Estudios electrofisiológicos han mostrado que la OT inhibe las respuestas sinápticas glutamatérgicas, mediadas por los receptores AMPA, producidas por la estimulación de aferentes sensoriales en ratas y ratones (Robinson et al., 2002). En otro estudio (Condés–Lara et al., 2003) se demostró que la aplicación tópica de OT reduce las respuestas neuronales producidas por la aplicación tópica de glutamato, y que estos efectos son selectivos, ya que no todas las neuronas registradas en la médula espinal responden a la aplicación de OT y los efectos podían ser diferentes, inhibitorios o excitatorios, lo que denota una acción selectiva de la OT sobre distintas poblaciones neuronales.

Por otro lado, mediante técnicas electrofisiológicas *in vivo* se ha mostrado que el sistema descendente NPV–OT tiene una acción selectiva sobre las respuestas nociceptivas en neuronas de WDR. De esta manera, la aplicación de OT no cambia las respuestas provocadas por la activación de las fibras A $\beta$ , pero las respuestas provocadas por la activación de fibras A $\delta$  y C se reducen significativamente, sugiriendo que la OT podría actuar presinápticamente. Estos efectos son revertidos por la aplicación de un antagonista selectivo de los receptores OT (Condés–Lara et al., 2006).

En pruebas conductuales (Miranda–Cárdenas et al., 2006) en ratas con dolor neuropático se encontró que la estimulación eléctrica del NPV y la administración intratecal de OT, disminuye de forma significativa la respuesta de retirada indicando un efecto antinociceptivo, y esta inhibición puede ser revertida por un antagonista selectivo de OT. Además, la administración de antagonistas de receptores opiáceos bloquea parcialmente el efecto inhibitorio provocado por la estimulación del NPV o la administración de OT, indicando solo una participación parcial de endorfinas (Condés–Lara et al., 2009).

También se ha encontrado que la administración tópica de bicuculina en el asta dorsal de la médula espinal bloquea la inhibición de las respuestas nociceptivas causada por la estimulación del NPV (Rojas–Piloni et al., 2007), o la aplicación de OT (Condés–Lara et al., 2009). Adicionalmente al efecto inhibitorio provocado por la estimulación del NPV en neuronas WDR, otra población de neuronas (NPV–ON) son activadas. De esta manera, la reducción de la respuesta de células de WDR correlaciona con el incremento de la actividad células NPV–ON, por lo que se ha propuesto que dichas células son interneuronas inhibitorias (Rojas–Piloni et al., 2007).

En un estudio en cultivos de médula espinal mediante la técnica de registro electrofisiológico de célula completa (Jo et al., 1998) se mostró que un subconjunto de neuronas del asta dorsal posee receptores OT y su activación facilita la transmisión sináptica glutamatérgica mediada por receptores tipo AMPA. En este mismo sentido, en otro estudio (Breton et al., 2008) se encontró que una subpoblación de neuronas glutamatérgicas de la lámina II del asta dorsal poseen receptores funcionales a la OT; los cuales al ser activados facilitan la liberación sináptica de glutamato y excitan una gran población de interneuronas GABAérgicas, lo que ha permitido sugerir que la OT promueve un incremento generalizado de la inhibición sináptica en la médula espinal. Esta facilitación de la inhibición GABAérgica probablemente representa la base de los efectos antinociceptivos espinales de la OT y de la estimulación del NPV. En este mismo estudio (Breton et al., 2008), se mostró que las neuronas activadas por OT no fueron positivas a GAD, por lo que sugieren la presencia de receptores funcionales OT en terminales sinápticas de una sub población de neuronas glutamatérgicas y no en interneuronas GABAérgicas del asta dorsal. Este mismo grupo (Breton et al., 2009) reportó que los efectos de la OT en la transmisión sináptica en neuronas de la lámina II se ve acompañada por una modulación de las corrientes de potasio, las cuales regulan las propiedades de salida de estas neuronas que reciben información nociceptiva de fibras aferentes primarias. Todos estos resultados han permitido sugerir que las proyecciones descendentes OT podrían activar interneuronas inhibitorias GABAérgicas en la lámina II, y éstas a su vez inhibir a las aferentes nociceptivas. Sin embargo, mediante microscopía confocal e inmunofluorescencia, se ha demostrado que en el asta dorsal de la médula espinal las fibras inmunomarcadas contra OT tienen interacción con fibras aferentes primarias

inmunomarcadas contra el transportador vesicular de glutamato tipo 1 (VGLUT1). De la misma manera, se ha mostrado que hay interacción entre fibras que contienen OT e interneuronas inmunomarcadas contra GABA y finalmente, interacciones de neuronas que contienen GABA y VGLUT1. Siendo la interacción OT–VGLUT1 la de mayor frecuencia (70%) y menos frecuentes las interacciones OT–GABA (15%) y GABA–VGLUT1 (16%) (Moreno–López, 2009). Estos datos sugieren que la modulación ejercida por la OT en el asta dorsal podría llevarse a cabo por una acción directa sobre las aferentes nociceptivas o bien, a través de interneuronas inhibitorias GABAérgicas.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema NPV–OT–espinal tiene, por un lado, efectos inhibitorios selectivos sobre respuestas de fibras A $\delta$  y C en neuronas de la médula espinal y por otro lado activa células que se han denominado NPV–ON que se ha sugerido son interneuronas de tipo inhibitorio y que a través de la activación de estas células este sistema ejerce sus efectos inhibitorios sobre las respuestas de fibras A $\delta$  y C en neuronas espinales. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo esta modulación dual por del sistema NPV–OT–espinal no se conocen por lo que para dilucidar entre estas opciones se investigó la localización y se realizó la caracterización de las células que expresan el ROT en la médula espinal y el DRG.

## JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento, las investigaciones sobre el mecanismo de acción antinociceptivo del sistema NPV–OT no han permitido clarificar con detalle los blancos celulares que activa la OT en el asta dorsal. Los estudios electrofisiológicos sugieren que la OT inhibe la transmisión de información nociceptiva actuando a nivel presináptico. Asimismo, hay evidencia que sugiere que el efecto antinociceptivo de la OT se obtiene por activación de interneuronas inhibitorias. Sin embargo, estudios histológicos muestran que existe una estrecha relación entre las proyecciones oxitocinérgicas descendentes con fibras aferentes primarias, lo que ha permitido suponer que la inhibición oxitocinérgica es directa sobre las aferentes nociceptivas.

En este trabajo fueron identificados los elementos espinales blancos de la OT que forman parte del mecanismo inhibitorio que modula la transmisión de información nociceptiva. Para ello, se utilizó, el trazado de vías, inmunofluorescencia y microscopía de fluorescencia y confocal, con la finalidad de identificar los elementos celulares que expresan el receptor a la OT.

## HIPÓTESIS

El mecanismo de acción del sistema NPV–OT en la médula espinal es postsináptico: el ROT se localiza en neuronas espinotalámicas o bien presináptico y puede estar mediado de dos formas distintas no excluyentes:

- Directamente sobre las fibras aferentes nociceptivas A $\delta$  y C: El ROT se expresa en las fibras aferentes primarias nocieptivas del grupo C.
- A través de interneuronas: El ROT se expresa en neuronas GABAérgicas de la médula espinal

## OBJETIVO GENERAL

- Identificar a los elementos celulares que son blanco de la vía descendente NPV–espinal en el asta dorsal de la médula espinal.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar la localización celular del ROT en el asta dorsal y en el DRG en los segmentos lumbares de la médula espinal.
- Identificar la posible colocalización de los ROT con fibras aferentes primarias, fibras C peptidérgicas, fibras C no peptidérgicas, proteína específica neuronal nuclear (NeuN), neuronas espinotalámicas y neuronas GABAérgicas.

## MÉTODO

Se utilizaron ratas macho Wistar de 280 a 310 g de peso, las cuales se mantuvieron en condiciones de temperatura y luz controladas ( $23\pm 1^\circ\text{C}$  con 12 horas de iluminación comenzando a las 6:00 horas), con agua y alimento *ad libitum*. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a las normas del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología y a los lineamientos para experimentación en animales de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) (Zimmermann, 1983).

