



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**Mecanismos segmentales de modulación sensorial regulados por el  
sistema corticoespinal**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

**M. EN C. YUNUEN LETICIA MORENO LOPEZ**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. GERARDO ROJAS PILONI**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR

**DR. FERNANDO PEÑA ORTEGA**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

**DR. ENRIQUE SOTO EGUIBAR**

INSTITUTO DE FISILOGIA, BUAP

**Juriquilla, Querétaro, Querétaro, Junio 2016**



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 AUTONOMA DE MEXICO**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA**

Los miembros del jurado de examen certificamos que la tesis elaborada por **Yunuen Leticia Moreno López**, cuyo título es: **Mecanismos segmentales de modulación sensorial regulados por el sistema corticoespinal**, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de **Doctor en Ciencias** y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**Presidente**

**Dr. José Bargas Díaz**

---

**Secretario (Tutor)**

**Dr. Gerardo Rojas Piloni**

---

**Vocal**

**Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar**

---

**Vocal**

**Dr. Hugo Merchant Nancy**

---

**Vocal**

**Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza**

---

## RESUMEN

El tracto corticoespinal tiene su origen en las neuronas piramidales de la corteza sensorimotora; representa un sistema complejo que tiene diversos blancos en la médula espinal. Este sistema tiene un papel importante en el control motor que resulta de conexiones directas con las motoneuronas e indirectas a través de conexiones con interneuronas de la sustancia gris intermedia. Pero también, este sistema está involucrado en una modulación selectiva de la información sensorial.

Un mecanismo bien estudiado a través del cual el tracto corticoespinal modula la información sensorial es la despolarización de aferentes primarias (PAD) que ha sido descrita en aferentes musculares y cutáneas mielinizadas, pero no en las aferentes amiélicas. Es así que, en la presente tesis analizamos si la corteza modula la información sensorial en aferentes amiélicas a través de la activación de interneuronas inhibitorias. Para ello, estudiamos en ratas macho wistar los efectos de la activación de la corteza sensorimotora en la proporción de pulsos pareados de la respuesta de fibras C amiélicas evocadas por estimulación del nervio ciático. Además, analizamos los cambios en la excitabilidad de las aferentes nociceptivas producidas por la estimulación cortical. Encontramos que la aplicación de bicuculina en la superficie cortical produce una reducción de la amplitud de las respuestas de fibras C provocadas por la estimulación del nervio ciático, así como un incremento de la proporción de pulsos pareados (PPP). Además, la corteza sensorimotora produce un aumento en la excitabilidad de fibras amiélicas C. Estos resultados indican que la corteza sensorimotora produce despolarización de aferentes primarias en aferentes amiélicas C, es decir inhibición presináptica.

Por otro lado, poco se sabe acerca de los circuitos espinales que modula el tracto corticoespinal y de la organización de las neuronas de la corteza sensorimotora que codifican las diferentes salidas a la médula espinal. En la presente tesis también estudiamos si el sistema corticoespinal de forma segregada ejerce control sobre diferentes circuitos intraespinales que participen en la integración sensorimotora. Encontramos que en la rata al menos dos poblaciones de neuronas corticoespinales activan con diferentes tiempos de latencia distintas poblaciones de interneuronas en la médula espinal que se localizan en láminas superficiales del asta dorsal y en la sustancia gris intermedia del mismo segmento.

Nuestros resultados sugieren que el tracto corticoespinal está compuesto por subsistemas que controlan diferentes circuitos intraespinales en el asta dorsal regulando la información sensorial, y en la sustancia gris intermedia regulando probablemente el control motor a través de la modulación de interneuronas premotoras.

## **ABSTRACT**

The corticospinal tract originates in pyramidal neurons of layer 5 and represents a complex system with different targets in spinal cord grey matter. The corticospinal tract plays an important role in motor control through direct and indirect connections with interneurons in intermediate zone of spinal cord and motoneurons. Additionally, this system is involved in a selective modulation of sensory signals. A well-described mechanism through which the corticospinal tract modulates sensory information is the primary afferent depolarization, which has been well described in fast muscle and skin afferents but not in slow amielinic afferents. Nevertheless, the possible role of cortex modulating amielinic fiber responses has not been clarified. On this basis, the present thesis we investigate if cortex modulates amilinic fibers responses. In anaesthetized male Wistar rats we analyzed the effects of sensorimotor cortex activation in paired pulses ratio evoked by sciatic nerve stimulation C-fiber response. In addition we analyzed the changes in the excitability of nociceptive afferent produced by cortical stimulation. We found that application of bicuculline on the cortical surface causes a reduction in the response amplitude of C-fibers and an increase in paired pulse ratio. Additionally sensorimotor cortex produces an increase in the excitability of unmyelinated C-fibers. These results suggest that sensorimotor cortex produces the depolarization of unmyelinated primary afferents and hence presynaptic inhibition.

In addition, little is known about the spinal circuitry that modulates the corticospinal tract and the organization of sensorimotor cortex neurons that encode the outputs to the spinal cord. We also studied whether the corticospinal system exerts control over different intraspinal circuits involved in sensorimotor integration. We found that in the rat at least

two populations of corticospinal neurons activated different populations of spinal interneurons with different latencies, which are located in superficial laminae of the dorsal horn and in the intermediate gray matter in the same spinal segment.

Our results suggest that the corticospinal tract is comprised of subsystems which controls different intraspinal circuits in the dorsal horn where regulates sensory information (including transmitted through unmyelinated fibers) and in the intermediate gray matter where is currently unclear what is its participation in motor control.

# **AGRADECIMIENTOS**

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**

## **A mi Tutor**

Dr. Gerardo Rojas Piloni

## **Al comité Tutor**

Dr. Fernando Peña Ortega

Dr. Enrique Soto Eguibar

## **Al Responsable e integrantes del laboratorio de Dolor y Epilepsia**

Dr. Miguel Condes Lara

Dra. Guadalupe Martínez Lorenzana

MVZ. Javier Rodríguez Jiménez

## **Unidad de Enseñanza**

M. en C. Leonor Casanova Rico

## **Bioterio**

MVZ. José Martín García Servín y Alejandra Castillo León

## **Videoconferencia**

Psicóloga Ma. De Lourdes Lara Ayala

## **Laboratorista**

Lic. Cutberto Dorado (A-13)

## **Técnico Académico**

Dr. Benito Ordaz

Microscopia

Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos

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

**CONACyT 176782, Y PAPIIT IN 202610, 200615**

*Dedico esta tesis a toda mi familia.*

*A mis padres Leticia y Ernesto por su apoyo incondicional y siempre ser mi ejemplo.*

*A mi hermana Nancy y sobrinos Armando y Adrián.*

*A mi esposo Javier por tu amor, comprensión y apoyo incondicional.*

*A mi hija Yatiziri.*

**GRACIAS**

# INDICE

<b>Introducción General</b>	1
Antecedentes	1
Médula espinal	2
Fibras aferentes primarias	3
Neuronas de la médula espinal	5
Interneuronas inhibitorias	6
Interneuronas excitatorias	7
Neuronas de proyección	7
Vías ascendentes	8
Tracto Corticoespinal: Origen y blancos en diferentes especies	11
<b>1. CAPITULO I Modulación de la información sensorial en la medula espinal</b>	<b>18</b>
1.1. <b>Modulación de la información aferente</b>	18
1.1.1. Inhibición presináptica y PAD	18
1.1.2. Inhibición segmental	22
1.2. <b>Control central de la información aferente</b>	23
1.2.1. Modulación sensorial mediada por el tracto corticoespinal	25
1.2.2. Modulación nociceptiva mediada por el tracto corticoespinal	26
1.3. <b>Planteamiento del problema</b>	29
1.4. <b>Hipótesis</b>	30
1.5. <b>Objetivos generales</b>	30
1.5.1. Objetivos particulares	30
1.6. <b>Materiales y métodos</b>	31
1.7. <b>Resultados</b>	35
1.8. <b>Discusión</b>	43
1.9. <b>Conclusiones</b>	47
<b>2. CAPITULO II Segregación funcional del tracto corticoespinal</b>	<b>48</b>
2.1. <b>Diversidad funcional del tracto corticoespinal</b>	50
2.1.1. Control motor	51
2.1.2. Control pre-motoneuronal	52
2.1.3. Conexiones cortico-motoneuronas	53
2.2. <b>Interneuronas espinales moduladas por la corteza sensorimotora</b>	55

2.3. Segregación anatómica y funcional del tracto corticoespinal	56
2.4. Planteamiento del problema	58
2.5. Hipótesis	58
2.6. Objetivos generales	58
2.6.1. Objetivos particulares	58
2.7. Material y métodos	60
2.8. Resultados	63
2.9. Discusión	70
2.10. Conclusiones	75
<b>Conclusiones generales</b>	76
<b>Referencias</b>	78

**Moreno-López, Y.,** Pérez-Sánchez, J., Martínez-Lorenzana, G., Condes-Lara, M., & Rojas-Piloni, G. (2013). Cortical presynaptic control of dorsal horn C-afferents in the rat. *Plos One*, 8(7), e69063. doi: 10.1371/journal.pone.0069063

**Moreno-López, Y.,** Olivares-Moreno, R., Cordero-Erausquin, M., & Rojas-Piloni, G. (2016). Sensorimotor Integration by Corticospinal System. *Front Neuroanat*, 10, 24. doi: 10.3389/fnana.2016.00024

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Láminas de Rexed del asta dorsal.

Figura 2 Velocidad de conducción y organización laminar de las fibras aferentes primarias

Figura 3 Diferentes tipos de neuronas del asta dorsal de la médula espinal

Figura 4 Neuronas de proyección de las láminas superficiales y sus blancos supraespinales

Figura 5 Tracto Corticoespinal

Figura 6 Terminación del tracto corticoespinal en diferentes especies

Figura 7 Inhibición presináptica

Figura 8 Mecanismo de la inhibición presináptica

Figura 9 Esquema de la teoría de la compuerta.

Figura 10 Sistemas de modulación descendente de información sensorial en la médula espinal

Figura 11 Control descendente de la información nociceptiva del tracto corticoespinal

Figura 12 EFP-Cx

Figura 13 Cambios en la actividad espontánea cortical y del asta dorsal antes, durante y después de la aplicación de BIC

Figura 14 La corteza sensorimotora modula la PPR de la respuesta de fibras C en la médula espinal

Figura 15 Potencial de acción compuesto antidrómico registrado en el NSu provocado por estimulación en el asta dorsal

Figura 16 La corteza aumenta la excitabilidad de las fibras C

Figura 17 Efectos de la estimulación cortical en neuronas WDR. A, esquema del diseño experimental.

Figura 18 Actividad control

Figura 19 La lesión del tracto piramidal abole el DRP y el potencial de campo provocado por la corteza

Figura 20 Control Motor

Figura 21 Neuronas segmentales que modula en TCE.

Figura 22 Distribución de las neuronas Cx-On

Figura 23 Diferentes neuronas espinales son moduladas por el tracto corticoespinal

Figura 24 Los componentes de larga y corta latencia tienen diferente origen cortical

Figura 25 Los EFP-Cx son abolidos después de la lesión del tracto piramidal.

Figura 26 Velocidad de conducción de las neuronas corticoespinales

Figura 27 El bloqueo por frío cortical suprime las respuestas de larga latencia del EFP-Cx

Figura 28 Mapas de distribución de las neuronas corticoespinales que proyectan al asta dorsal y a la sustancia gris intermedia

Figura 29 El sistema corticoespinal

## ABREVIATURAS

SN	Sistema Nervioso
TCE	Tracto corticoespinal
SNC	Sistema Nervioso Central
SI	Corteza somatosensorial primaria
SII	Corteza somatosensorial secundaria
VPL	Núcleo ventroposterolateral talámico
VPM	Núcleo ventroposteromedial talámico
Po	Núcleo posterior talámico
PoT	Núcleo posterior triangular talámico
PAG	Sustancia Gris Periacueductal
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1,
CGRP	Péptido relacionado con el gen de calcitonina
IB4	Isolectina B4
GABA	Acido $\gamma$ – amino butírico
NPY	Neuropeptido Y
nNOS	Oxido Nitrico Sintetasa neuronal
VGLUT2	Transportador vesicular de glutamato 2
PKC	Proteína kinasa C
NK-1	Neurokinina
LPb	Área lateral parabraquial
NTS	Núcleo del tracto solitario
NRM	Núcleo rafe magnus
MRV	Médula rostro ventromedial
MCS	estimulación de la corteza motora
NSu	Nervio sural

Pe	Nervio peroneo
PPP	proporción de pulsos pareados
SMC	Corteza sensorimotora
dSC	Neuronas del tracto espinocerebeloso dorsal
ROR $\alpha$	Receptor núcleos órgano $\alpha$
BIC	bicuculina
DRP	Potencial de raíz dorsal
PAD	Despolarización de fibras aferentes primarias

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

### *Antecedentes*

El movimiento es en última instancia lo que moldea nuestra relación con el mundo exterior, a lo largo de la evolución las estrategias motoras se han esculpido para transformar la decisión y el deseo en movimientos. Es así que el trabajo del sistema nervioso (SN) de forma simplificada consiste en interpretar las señales del medio ambiente (externo e interno) y convertirlas en movimiento (Miri et al., 2013).

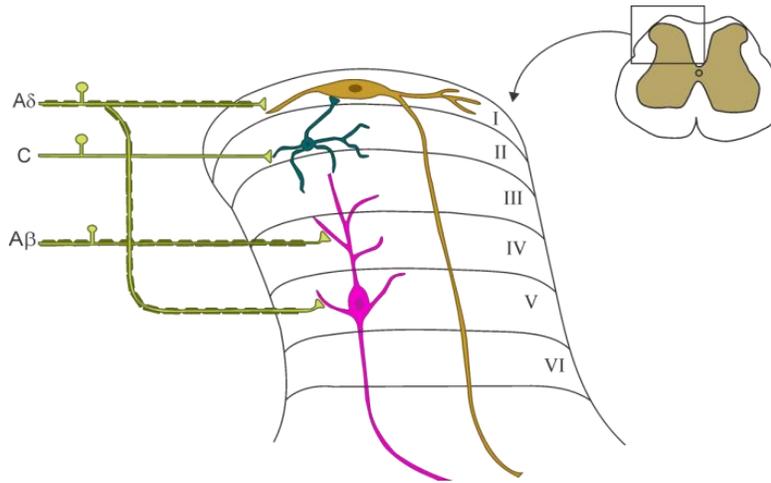
Independientemente del tipo de acción a realizar es importante la participación de 3 componentes principales: neuronas de la médula espinal, centros supraespinales en el tallo cerebral y el encéfalo. Un componente que también es importante es la retroalimentación sensorial, ya que la información sensorial es fundamental para la apropiada ejecución motora evaluando y ajustando los comandos motores durante la actividad motora (Arber, 2012; Bui et al., 2015).

Entonces los movimientos coordinados dependen del flujo continuo de información entre la periferia, la médula espinal y la información generada centralmente (Catela et al., 2015). Particularmente, en la médula espinal se localizan los circuitos esenciales para la ejecución de conductas básicas de locomoción pero también representa un sitio donde se procesa la información sensorial. Muchas entradas sensoriales proyectan a circuitos espinales que tienen comunicación con circuitos motores dentro de la medula espinal. De tal forma, que el procesamiento de la información sensorial también tiene un flujo continuo entre circuitos intraespinales y supraespinales (Bui et al., 2015).

## *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 (Rexed, 1952; Molander et al., 1984).

Funcionalmente, la médula espinal está compuesta por: entradas aferentes sensoriales, neuronas intrínsecas, neuronas de proyección y aferentes descendentes de centros supraespinales (Kandel, 2013). De esta manera, el asta dorsal recibe información sensorial de las fibras aferentes primarias que inervan la piel y tejidos profundos del cuerpo y responden a tipos específicos de estímulos nocivos y no nocivos (Braz et al., 2014; West et al., 2015). Estas aferentes terminan en el asta dorsal con un patrón de distribución particular que está determinado por la modalidad sensorial y la región del cuerpo que inervan. Esta información es procesada por circuitos complejos donde participan interneuronas excitatorias e inhibitorias para después transmitirla a neuronas de proyección para su relevo a cerebro (Todd, 2010; Braz et al., 2014) Ver **figura 1**.



**Figura 1.** Láminas de Rexed del asta dorsal. En el esquema se puede apreciar la localización de las diferentes láminas que conforman el asta dorsal de la médula espinal, así como la distribución de las distintas aferentes primarias (Modificado de Kandel et al 2015).

### *Fibras aferentes primarias*

Las neuronas aferentes primarias del ganglio de la raíz dorsal y el ganglio trigémino transmiten la información sensorial de la piel, músculos, articulaciones y viseras a la médula espinal y al núcleo del trigémino en el tallo cerebral respectivamente (Todd, 2010).

Estas neuronas se pueden clasificar de acuerdo a sus blancos periféricos (cutáneos, articulares, viscerales, etc.), velocidad de conducción (está relacionado con su diámetro y la mielinización), propiedades de respuesta (modalidad sensorial e intensidad del estímulo necesaria para activarlas) y fenotipo neuroquímico (expresión de péptidos) (Todd, 2010).