### *Inyección de Trazadores*

#### *Fluororuby*

Para la inyección del trazador anterógrado fluoro ruby (FR) (Fluorochrome, LLC) los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina (Cheminova) (70/6 mg/kg, i.p). Los animales se colocaron en un aparato estereotáxico y se fijaron las vertebrae T13–L1, donde se realizó una laminectomía para exponer los segmentos lumbares L4–L5. Para ello, se removió el músculo adyacente a la vertebra fijada y bajo un microscopio de disección y con ayuda de un taladro dental se removió la apófisis espinosa y el hueso adyacente. Después de aislar las raíces dorsales, se realizó una lesión a la raíz dorsal L4 sobre la cual se inyectaron 30  $\mu\text{l}$  de FR 10% disuelto en agua destilada. La inyección del trazador se realizó por el método de presión manual, con una jeringa Hamilton acoplada a un vernier manual y todo esto acoplado a una torre milimétrica de estereotáxico. Una vez realizada la inyección, la jeringa se dejó por 15 minutos en el sitio de inyección. Finalmente, se colocó spongostan standard Johnson–Johnson en la raíz lesionada y se procedió a suturar el músculo y la piel con hilo quirúrgico estéril. A los animales se les dió un periodo de supervivencia de 2 días con el fin de que el trazador se transporte.

Una vez concluido dicho periodo, los animales se anestesiaron con una sobre dosis de pentobarbital sódico (Cheminova) y se fijaron por perfusión vía intracardiaca con 100 ml de solución salina seguida de 250 ml de solución fijadora (paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1M, pH7.4) a  $4^\circ\text{C}$ . Se extrajeron los segmentos lumbares de la médula espinal y se colocaron en 50 ml de la solución fijadora. Se les dió un período de post

fijación de 2 h a 4°C. A continuación los cerebros se colocaron en una solución de sacarosa al 30% en buffer de fosfatos 0.1M pH 7.4 para su crioprotección.

Los segmentos lumbares se cortaron en un micrótopo de congelación. Se realizaron 5 series de cortes transversales de 100 µm de espesor cada 500µm, en buffer fosfatos salino (BFS), pH 7.4. Estos cortes se utilizaron para evaluar la localización del ROT en médula espinal.

### *FluoroGold*

Para la inyección del trazador neuronal retrógrado FluoroGold (FG) (Fluorochrome, LLC), los animales previamente anestesiados con ketamina/xilacina (70/6 mg/kg, i.p), se colocaron en un aparato estereotáxico. Se expuso el cráneo y se realizaron trépanos del lado derecho en las coordenadas AP=5.70 y 4.8 mm; L=3.4mm; H=3.60 y 3.8 mm para localizar el VPL; AP=5.70 y 4.80 mm; L=2 y 2.20 mm; H=4.40mm para localizar el PO; y AP=3.70 mm, L=2.6 mm, H=3.8 mm para localizar el núcleo posterior talámico (Po) de acuerdo al atlas de Paxinos & Watson (1998). 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. Posterior a la inyección del FG la pipeta se dejó por 15 segundos en la última posición después de este tiempo se retiró, se colocó cera para hueso en el trepano y se procedió a suturar piel y músculo con hilo quirúrgico. A los animales 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 intracardiaca con solución salina 0.9% seguida de solución fijadora (paraformaldehído 4% en Buffer Fosfatos 0.1M pH 7.4). Posteriormente, se extrajeron el cerebro y los segmentos lumbares de la médula espinal. Se les dio un periodo de post fijación de 2h y posterior a éste se colocaron en solución de sacarosa al 30% para su crioprotección. Para verificar los sitios de inyección se realizaron 5 series de cortes coronales de 40 µm del cerebro. La serie 1 se montó inmediatamente en portaobjetos gelatinizados, se procedió a deshidratar utilizando alcoholes (70%, 80%, 96% y 100%,) y a aclarar (Xilol). La serie 2 se montó y procesó con violeta de cresilo, con la finalidad de verificar el sitio de inyección.

De la médula espinal se realizaron 4 series de cortes transversales de 40  $\mu\text{m}$  de espesor. Los cortes se procesaron mediante inmunofluorescencia para detectar ROT y evaluar la colocación de neuronas de proyección espinotalámicas y ROT.

#### *Localización de ROT en médula espinal y en el ganglio de la raíz dorsal*

Para identificar la posible localización de ROT en los segmentos lumbares de la médula espinal y neuronas sensoriales del DRG se utilizaron ratas macho Wistar que fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital sódico para ser perfundidas vía intracardiaca con solución salina 0.9% seguido de paraformaldehído 4% en Buffer Fosfatos 0.1 M. Se obtuvieron los segmentos lumbares de la médula espinal y los ganglios lumbares (L1–L6) de ambos lados y se les dió un periodo de postfijación de 2 h y después de éste tiempo se colocaron en sacarosa 30% en buffer fosfato 0.1 M. Del tejido de médula espinal, se realizaron cortes transversales de un espesor de 50  $\mu\text{m}$  en un micrótopo que cuenta con un sistema de congelación, los cortes se almacenaron en PBS 0.1 M. Del tejido de DRG se realizaron cortes de 30  $\mu\text{m}$  de espesor en un criostato, los cuales se montaron inmediatamente en portaobjetos gelatinizados para posteriormente ser procesados mediante inmunofluorescencia para detectar ROT, SP e IB4.

#### *Inmunofluorescencia*

En todos los casos se utilizaron cortes de médula espinal o DRG (según el objetivo), los cuales se almacenaron en PBS a 4°C. Para evaluar la localización de ROT en el asta dorsal de la médula espinal se utilizaron los cortes de los animales a los que se les realizó la inyección de FR en fibras aferentes y se procesaron con inmunofluorescencia para sustancia P, ROT y NeuN.

Para determinar la localización del ROT en neuronas espinotalámicas en el asta dorsal de la médula espinal se utilizaron los cortes de los animales a los cuales se les inyectó FG en el Po y VPL talámicos y el tejido se procesó con inmunofluorescencia contra ROT.

Para evaluar la localización del ROT en neuronas sensoriales del DRG se utilizaron cortes de ganglio y el tejido se procesó con inmunofluorescencia para detectar ROT y SP

En todos los casos, los cortes se incubaron con los anticuerpos primarios por 24h a 4°C, para lo cual los anticuerpos primarios se diluyeron en 5 ml de PBS a la concentración apropiada.

- ROT (epitope: región N-terminal del receptor de origen humano): anti-ROT desarrollado en cabra (sc-8103, Santa Cruz Biotechnology, santa cruz, CA, USA 1:400).
- Sustancia P (reacciona con la región COOH-terminal de SP): anti-SP desarrollada en rata (Chemicon 1:200),
- Proteína nuclear neuronal específica (NeuN MAB377 reacciona con la mayoría de tipos de células neuronales): anti-NeuN desarrollado en ratón (Chemicon 1:1000).
- Oxitocina: Anti OT-neurofisisina desarrollada en ratón proporcionada por el Dr. H. Gainer 1:250.
- GABA: Anti-GABA desarrollado en conejo (Sigma 1:2000).
- Isolectin IB4 Alexa Fluor 564 dye conjugates (Invitrogen 1:400).

Después se realizó un lavado de 5 minutos en PBS 0.1M, para continuar con la incubación de los anticuerpos secundarios correspondientes por 24h a 4°C, se utilizaron: Alexa 633 burro anti-cabra, Alexa 488 burro anti-rata, Alexa 350 burro anti-ratón, Alexa 488 burro anti rata [1:300], Alexa 555 burro anti-conejo. Después del periodo de incubación los cortes se lavaron por 5 minutos en PBS y se montaron en portaobjetos gelatinizados utilizando como medio de montaje DPX o glicerol en PB [1:1].

### *Análisis histológico*

Para analizar la colocalización ROT–SP–FR–NeuN en médula espinal y ROT–SP en el DRG, se utilizaron las imágenes obtenidas de un microscopio confocal invertido Zeiss LSM 510 Meta que cuenta con 4 láseres: un láser de Argón/2 que trabaja con 4 longitudes de onda, 458, 477, 488 y 515nm que se utilizó para detectar el anticuerpo secundario Alexa 488 y FR; un láser DPSS; un láser HeNe de 633nm, que se utilizó para detectar el anticuerpo secundario Alexa 633; y finalmente un mecanismo multifotónico coherente–XR entonable que opera desde el rango UV al Infrarrojo, que se utilizó para detectar el anticuerpo secundario Alexa 350. Los análisis de colocalización se realizó con el programa Zeiss LSM Image examiner versión 4.0.0241. Para analizar la colocalización ROT–FG se utilizaron imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia, utilizando los filtros de fluoresceína y ultravioleta. Estas imágenes se procesaron con Adobe Photoshop CS y el programa Zeiss LSM Image Examiner.

## RESULTADOS

En los experimentos con inmunofluorescencia los resultados muestran que existen cuerpos celulares en los cuales colocaliza ROT–NeuN, lo que indica que el ROT se localiza en neuronas de las láminas superficiales del asta dorsal. Sin embargo, también se encontraron cuerpos celulares que presentan el ROT pero que no colocalizan con NeuN. Mediante la técnica de trazado neuronal los resultados indican que las neuronas espinotalámicas no expresan ROT, además mediante inmunofluorescencia encontramos que las neuronas GABAérgicas no expresan ROT. Por otro lado, se encontró que el ROT se expresa en neuronas sensoriales del DRG y que en estas células no colocalizan con SP ni con IB4.

### *Localización de ROT en el asta dorsal de la médula espinal*

El análisis de la localización de ROT, FR y NeuN se realizó en los segmentos L1–L6 de la médula espinal. La colocalización de NeuN–ROT nos permitió dilucidar si el ROT se localiza en neuronas del asta dorsal; la colocalización FR–ROT permitió dilucidar si el ROT se localiza en fibras aferentes primarias; la colocalización de SP–FR ROT permitió dilucidar si el ROT se localiza en fibras aferentes primarias nociceptivas. De esta forma, la SP se localizó en las láminas I y II de la médula espinal; el FR se localizó en toda el asta dorsal; ROT se localizó densamente en las láminas I–II y con menor densidad en las láminas III–VI; NeuN además permitió identificar la citoarquitectura de la médula espinal.

Se analizaron las imágenes de microscopía confocal utilizando la proyección tridimensional. De esta manera, 552 células fueron NeuN positivas, 203 fueron ROT positivas, 187 ROT–NeuN y 16 ROT–no NeuN. Esto nos indica que el ROT colocaliza con NeuN (92.11%), lo que indica que neuronas del asta dorsal expresan el receptor a OT (Figura 6). Adicionalmente, no se encontró colocalización del ROT ni con SP ni con FR, lo cual indica que las aferentes primarias en la médula espinal no expresan el ROT. Un hallazgo interesante fué que se encontraron cuerpos celulares (7.88%) que expresan el ROT, pero no colocalizan con NeuN (Figura 6). Finalmente es importante señalar que se encontró colocalización SP+FR.

### *Localización de ROT en neuronas espinotalámicas en el asta dorsal de la médula espinal*

Con la finalidad de analizar si neuronas de proyección espinotalámicas expresan el ROT, se inyectó el trazador retrógrado neuronal FG en los núcleos Po y VPL talámico en 2 animales (Figura 7a)

Las neuronas FG positivas se localizaron principalmente en las láminas I–VII y X en los segmentos lumbares L1–L6 de la médula espinal. Se identificaron un total de 66 neuronas FG positivas en el asta dorsal, sin embargo, de éstas sólo 2 se localizaron en la lámina I. El ROT se observó como un punteo en color verde en cuerpos celulares y se localizó de forma densa en las láminas superficiales, así como esparcido en el asta dorsal. No se observó colocalización ROT–FG en ningún caso, lo cual indica que el ROT no se localiza en neuronas espinotalámicas (Figura 7b).

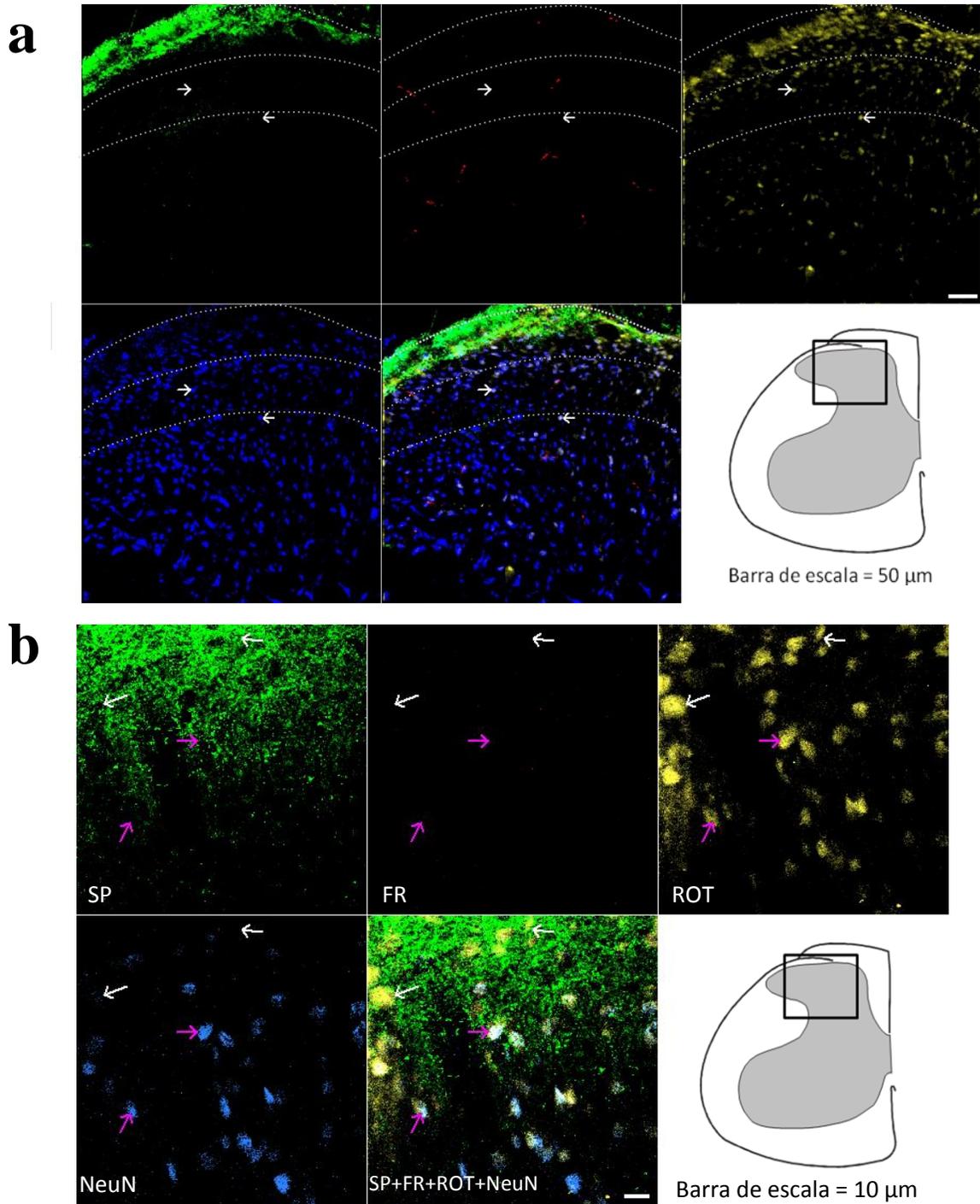


Figura 6. Imágenes de microscopía confocal donde se muestra la reconstrucción de un corte transversal de médula espinal lumbar de un espesor de 100  $\mu\text{m}$ . En **a** se ilustra la distribución de SP, FR, ROT, NeuN y SP+FR+ROT+NeuN en el asta dorsal de la ME. La colocalización de ROT-NeuN se señala con las flechas blancas Barra de escala igual a 50 $\mu\text{m}$ . En **b** con las flechas blancas se señala las células que contienen ROT+NeuN y las flechas moradas señalan células que contienen ROT y no colocalizan con NeuN. Barra de escala igual a 10  $\mu\text{m}$ . En el recuadro inferior derecho se observa un esquema modificado de Paxinos & Watson (1998), de un corte de médula espinal L4 donde el cuadro indica el campo correspondiente a la imagen de confocal.