Las fibras A $\beta$  son mielinizadas con un diámetro de más de 10 $\mu$ m y tienen una velocidad de conducción de 30–100m/s, tienen un umbral de activación bajo y transmiten información no nociceptiva de tacto y propiocepción, sus fibras se localizan en las láminas III-V del asta dorsal de la médula espinal. Las fibras A $\delta$  son poco mielinizadas, tienen un diámetro de 2.0 a 6  $\mu$ m y una velocidad de conducción de 12–30 m/s. Las fibras C son no mielinizadas, tienen un diámetro de 0.4 a 1.2  $\mu$ m y tienen una velocidad de conducción de

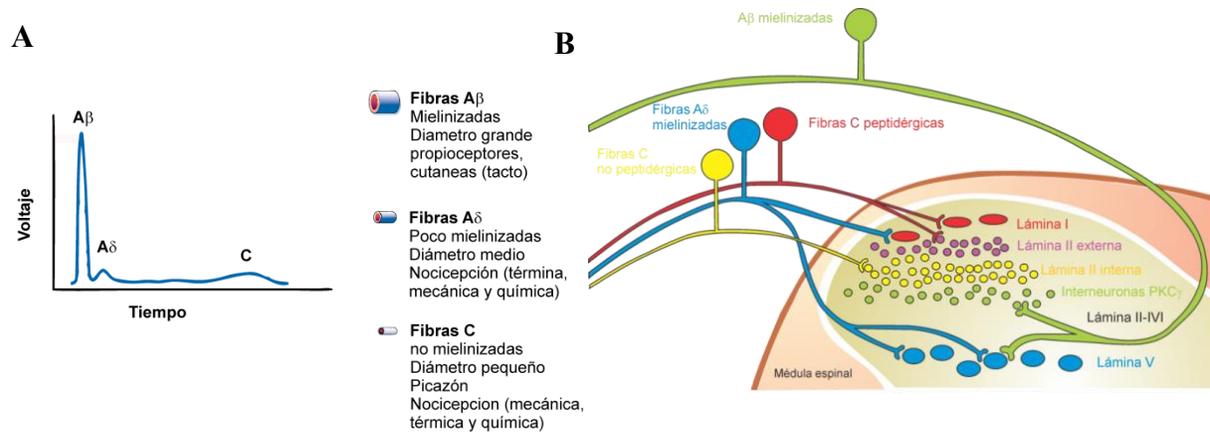
0.5–2.0 m/s. (Basbaum et al., 2009; Todd, 2010; Braz et al., 2014). Además, hay dos poblaciones de aferentes amielínicas de bajo umbral de activación (no nociceptiva) y en humanos se han asociado con sensaciones de tacto placentero.

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 nociva. 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 mielínicas C que transmiten dolor lento, de localización difusa o secundario (Julius and Basbaum, 2001; Kandel, 2013; Braz et al., 2014) **figura 2A**.

Todas las fibras aferentes primarias utilizan glutamato como neurotransmisor principal. Además, de acuerdo a los péptidos que expresan los nociceptores se pueden dividir en NGF/TrkA-dependientes, peptidérgicas y GDNF/cRet no peptidérgicas (D'Mello and Dickenson, 2008; Braz et al., 2014).

Las neuronas peptidérgicas expresan sustancia P y péptido relacionado al gen de calcitonina (CGRP), también el receptor de capsaicina receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1), todo esto les confiere la sensibilidad a dolor por calor. Estas fibras inervan la epidermis. La población no peptidérgica se define anatómicamente por que se une con la isolectina IB4 y la expresión de Mrg de la familia de GPCRs e inervan regiones profundas de la piel (Todd, 2010; Braz et al., 2014).

Las poblaciones peptidérgicas y no peptidérgicas también se distinguen por sus blancos en la médula espinal. Las aferentes peptidérgicas proyectan a las láminas más superficiales del asta dorsal I y IIe, y las no peptidérgicas a la Iii. Este patrón diferencial sugiere que tengan funciones distintas, en estudios donde las eliminan selectivamente han mostrado que la habilidad para transmitir la información de dolor por calor requiere la población que expresa TRPV1. Pero el componente mecánico es transmitido por los nociceptores que se unen a IB4 (Braz et al., 2014) **figura 2 B**.



**Figura 2.** *Velocidad de conducción y organización laminar de las fibras aferentes primarias.* **A.** Potencial de acción compuesto donde se ilustran la velocidad de conducción (ver texto para detalles) de las diferentes fibras aferentes primarias (A $\beta$ , A $\delta$  y C). **B,** se pueden observar los blancos de las fibras aferentes primarias. Las fibras C no mielínicas peptidérgicas (rojo) y las fibras mielínicas A $\delta$  (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 A $\beta$  (verde) terminan en las láminas III–V. Modificado de Kandel et al 2015 y Basbaum et al 2009.

### *Neuronas de la médula espinal*

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, II, 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 (Millan, 1999; 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 (Millan, 1999; 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 (Millan, 1999; Almeida et al., 2004).

#### *Interneuronas Inhibitorias*

La mayoría de las neuronas de las láminas I-III tienen axones que terminan en la médula espinal y arborizan localmente son definidas como interneuronas. Las interneuronas pueden ser divididas en dos clases: excitatorias (glutamatérgicas) e inhibitorias. Las interneuronas inhibitorias utilizan ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) y/o glicina como neurotransmisor principal. En la rata el GABA está presente en 25, 30 y 40% de las neuronas de las láminas I, II y III respectivamente. Y en estudios con inmunomarcaje

sugieren que muchas interneuronas co-liberan GABA y glicina y otras solo GABA (Todd, 2010).

Las interneuronas de la lámina II se han dividido de acuerdo a su morfología en: islet, central, vertical y radiales. Sin embargo, no todas las células pueden ser asignadas a un tipo particular y la relación entre morfología y neurotransmisor no es tan fuerte (Grudt and Perl, 2002; Yasaka et al., 2010). Otra aproximación que se ha utilizado para clasificar las interneuronas inhibitorias es con marcadores neuroquímicos. En este sentido se han identificado 4 poblaciones de neuronas inhibitorias en las láminas I-III de la rata que expresan neuropeptido Y (NPY), galanina, óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS) o parvaalbumina (Todd, 2010).

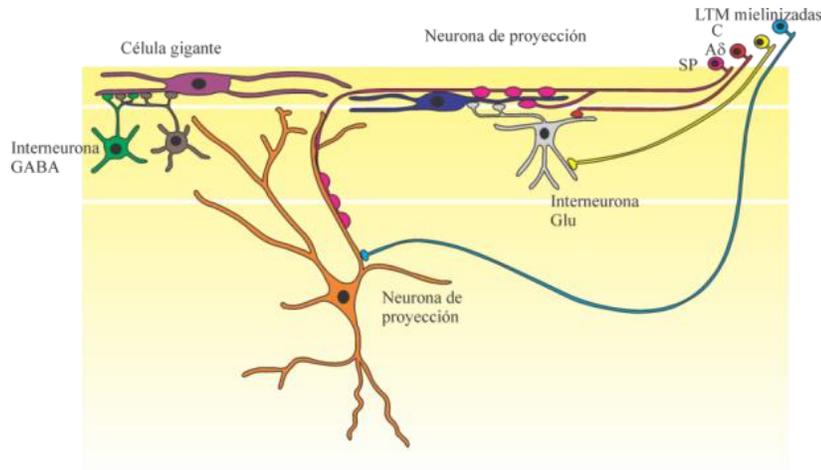
#### *Interneuronas Excitatorias*

Todas las neuronas que no son de proyección y no son inmunoreactivas contra GABA y Glicina se postula que son interneuronas glutamatérgicas (excitatorias), expresan el transportador vesicular de glutamato VGLUT2 y representan el 60 -70% de la población neuronas de las láminas I-III. En cuanto a su morfología, algunas pertenecen al tipo vertical o radial pero no se ha podido asignar una morfología particular. Existen marcadores que solo se expresan en interneuronas excitatorias como calretinina y la proteína kinasa C (PKC) (Todd et al., 2003; Todd, 2010; Yasaka et al., 2010).

#### *Neuronas de proyección*

En la médula espinal también hay neuronas de proyección que transmiten la información a centros supraespinales, estas se localizan densamente en la lámina I y con

menor densidad en las láminas III-VI. Muchas de estas neuronas expresan el receptor de neurokinina 1 (NK-1) (Basbaum et al., 2009; Todd, 2010) Ver **figura3**.



**Figura 3.** *Diferentes tipos de neuronas del asta dorsal de la médula espinal.* Tipos de neuronas del asta dorsal de la médula espinal. Se pueden observar distintos tipos de neuronas, así como las aferencias que reciben de los diferentes tipos de fibras aferentes primarias. Esquema modificado de Todd, 2010.

### *Vías ascendentes*

Una vez que la información nociceptiva es procesada en la médula espinal se transmite a través de neuronas de proyección a centros cerebrales supraespinales. Algunas neuronas de proyección tienen axones que cruzan la línea media y ascienden, mientras que otras no cruzan la línea media, ambos tipos ascienden rostralmente por la sustancia blanca formando vías ascendentes: la vía espinohipotálamica, espinoreticular, espinomescencefálica, cervicotalámica, espinotalámica, postsináptica de las columnas dorsales y espino parabraquial (Purves, 2004; Kandel, 2013).

La vía espinoreticular comprende axones de neuronas en las láminas VII y VIII. Ascende por el cuadrante anterolateral de la médula espinal y termina en la formación reticular y el tálamo (Millan, 1999).

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 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.

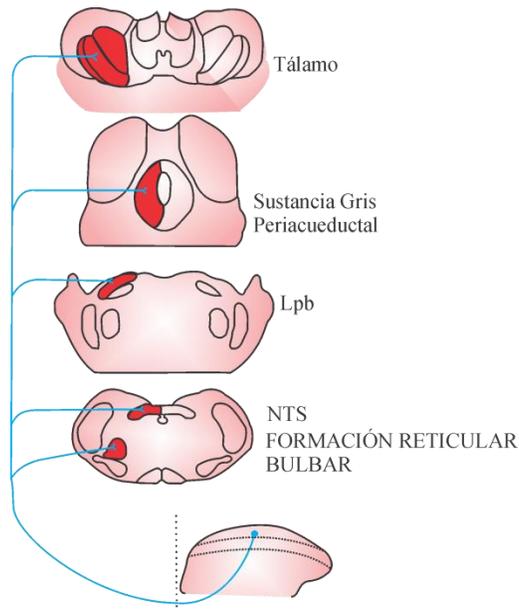
El tracto espinohipotálamico comprende axones de neuronas de la lámina I, V y VII. Proyecta directamente a centros supraespinales autonómicos y activa respuestas neuroendocrinas y cardiovasculares.

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, 2013). 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 la lámina I tiene proyecciones al tálamo, sin embargo, estudios de trazado retrógrado en la rata sugieren que en L4 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 (Todd, 1990). Esto parece ser una característica del ensanchamiento lumbar de la rata. Ya que en el ensanchamiento cervical de la rata y en los ensanchamientos lumbar y cervical del gato y el mono estas neuronas son más numerosas (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 ventroposterolateral (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 and 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 (D'Mello and Dickenson, 2008), **figura 4**.



**Figura 4.** *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 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.

#### *Tracto Corticoespinal: Origen y blancos en diferentes especies*

En los mamíferos el control de las extremidades se lleva a cabo a través los tractos corticoespinal (TCE) y el tracto rubroespinal (Lemon, 2008). El TCE provee la vía más directa a través de la cual la corteza cerebral controla el movimiento. El TCE tiene su origen en las neuronas piramidales de la capa V de las cortezas motora, somatosensorial y parietal. En roedores y marsupiales esta influencia se ejerce a través de interneuronas localizadas en el asta dorsal y la sustancia gris intermedia de la médula espinal (Lemon and Griffiths, 2005; Lemon, 2008). Sin embargo, si ascendemos en la escala filogenética a los carnívoros y primates, el número de axones corticoespinales crece progresivamente hacia las interneuronas de las sustancia gris intermedia y finalmente al asta ventral donde contacta directamente con las motoneuronas (Schieber, 2007). Debido a que el TCE tiene

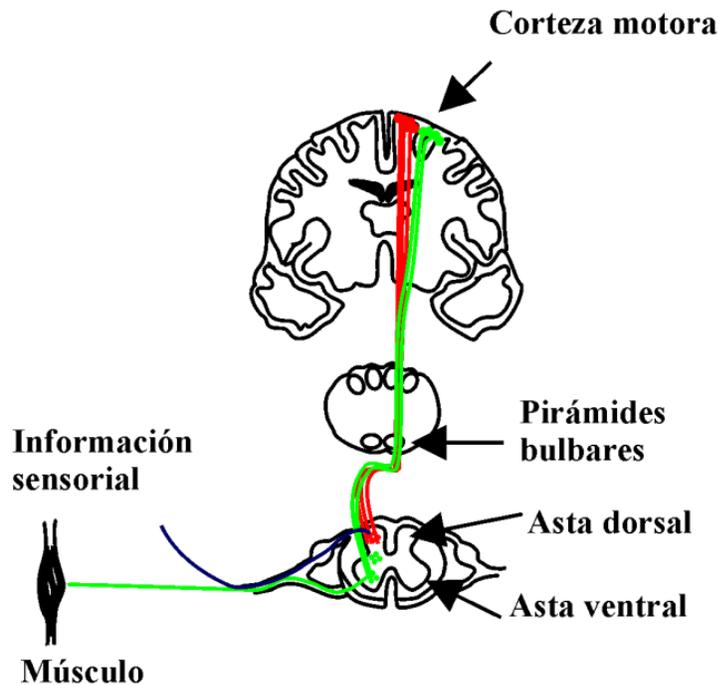
origen en cortezas distintas y en la médula espinal tiene distintos blancos (Lemon and Griffiths, 2005; Olivares-Moreno R. et al., 2016) se ha postulado que tenga diversas funciones relacionadas con integración sensorimotora en la médula espinal.

Los estudios sobre el TCE en animales son muy importantes ya que han dado evidencia de las anomalías motoras que resultan de la lesión del TCE en humanos. Sin embargo, es importante mencionar que estos modelos implican poca representatividad ya que las investigaciones han mostrado que muchos de los déficits que resultan de las lesiones corticoespinales son más evidentes en humanos que en animales lo que ha sugerido que para los cuadrúpedos otras vías descendentes son igualmente importantes para el control del movimiento (Alstermark and Pettersson, 2014). En este sentido, es importante mencionar que la proyección directa corticoespinal no es la única vía a través de la cual el cerebro controla el movimiento. Además, la corteza motora tiene proyecciones al núcleo rojo y a la formación reticular pontina, sitios que dan lugar a los tractos rubroespinal y retículo espinal respectivamente (Schieber, 2007). Es así que, dadas las limitaciones metodológicas y éticas para la experimentación con humanos, los estudios comparativos en animales continúan proveyendo conocimiento sobre déficits en seres humanos que resultan de lesiones del TCE, ya sea por stroke, tumores, esclerosis múltiple, trauma etc.

El tracto TCE está presente en todos los mamíferos. Esta vía se origina de los axones de las neuronas piramidales localizadas en la capa V de la corteza cerebral y decusan a nivel de la médula oblongada antes de descender a la médula espinal (Armand, 1982). Tradicionalmente se le ha atribuido una función motora, sin embargo, dado que se origina de múltiples cortezas (motora y sensorial) y además tiene diferentes blancos en la

médula espinal, se ha sugerido que participe en múltiples funciones (Lemon, 2008) **figura**

5.

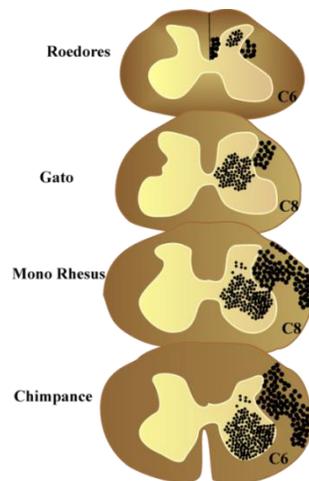


**Figura 5.** *Tracto Corticoespinal*. Tiene su origen en las neuronas de la corteza motora, decusa en el bulbo raquídeo en la decusación piramidal y desciende hasta alcanzar la médula espinal (Moreno-López 2016).

La trayectoria del TCE y los sitios de terminación en la sustancia gris de la médula espinal varían de una especie a otra. El TCE se origina de una gran variedad de áreas corticales, cada una con diferentes funciones. En el mono y el gato el 60% del TCE se origina en el área 4 y 6 (corteza motora primaria M1 y cortezas premotoras) y termina en la sustancia gris intermedia de la médula espinal. El 40% restante tiene su origen en las áreas 1, 2 y 3 (corteza somatosensorial) y 5 (corteza parietal). En roedores el TCE se origina en las áreas corticales 3 y 4 (corteza motora), área 2 (corteza somatosensorial), así como en áreas 14, 39 y 40 (corteza parietal) (Ullan and Artieda, 1981; Miller, 1987). Por otro lado, también existen diferencias en los sitios donde terminan los axones corticoespinales en la

sustancia gris de la médula espinal. De acuerdo a esto, los mamíferos pueden ser clasificados en tres grupos:

- 1) Cervical-torácico-asta dorsal: Las fibras del TCE terminan en los segmentos cervical y torácico del asta dorsal (lámina IV y VI) y con menos densidad en la sustancia gris intermedia (lámina VII). En este grupo se incluyen especies como cabra, elefante, conejo y armadillo (Armand, 1982).
- 2) Cervical-torácico-lumbar- asta dorsal-sustancia gris intermedia: Las fibras del TCE terminan en los segmentos torácico y lumbar de la médula espinal. Se pueden diferenciar dos componentes: uno dorsomedial que termina en la lámina IV y V; y un componente ventromedial que termina en la lámina VI y VII. Las especies incluidas en este grupo son el gato, perro y rata (Armand, 1982).
- 3) Cervical-torácico-lumbar-sustancia gris intermedia-asta ventral: las fibras del TCE terminan en el asta dorsal, la sustancia gris intermedia y el asta ventral. En este grupo se encuentran los primates (Armand, 1982) **figura 6.**



**Figura 6.** Terminación del tracto corticoespinal en diferentes especies. Los esquemas ilustran las diferencias en los sitios donde termina el tracto corticoespinal en diferentes especies de mamíferos. Modificado de (Armand, 1982).

Esta diversidad en el origen y terminación de las fibras del TCE sugiere que distintos circuitos de la médula espinal involucrados en la integración sensorimotora están modulados por el TCE de una forma muy selectiva.

Particularmente en los roedores, la inyección del trazador anterógrado en la corteza sensorimotora muestra que la proyección corticoespinal comprende las láminas superficiales del asta dorsal (I-II), así como también la sustancia gris intermedia y el asta ventral (Casale et al., 1988). En la rata aproximadamente el 25% de las neuronas de proyección corticoespinal que alcanzan el segmento cervical C4 también proyectan al segmento C8 (Biane et al., 2015). Un patrón similar se observa en el ratón, como se muestra con la inyección de un trazador anterógrado en M1 produce un marcaje de C1 a C8, es interesante que el área de proyección en C1-C3 es más ventral (sustancia gris intermedia y asta ventral) que en C6-C8 (asta dorsal- sustancia gris intermedia) (Suter and Shepherd, 2015). Sin embargo, la relevancia funcional de estas diferentes áreas de proyección no ha sido estudiada.