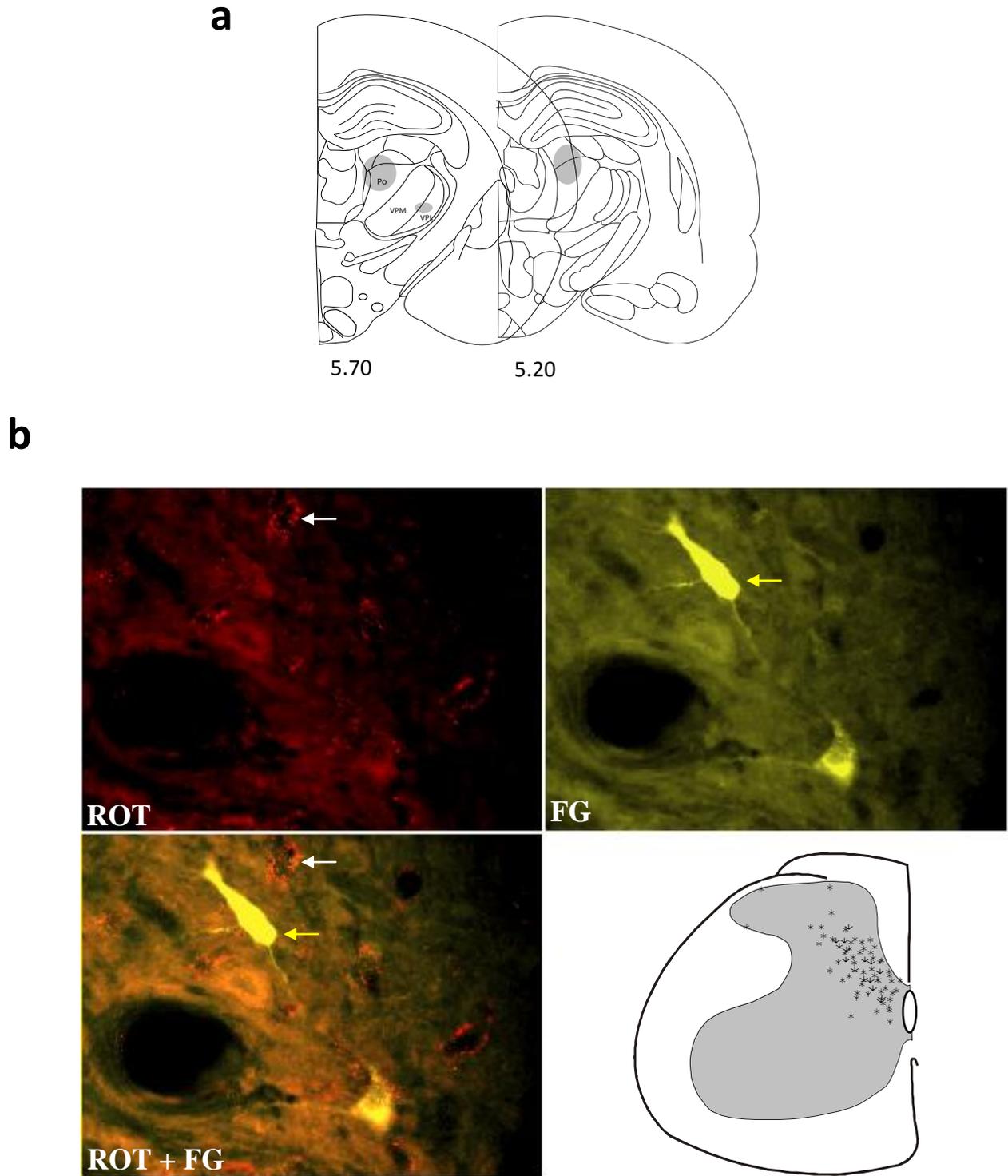


Figura 7. **a** muestra los sitios de inyección del trazador retrógrado FG en un esquema modificado de Paxinos & Watson. **b** imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando células que expresan el ROT (rojo) y células espinotalámicas (FG), así como un traslape ROT+FG. El esquema modificado de Paxinos & Watson, 1998, de un corte de médula espinal L4 muestra la distribución de todas las células FG positivas contabilizadas en los segmentos lumbares de la médula espinal en dos animales. Ninguna de las células marcadas con FG colocalizó con ROT. Magnificación 400X.

### *Localización de ROT en neuronas GABAérgicas*

Con el fin de estudiar si el ROT se localiza en neuronas GABAérgicas se analizó la colocalización de células GABA y ROT en los segmentos lumbares L1–L6 de la rata. Las neuronas inmunopositivas a GABA (n=20) se localizaron en las lámina II–III del asta dorsal y ROT se localizó de forma densa en las láminas superficiales y esparcidas en el resto del asta dorsal (Figura 8). Se encontramos que ROT no colocaliza con GABA en ningún caso.

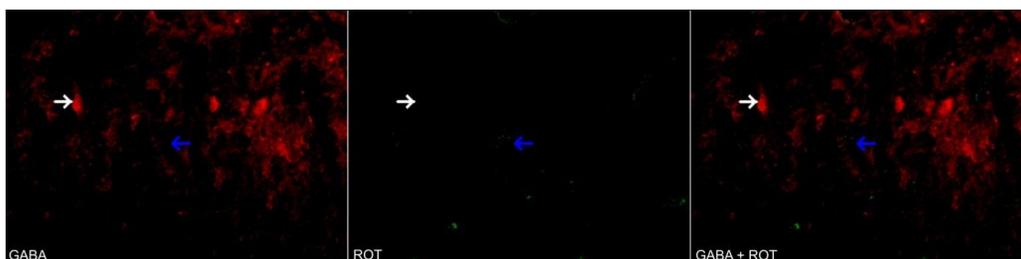


Figura 8. Imágenes de microscopia de fluorescencia donde se observa GABA (rojo) y ROT (verde) y un traslape de los 2 canales. La flecha blanca señala una neurona GABA inmunopositiva y como se puede observar no colocaliza con ROT. La flecha azul indica la marca ROT inmunopositiva, nótese que ROT no colocaliza con GABA. Magnificación=400X.

### *Localización de ROT en células sensoriales del ganglio de la raíz dorsal*

Se encontró que el ROT se localiza en células sensoriales del DRG (Figura 9). En el DRG se localizan los somas de las neuronas que dan origen a las diferentes fibras aferentes primarias: peptidérgicas que liberan SP y CGRP y no peptidérgicas que unen IB4. El ROT no colocaliza con SP (Figura 9 C), lo cual está de acuerdo con lo encontrado en médula espinal en el presente estudio (figura 6). Por otro lado, se encontró colocalización entre las neuronas IB4 positivas y ROT, sin embargo, solo el 5% de las células mostraron esta condición (Figura 9 D).