También, se pueden encontrar colaterales corticoespinales en sitios distales, algunas neuronas que proyectan a C7 también proyectan a L4 en el ratón adulto (Kamiyama et al., 2015). Estos datos demuestran que una sola neurona corticoespinal puede tener múltiples blancos dentro de la sustancia gris de la médula espinal: en diferentes láminas (dorsal/ventral) y/o diferentes segmentos espinales. Esto puede tener consecuencias importantes para la integración sensorimotora, en particular si consideramos que el asta dorsal está relacionada con la modulación sensorial y la sustancia intermedia-asta ventral con la modulación motora.

## **PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA**

El TCE es una vía que se origina de diferentes cortezas (sensorial, motora y parietal) y en la médula espinal tiene distintos blancos (asta dorsal, sustancia gris intermedia, asta ventral), estos hallazgos han sugerido que participe en diversas funciones.

Tradicionalmente se ha postulado que el TCE participa en el control motor de las extremidades a través de modular diversos circuitos en la médula espinal, por un lado ejerce el control motor a través de interneuronas premotoras y contactos directos con motoneuronas. Además, este sistema está involucrado en la modulación selectiva de la información sensorial activando interneuronas espinales que producen despolarización de fibras aferentes primarias (PAD) en aferentes cutáneas y musculares mielinizadas. Sin embargo, no existen evidencias experimentales que sustenten la diversidad funcional del TCE. En particular, no se conoce si son los mismos grupos de neuronas corticoespinales las que modulan las entradas sensoriales, de aquellas que participan en el control motor en los mismos segmentos espinales.

Estudios clásicos han mostrado que las proyecciones corticoespinales producen PAD en fibras cutáneas y musculares mielinizadas que conducen principalmente información propioceptiva. Sin embargo, esto no ha sido demostrado para las fibras amielínicas que conducen información de temperatura y nociceptiva. Entender esto es importante, ya que se ha propuesto que el TCE suprime la información sensorial que no es relevante para la correcta ejecución de un movimiento. Dado que las motoneuronas integran información segmental y descendente, la apropiada modulación sensorial

maximizaría la relación señal-ruido en estas neuronas, permitiendo una ejecución motora más eficiente.

Por otro lado, los circuitos intracorticales de la corteza sensorimotora que codifican las diferentes salidas a la médula espinal han sido poco estudiados. La diversidad de funciones en las que participa el TCE sugiere la posibilidad de que la corteza segregue sus comandos a través de diferentes subpoblaciones de neuronas corticoespinales, las cuales puedan modular distintas poblaciones de interneuronas en la médula espinal que participen de forma diferencial en el control sensorial y motor.

En la presente tesis, el capítulo I muestra hallazgos experimentales que indican que, al igual que las fibras aferentes de conducción rápida, las aferentes de conducción lenta también son despolarizadas por la proyección corticoespinal y de esta forma la corteza sensorimotora suprime el flujo de información nociva a nivel espinal. En el capítulo II, se muestra la caracterización de al menos dos grupos de interneuronas segmentales que son moduladas de manera diferencial por distintas poblaciones de neuronas corticoespinales. Es así que las evidencias mostradas llevan a sugerir que el TCE forma distintos sub-sistemas que pueden modular diversos grupos de interneuronas que participan tanto en el control de la información sensorial como en el control motor.

Algunos resultados de la presente tesis han sido publicados (Moreno-López et al 2013; Moreno-López et al 2016) y los artículos se anexan al final de la presente tesis.

# 1. CAPITULO I

## Modulación de la información sensorial en la medula espinal

### 1.1. *Modulación de la información aferente*

La información sensorial que se origina en las extremidades permite a los organismos interactuar con el medio ambiente externo e interno. De esta forma, los organismos pueden extraer información de temperatura, textura y tamaño de diversos objetos así como informar la posición de las extremidades.

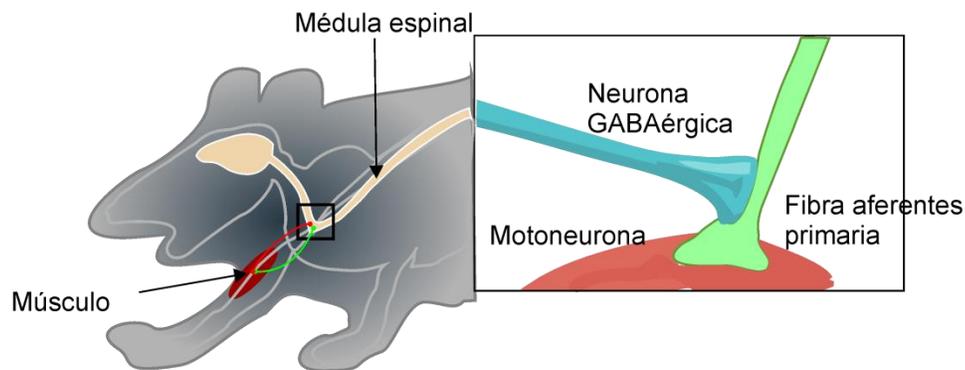
Toda esta información es susceptible a ser modulada. Existe mucha información que no es relevante y tiene que ser reducida o eliminada a través de mecanismos inhibitorios. Esta inhibición sirve para varios propósitos: primero, regula la recepción y el procesamiento de la información sensorial directamente en la transmisión sensorial aferente (inhibición presináptica) o bien de forma postsináptica sobre neuronas que están interpuestas en las vías de transmisión sensorial. Y segundo la inhibición tiene un rol importante en coordinar la actividad motora necesaria para el control de movimientos reflejos, locomoción y postura (Rudomin and Schmidt, 1999; Goulding et al., 2014).

#### 1.1.1. *Inhibición presináptica y PAD*

Un movimiento produce activación de receptores periféricos (propioceptivos y cutáneos) generando actividad autoinducida que es transmitida al sistema nervioso central (SNC) donde interactúa con otros comandos motores y otros procesos (Rudomin, 1999; Rudomin and Schmidt, 1999; Seki et al., 2003). A nivel de médula espinal, la inhibición presináptica modula la transmisión de estas respuestas regulando la liberación de

neurotransmisor de las aferentes presinápticas y de esta forma modifica las entradas a las neuronas de segundo orden.

Entonces, las fibras aferentes primarias representan el primer sitio de modulación de la información sensorial. La PAD es producida y modulada segmentalmente por otras fibras aferentes primarias o bien, por fibras descendentes originadas en estructuras centrales como la corteza cerebral (Rudomin and Schmidt, 1999) **figura 7.**

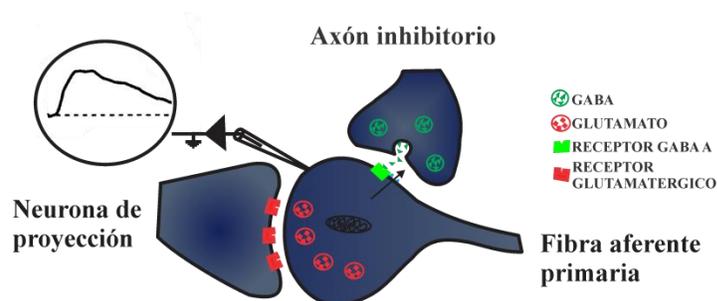


**Figura 7. Inhibición presináptica.** Cuando un músculo se estira las neuronas aferentes sensoriales se activan y los impulsos viajan a la médula espinal. Esta retroalimentación produce actividad en las motoneuronas que transmiten información a los músculos generando movimiento. Del lado derecho se observa un acercamiento de una sinapsis sensorial-motora, donde se ilustra una neurona GABAérgica que contacta con la terminal axónica de la fibra aferente disminuyendo así la liberación de moléculas de neurotransmisor de las fibras aferentes primarias de forma presináptica. Modificado de (Scott and Crevecoeur, 2014).

Se han propuesto otros mecanismos de inhibición presináptica (Hochman et al., 2010), sin embargo, el mecanismo más estudiado es la PAD mediada por el receptor GABA<sub>A</sub>. La activación del receptor GABA<sub>A</sub> localizado en las fibras aferentes primarias permiten que los iones de Cl<sup>-</sup> fluyan de acuerdo a su gradiente electroquímico (del espacio intracelular al extracelular). La concentración intracelular de Cl<sup>-</sup> en las fibras aferentes

primarias es mayor debido a la presencia de una bomba activa NKCC (Rudomin, 1999; Rudomin and Schmidt, 1999). La PAD también reduce la entrada de  $Ca^{2+}$  y por ende disminuye la liberación de neurotransmisor bloqueando la invasión de los potenciales de acción y reduciendo su amplitud (Rudomin and Schmidt, 1999). La PAD está mediada por interneuronas GABAérgicas que forman sinapsis axoaxónicas con las fibras aferentes primarias.

Debido a que se pierden cargas negativas, la terminal aferente se despolariza y puede ser registrado como un potencial de raíz dorsal negativo o como un aumento en la excitabilidad. Durante la PAD, los potenciales de acción que llegan de la periférica tienen una menor amplitud lo que resulta en una disminución en la activación de los canales de  $Ca^{2+}$  de bajo umbral y por lo tanto un menor incremento intracelular de  $Ca^{2+}$  necesario para la liberación de neurotransmisor, por lo tanto la PAD es un mecanismo inhibitorio (Rudomin and Schmidt 1999). Entonces la inhibición presináptica inhibe información en algunas aferentes pero no en otras, lo que puede servir para excitar solo ciertos blancos neuronales necesarios para el control motor y la discriminación sensorial en una situación particular **figura 8**. Asimismo, la PAD modula la información de diversas maneras, activando y/o inhibiendo de forma diferencial las fibras aferentes primarias y esto permite seleccionar estímulos relevantes para discriminar una sensación o ejecutar un movimiento (Rudomin, 1999; Rudomin and Schmidt, 1999).



**Figura 8.** *Mecanismo de la inhibición presináptica.* Un axón inhibitorio que contacta con una fibra aferente primaria, cuando un microelectrodo esta insertado en la terminal de la fibra aferente y registra la despolarización provocada por la activación del receptor GABA<sub>A</sub>. (ver el texto para detalles; Modificado de Rudomin and Schmit 1999).

La PAD puede ser producida por estimulación de otras aferentes primarias o bien por estructuras centrales. Por ejemplo, las aferentes sensoriales que inervan los husos musculares se despolarizan por aferentes musculares del grupo I y por estructuras centrales como la corteza motora, el núcleo rojo, la formación reticular y el núcleo del rafe. En contraste, las aferentes que inervan los órganos tendinosos se despolarizan por estimulación de aferentes musculares y cutáneas y estructuras supraespinales (Rudomin, 2009). Las fibras aferentes del grupo II se despolarizan por estimulación de otras fibras del grupo II, grupo I, cutáneas y estructuras centrales. Las fibras aferentes cutáneas son despolarizadas por otras aferentes cutáneas, por fibras de los grupos Ib, II y supraespinales, esto es importante para la discriminación sensorial cutánea (Rudomin, 2009).

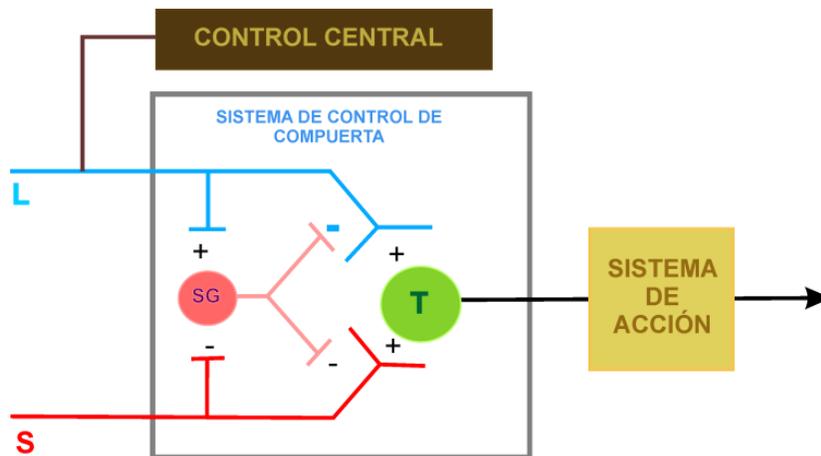
La despolarización de fibras amielínicas y la contribución de la PAD en el procesamiento de la información nociceptiva no se ha estudiado con tanto detalle. Recientemente utilizando herramientas genéticas de mutación puntual de la subunidad  $\alpha$  del receptor GABA<sub>A</sub> en aferentes amielínicas reduce la sensibilidad a benzodiazepinas y la inhibición presináptica (Witschi et al., 2011).

### 1.1.2. *Inhibición Segmental.*

La inhibición local en el asta dorsal es esencial para la codificación apropiada de las señales sensoriales y depende de la conectividad sináptica y postsináptica de las neuronas del asta dorsal. Esta inhibición es regulada principalmente por dos neurotransmisores, GABA y glicina. Estos neurotransmisores son liberados por interneuronas locales y por sistemas descendentes y se unen a su receptor apropiado. La activación de los receptores de GABA<sub>A</sub> y glicina disminuyen la excitación neuronal porque producen hiperpolarización de la membrana postsináptica (Bardoni et al., 2013).

La función de las interneuronas del asta dorsal es importante para el procesamiento fisiológico de los estímulos somatosensoriales y también tiene implicaciones importantes para la generación y mantenimiento de estados de dolor crónico (Todd, 2010).

En 1965 Melzack y Wall, postularon la teoría de la compuerta, la cual propone que la información sensorial de la piel es modulada por un sistema de compuerta en la médula espinal. Así, una estimulación en la piel provoca estímulos nerviosos que son transmitidos por 1) Fibras A $\beta$  (grueso calibre), que activan neuronas en la sustancia gelatinosa (lámina I) del asta dorsal de la médula espinal, que en turno bloquean la entrada de la información nociceptiva; 2) Fibras C (delgado calibre), las cuales inhiben células en la sustancia gelatinosa, que entonces permiten el flujo de la información nociceptiva a células de proyección, que transmiten la información a centros cerebrales superiores. Esta teoría además propone que existe en el SNC un sistema descendente que modula las entradas sensoriales modificando la excitabilidad de células en la médula espinal y modulando así la información sensorial (Melzack and Wall, 1965) **figura 9**.



**Figura 9.** *Esquema de la teoría de la compuerta.* Propone que las fibras de grueso calibre (L) activan neuronas de la sustancia gelatinosa (SG) (lámina I) y estas inhiben la transmisión de la señales de fibras de delgado calibre (S) a neuronas de transmisión (T) “cerrando la compuerta”. También propone que las fibras S inhiben neuronas de la SG, y estas en turno permiten el flujo de información “abriendo la compuerta”. Y además, propone que este sistema de compuerta está sujeto a controles supraespinales. Modificado de (Melzack and Wall, 1965).

## 1.2. Control central de la información sensorial

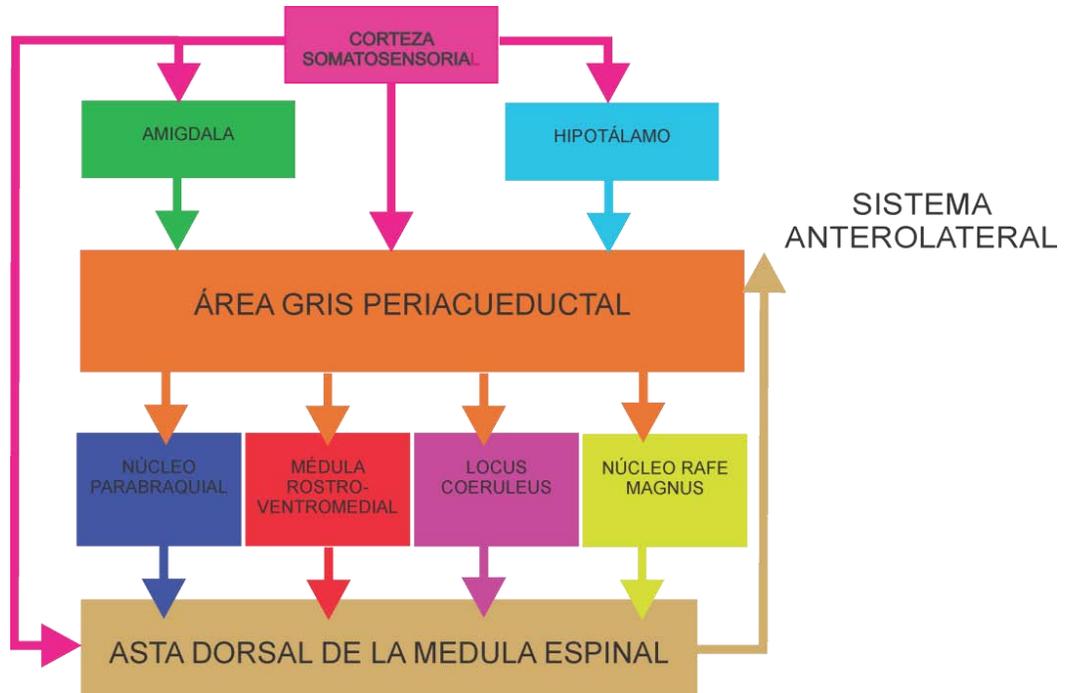
La información sensorial también puede ser modulada centralmente en la médula espinal (Kandel, 2013). Es así que la excitabilidad de las neuronas de la médula espinal está influenciada directamente por vías descendentes originadas en diferentes centros cerebrales como el hipotálamo, el núcleo parabraquial, el núcleo del tracto solitario (NTS), núcleo rafe magnus (NRM), médula rostroventromedial (MRV), PAG y la corteza cerebral como revisión ver (Millan, 1999). 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, 1999, 2002; Fields, 2004; Condes-Lara et al., 2009).

De manera interesante, el sistema cortico–espinal representa un sistema endógeno de modulación de la información nociceptiva. Es así que incluso clínicamente se ha utilizado la estimulación de la corteza motora para el tratamiento de dolor crónico y neuropático en pacientes (Brown and Barbaro, 2003). A pesar de ello, los mecanismos a través de los cuales se ejerce la modulación de este sistema sobre la información nociceptiva a nivel espinal no son claros (ver **figura 10**).



**Figura 10.** *Sistemas de modulación descendente de información sensorial en la médula espinal.* Se puede observar que existe jerarquía entre las diversas estructuras que conforman el sistema de modulación descendente (Modificado de Purves et al 2004).