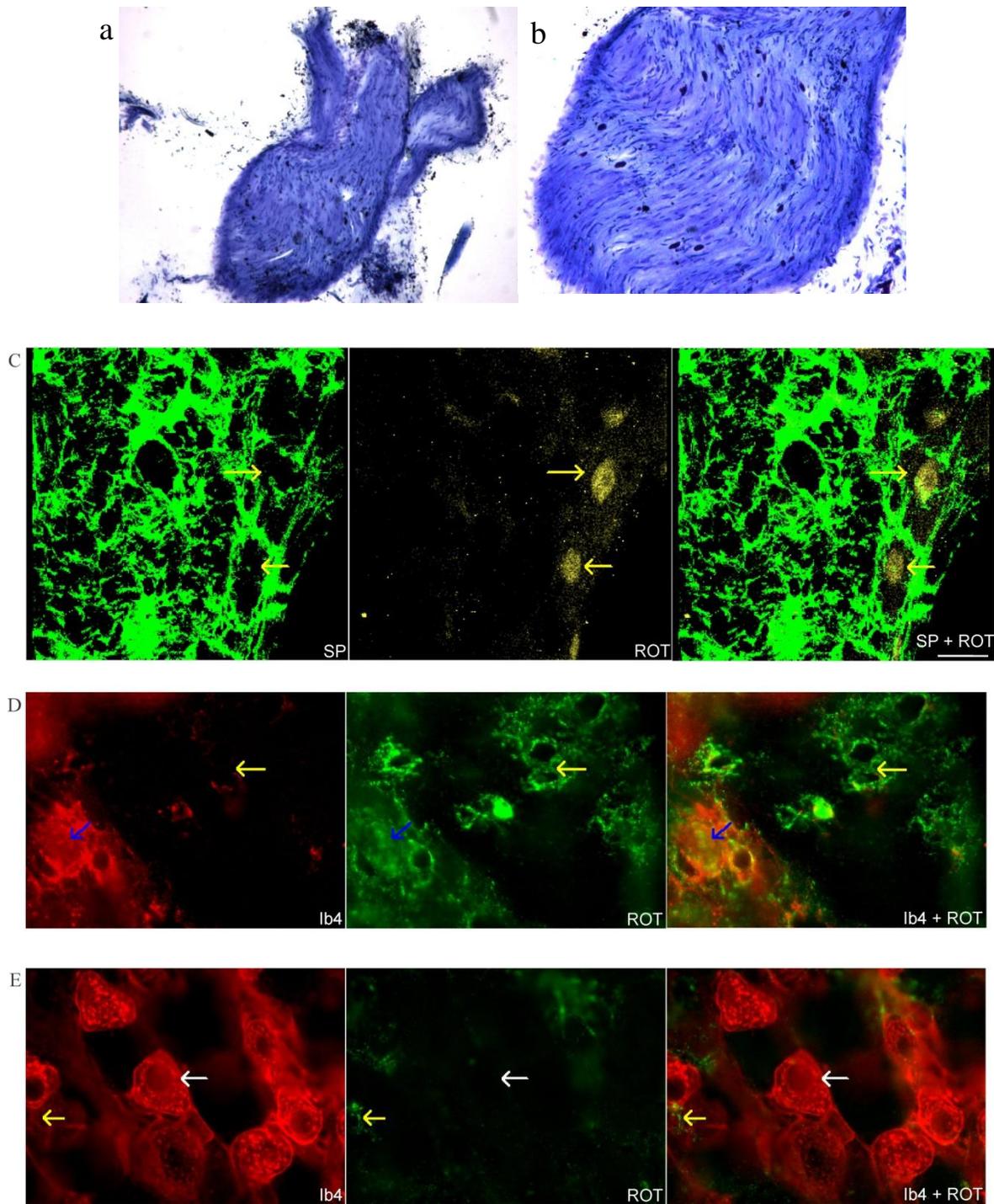


Figura 9. Imagen de microscopio óptico de un ganglio lumbar con tinción de violeta de cresilo en **a** con un aumento de 5X y en **b** con un aumento 10X. **C** Imagen de microscopia confocal de un DRG que muestra SP (verde) y ROT (amarillo). Nótese que ROT no colocaliza con SP. Barra de escala=10  $\mu$ m. **D** y **E** imagen de microscopia de fluorescencia donde en rojo se observa IB4 y en verde ROT, Nótese que ROT no colocaliza con IB4. En **D** se ilustra un ejemplo de colocalización ROT-IB4, sin embargo, solo el 5% de neuronas IB4 positivas colocalizó con ROT. Aumento 400X, las flechas amarillas señalan ROT, las flechas blancas señalan IB4 y las flechas azules señalan la colocalización IB4-ROT.

## DISCUSIÓN

Mediante técnicas de inmunofluorescencia, microscopia de fluorescencia y microscopía confocal en este trabajo se encontró que el ROT se localiza de forma densa en las láminas superficiales (I–II) y de forma dispersa en las láminas profundas del asta dorsal de la médula espinal. Asimismo, existen cuerpos celulares en los que colocaliza ROT–NeuN, lo que indica que el ROT se expresa en neuronas de las láminas superficiales así como en láminas profundas del asta dorsal. Sin embargo, también se encontraron cuerpos celulares que expresan el ROT pero que no colocalizan con NeuN. Adicionalmente, mediante la técnica de trazado neuronal de la vía espinotalámica los resultados indican que las neuronas espinotalámicas no expresan ROT. Por otro lado mediante inmunofluorescencia se encontró que el ROT no se expresa en neuronas GABAérgicas localizadas en las láminas superficiales del asta dorsal.

Los hallazgos indican que el ROT se expresa en células del DRG y que estas no colocalizan con SP e IB4.

### *Localización del ROT en el asta dorsal de la médula espinal*

El ROT se ha estudiado mediante técnicas de histoautoradiografía y se ha encontrado que se encuentra ampliamente distribuido en el SNC: en áreas corticales, en el sistema olfatorio, en los ganglios basales, el sistema límbico, el tálamo, el hipotálamo, el tallo cerebral y en la médula espinal (Gimpl y Fahrenholz, 2001). Las terminales OT en la médula espinal de la rata tienen coincidencia de localización con el ROT, lo que sugiere que la OT está involucrada en funciones sensoriales y autonómicas (Rousselot et al., 1990).

Recientemente se ha estudiado el ROT con técnicas de inmunofluorescencia en el hipotálamo (Caligioni et al., 2007) y la en médula espinal con el uso de ratones knock-in que expresan una proteína fluorescente bajo control de la región reguladora del gen del ROT (Wrobel, et al., 2011) así como mediante ratones knock out para el ROT (Schorsch–Petcu et al., 2010). Sin embargo no existen reportes anteriores en donde se haya estudiado el ROT mediante inmunofluorescencia en la médula espinal. En el presente trabajo estudiamos mediante inmunofluorescencia la localización del ROT en la médula espinal y se encontró que se localiza de forma densa en las láminas superficiales y de forma menos

densa en las láminas III–VI. El ROT se localiza en neuronas lo cual está de acuerdo con lo reportado por Wrobel et al., 2011 en ratones. De manera interesante, el ROT no se localiza en fibras inmunomarcadas con SP, lo que sugiere que el éste no es expresado por fibras C peptidérgicas. Estos resultados sugieren que la modulación descendente oxitocinérgica no se lleva a cabo directamente sobre este tipo de fibras e indican que la modulación es sobre neuronas.

Las fibras aferentes primarias llegan a la médula espinal con una distribución específica. Los mecanorreceptores llegan a las láminas III–V, las fibras A $\delta$  y C inervan la lámina I y II. A su vez, las fibras C nociceptivas pueden ser divididas en dos grupos neuroquímicos: fibras peptidérgicas que liberan SP y CGRP y fibras no peptidérgicas que unen IB4 (Todd, 2010). En este trabajo se encontró que el ROT no colocaliza con SP, sin embargo, aun no podemos descartar que el ROT no se localice en fibras aferentes nociceptivas que liberen únicamente CGRP ya que no todas las fibras C peptidérgicas coliberan estos péptidos (Gibbons et al., 1987).

Las fibras C peptidérgicas están asociadas principalmente con la piel donde inervan la epidermis, mientras que las no peptidérgicas inervan otros tejidos y regiones profundas de la piel. Las diferencias en la distribución periférica y central de estas aferentes sugiere que son diferentes en su función (Todd, 2010; Basbaum et al., 2009). En el presente estudio no encontramos colocalización de ROT con sustancia P ni con IB4. Esto último concuerda con un trabajo reciente en donde se describe que en la médula espinal las neuronas que expresan ROT no colocalizan con IB4 (Wrobel, et al., 2011).

Por otro lado se ha descrito que en la lámina III se localizan interneuronas glutamatérgicas que expresan la subunidad  $\gamma$  de la Proteína Kinasa C (PKC $\gamma$ ) (Braz et al., 2005; Todd, 2010). Recientemente se describió que las neuronas que expresan ROT no colocalizan con PKC $\gamma$  (Wrobel et al., 2011), sin embargo, mediante la técnica de registro electrofisiológico en cultivos (Jo et al., 1998) y en rebanadas (Breton et al., 2008) se ha demostrado que la aplicación de OT incrementa la transmisión sináptica glutamatérgica mediada por el receptor AMPA en neuronas del asta dorsal.

Un dato interesante fue el hecho de encontrar que el ROT se localiza en células que no son neuronas. Esto sugiere que el ROT es expresado por células gliales de la médula espinal. En este sentido, en el hipotálamo se ha reportado que el ROT se localiza en astrocitos y participa en funciones de regulación en la transmisión sináptica glutamatérgica (Kuo et al., 2009) y en cultivos de astrocitos, Evrard et al. (1997) reportaron sitios de unión a OT en cultivos de astrocitos de médula espinal. Por otro lado, la participación de la glía en la modulación de las aferencias nociceptivas en médula espinal es un hecho conocido (O'Callaghan & Miller, 2010). Sin embargo, no existen reportes en la literatura que describan la participación de la OT sobre la excitabilidad neuronal mediada por células gliales en la médula espinal.

#### *Localización de ROT en neuronas espinotalámicas en el asta dorsal de la médula espinal*

La información nociceptiva es procesada en la médula espinal y se transmite a través de neuronas de proyección a centros cerebrales supraespinales. Las neuronas de proyección se concentran en la lámina I, III–VI, con pocas en la lámina II a niveles lumbares (Millan, 1999; Todd, 2010). Estas neuronas de proyección forman diversos tractos, entre los cuales se encuentra el tracto espinotalámico. Las células que dan origen a este tracto comprenden neuronas nociceptivas específicas y WDR de la lámina I y V–VII del asta dorsal. Estos axones proyectan al lado contralateral de la médula espinal y ascienden por la sustancia blanca anterolateral terminando en el VPL y VPM (Kandel et al., 2000; Carpenter, 1994).

Además, mediante trazado anterógrado se encontró que neuronas cervicales de la lámina I del asta dorsal proyectan al Po, VPL, VPM y PoT talámicos y además al núcleo caudado (Gauriau y Bernard, 2004). En el presente trabajo se encontró que el ROT no se localiza en neuronas de proyección espinotalámicas localizadas en las láminas I, III–VI, lo que sugiere que los efectos inhibitorios del sistema NPV–espinal–OT no se modulan de forma postsináptica sobre este sistema de proyección. En este estudio, así como en trabajos previos (Reiter, et al., 1994; Wrobel et al., 2011; Gimpl y Fahrenholz, 2001), se ha descrito que el ROT se localiza de forma densa en las láminas superficiales y de forma esparcida en el asta dorsal. Las neuronas espinotalámicas se localizan en las láminas I y V–VII, sin embargo el número de neuronas localizadas en las láminas superficiales del segmento lumbar en la rata que proyectan al tálamo representan ~5% (Todd, 2010) del total de

neuronas de proyección localizadas en la lámina I. Es posible que el ROT se localice en neuronas que formen sistemas que proyecten a otras estructuras supraespinales como son la PAG, el NTS y el LPb (Todd, 2010). Se necesitan más estudios que permitan analizar esta posibilidad.

El sistema NPV–espinal–OT modula neuronas espinotalámicas que proyectan al VPL (Rojas–Piloni et al., 2008), debido a que el ROT no se localizó en las neuronas espinotalámicas nos sugiere que las neuronas de proyección de este tracto no son moduladas directamente por la proyección descendente oxitocinérgica y refuerza la idea de que el mecanismo de acción es presináptico. También es importante considerar que la información nociceptiva también se transmite por el sistema postsináptico de las columnas dorsales y que estas neuronas también están moduladas este sistema NPV–espinal–OT (Rojas–Piloni et al., 2008). Por lo tanto no podemos descartar que el ROT se localice en neuronas que proyecten por este sistema u otros.

#### *Localización de ROT en neuronas GABAérgicas*

El ROT se localiza de forma densa en las láminas superficiales y tiene coincidencia de localización con las fibras oxitocinérgicas (Reiter et al., 1994; Wrobel et al., 2010; Rousselot et al., 1990). En este sentido las neuronas de las láminas I–III tienen axones que terminan en la médula espinal y se ramifican localmente. En la rata, el GABA está presente en ~25%, 30% y 40% de neuronas en las láminas I, II y III respectivamente (Todd, 2010); asimismo, la información nociceptiva llega principalmente a las láminas superficiales (Millan, 1999). Estudios recientes sugieren la participación de sistemas GABAérgicos que median los efectos inhibitorios del NPV sobre neuronas WDR del asta dorsal de la médula espinal (Rojas–Piloni et al., 2007; Breton et al., 2008; Condés–Lara et al., 2009). Aquí se identificó que células inmunopositivas GABA no colocalizan con ROT. En este sentido, se ha planteado que los efectos inhibitorios del sistema NPV–OT–espinal estén mediados tanto por interneuronas excitatorias como por inhibitorias (Breton et al., 2008; Condés–Lara et al., 2009), los presentes hallazgos apoyan esta hipótesis ya que el ROT no se expresa en neuronas GABAérgicas.

Asimismo, se ha reportado que las neuronas GABAérgicas espinales, cuando se estimula el NPV, no son c-Fos positivas. Además la aplicación de OT modula la transmisión glutamatérgica mediada por el receptor AMPA en registros electrofisiológicos en cultivos y en rebanadas de médula espinal (Jo et al., 1998; Breton et al., 2008). En ratas recién nacidas se ha descrito que la OT reduce la entrada de calcio evocadas por GABA y además reduce corrientes de  $Cl^-$  (Mazzuca et al., 2011) lo cual refuerza la participación del sistema GABAérgico en mediar los efectos analgésicos del NPV. Sin embargo el hecho de que ROT no colocaliza con GABA sugiere que la activación de interneuronas GABAérgicas no es por una acción directa de OT, si no posiblemente a través de interneuronas glutamatérgicas.

#### *Localización de ROT en neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal*

En este trabajo se describió que el ROT se localiza en células sensoriales del DRG, pero no colocaliza con sustancia P, un péptido liberado por fibras aferentes nociceptivas peptidérgicas. Este resultado está de acuerdo con lo reportado en este trabajo en la médula espinal, en donde no se encontraron fibras inmunoreactivas a SP que colocalizaran con el ROT (Figura 6 y 9 respectivamente).

El análisis de colocalización de células IB4 positivas con ROT en el DRG indicó que solo el 5% de las células inmunopositivas a ROT colocaliza con IB4. Los estudios electrofisiológicos *in vivo* han mostrado que el sistema descendente NPV-OT tiene una acción selectiva sobre las respuestas de fibras nociceptivas A $\delta$  y C en neuronas espinales WDR (Condés-Lara et al., 2006., Condés-Lara et al., 2009., Rojas-Piloni et al., 2008), lo que sugiere que el mecanismo de acción de este sistema es presináptico, es decir, actúa sobre aferentes nociceptivas. En este sentido, se ha reportado que fibras oxitocinérgicas tienen cercanía con fibras aferentes primarias inmunomarcadas con VGLUT1, el cual es un marcador molecular que expresan ciertas poblaciones de aferentes primarias (Moreno-López, 2009). Este hallazgo sugiere que el mecanismo de acción del sistema NPV-OT-espinal es directo sobre las fibras aferentes primarias. Sin embargo, en este trabajo el ROT no se localizó en fibras aferentes que liberan SP lo que sugiere que el ROT se encuentra en fibras aferentes primarias que no liberan sustancia P. A este respecto se encontró que ROT no colocaliza con IB4 que es un marcador de fibras aferentes del grupo C no peptidérgicas.