### 1.2.1. *Modulación sensorial mediada por el tracto corticoespinal*

La corteza motora tiene un papel central en el aprendizaje y ejecución de habilidades motoras a través de conexiones directas e indirectas a la médula espinal (Lemon, 2008). Sin embargo, adicionalmente, las proyecciones directas corticoespinales participan en la modulación del flujo de información sensorial de distintas modalidades. A continuación se revisan las evidencias que muestran el papel de las proyecciones corticoespinales sobre la modulación sensorial, así como en el control motor.

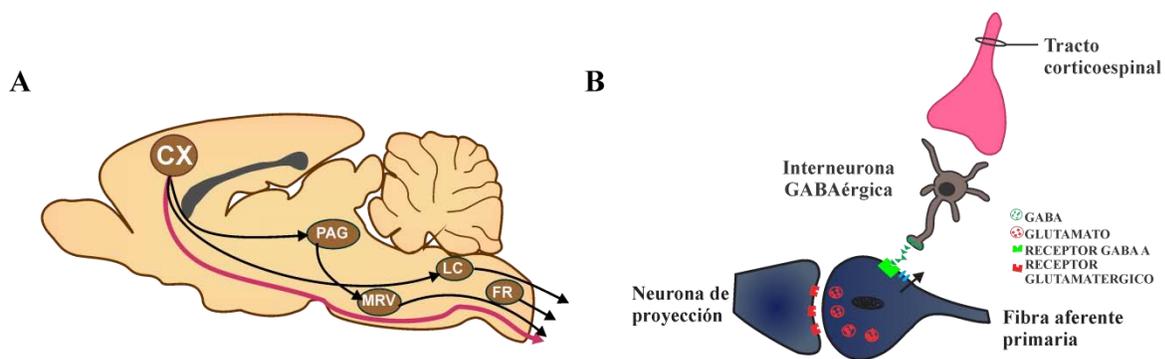
La vía cortico-espinal de todos los mamíferos tiene su origen en las neuronas de la capa 5 de la corteza somatosensorial y motora. Los axones que forman esta vía decusan en la decusación piramidal y alcanzan la médula espinal. A pesar de que a la proyección corticoespinal tradicionalmente se le ha atribuido un papel relacionado al control motor (Canedo, 2003), este tracto difiere entre las diferentes especies de mamíferos en el origen, número y lugar en el que terminan las fibras, lo que ha llevado a proponer que existen diferencias funcionales de este tracto (Lemon and Griffiths, 2005). Como se describió en el capítulo anterior, en los primates, el gato y la rata se ha demostrado que la vía corticoespinal tiene proyecciones directas al asta dorsal de la médula espinal (Lemon and Griffiths, 2005). A pesar de que la función de estas proyecciones al asta dorsal no se conoce del todo, es muy probable que participan en el control descendente de la información sensorial (Hultborn et al., 1987a; Hultborn et al., 1987b; Eguibar et al., 1994; Eguibar et al., 1997; Wall and Lidierth, 1997). Desde los 1960s (Carpenter et al., 1963; Andersen et al., 1964) se ha mostrado en el gato y en el mono (Abdelmoumene et al., 1970) que la estimulación repetitiva de la corteza somatosensorial primaria y secundaria (SI y SII respectivamente), así como la estimulación del tracto piramidal (Rudomin et al., 1986)

produce una despolarización de fibras rápidas mielinizadas cutáneas y musculares Ib pero no en fibras Ia y II en la médula espinal (Aggelopoulos et al., 2008). De esta forma, la corteza cerebral produce acciones diferentes en la efectividad sináptica de las diferentes fibras aferentes primarias. En este sentido la estimulación de la corteza sensorimotora puede además producir (Eguibar et al., 1994; Eguibar et al., 1997) o modular (Lomeli et al., 1998) la PAD en una colateral y no en otra de una misma fibra aferente. Este control selectivo de entradas a la médula espinal mediada por la corteza significa que la modulación de la información sensorial es relevante para el control motor y la correcta ejecución de los movimientos (Lebedev and Nelson, 1996). Particularmente, se ha estudiado poco el papel de la corteza sensorimotora en la modulación de la información que es transmitida por las aferentes amielínicas nociceptivas.

#### 1.2.2. *Modulación nociceptiva mediada por el tracto corticoespinal*

En estudios conductuales con modelos animales han reportado que la estimulación eléctrica epidural de la corteza motora produce antinocicepción en la prueba de presión de la pata (Fonoff et al., 2009), el test de formalina (Kuroda et al., 2000; Kuroda et al., 2001), daño al nervio ciático (Pagano et al., 2011) y con rizotomía de raíz dorsal (Rusina et al., 2005). Y la administración intracortical de bicuculina en la corteza somatosensorial (SI) tiene efectos antinociceptivos en un modelo de dolor inflamatorio sugiriendo un efecto inhibitorio de SI en el dolor crónico (Wang et al., 2009). La estimulación de la corteza motora (MCS, por sus siglas en inglés) también disminuye la inmunoreactividad de c-Fos en los núcleos VPL y VPM talámicos y en el asta dorsal de la médula espinal (Pagano et al., 2012). Se ha propuesto que en estos efectos antinociceptivos pueden estar involucradas diversas estructuras. En este sentido se sabe que la MCS aumenta la frecuencia de disparo y

la inmunoreactividad de c-Fos en la PAG y al mismo tiempo, en la misma región disminuye la expresión de GABA, sugiriendo que la MCS inhibe las neuronas talámicas desinhibiendo las neuronas de la PAG. También se postula que la MCS activa el sistema canabinoide y así activa los astrocitos y la microglía que por su parte disminuyen la secreción de citosinas pro-inflamatorias y por lo tanto disminuye la neuroinflamación. También a través del sistema opiáceo la MCS disminuye la excitabilidad neuronal y por lo tanto la transmisión del dolor persistente (Silva et al., 2015). Por otro lado, en estudios electrofisiológicos, a nivel cerebral, la MCS inhibe las respuestas a estímulos periféricos en SI, esta inhibición se bloquea con naloxona y el antagonista del receptor de dopamina D1 (SCH-23390), esto sugiere que estos efectos están mediados por el sistema opiáceo y los receptores dopaminérgicos D1 (Chiou et al., 2012; Chiou et al., 2013). Por otro lado a nivel espinal, la estimulación eléctrica de las cortezas somatosensorial y motora en la rata disminuyen las respuestas nociceptivas de neuronas del asta dorsal sin afectar las respuestas a estímulos inocuos (Senapati et al., 2005b; Senapati et al., 2005a). Adicionalmente, nuestro grupo mostró que la activación de la corteza sensorimotora en la rata inhibe la respuestas electrofisiológicas de fibras C en el asta dorsal contralateral y que las lesiones del tracto piramidal suprimen estos efectos. Esto sugiere la participación de una vía directa corticoespinal que modula la transmisión de información nociceptiva en la médula espinal (Rojas-Piloni et al., 2010). Asimismo, la aplicación de bicuculina en la médula espinal bloquea los efectos inhibitorios de las respuestas neuronales nociceptivas mediados por la corteza sensorimotora, lo cual indica la participación de mecanismo GABAérgica inhibitorio (Moreno-Lopez et al., 2013) Ver **figura11**.



**Figura 11.** *Control descendente de la información nociceptiva del tracto corticoespinal.* **A**, se muestran las conexiones que tiene la Cx con diversas estructuras que modula para en conjunto producir efectos antinociceptivos. Nótese que además de múltiples conexiones la Cx a través de la vía corticoespinal modula de forma directa la información nociceptiva en la medula espinal. **B**, mecanismo de acción propuesto de la inhibición de la información nociceptiva en la medula espinal. Modificado de (Heinricher et al., 2009).

Nuestros resultados muestran que los efectos de la MCS sobre la información nociceptiva son debidos en parte a la activación del sistema cortico-espinal. Sin embargo, los mecanismos involucrados a nivel espinal en los efectos antinociceptivos mediados por la vía corticoespinal no se conocen por completo, por lo que en la presente tesis nos enfocamos en estudiar tales mecanismos, y así tratar de entender la selectividad del TCE sobre la modulación y procesamiento de la información nociceptiva.

### 1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las funciones del TCE es la modulación de la información sensorial que ocurre durante la ejecución de movimientos. Dicha modulación ha sido descrita para la información que viaja por aferentes mielínicas, tal como la propioceptiva y no se conoce si la información sensorial que viaja por aferentes amielínicas se encuentra también sujeta a dicha modulación. Esto es factible, ya que, en modelos animales la estimulación de la corteza sensorimotora suprime las respuestas nociceptivas en la médula espinal. Sin embargo, los mecanismos espinales a través de los cuales esto ocurre no han sido estudiados con detalle. Es así que en el presente trabajo se estudiaron los efectos de la estimulación de la corteza sensorimotora sobre la actividad eléctrica de fibras aferentes amielínicas y de neuronas del asta dorsal identificadas funcionalmente para determinar si la vía corticoespinal modula la transmisión de información nociceptiva a nivel presináptico (sobre las aferentes primarias) y/o postináptico sobre neuronas de segundo orden. Esto es importante para entender de manera integrativa como se organizan las distintas salidas corticoespinales, así como la selectividad que el TCE ejerce sobre las diferentes modalidades sensoriales.

#### 1.4. **HIPÓTESIS**

La activación de las proyecciones corticoespinales activa interneuronas inhibitorias segmentales que a su vez despolarizan terminales de fibras aferentes primarias miélicas en la médula espinal de la rata.

#### 1.5. **OBJETIVOS GENERALES**

- Caracterizar si la modulación provocada por la estimulación cortical sobre las respuestas neuronales provocadas por la activación de fibras aferentes miélicas, se ejerce de forma presináptica.

##### 1.5.1. **OBJETIVOS PARTICULARES**

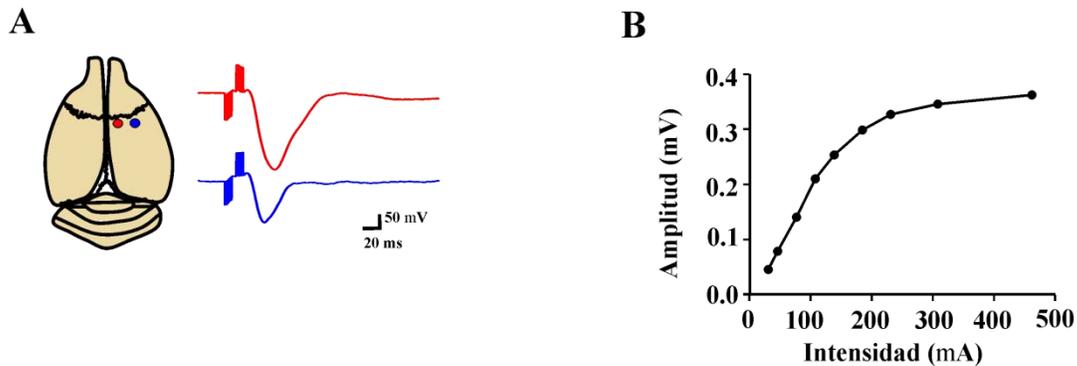
- Analizar si las proyecciones corticoespinales modulan a fibras aferentes primarias de forma presináptica o postsináptica mediante un protocolo de pulsos pareados.
- Analizar el efecto de la estimulación de la corteza sensorimotora sobre la excitabilidad de las fibras aferentes primarias miélicas.
- Evaluar si la excitabilidad de fibras aferentes primarias miélicas es provocada por la activación del TCE.
- Analizar el efecto de la estimulación cortical en neuronas del asta dorsal de la médula espinal por medio del registro electrofisiológico extracelular.
- Evaluar si los efectos producidos por la estimulación de la corteza sensorimotora son debidos a proyecciones directas corticoespinales.

## 1.6. MATERIALES Y MÉTODOS

Para estudiar los efectos de la estimulación de la corteza sensorimotora sobre la actividad eléctrica de las neuronas del asta dorsal en la rata planteamos realizar registros electrofisiológicos de campo y extracelulares. Para este estudio se utilizaron ratas macho Wistar adultas. 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).

### *Animales y estimulación*

Para los registros electrofisiológicos los animales se anestesiaron con uretano 1.4grms/kg i.p. Una vez anestesiados a los animales se les realizó una traqueotomía para ventilarlos artificialmente, se monitoreó la frecuencia cardiaca, el CO<sub>2</sub> tidal y se controló la temperatura corporal. Con ayuda de un estereotáxico y un taladro dental se expuso la corteza sensorimotora (sensorial y motora) y los segmentos L3-L4 de la médula espinal. La corteza sensorimotora se estimuló eléctricamente (5 pulsos, 1ms, 100–300  $\mu$ A) mediante una matriz de electrodos (3 x 5) que se localizó a 3mm de la línea media y 2.5 mm posterior a Bregma, (Paxinos and Watson, 1998) y se registró en el asta dorsal con electrodos de borosilicato llenos con NaCl 1M con resistencia de 1–2 M $\Omega$  el potencial de campo producido por la estimulación cortical (EFP–Cx ). En cada sito de registro se estimuló el sitio de la corteza que produjo un EFP–Cx de mayor amplitud y posteriormente la intensidad se ajustó de tal forma que se tuviera un EFP–Cx de 50% de su amplitud máxima, **figura 12.**



**Figura 12.** *EFP-Cx*. A, *EFP-Cx* promedio provocado por la estimulación de la corteza sensorimotora contralateral y registrado en el segmento L4 de la médula espinal. El dibujo muestra los sitios de estimulación en la corteza. El trazo en rojo es producido por estimular la zona marcada en rojo en la corteza (1.5 mm medial con respecto al trazo azul). B, muestra la relación entre la intensidad de estimulación y la amplitud de *EFP-Cx*.

### *Pulsos pareados*

Para registrar las respuestas de campo provocadas de fibras C (*EFP-fibras C*) en el asta dorsal, se aplicaron 2 estímulos consecutivos al nervio ciático, separados 200 ms, a frecuencia 0.5 Hz. La intensidad de estimulación se ajustó de tal forma que la razón R1/R2 (PPP) fuera igual o menor a 1. De esta manera se midieron las amplitudes de las respuestas provocadas por estimulación de fibras C y se calculó la PPP (R2/R1). Simultáneamente, se registró la actividad de campo cortical y de la médula espinal intrínseca antes, durante 60 minutos de aplicación de bicuculina (BIC) (50  $\mu$ L, 100 $\mu$ M) y 60 minutos después de lavar dicho fármaco con solución salina fisiológica. La PPP se midió en condiciones control, después de la aplicación de BIC en la superficie de la corteza sensorimotora y durante el lavado.

### *Registro de la excitabilidad de aferentes amielínicas*

Se registró el potencial de acción compuesto antidrómico con un electrodo de gancho en los nervios cutáneos sural (NSu) y peroneo (Pe) producido por la activación de

aferentes nociceptivas lentas (velocidades de conducción entre 0.5–2 m/s) en el asta dorsal, según el método descrito por Wall (Wall, 1958). Para estimular las terminales de las fibras aferentes se utilizó un electrodo bipolar concéntrico (0.5mm de separación entre las puntas) que se localizó en asta dorsal en los segmentos lumbares L4-L5 a una profundidad de 300-400  $\mu\text{m}$  (sitio donde se localiza la mayor amplitud del EFP–fibras C por la estimulación al NSu). Los estímulos tuvieron 1ms de duración, frecuencia de 2Hz y la intensidad del estímulo se ajustó hasta registrar un potencial de acción compuesto del 50% de amplitud máxima (0.3–0.7  $\mu\text{A}$ ). Las velocidades de conducción se calcularon a partir de la diferencia en la latencia registrada en las respuestas antidrómicas registradas mediante dos electrodos separados 7 mm localizados en el NSu.

Con la finalidad de demostrar que las respuestas antidrómicas registradas fueron provocadas por la activación de fibras C amielínicas, se llevó a cabo un test de colisión que consistió en aplicar simultáneamente un estímulo en el asta dorsal y un estímulo al NSu. La intensidad del estímulo en el NSu se varió (utilizando como intensidad mínima el umbral de las fibras más excitables) mientras que el del asta dorsal se mantuvo constante. De esta manera se midió el umbral a partir del cual la respuesta antidrómica provocada por la estimulación al asta dorsal colisiona con la producida por la estimulación al Nsu.

Posteriormente, se analizó la amplitud de las respuestas antidrómicas nociceptivas y se compararon estas respuestas con aquellas precedidas por la estimulación cortical, a diferentes intervalos de tiempo entre la estimulación en el asta dorsal y la estimulación de la corteza (de 5 a 300 ms).

### *Registros electrofisiológicos extracelulares unitarios*

Se realizaron registros extracelulares en neuronas del asta dorsal de los segmentos L3-L5 de la médula espinal (sitio donde se recibe la información aferente correspondiente a las extremidades inferiores). Para ello, se utilizaron electrodos de vidrio llenos con solución extracelular (mM): 135 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, y 5 Hepes, pH 7.2 con resistencia de 7-10 MΩ. De cada célula se determinó su respuesta mediante la estimulación eléctrica de su campo receptivo (RF). La estimulación eléctrica al RF se aplicó con dos electrodos de metal y consistió en pulsos de 1 ms de duración, 0.5 Hz, en cada célula la intensidad se ajustó para provocar respuestas de fibras C. De cada célula se determinaron los componentes de su respuesta de acuerdo a sus latencias Aβ (0-20 ms), Aδ (20-90), C (90-300) (Harper and Lawson, 1985). Una vez caracterizada la respuesta de la célula se analizó el efecto de la estimulación cortical sobre las respuestas de fibras C. La estimulación cortical precedió en diferentes intervalos a las fibras C.

### *Análisis de datos*

El análisis de las respuestas se realizó con el programa Clampfit (pCLAMP 10.0 Molecular Devices). Se midió la amplitud de las respuestas de fibras C y la PPP antes, durante y después de la aplicación de BIC, así como el área bajo la curva calculada del espectro de potencia de la actividad de campo cortical. Los datos se compararon con la prueba de Kruskal–Wallis y se realizó una correlación de Spearman entre la actividad cortical y la PPP. Para los registros de excitabilidad se utilizó la prueba de Kruskal–Wallis. Para los registros unitarios de fibras C se compararon los efectos de la estimulación cortical en la respuesta de fibras C en diferentes intervalos de tiempo utilizando la prueba de Kruskal–Wallis. En todos los experimentos se consideraron diferencias significativas si  $p < 0.05$ .