Wrobel et al., (2011) reportaron que las neuronas que expresan el ROT no colocalizan con IB4 en médula espinal, lo cual está de acuerdo con los presentes resultados. Sin embargo, no es posible descartar que otro tipo de fibras aferentes nociceptivas expresen el ROT, como son fibras aferentes peptidérgicas que liberen CGRP o bien que el ROT se localice en fibras A $\delta$  o A $\beta$  y que participe en un sistema de modulación de compuerta (Melsa y Wall, 1965). Estos resultados además refuerzan la participación de interneuronas que medien los efectos inhibitorios de la oxitocina en médula espinal y existe la posibilidad de que el ROT además tenga funciones periféricas.

Los presentes resultados indican que el ROT se localiza en neuronas del asta dorsal de la ME, de forma densa en la láminas superficiales y con menor densidad en las láminas III – VI lo que coincide con lo reportado en Wrobel et al., 2010 en el ratón. Además en este estudio se encontró que el ROT no se localiza en fibras aferentes primarias inmunopositivas a SP en ME, lo cual concuerda con los hallazgos de Wrobel et al., (2011) quienes reportaron que el ROT no colocaliza con IB4. Esto sugiere que el ROT no se expresa en fibras C, sin embargo, queda por estudiar si el ROT se expresa en fibras peptidérgicas que liberan CGRP.

Como ya se mencionó, se ha propuesto la participación de interneuronas excitatorias e inhibitorias que median los efectos analgésicos del NPV en médula espinal (Jo et al., 1998; Breton et al., 2008; Rojas–Piloni et al., 2007; Condés–Lara et al., 2009). Anteriormente se reportó que las células NPV–ON que son activadas por la estimulación del NPV no son moduladas por la aplicación de bicuculina, pero sí los efectos inhibitorios del NPV (Condés–Lara et al., 2009). Aquí se describió que el ROT no colocaliza con neuronas GABAérgicas, ni neuronas de proyección espinotalámicas lo cual refuerza la hipótesis que sugiere que el mecanismo de acción del sistema NPV–OT–espinal es presináptico y que es mediado a través de interneuronas glutamatérgicas que amplifican la señal GABAérgica (Figura 10).

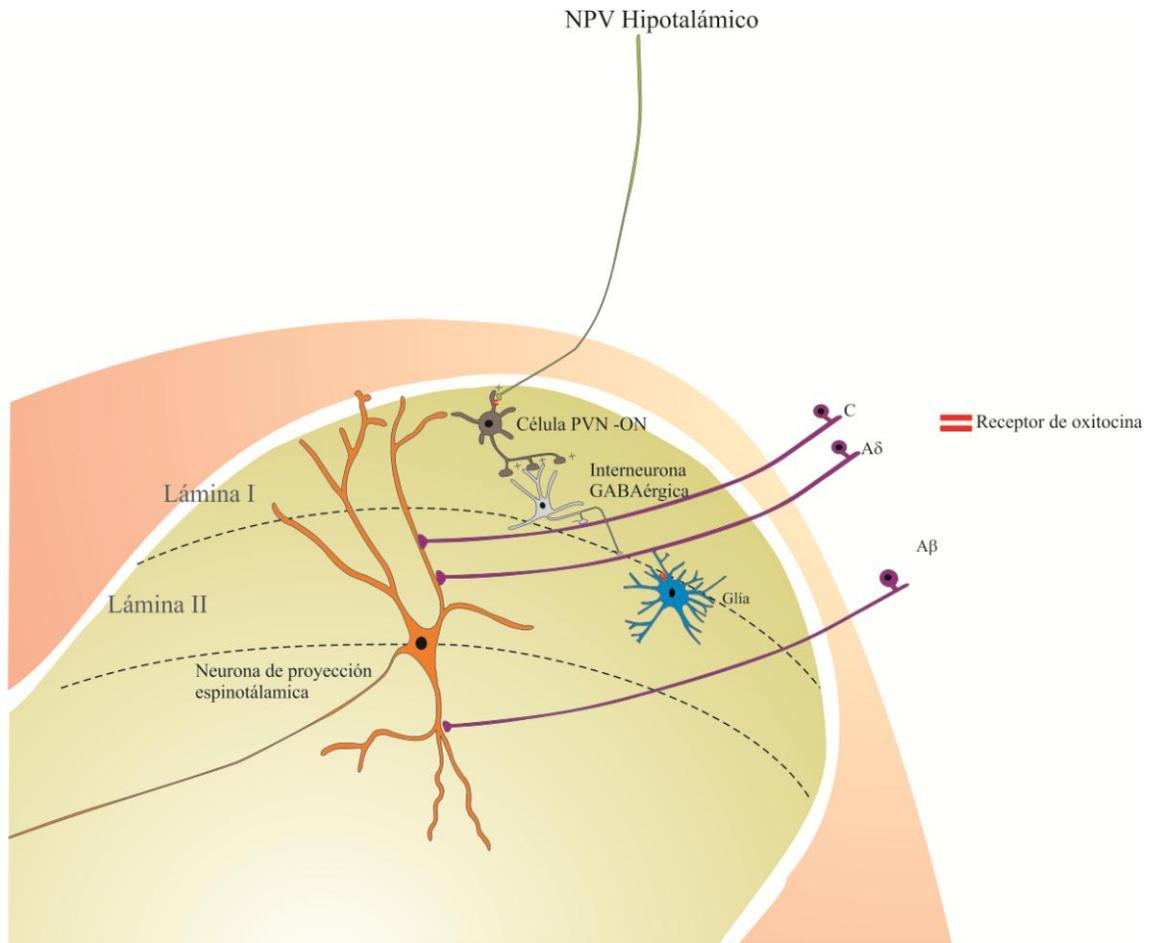


Figura 10. Mecanismo de acción inhibitorio propuesto del sistema NPV–OT–espinal. Los presentes hallazgos mostraron que el ROT no se localiza en neuronas de proyección espinotalámicas ni en neuronas GABAérgicas, pero sí en otras neuronas y probablemente en células gliales del asta dorsal. Por otro lado, se describió que el ROT se localiza en células sensoriales del DRG que no son fibras C. De esta manera, un posible modelo de inhibición mediada por OT involucraría la activación de células NPV–ON, las cuales a su vez activarían a interneuronas GABAérgicas las cuales inhibirían directamente las fibras Aδ y C.

## CONCLUSIONES

- El ROT se localiza en neuronas del asta dorsal de la médula espinal y en células que no son neuronas.
- El ROT no se localiza en neuronas espinotalámicas.
- El ROT no se localiza en neuronas GABAérgicas del asta dorsal.
- EL ROT se expresa en células sensoriales del DRG que no expresan SP y no son positivas a IB4.

## BIBLIOGRAFÍA

- Almeida T, Roizenblatt S & Tufi, S. 2004. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* 1000, 40–56.
- Basbaum A, Bautista A, Scherrer G & Julius D. 2009. Cellular and molecular mechanisms of Pain. *Cell* 139, 267–284.
- Braz J, Nassar M, Wood J & Basbaum A. 2005. Parallel “Pain” pathways arise from populations of primary afferent nociceptor. *Neuron* 47, 787–793.
- Breton J, Poisbeau P & Darbon P. 2009. Antinociceptive action of oxytocin involves inhibition of potassium channel currents in laminae II neurons of the rat spinal cord. *Mol Pain* 5:63, 1–12.
- Breton J, Vinante P, Uhl–Bronner S, Vergnano A, Freund–Mercier M, Schlichter R & Poisbeau P. 2008. Oxytocin–induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lámina I–II which amplify GABAergic inhibition. *Mol Pain* 4:19, 1–12.
- Caligioni C, Oliver C, Jamurt M & Franci C. 2007. Presence of oxytocin receptors in the gonadotrophin–releasing hormone (GnRH) neurones y female rats: A posible direct action of oxytocin on GnRH neurons. *J of Neuroendocrinol* 19, 439–448.
- Carlson N, 2006. *Fisiología de la conducta*. Pearson. 8<sup>va</sup> ed. pp 251–255.
- Carpenter M, 1994. *Neuroanatomía. Fundamentos*. Editorial Médica Panamericana 4ta ed. Buenos Aires, pp 93, 94, 110,111.
- 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 Res* 976, 75–81.

- 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 Res* 1160, 20–29.
- Condés–Lara M, Rojas–Piloni G, Martínez–Lorenzana G & Rodríguez–Jiménez J. 2009. Paraventricular hypothalamic oxytocinergic cells responding to noxious stimulation and projecting to the spinal dorsal horn represent a homeostatic analgesic mechanism. *Eur J of Neurosc* 30, 1056–1063.
- Condés–Lara M, Rojas–Piloni G, Martínez–Lorenzana G, López–Hidalgo M & 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 Res* 1247, 38–49.
- Condés–Lara M, Rojas–Piloni G, Martínez–Lorenzana G, Rodríguez–Jiménez J, López M & Freund–Mercier M. 2006. Paraventricular hypothalamic influences on spinal nociceptive processing. *Brain Res* 1081, 126–137.
- Craig A. 2003. A new view of pain as a homeostatic emotion. *Trends in Neurosci* 25, 6, 303–307.
- Dickenson A & D’Mello R. 2008. Spinal cord mechanisms of pain. *Brit J Anaesth* 101, 8–16.
- Evrard M, Strosser M & Scala–Guenot D. 1997. Pharmacological characterization of oxytocin – binding sites in rat spinal cord membranes: comparison with embryonic cultured spinal cord neurones and astrocytes. *J Neuroendocrinol* 9, 553–560.
- Fields H. 2004. State–dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 5, 565–575.
- Frings S. 2008. Primary process in sensory cells: current advances. *J Com Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 195, 1, 1–19.
- Gauriau C & Bernard J. 2004. A comparative reappraisal of projections from the superficial laminae of the dorsal horn in the rat: the forebrain. *J Comp Neurol* 468, 24–56.

- Gibbons IL, Furness JB & Costa M. 1987. Pathway-specific patterns of the coexistence of substance P, calcitonin gene-related peptide, cholecystokinin and dynorphin in neurons of the dorsal root ganglia of the guinea-pig. *Cell Tissue Res* 248(2) 417–437.
- Gimpl G & Fahrenholz F. 2001. The oxytocin Receptor System: structure, function and regulation. *Physiol Rev* 81, 629–683.
- Golstein B. 2005. *Sensación y Percepción*. Cengage Learning Editores 6<sup>ta</sup>ed. Pp 2–30.
- Jo M, Stoeckel M, Freund-Mercier M & Schlinder R. 1998. Oxytocin modulates glutamatergic synaptic transmission between cultured neonatal spinal cord dorsal horn neurons. *J Neurosci* 18(7) 2377–2386.
- Kandel E, Schwartz J & Jessell T. 2000. *Principles of Neural Science*. McGrawHill. Cuarta edición pp 481 – 483.
- Kuo J, Hariri O & Micevych P. 2009. An interaction of oxytocin receptor with metabotropic glutamate receptors in hypothalamic astrocytes. *J Neuroendocrinol* 21, 1001–1006.
- Mazzuca M, Minlebaev M, Shakirzyanova A, Tyzio R, Taccola G, Janackova S, Gataullina S, Ben-Ari Y, Giniatullin R & Khazipov R. 2011. Newborn analgesia mediated by oxytocin during delivery. *Front Cellular Neurosci* 5(3), 1 – 9.
- Melzack R & Wall P. 1965 Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150, 971–979.
- Millan M. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57, 1–164.
- Millan M. 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66, 335–474.
- Miranda-Cárdenas Y, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J, López-Hidalgo M, Freund-Mercier M & 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.

- Moreno-López YL. 2009. Interacción de terminales oxitocinérgicas con neuronas espino-talámicas e interneuronas gabaérgicas en el asta dorsal. Tesis no publicada.
- O'Callaghan J & Miller D. 2010. Spinal glia and chronic pain. *Metabolism* 59, s21-s26
- Paxinos G & Watson C. 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
- Paxinos G. 1995. *The Rat Nervous System*. 2<sup>nd</sup> Edition. Academic Press. USA pp. 253-256.
- Pinault D. 1996. A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biotin or neurobiotin. *J Neurosci Meth* 65, 113-136.
- Pinto-Ribeiro F, Ansah O, Almeida A & Pertovaara A. 2008. Influence of arthritis on descending modulation of nociception from the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 1197, 63-75.
- Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Hall W, LaMantia A, McNamara J & Williams M. 2004. *Neuroscience*. Sinauer Associated, Inc. 3<sup>o</sup> ed. Pp 209-228.
- 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. *Eur J Neurosci* 6, 98-104.
- Robinson D, Wei F, Wang G, Li P, Kim S, Vogt S, Muglia L & Zhuo M. 2002. Oxytocin mediates stress-induced analgesia in adult mice. *J Physiol* 540.2, 593-606.
- Rojas-Piloni G, López-Hidalgo M, Rodríguez-Jiménez J, Martínez-Lorenzana G & Condés-Lara M. 2007. GABA-mediated oxytocinergic inhibition in dorsal horn neurons by hypothalamic paraventricular nucleus stimulation. *Brain Res* 1137, 69-77.

- 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. *Eur J Neurosci*. 28, 546–558.
- Rousselot P, Merighi A, Poulain D & Theodosis D. 1990. Oxytocinergic innervations of the rat spinal cord. An electron microscopic study. *Brain Res* 529, 178–184.
- 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. *J Comp Neurol* 205, 260–272.
- Schorscher-Petcu A, Sotocinal S, Ciura S, Dupre A, Ritchie J, Sorge R, Crawley J, Shuang-Bao H, Nishimori K, Young L, Tribollet E, Quirion R & Mogil J. 2010. Oxytocin-induced analgesia and scratching are mediated by the vasopressin-1A receptor in the mouse. *J Neurosci* 30(24) 8274–8284.
- 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 Histochem Supp* 79–95.
- Swanson L. 1977. Immunohistochemical evidence for a neurophysin – containing autonomic pathway arising in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 128, 346–353.
- Todd A. 2010. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11, 823–836.
- Tracey I & Mantyh P. 2007. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron* 55, 377–391.
- Wrobel L, Schorscher-Petcu A, Drupe A, Yoshida M, Nisaimori K & Tribollet A. 2011. Distribution and identity of neurons expressing the oxytocin receptor in the mouse spinal cord. *Neurosci Lett* 495, 49 – 54.
- Zimmermann M. 1983. Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. *Pain* 16, 109–110.

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Organización laminar del asta dorsal de la médula espinal	5
2. Tipos de neuronas del asta dorsal de la ME	7
3. Neuronas de proyección de las láminas superficiales y sus blancos supraespinales	10
4. Vía NPV – Espinal	12
5. Localización del ROT en médula espinal	13
6. Distribución de SP, FR, ROT, NeuN y SP+FR+ROT+NeuN en el asta dorsal de la ME	28
7. Sitios de inyección del trazador retrogrado FG, y células que expresan el ROT (rojo) y espinotalámicas	29
8. GABA y ROT	30
9. Ganglio lumbar con tinción de violeta de crecilo e imagen de microscopia confocal de un DRG que muestra SP (verde) y ROT (amarillo).	31
10. Mecanismo de acción inhibitorio propuesto del sistema NPV–OT–espinal	38