## 1.7. RESULTADOS

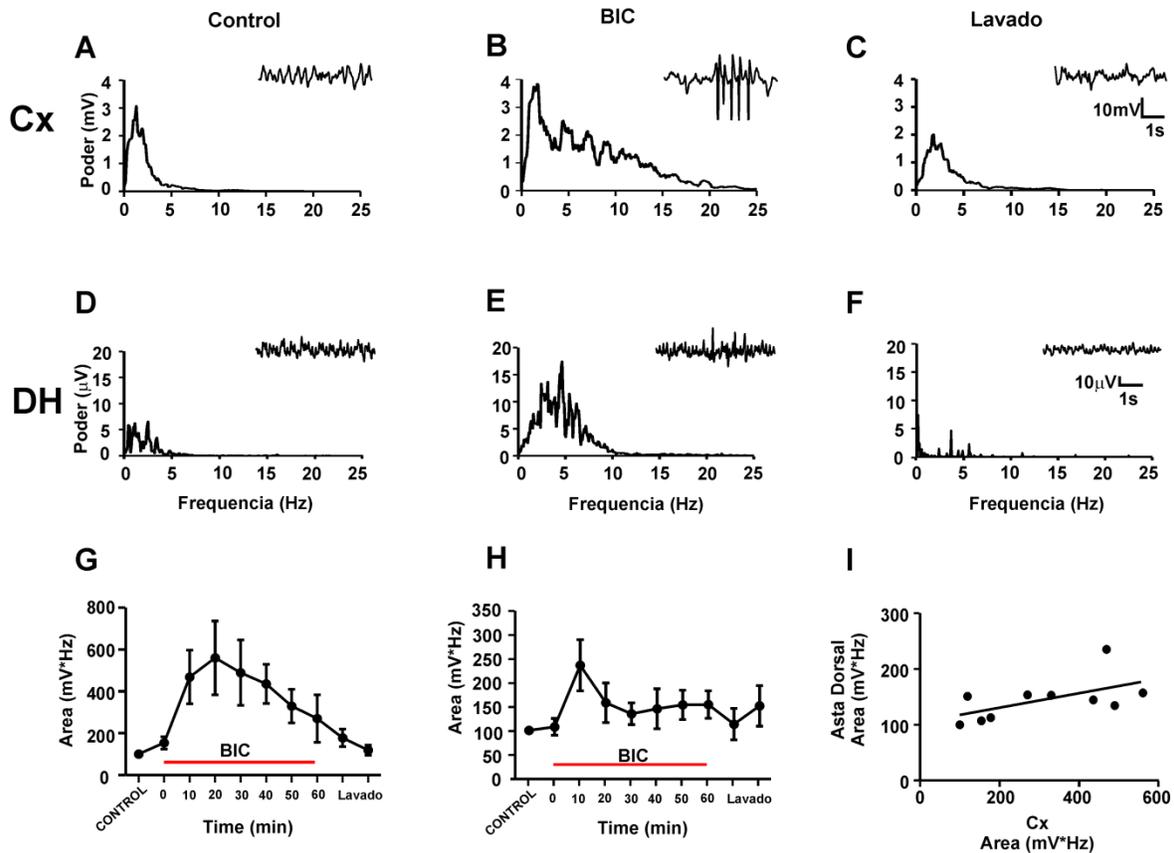
### *Efectos de la activación cortical en la PPP de respuestas de fibras C*

Inicialmente se evaluó la influencia cortical sobre las respuestas neuronales provocadas por la activación de fibras C. Para ello, se analizaron los efectos de la administración de BIC en la corteza sensorimotora sobre la PPP de la respuesta provocada por estimulación de fibras C en la médula espinal, producida por 2 estímulos consecutivos al nervio ciático. Así, se analizó su amplitud y la PPP antes, durante y después de la aplicación de BIC en la superficie de la corteza sensorimotora contralateral al sitio de registro en la médula espinal. Asimismo se registró la actividad de campo espontánea cortical y de la médula espinal cada 10 minutos posterior a la aplicación de BIC.

Observamos que la actividad de campo de la médula espinal durante la aplicación de BIC en la superficie cortical contralateral aumento gradualmente alcanzando su máximo a los 20 minutos posteriores a la administración de BIC. En la **figura 13 A-F** se ilustran los espectros de potencia y registros representativos. La actividad regresó a sus niveles control después del lavado de la BIC con NaCl 0.09%. Se observó una correlación significativa (Spearman  $r=0.6$ ,  $p=.03$ ) entre la actividad espontánea cortical y la actividad de la médula espinal seguida de la aplicación de BIC en la corteza sensoriomotora (**figura 13 G-I**).

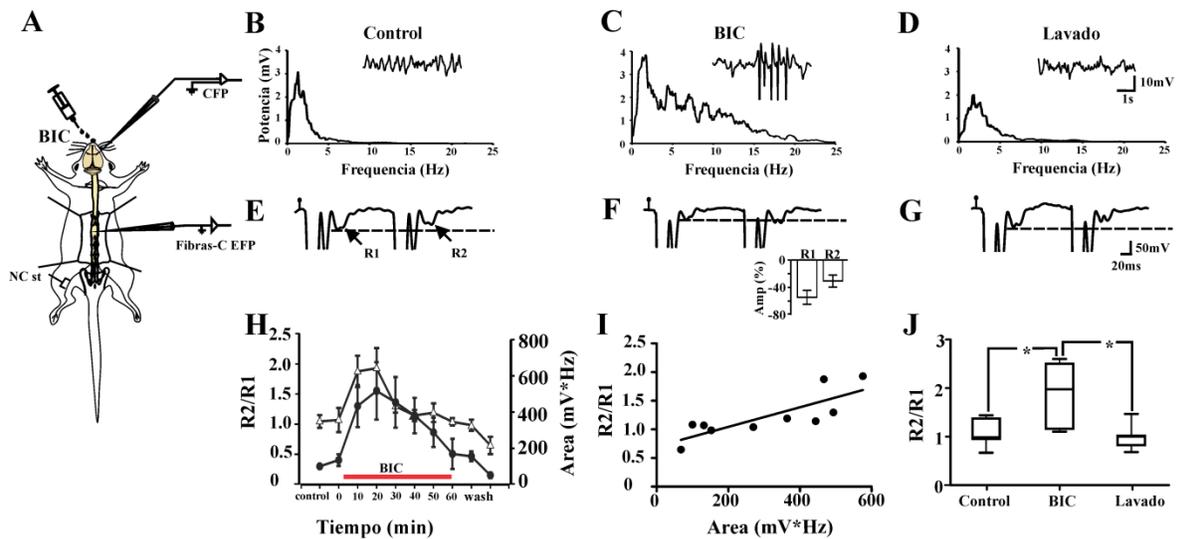
Adicionalmente analizamos la amplitud de las respuestas provocadas por fibras C y la PPP. En la **figura 14** se ilustran ejemplos de las respuestas observadas: actividad espontánea cortical (**B-D**) y potencial de campo provocado por activación de fibras C (**E-G**). La amplitud de las respuestas de fibras C en la médula espinal disminuyó significativamente ( $54.4\pm 10.1$  %;  $p=0.01$ ; Kruskal–Wallis test;  $n=6$ ) después de 20 minutos

de la aplicación de BIC y dicha disminución se acompañó de un aumento significativo en la PPP de estas mismas respuestas (**figura 14 J**).



**Figura 13.** Cambios en la actividad espontánea cortical y del asta dorsal antes, durante y después de la aplicación de BIC. **A.** Espectro de potencia de la actividad espontánea cortical registrada durante 30s. El inserto muestra un ejemplo del registro de la actividad de campo cortical de la corteza sensorimotora (profundidad 1000 mm, 2.5 mm caudal a bregma y 3 mm de la línea media). **B,** lo mismo que en **A** pero 20 minutos después de la aplicación tópica de BIC en la superficie de la corteza sensorimotora. **C,** lo mismo que en **A** pero después del lavado con NaCl 0.09 % de la BIC de la superficie cortical. **D–F,** lo mismo que en **A–C** el espectro de potencia de la actividad espontánea registrada en el asta dorsal de la médula espinal. **G,** cambios en el área bajo la curva calculada del espectro de potencia de la actividad cortical durante la aplicación de BIC. **H,** lo mismo que en **G** pero corresponde a la actividad del asta dorsal. **I,** el grafico muestra una correlación positiva entre el área bajo la curva calculada del espectro de potencia de la actividad cortical y el de la médula espinal (Spearman  $r = 0.6$ ,  $p = 0.03$ ).

Los cambios en la actividad espontánea cortical (área bajo la curva del espectro de potencia) y la PPP tuvieron un curso temporal similar (**figura 14 H**), observándose una correlación positiva significativa entre la actividad cortical y la PPP (Spearman  $r=0.73$ ;  $p=0.03$ ) (**figura 14 I**). Estos resultados indican que la activación de la corteza sensorimotora modula de forma presináptica las respuestas nociceptivas en la médula espinal.

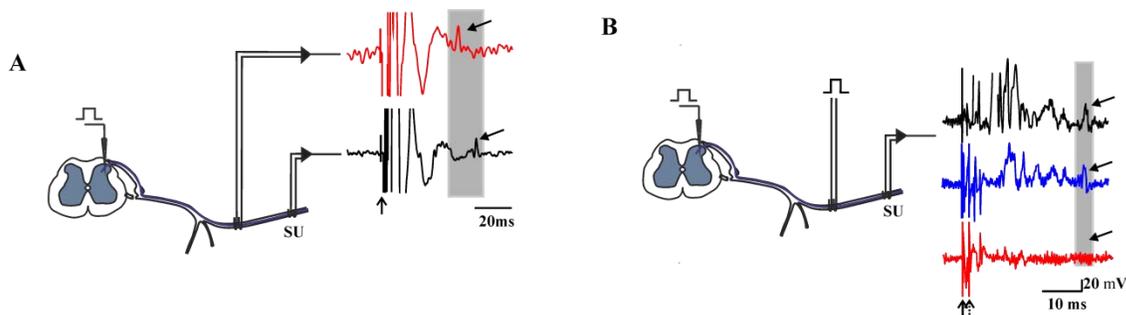


**Figura 14.** La corteza sensorimotora modula la PPR de la respuesta de fibras C en la médula espinal. **A**, Diagrama del diseño experimental. **B**, gráfico del poder espectral de la actividad cortical y el ejemplo de un registro de la actividad cortical control. **C**, lo mismo que en el anterior, en el minuto 20 de la aplicación de BIC. **D**, lo mismo que el anterior, después de lavar la BIC 60 minutos. **E-G**, registros de la respuesta de fibras C provocados por 2 estímulos consecutivos al nervio ciático, antes, durante y después de la aplicación de BIC en la superficie cortical. **H**, Curso temporal de la PPR (triángulos blancos) y la actividad cortical (círculos negros), antes, durante y lavado de la de BIC. **I**, la PPR y la actividad cortical tienen una correlación positiva  $r=0.7$ . **J**, Gráfico de la PPR control, BIC 20 minutos y lavado  $*p<0.05$ , ANOVA Kruskal–Wallis.

#### *Efectos de la estimulación de la corteza sensorimotora sobre la excitabilidad de las terminales de aferentes nociceptivas*

Con la finalidad de estudiar si la corteza produce PAD en las fibras aferentes nociceptivas, realizamos registros de excitabilidad de acuerdo al método descrito por Wall en 1958. De esta forma, se registró el potencial de acción compuesto antidrómico de lenta

latencia ( $1.88 \pm 0.36$  m/s) en el NSu provocado por la estimulación al asta dorsal. La velocidad de conducción del potencial de acción compuesto se calculó a partir de los cambios en la latencia de la respuesta y la distancia entre dos electrodos de registro localizados en el NSu (**figura 15 A**). Para demostrar el umbral de activación del potencial de acción compuesto de lenta latencia se llevó a cabo un test de colisión (Ver métodos). De esta forma, la intensidad necesaria para provocar una colisión del potencial de acción compuesto antidrómico de lenta latencia, es 30 veces mayor que el de las fibras A $\beta$ , **figura 15 B**.

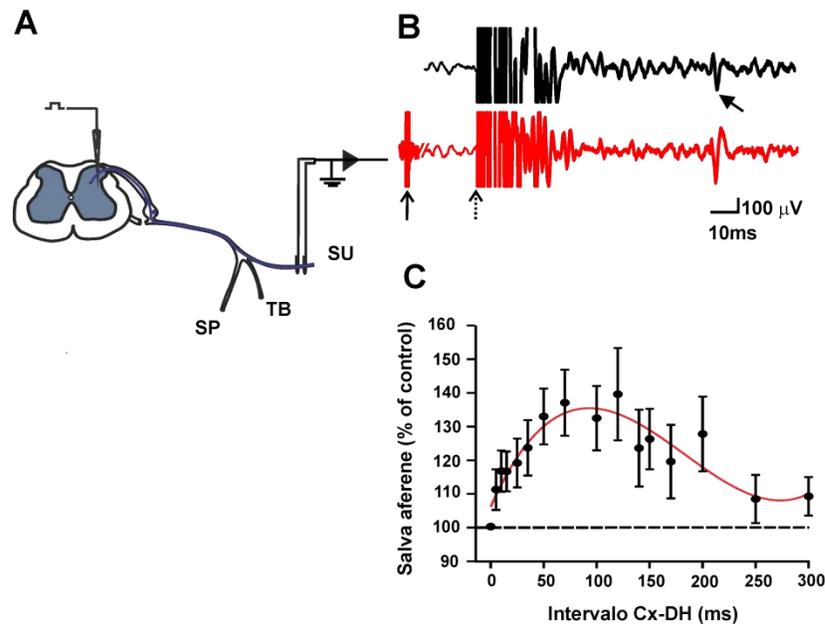


**Figura 15.** *Potencial de acción compuesto antidrómico registrado en el NSu provocado por estimulación en el asta dorsal.* **A.** Arreglo experimental utilizado para determinar la velocidad de conducción de las fibras en el NSu. Los trazos muestran las respuestas lentas producidas por estimulación en el asta dorsal registradas en dos sitios separados 7 mm en el NSu. **B,** arreglo experimental para determinar el umbral de activación de las respuestas lentas. Los trazos ilustran la respuesta producida por estimulación en el asta dorsal (flecha negra) seguida de la estimulación al NSu (flecha punteada) con intensidad 1 umbral (trazo negro), 15 umbral (trazo azul), 30 umbral (trazo rojo), de fibras A $\beta$ . El sitio de estimulación del NSu se localizó a 4 mm del electrodo de registro. El \* ilustra el punto en el cual la respuesta antidrómica debería ocurrir.

El potencial de acción compuesto se registró durante 30 minutos y solo se evaluó el efecto de la estimulación cortical en las respuestas que se mantuvieron constantes por ese tiempo. Posteriormente se analizó la amplitud del potencial de acción compuesto

antidrómico de lenta latencia cuando fue precedido por la estimulación a la corteza sensorimotora contralateral a diferentes intervalos de tiempo.

Encontramos que la amplitud de dicho potencial aumentó de forma significativa en los intervalos de 70–120 ms ( $p=0.002$ ; Kruskal–Wallis;  $n=23$ , **figura 16**). Estos resultados indican que las proyecciones corticoespinales son capaces de despolarizar a las aferentes amielínicas.

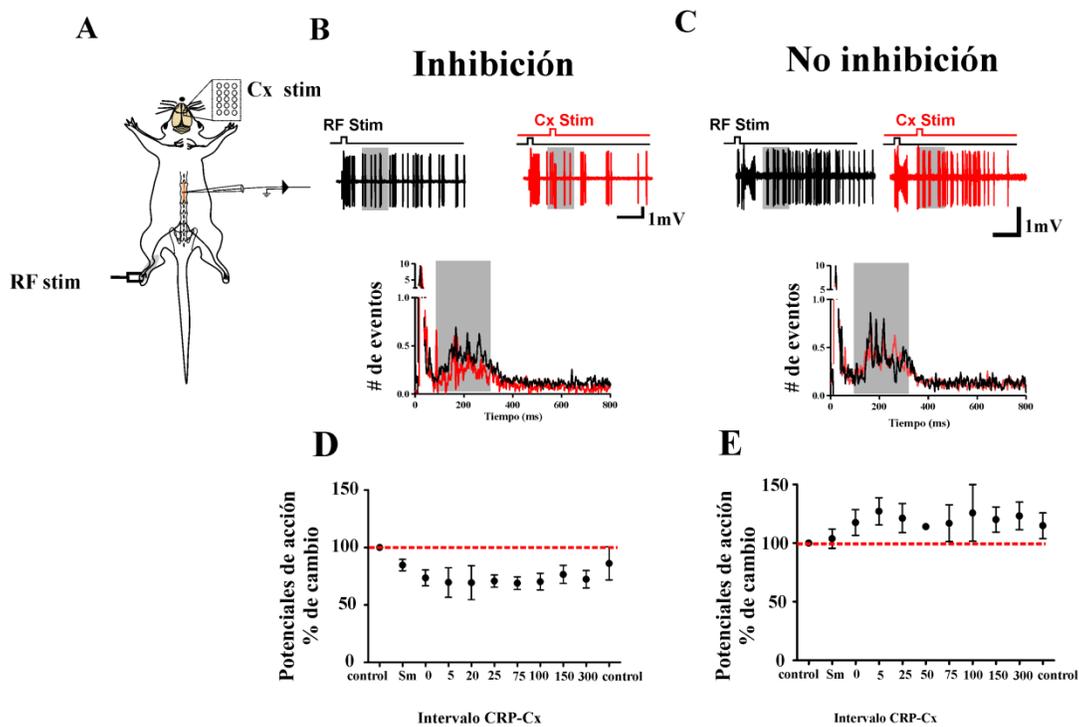


**Figura 16.** La corteza aumenta la excitabilidad de las fibras C. A, diagrama del diseño experimental. B, registro representativo del potencial de acción compuesto control (negro) y cuando el estímulo a la corteza es precedido 70 ms (rojo). La flecha indica la aparición de dicho potencial. C, gráfico que muestra las amplitudes en diferentes intervalos de estimulación cortical.

#### *Efectos de la estimulación cortical en neuronas del asta dorsal.*

Mediante registros unitarios extracelulares realizados en neuronas ( $n=28$ ) WDR, se analizaron los efectos producidos por la estimulación cortical cuando precedió en diferentes intervalos las respuesta de fibras C. Encontramos dos poblaciones de neuronas en el asta dorsal: una población ( $n=20$ ) mostró una disminución significativa en las respuestas provocadas por la activación de fibras C al estimular la corteza en los intervalos de 25 a 300 ms previos a las respuestas neuronales ( $p=.0001$ , Kruskal-Wallis,  $n=20$ ) (**figura 17 D**).

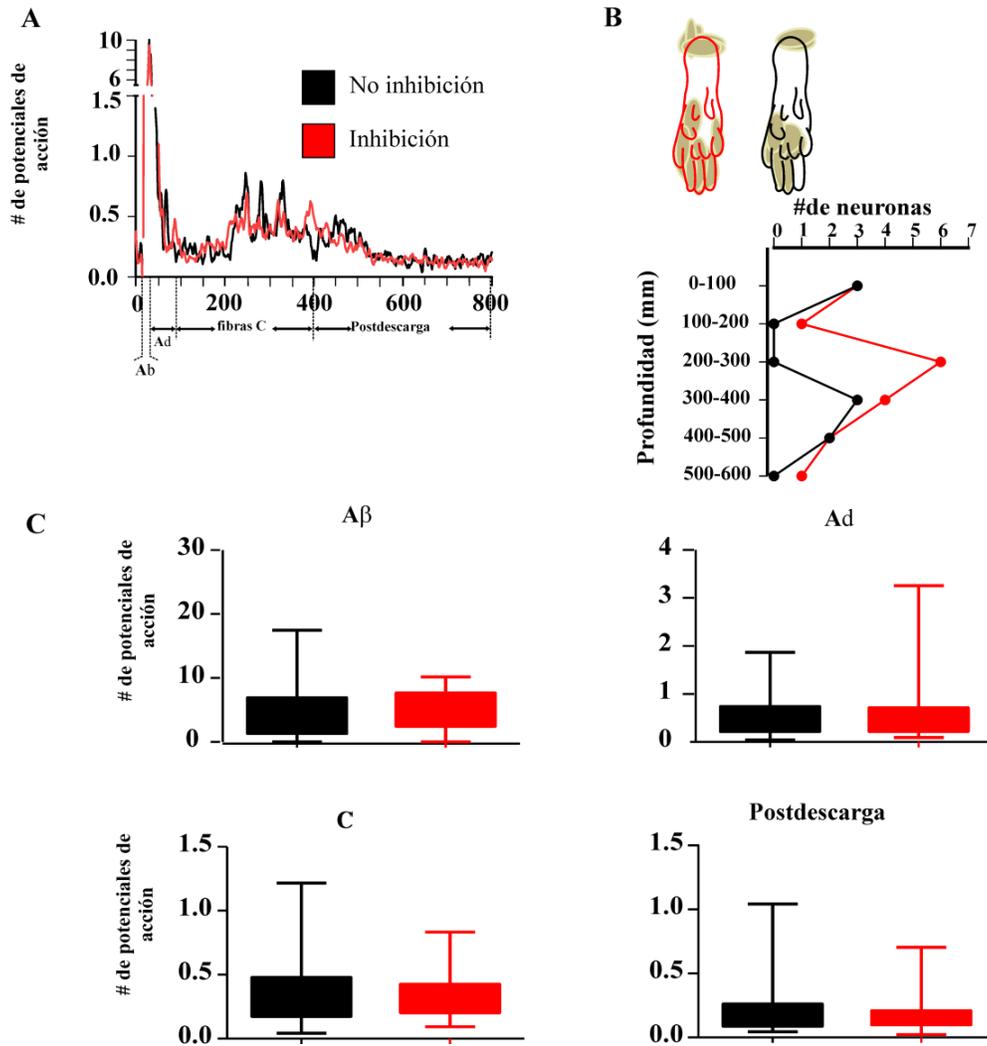
Además, encontramos una población de neuronas en las cuales la estimulación de la corteza sensorimotora no tiene ningún efecto  $n=8$  (**figura 17 E**). Aquellas neuronas que se inhiben se localizaron a una profundidad de 30 a 500  $\mu\text{m}$ , mientras que aquellas que no se inhiben se localizan a una profundidad de 50 a 400  $\mu\text{m}$ .



**Figura 17.** Efectos de la estimulación cortical en neuronas WDR. **A**, esquema del diseño experimental. **B**, respuesta de una neurona WDR provocada por estimulación de su campo receptivo en condiciones control (izquierdo), la gráfica de abajo muestra las respuestas promedio de 20 neuronas a 24 estímulos periféricos en condición control (trazo negro) y cuando el estímulo cortical precede 75 ms la respuesta de fibras C (trazo rojo), se puede observar que cuando la respuesta de fibra C es precedida por el estímulo cortical hay una disminución en el número de potenciales de acción. **C**, se muestra la respuesta de una neurona WDR provocada por la estimulación periférica (izquierda) y cuando cada respuesta de fibra C fue precedida por estimulación cortical (derecha). Se puede observar que la respuesta de fibra C de esta neurona no cambia cuando se estimula eléctricamente la corteza. La grafica de abajo muestra la respuesta promedio de 8 neuronas a la estimulación de su CRP en condición control (trazo negro) y cuando la respuesta de fibras C es precedida por la estimulación cortical (trazo rojo). **D**, gráfico de los porcentajes de inhibición en diferentes intervalos de tiempo en que la estimulación cortical precedió la respuesta de fibras C el \* indica una inhibición significativa (\*\* $p=0.0001$ , Kruskal-Wallis,  $n=19$ ). **E**, gráfico del promedio de 8 neuronas que no cambian su respuesta cuando se estimula la corteza sensorimotora

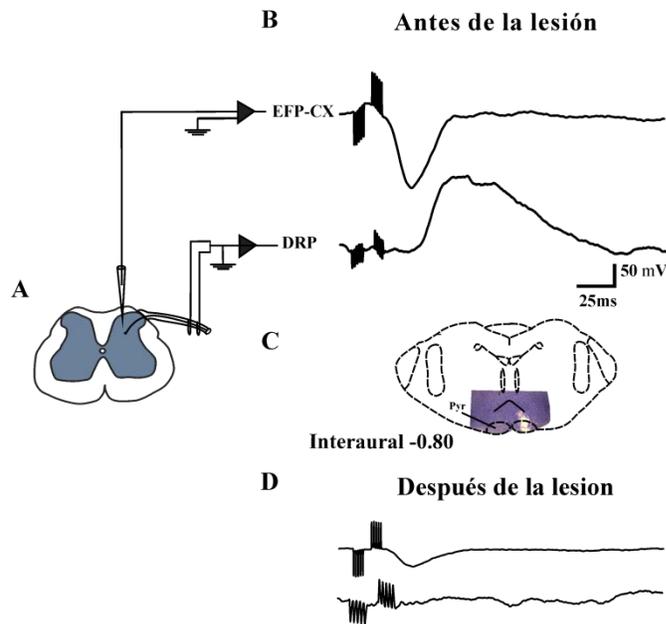
La profundidad de registro de ambos tipos de neuronas (**figura 18 B**) no es significativamente diferente. Tampoco encontramos diferencias cuando se comparó su actividad espontánea basal así como sus respuestas provocadas por la activación de fibras

A $\beta$ , A $\delta$ , y C (**figura 18**). Estos resultados sugieren que la proyección corticoespinal ejerce sus efectos de una manera muy selectiva.



**Figura 18.** *Actividad control.* En **A** se muestra la actividad control promedio de las neuronas que se inhiben (rojo) y las que no se inhiben (negro) en respuesta a la estimulación de su campo receptivo periférico. En **B** se ilustran los CRP de las neuronas que se inhiben (rojo) y las que no se inhiben (negro), se puede observar que ambos tuvieron tamaños y localización similares y el grafico muestra la profundidad de registro de las neuronas que se inhiben y no se inhiben, podemos observar que se localizan en sitios similares. En **C** se muestran los gráficos de las respuestas de fibras A $\beta$ , A $\delta$ , C y postdescarga de las neuronas que se inhiben (rojo) y las que no se inhiben (negro). Se puede observar que la actividad en ambas poblaciones neuronales es similar

Por otro lado, tanto los potenciales de campo intraespinales, como los potenciales de raíz dorsal (DRPs), provocados por la estimulación cortical, son abolidos por la lesión electrolítica (100  $\mu$ A 10s) del tracto piramidal, (**figura 19**). Esto sugiere la participación de una vía directa que modula las respuestas de las neuronas que son activadas por la corteza (Cx-On) y las posibles responsables de producir PAD en aferentes amielínicas.



**Figura 19.** La lesión del tracto piramidal abole el DRP y el potencial de campo provocado por la corteza. **A**, diseño experimental. **B** en la parte superior se muestra un trazo representativo del DRP y en la parte inferior un potencial de campo cortical registrados en el segmento L4 de la médula espinal, producidos por la estimulación de la corteza sensorimotora, antes de la lesión del tracto piramidal. **C**, esquema y fotomicrografía de la lesión del tracto piramidal. **D**, trazo del DRP y el potencial de campo después de la lesión del tracto piramidal.

## 1.8. DISCUSIÓN

### *La corteza inhibe de forma presináptica las aferentes amielínicas*

En el presente capítulo estudiamos los mecanismos a través de los cuales se llevan a cabo los efectos inhibitorios mediados por la corteza sensorimotora sobre el flujo de información transmitido por fibras delgadas amielínicas. Para evaluar si la corteza ejerce sus efectos inhibitorios de forma presináptica o postsináptica se utilizó un test de pulsos pareados donde encontramos que la activación farmacológica de la corteza incrementa la PPP acompañada de una disminución en la amplitud de las respuestas provocadas por activación de fibras C, esto nos indica que el mecanismo inhibitorio es presináptico. En este mismo sentido, con el método descrito por Wall en 1958 encontramos que la corteza incrementa la excitabilidad de las fibras delgadas amielínicas. Además, mediante registros unitarios extracelulares analizamos el efecto de la estimulación cortical en neuronas del asta dorsal de la médula espinal encontramos que inhibe de forma significativa el 71.42% de las células registradas y cuando la estimulación cortical precede 25–150 ms a las respuestas neuronales de fibras C provocadas por la estimulación del RF, siguiendo un curso temporal de inhibición similar al reportado previamente para las respuestas C–EFP (Rojas-Piloni et al., 2010; Moreno-Lopez et al., 2013). Además, encontramos neuronas que responden a la estimulación cortical se localizan en las láminas II–VI y reciben información sensorial aferente no nociceptiva. Todos estos resultados sugieren que el mecanismo inhibitorio corticoespinal está mediado por interneuronas inhibitorias de forma presináptica. En un estudio previo se reportó que la aplicación tópica de bicuculina en la médula espinal bloquea los efectos inhibitorios producidos por la estimulación cortical (Perez-Sanchez,

2012), de acuerdo a esto nuestros resultados sugieren que estas interneuronas son GABAérgicas.

#### *Efectos de la activación cortical en la PPP de respuestas de fibras C*

Una forma de plasticidad a corto plazo, son la depresión y facilitación de pulsos pareados. Estas formas de plasticidad resultan de cambios en la probabilidad de liberar un neurotransmisor ( $\rho$ ). El que una sinapsis exhiba facilitación o depresión de pulsos pareados depende de su historia de activación. Sinapsis con alta  $\rho$  tienden a disminuir su respuesta al segundo pulso y sinapsis con una baja  $\rho$  tienden a aumentar la amplitud de su respuesta al segundo pulso; entonces las manipulaciones que disminuyen  $\rho$  causan un incremento en la PPP y por lo tanto inhibición presináptica (Zucker and Regehr, 2002; Citri and Malenka, 2008). En este trabajo analizamos la PPP durante la aplicación de BIC en la superficie cortical y observamos que el aumento de la actividad cortical está acompañado de un aumento en la PPP y una disminución en la amplitud de las R1 y R2, además la actividad espontánea de la médula espinal también aumento, lo que indica que la BIC en la corteza afecto la actividad de las neuronas corticoespinales. Estos resultados indican una menor liberación de neurotransmisor de las aferentes nociceptivas y por lo tanto un mecanismo inhibitorio presináptico de las respuestas nociceptivas en la médula espinal mediado por la activación cortical.

#### *Efectos de la estimulación de la corteza sensorimotora sobre la excitabilidad de las terminales de aferentes nociceptivas*

Un mecanismo bien estudiado de inhibición presináptica es la PAD (Rudomin, 1999; Rudomin and Schmidt, 1999; Rudomin, 2009). Una manera indirecta para medir la

PAD es mediante los cambios en la excitabilidad de las fibras aferentes primarias (Wall, 1958). En particular se ha descrito que la PAD en fibras nociceptivas tiene un curso temporal muy similar al de las aferentes mielínicas, que va de los 5–300 ms. Su amplitud máxima se localiza entre 30 y 120 ms (Hentall and Fields, 1979; Fitzgerald and Woolf, 1981). Estos resultados están de acuerdo a lo que nosotros encontramos. Dado que la excitabilidad de las fibras aumenta durante la PAD, el umbral de estas fibras disminuye y, por lo tanto, un mismo pulso de corriente puede reclutar más fibras. De esta manera, encontramos que la estimulación cortical produce un aumento significativo en la excitabilidad de las fibras C que sigue un curso temporal similar al de los DRP producidos por la estimulación cortical (Abdelmoumene et al., 1970). Nuestros resultados sugieren que la corteza produce PAD en aferentes amielínicas, inhibiendo así la propagación de potenciales de acción en las terminales de dichas fibras y por lo tanto disminuye la liberación de glutamato sobre neuronas de segundo orden del asta dorsal. Sin embargo, también observamos inhibición con intervalos cortos de alrededor de 25 ms, lo que nos sugiere que podría estar implicado adicionalmente un mecanismo postsináptico (Bardoni et al., 2013).

#### *Efectos de la estimulación cortical en neuronas del asta dorsal.*

La estimulación eléctrica de la corteza inhibe las respuestas provocadas por estimulación de fibras C en el asta dorsal (Rojas-Piloni et al., 2010). En registros extracelulares unitarios (Senapati et al., 2005b; Senapati et al., 2005a) reportaron que la estimulación de la corteza sensorial y motora inhibe de forma transitoria pero significativa las respuestas nociceptivas provocadas por estímulos mecánicos sin afectar las no nociceptivas. En este trabajo encontramos que la corteza inhibe las respuestas nociceptivas

en neuronas WDR cuando la corteza precede de 25 a 300 ms la respuesta de fibras C, estos resultados están de acuerdo a los descritos previamente (Rojas-Piloni et al., 2010; Moreno-Lopez et al., 2013). De esta forma, es posible proponer que esta inhibición este mediada a través de un mecanismo GABAérgico que actúa sobre las fibras aferentes primarias nociceptivas (Senapati et al., 2005b; Senapati et al., 2005a; Moreno-Lopez et al., 2013). Sin embargo, como se mencionó en el apartado anterior, no es posible descartar que la inhibición este mediada en parte por un mecanismo postsináptico.

#### *Control cortical presináptico de aferentes nociceptivas: Aspectos funcionales*

La vía cortico espinal participa en el control motor a través de conexiones con interneuronas espinales (localizadas en la sustancia gris intermedia) y con motoneuronas (Lemon and Griffiths, 2005). Sin embargo, esta vía también tiene proyecciones al asta dorsal, sitio en el que se recibe y procesa información sensorial (incluida la nociceptiva). En este sentido, trabajos clásicos han mostrado que la estimulación de la corteza sensoriomotora así como la estimulación del tracto piramidal (Rudomin et al 1986) en gatos y monos produce PAD en fibras aferentes musculares y cutáneas de bajo umbral (Andersen et al., 1964; Abdelmoumene et al., 1970), indicando que la corteza tiene control altamente selectivo (Eguibar et al., 1994; Eguibar et al 1997; Lomeli et al 1998) sobre la información aferente. Por otro lado, en el humano las entradas sensoriales se modulan durante la ejecución de movimientos voluntarios. (Hultborn et al., 1987a; Hultborn et al., 1987b). En monos, la inhibición presináptica reduce las entradas aferentes a la médula espinal del primate durante la ejecución de movimientos voluntarios con efectos potenciales en el control motor y la percepción sensorial. De forma que se ha sugerido que los sistemas descendentes, como el corticoespinal, reducen entradas periféricas específicas que pueden interferir con comandos ascendentes y con circuitos espinales durante movimientos voluntarios. Esto implica que la corteza cerebral puede reclutar circuitos neuronales intraespinales que seleccionan la información sensorial que es necesaria para la correcta ejecución de movimientos voluntarios (Seki et al., 2003).

En la presente tesis mostramos que la corteza produce PAD en aferentes amielínicas y además una inhibición rápida (5–150ms) de las respuestas neuronales de fibras amielínicas, estos datos apoyan la propuesta que más que producir analgesia duradera, que a nivel espinal la corteza modula la información sensorial (Perez-Sanchez, 2012) incluyendo la nociceptiva para ejecutar movimientos voluntarios de forma correcta.

## 1.9. CONCLUSIONES

- La aplicación de bicuculina en la corteza sensorimotora incrementa la PPP, acompañada de una disminución en la amplitud, en las respuestas de fibras C en la médula espinal.
- La estimulación eléctrica de la corteza sensorimotora aumenta la excitabilidad de las terminales de las aferentes primarias nociceptivas.
- La estimulación de la corteza sensorimotora inhibe las respuestas de fibras C en neuronas WDR del asta dorsal de la médula espinal.
- La lesión del tracto piramidal abole la PAD producida por estimulación cortical.

## **2. CAPITULO II**

### **Segregación funcional del tracto corticoespinal**

La corteza sensorimotora (SMC) tiene un papel fundamental en el aprendizaje y ejecución nuevos movimientos (Nudo and Frost, 2009). La SMC tiene acceso a información sensorial y de planeación de otras neocortezas, áreas que probablemente no están disponibles para otras estructuras subcorticales y la médula espinal. Además, la SMC recluta circuitos filogenéticamente antiguos como el núcleo rojo, la formación reticular y la médula espinal para ejecutar movimientos adecuadamente. La mayoría de las conexiones de neuronas corticoespinales con motoneuronas se establecen a través de neuronas premotoras (Lemon and Griffiths, 2005), sin embargo, las conexiones directas de neuronas corticoespinales con motoneuronas (cortico–motoneurona) son la base para la destreza manual así como subyacen el control fraccionado de los dedos (Isa et al., 2013).

Las conductas sensorimotoras son por definición procesos “closed-loops” en donde la retroalimentación sensorial modula la salida motora. Esta retroalimentación sensorial puede ser visual, auditiva, vestibular, por aferentes propioceptivas que informan la contracción muscular, etc. La integración sensorimotora es entonces un proceso dinámico donde el animal constantemente actualiza sus entradas sensoriales de acuerdo a su conducta (Wyart and Knafo, 2015). En este sentido, cualquier movimiento produce la activación de receptores periféricos (propioceptivos y cutáneos) generando actividad autoinducida que es transmitida al sistema nervioso central donde interactúa con otros comandos motores y otros procesos (Rudomin, 1999; Rudomin and Schmidt, 1999; Seki et al., 2003; Rudomin, 2009). Cuando entran a la médula espinal las fibras aferentes primarias pueden ser moduladas por PAD, dando lugar a inhibición presináptica de liberación de

neurotransmisor y así se modifican las entradas a neuronas de segundo orden (Hochman et al., 2010).

Ya se ha mencionado en capítulos previos que la PAD, y por lo tanto la inhibición presináptica de diferentes clases de aferentes cutáneas y propioceptivas, puede ser producida por estimulación de otras fibras sensoriales, pero también por estructuras supraespinales como la corteza sensorimotora (Carpenter et al., 1963; Andersen et al., 1964; Abdelmoumene et al., 1970; Aggelopoulos et al., 2008; Moreno-Lopez et al., 2013) y el tracto piramidal (Rudomin et al., 1986). La corteza ejerce este control cortical de las entradas sensoriales en la médula espinal de forma muy selectiva, ya que puede producir (Eguibar et al., 1994; Eguibar et al., 1997) o modular (Lomeli et al., 1998) la PAD de una colateral pero no en otras de una misma fibra aferente. Además, la inhibición presináptica es importante durante el movimiento voluntario (Hultborn et al., 1987a; Hultborn et al., 1987b) y un sistema descendente como el corticoespinal tiene un papel importante en producir inhibición presináptica en aferentes sensoriales comparadas con la inhibición que producen las aferentes primarias como resultado del movimiento. Los sistemas descendentes pueden reducir entradas periféricas e interferir con comandos ascendentes y con circuitos de la médula espinal durante el movimiento voluntario (Seki et al., 2003). Esto implica que la corteza cerebral recluta circuitos neuronales que seleccionan la información sensorial necesaria para la ejecución apropiada de los movimientos voluntarios.

## 2.1. *Diversidad funcional del tracto corticoespinal*

La corteza motora tiene un papel central en el aprendizaje y ejecución de habilidades motoras a través de conexiones directas e indirectas a la médula espinal (Lemon, 2008). Sin embargo, adicionalmente, las proyecciones directas corticoespinales participan en la modulación del flujo de información sensorial de distintas modalidades. A continuación se revisan las evidencias que muestran el papel de las proyecciones corticoespinales sobre la modulación sensorial, así como en el control motor.

En el humano las entradas sensoriales se modulan durante la ejecución de movimientos voluntarios. Es así que, en el comienzo de un movimiento voluntario hay una reducción de la inhibición presináptica de las aferentes Ia que inervan el músculo que se contrae y al mismo tiempo hay un incremento en la inhibición presináptica de las fibras Ia que inervan el músculo heterónimo que no se contrae (Hultborn et al., 1987a; Hultborn et al., 1987b). Seki y colaboradores también abordaron este problema registrando la actividad electrofisiológica de neuronas espinales en monos durante la ejecución de una tarea motora (Seki et al., 2003). Este grupo mostró que la inhibición presináptica reduce las entradas aferentes a la médula espinal del primate durante la ejecución de movimientos voluntarios con efectos potenciales en el control motor y la percepción sensorial. Ellos sugieren que existe un papel dominante del sistema corticoespinal para producir inhibición presináptica comparado con la PAD que producen la activación de fibras aferentes primarias como resultado del movimiento. Esto indica que los sistemas descendentes reducen entradas periféricas específicas que pueden interferir con comandos ascendentes y con circuitos espinales durante movimientos voluntarios. Esto implica que la corteza cerebral puede

reclutar circuitos neuronales intraespinales que seleccionan la información sensorial que es necesaria para la correcta ejecución de movimientos voluntarios.

Las interneuronas inhibitorias Ia y Ib reciben aferencias de estructuras supraespinales, entre ellas de la corteza cerebral, y es a través de estas conexiones con interneuronas espinales que el sistema corticoespinal puede modular reflejos básicos (Lundberg, 1979). Además, de modular los reflejos espinales, el sistema corticoespinal tiene influencia sobre circuitos espinales que constituyen el generador central de patrones (CPGs) para conductas motoras como caminar. En gatos las neuronas corticoespinales contactan con neuronas propioespinales cervicales (C3–C4) que participan en alcanzar objetos con guía visual (Alstermark et al., 1981).

#### 2.1.1. *Control motor*

Por otro lado, las conexiones con motoneuronas se han asociado particularmente con movimientos finos y movimientos independientes de los dedos, los cuales están más desarrollados de monos–simios–humanos. Basados en esta tendencia filogenética de monos-simios-humanos, se infiere que estas conexiones corticomotoneuronales son más importantes para la función normal en humanos que en monos (Schieber, 2007).

Particularmente en primates las conexiones cortico-motoneurona (CM) subyacen la destreza manual así como el potencial de controlar el movimiento fraccionado de los dedos. Además, estudios de lesiones del TCE en primates no humanos así como en pacientes humanos se ve afectada la destreza manual y el movimiento fraccionado de los dedos (Isa et al., 2013). En la rata sin embargo, parece que este no es el caso, a pesar de que los roedores realizan movimientos complejos con sus extremidades no se han descrito

conexiones cortico–motoneuronales (Yang and Lemon, 2003; Alstermark et al., 2004). Además, la lesión del TCE en C1–C2 no tiene efecto en conductas de alcance y agarre (Alstermark and Pettersson, 2014) y las lesiones de la corteza motora no tienen efectos discernibles en la ejecución de conductas motoras estereotipadas aprendidas, sin embargo, si la corteza se lesiona previamente al entrenamiento la rata no puede aprender la conducta motora estereotipada, estos resultados indican que la corteza motora es esencial para el aprendizaje de habilidades motoras (Kawai et al., 2015).

El control neuronal de la actividad motora es producto de señales de tres fuentes: centros supraespinales, redes intraespinales y aferentes sensoriales. En términos más generales, los centros supraespinales generan comandos motores y seleccionan la secuencias apropiadas para la actividad motora y las redes intraespinales traducen los comandos motores descendentes en actividad muscular. La información sensorial lleva señales relevantes sobre el mundo externo (exteroceptiva) y sobre información interna (interoceptiva) al SNC (Bui et al., 2015). Entonces, el movimiento es generado por la actividad de circuitos neuronales que colectan e integran información que da lugar a contracciones músculo–esqueléticas coordinadas.

### 2.1.2. *Control Pre–motoneuronal*

El TCE ejerce sus efectos a través de conexiones con interneuronas que se localizan en la sustancia gris intermedia de la médula espinal o bien a través de conexiones directas con motoneuronas (Lemon, 2008).

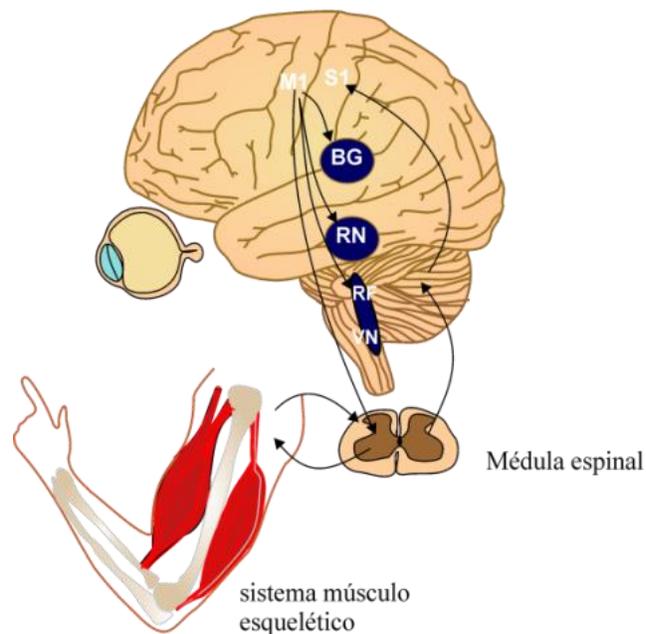
Las interneuronas espinales son capaces de producir muchos patrones motores básicos como los de la locomoción, rascado, etc., y evidencia reciente muestra que estos

patrones primitivos pueden ser ensamblados para dar lugar a acciones motoras más complejas. Estas interneuronas proveen una red que permite el control a nivel pre-motoneuronal sin participación de las motoneuronas. Esto significa que la información que es importante para las motoneuronas es susceptible de ser integrada y filtrada a nivel pre-motoneuronal. Aquí se incluye información que se origina en vías motoras ascendentes y descendentes, propioespinales, de interneuronas segmentales así como las entradas periféricas sensoriales (Lemon and Griffiths, 2005). Dentro de estas interneuronas están las interneuronas propioespinales (PNs), interneuronas GABAérgicas y neuronas dI3 (Catela et al., 2015).

### 2.1.3. *Conexiones Cortico-motoneuronas*

Múltiples vías descendentes como la rubroespinal, retículoespinal, vestibuloespinal y corticoespinales producen efectos monosinápticos en las motoneuronas (Lemon et al., 2004). Estas conexiones monosinápticas permiten una contribución directa para controlar las motoneuronas y por lo tanto tienen un impacto directo en las salidas motoras (Miri et al., 2013). Particularmente los efectos del sistema corticoespinal en las motoneuronas en el caso de músculos de los dedos y la mano se han mostrado en el macaco, que es posible evocar contracciones en el músculo relajado de la mano con estimulación en el tracto piramidal (Lemon et al., 2004). Se ha propuesto que estas conexiones directas subyacen al control de los dedos, sin embargo, también existen conexiones cortico-motoneurona en regiones que inervan los músculos de extremidades inferiores (Lemon and Griffiths, 2005; Lemon, 2008). Kuypers en 1978 propuso que las conexiones cortico-motoneurona daban lugar a la capacidad para tener movimientos fraccionados y el control de grupos musculares pequeños de forma muy selectiva (Kuypers, 1978).

La idea de que los contactos corticoespinales directos sobre las motoneuronas determinan la activación muscular ha sido difícil de validar o refutar (Miri et al., 2013). Un problema para tratar de entender la función de las neuronas corticoespinales analizando la actividad de la corteza motora es que no se sabe bien cuál es el rol de los circuitos espinales modulados por las neuronas corticoespinales. Las interneuronas espinales indudablemente intervienen entre las neuronas corticoespinales y las motoneuronas. En ese sentido el patrón de disparo de las neuronas corticoespinales y su influencia en el movimiento depende de la naturaleza y organización de los circuitos espinales y la forma en que las neuronas corticoespinales los modulan. Entonces toda caracterización de la función de las neuronas corticoespinales necesita tomar en cuenta esta dependencia (Miri et al., 2013) **figura 20**.



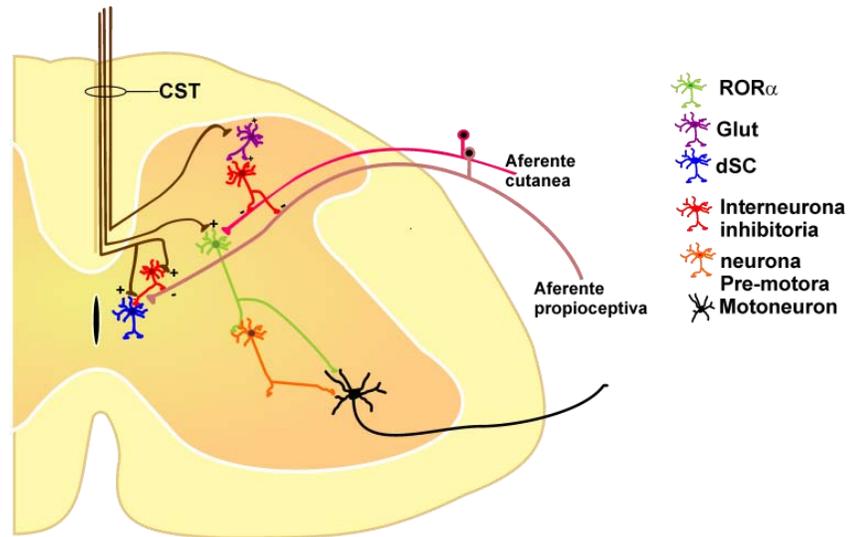
**Figura 20.** *Control motor.* En el esquema se pueden observar los diferentes subsistemas que participan en el control motor: la corteza cerebral, el tallo cerebral, la médula espinal y los músculos. BG: ganglios basales, RN: núcleo rojo, RF: formación reticular y VN: núcleo vestibular Modificado de (Scott, 2004)

## 2.2. *Interneuronas espinales moduladas por la corteza sensorimotora*

En la mayoría de los primates, las motoneuronas son contactadas directamente por las neuronas corticoespinales. Estas conexiones son importantes para manipular objetos pequeños y el movimiento fraccionado de los dedos. Sin embargo, las interneuronas segmentales que son blanco del TCE han sido pobremente estudiadas y caracterizadas. Entre ellas se encuentran las interneuronas premotoras que se han reportado tanto en el mono (Lemon, 2008) como en el ratón (Alstermark et al., 2004). Asimismo, el TCE directamente modula interneuronas segmentales que participan regulando la retroalimentación sensorial (Carpenter et al., 1963). Entre ellas se encuentran el grupo de neuronas que originan el tracto espinocerebeloso dorsal (dSC), que reciben entradas propioceptivas de fibras aferentes del grupo Ia y del TCE. Las neuronas dSC pueden ser inhibidas por entradas GABAérgicas y glicinérgicas que son activadas por el TCE, lo que significa que el TCE ejerce un control presináptico inhibitorio a través de un sistema complejo de interneuronas que median la transmisión de las terminales de las fibras aferentes primarias que contactan con neuronas que forman el tracto espinocerebelar (Hantman and Jessell, 2010).

Recientemente se demostró que las interneuronas que expresan el receptor nuclear orfano ( $ROR\alpha$ ) están inervadas por neuronas de proyección del núcleo vestibular lateral y por el TCE y además tienen entradas sensoriales de mecanorreceptores cutáneos de bajo umbral, participan en la percepción de tacto ligero así como en movimientos correctivos de los pies para un control motor fino (Bourane et al., 2015). Lo anterior refuerza que el TCE tiene un papel importante en la modulación de la información sensorial necesaria para la propia ejecución de movimientos volitivos.

Estas evidencias sugieren que la corteza tiene diversos blancos en la médula espinal y a través del TCE modula diferentes clases de neuronas espinales excitatorias e inhibitorias y forma distintos circuitos neuronales que juntos participan en la integración sensorimotora **figura 21**.



**Figura 21.** *Neuronas segmentales que modula en TCE.* Algunas neuronas identificadas son las ROR $\alpha$  (Bourane et al., 2015), dSC (Hantman & Jessell 2010), y las que producen PAD- (Rudomin 1999), todas participan en integrar la información sensorimotora. Ver el texto para detalles. (Moreno-López et al 2016).

### 2.3. *Segregación anatómica y funcional del tracto corticoespinal*

Una neurona corticoespinal puede ser estimulada antidrómicamente en diferentes segmentos espinales, lo que sugiere que tiene colaterales a diferentes niveles (Shinoda et al 1986). La inyección masiva de un trazador anterógrado en la corteza sensorimotora de la rata demostró que las proyecciones corticoespinales se distribuyen no sólo en el asta ventral, sino también en la sustancia gris intermedia y el asta dorsal (Casale et al., 1988). En la rata, el 25% de las neuronas corticoespinales que proyectan al segmento cervical C4 también proyectan a C8 (Biane et al., 2015). Un patrón similar se observa en el ratón donde

la inyección de un trazador anterógrado en M1 produce marcaje de fibras corticoespinales de C1–C8 (en el asta dorsal y sustancia gris intermedia) (Suter and Shepherd, 2015). Esta colateralización incluso pueden ocurrir en sitios distales, se han descrito neuronas corticoespinales que proyectan a C7 y L4 (Kamiyama et al., 2015). Resultados recientes de nuestro laboratorio muestran que las neuronas que proyectan al asta dorsal y ventral constituyen poblaciones independientes en los segmentos cervical y lumbar (Olivares-Moreno R. et al., 2016). Estos datos muestran que una neurona corticoespinal puede tener múltiples blancos en la médula espinal: diferentes láminas (dorsal/ventral) y diferentes segmentos (cervical/lumbar). Esto podría tener consecuencias importantes para la integración sensorimotora a nivel espinal y queda por dilucidar la relevancia funcional de estas proyecciones y los circuitos que modula en la médula espinal.

## **2.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Dados los distintos orígenes que tienen las neuronas corticoespinales en la corteza cerebral, así como la distribución tan diversa de sus terminaciones en distintas zonas de la médula espinal, ha sido propuesto que el TCE es multifuncional. Esto sugiere que distintos circuitos segmentales estarían siendo modulados de manera diferencial por el sistema corticoespinal. Es así que en este capítulo, se describen dos grupos de interneuronas espinales que son blancos de las proyecciones corticoespinales. Ambos grupos de interneuronas son activadas con distintas latencias y se encuentran localizadas en diferentes láminas de un mismo segmento. De esta manera, damos la primera evidencia que sugiere que el TCE se encuentra formado sub-sistemas funcional y anatómicamente segregados.

## **2.5. HIPÓTESIS**

El sistema corticoespinal proyecta de forma segregada modulando de manera diferencial distintas poblaciones de interneuronas espinales.

## **2.6. OBJETIVOS GENERALES**

- Caracterizar las neuronas de la médula espinal que son moduladas por la activación de la corteza sensorimotora.

### **2.6.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Describir la distribución de las neuronas que la corteza sensorimotora activa en la sustancia gris de la médula espinal cervical y lumbar.

- Analizar el efecto de la estimulación cortical en neuronas del asta dorsal de la médula espinal por medio del registro electrofisiológico extracelular.
- Evaluar si los efectos producidos por la estimulación de la corteza sensorimotora son debidos a proyecciones directas corticoespinales.
- Analizar la velocidad de conducción de las neuronas corticoespinales que proyectan a los segmentos lumbares.
- Mapear los sitios corticales que provocan la activación de distintas interneuronas espinales.

## 2.7. MATERIAL Y MÉTODOS

### *Registros electrofisiológicos*

Se utilizaron ratas macho wistar (260-290) que fueron anestesiadas con uretano (1.4g/kg i.p.) fueron paralizadas con pancuronio (0.5mg/kg i.v.) y ventiladas artificialmente. Se monitoreo y ajusto el CO<sub>2</sub> para tener una concentración final de 2-4%. La temperatura se mantuvo en 37 °C mediante un cojín caliente. Las ratas fueron fijadas en un aparato estereotáxico. Se realizó una laminectomía para exponer los segmentos L3-L5 o C3-C6 y la superficie de la médula espinal fue irrigada con solución salina.

### *Registros del potencial de campo intraespinales*

Se registró el potencial de campo intraespinal provocado por estimulación cortical (EFPs– Cx), utilizando micropipetas de borosilicato llenas con NaCl 1.2M (diámetro de la punta, 1–0–2.5 µm; 1.2-2 MΩ). Durante el experimento todos los registros fueron digitalizados y almacenados para su posterior procesamiento. Los EFPs fueron registrados en diferentes profundidades (intervalos de 100 µm) de 0 a 2000 µm en 4 trayectos paralelos separados por 500 µm. En cada profundidad se promediaron los EFPs (n = 16) producidos por la estimulación de la corteza sensorimotora contralateral.

La estimulación cortical consistió en trenes de 5 pulsos (duración del pulso 0.1 ms, 1000 Hz, 100 – 300 µA) con un electrodo bipolar concéntrico de acero inoxidable (1 MΩ de resistencia) que se localizó a una profundidad de 1000 µm a partir de la superficie cortical. El electrodo de estimulación se localizó en el centro de la corteza sensorimotora, donde se localizan las neuronas corticoespinales que proyectan a la región lumbar (3 mm de

la línea media y  $\pm 2.5$  mm posterior a Bregma) o cervical (5mm de la línea media y -1 mm posterior a Bregma).

En cada sitio de registro se analizó la amplitud del EFPs–Cx promedio (n=16), con una latencia fija a partir del último estímulo cortical. Se realizaron gráficos de contorno isopotenciales de las amplitudes para cada localización utilizando la profundidad y la lateral de cada registro. Finalmente los contornos isopotenciales de los EFPs–Cx fueron superpuestos en un plano métrico de la médula espinal.

#### *Efectos de la estimulación cortical en neuronas del asta dorsal*

Se realizaron registros extracelulares en neuronas del asta dorsal de los segmentos L3–L5 de la médula espinal (sitio donde se recibe la información aferente correspondiente a las extremidades inferiores). Para ello, se utilizaron electrodos de vidrio llenos con solución extracelular (mM): 135 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, y 5 Hepes, pH 7.2 con resistencia de 7–10 M $\Omega$ . De cada célula se determinó su respuesta mediante la estimulación eléctrica de su campo receptivo (RF). La estimulación eléctrica al RF se aplicó con dos electrodos de metal colocados subdérmicamente en el centro del RF y consistió en pulsos de 1 ms de duración, 0.5 Hz. De cada célula se determinaron los componentes de su respuesta de acuerdo a sus latencias A $\beta$  (0-20 ms), A $\delta$  (20-90), C (90-300) (Harper and Lawson, 1985). Una vez caracterizada la respuesta de la célula se analizó el efecto de la estimulación cortical.

### *Registros unitarios de neuronas corticoespinales*

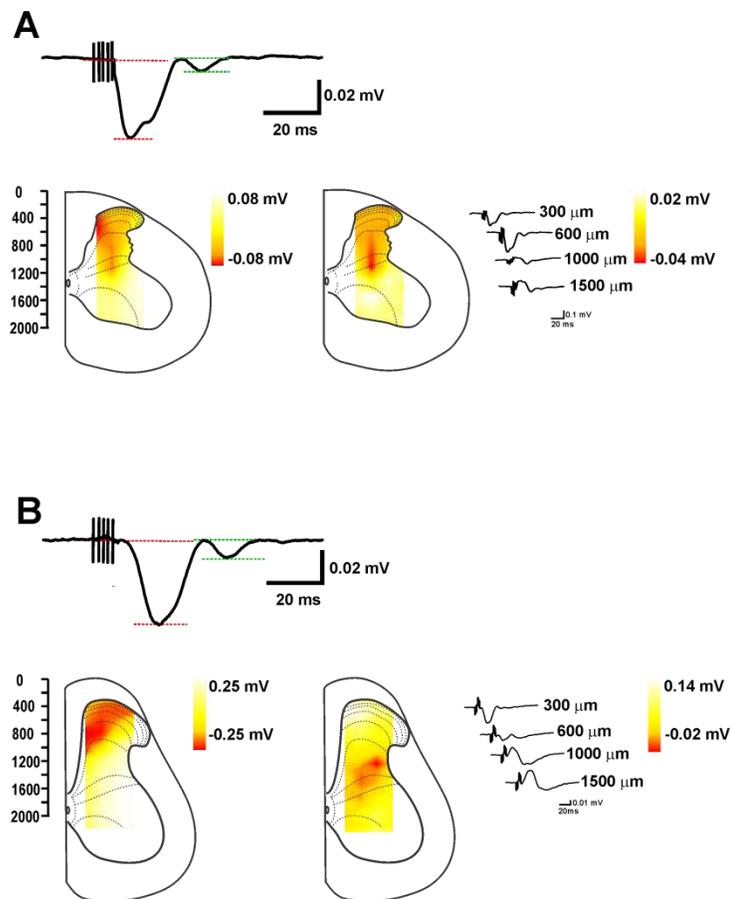
Se realizaron registros extracelulares unitarios de neuronas corticoespinales que proyectan al segmento lumbar. Para identificar las neuronas corticoespinales, se utilizaron dos electrodos bipolares concéntricos (0.2 mm de separación entre las puntas) se localizaron en el TCE contralateral (funículo dorsal a nivel L4). Se utilizaron los potenciales de acción espontáneos para desencadenar la estimulación eléctrica antidrómica a las fibras corticoespinales con intervalos variables. La variación del intervalo en la estimulación de TCE nos permitió medir el tiempo de colisión entre los potenciales de acción espontáneos y los evocados así describir sus características antidromicas. Las respuestas antidrómicas evocadas por estimulación del TCE contralateral fueron probadas con pulsos cuadrados unitarios 0.1 ms con intensidades iniciales de 100  $\mu$ A incrementándolas hasta encontrar el umbral de cada célula sin exceder los 300  $\mu$ A. Cuando se obtuvo un registro estable de una célula, se siguieron los siguientes criterios para determinar su respuesta antidrómica: latencia constante, respuesta a un tren de estímulos de 333 Hz y colisión de espigas ortodrómicas con espigas antidrómicas provocadas. De esta manera, en la prueba de colisión un potencial de acción espontáneo de una neurona corticoespinal desencadenó un estímulo al TCE que provoco un potencial de acción antidrómico. Así, calculamos el tiempo máximo de colisión, considerando la latencia antidrómica más el periodo refractario.

## 2.8. RESULTADOS

### *Distribución de neuronas moduladas por la corteza en la médula espinal*

Para analizar la distribución de las neuronas espinales que responden a la estimulación cortical analizamos el EFP-Cx. La estimulación cortical se realizó en el sitio donde la amplitud del potencial de campo intraespinal provocado por la estimulación cortical fue mayor. Asimismo, la intensidad de estimulación se ajustó para tener una respuesta del 50% de su amplitud máxima. En los engrosamientos cervical y lumbar, el EFP-Cx tuvo dos componentes con diferentes latencias calculadas a partir del estímulo cortical. Para el segmento cervical la respuesta de corta latencia tuvo una máxima negatividad en  $6.2 \pm 0.2$  ms y la respuesta de latencia larga tuvo su máxima negatividad en  $34.2 \pm 0.5$  ms (n=6) **figura 22 A**. Para el EFP-Cx registrado en el segmento lumbar L4 la respuesta de latencia corta fue de  $18.7 \pm 0.2$  y la de larga latencia fue de  $44.1 \pm 1.1$  ms (n=7) **figura 22 B**. La distribución de los dos componentes lumbar y cervical tuvo dos focos donde se localizó la máxima negatividad de ambas respuestas (corta y larga).

Respecto a su distribución intraespinal, el EFP-Cx de corta latencia registrado en los segmentos lumbares (L4) tuvo una amplitud negativa máxima en las láminas superficiales I-V, (100-400 mm de profundidad) mientras que el EFP-Cx de larga latencia tuvo su amplitud máxima localizada las láminas VI-VII (1000  $\mu$ m de profundidad) (n=6). De la misma forma, el EFP-Cx de corta latencia registrado en los segmentos cervicales (C4) tuvo una amplitud negativa en las láminas superficiales I-V, (100-500 mm de profundidad) y el EFP-Cx de larga latencia tuvo su amplitud máxima localizada en las láminas V-VI (800  $\mu$ m de profundidad) (n=6) **figura 22**.

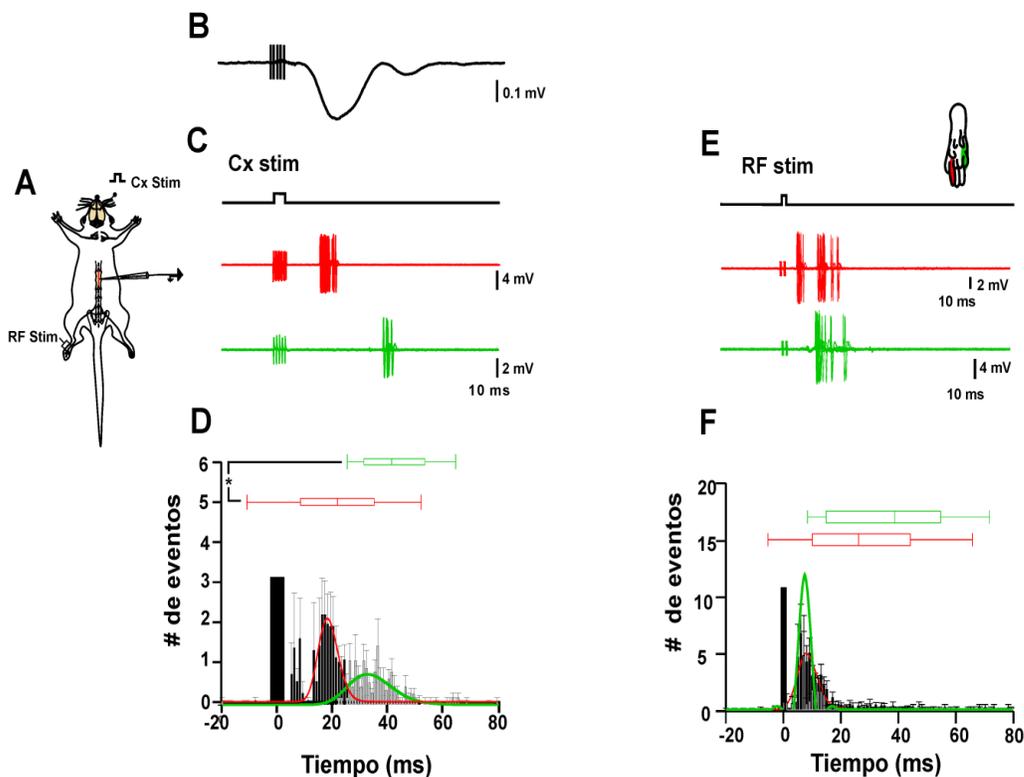


**Figura 22.** *Distribución de las neuronas Cx–On.* Potencial de campo provocado por la estimulación cortical y distribución de las neuronas CX-ON. **A**, registro del EFP-Cx, registrado en el segmento C4 de la médula espinal, las líneas punteadas representan la magnitud de los componentes de corta (rojo) y larga (verde) latencia en la parte inferior se muestra el mapa isopotencial de las amplitudes EFP-Cx de corta (izquierda) y larga (derecha) latencia, registrados de la superficie de la médula espinal desde la superficie hasta 2000 $\mu$ m, en pasos de 100  $\mu$ m en cada trayecto (n=6). Se muestran ejemplos de los EFP-Cx registrados en diferentes profundidades. **B**, lo mismo que en **A** pero para los EFP-Cx registrados en L4.

### *Neuronas que modula la corteza sensorimotora*

Para caracterizar las interneuronas segmentales que son moduladas por la proyección corticoespinal, se realizaron registros unitarios en los segmentos lumbares (L3–L4). Registramos 28 neuronas que responden a la estimulación cortical (Cx–On). De acuerdo a su latencia de activación calculada como el tiempo entre el estímulo cortical y el primer potencial de acción, pudimos distinguir dos clases de neuronas: con corta latencia (latencia promedio  $19.9 \pm 1.1$ ms; n=17) y con latencia larga (latencia promedio  $36.2 \pm 2.2$ ;

n=11) **figura 23 C, D**. Las respuestas fueron estadísticamente diferentes ( $p=0.0001$ , U de Man–Whitney). No encontramos diferencias en la profundidad de registro de ambos tipos de neuronas espinales (corta latencia:  $288.9 \pm 42.6 \mu\text{m}$ ; larga latencia  $232.3 \pm 31.7 \mu\text{m}$ ;  $p = 0.58$ , U de Man–Whitney). Tampoco se encontraron diferencias en el número promedio de potenciales de acción provocados por la estimulación periférica. Finalmente pocas neuronas tuvieron actividad espontánea y no encontramos diferencias en la frecuencia de disparo de cada tipo de neurona (corta latencia 5 de 17, larga latencia 3 de 11).

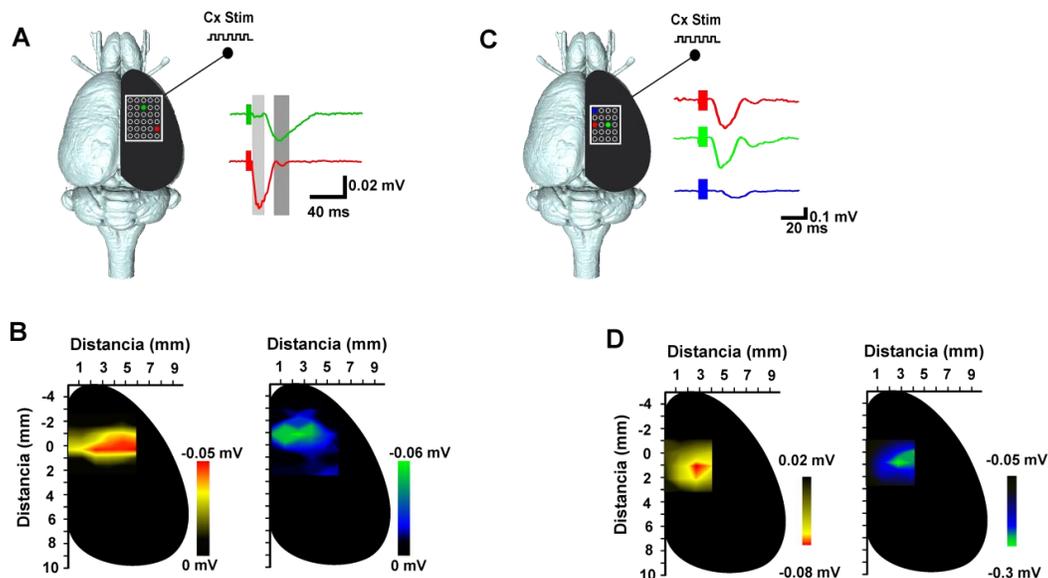


**Figura 23.** *Diferentes neuronas espinales son moduladas por el tracto corticoespinal.* A Diseño experimental. B EFP–Cx provocado por estimulación de la corteza sensorimotora contralateral donde se muestran los dos componentes (corta y larga latencia) C, ejemplo de un registro extracelular unitario de las respuestas de dos neuronas espinales producidos por la estimulación de la corteza sensorimotora. El trazo superior muestra una latencia corta de sus potenciales de acción que puede estar asociada con el primer componente del EFP–Cx, mientras que el trazo inferior muestra una respuesta de larga latencia que puede estar asociada con el componente de larga latencia. D, histograma peri estímulo calculado de 27 neuronas Cx–On registradas. Las barras negras muestran las neuronas con corta latencia y las barras grises las de larga latencia. Se realizó un ajuste normal –log y los gráficos de caja muestran la distribución de las respuestas neuronales provocadas para las de corta latencia (rojo) y larga latencia (verde) (\* $p < 0.001$ , MannWhitney U).

E, ejemplo de una respuesta evocada por estimulación eléctrica del campo receptivo (RF) representado en el esquema de la pata, de la misma neurona registrada en B. F, histograma peri estímulo de los potenciales de acción de las respuestas provocadas por la estimulación del RF en las mismas neuronas que se activan con la estimulación cortical.

### *Origen cortical de las diferentes latencias de los EFPs–Cx espinales*

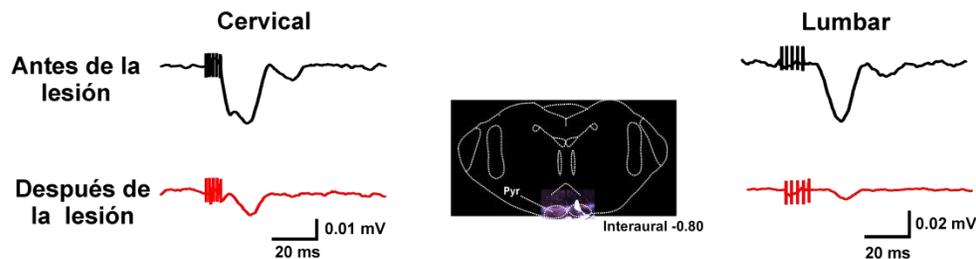
Analizamos el perfil espacial del EFPs–Cx de corta y larga latencia producido por diferentes áreas corticales. La amplitud de los componentes larga latencia del EFPs–Cx es mayor cuando la estimulación se produce en regiones más anteriores de la corteza sensorimotora, correspondientes a la corteza motora primaria (M1). La respuesta de corta latencia del EFPs–Cx es mayor cuando se estimulan regiones posteriores de la corteza sensorimotora correspondientes a la corteza somatosensorial primaria (S1)(Olivares-Moreno R. et al., 2016) ver **figura 24**.



**Figura 24.** *Los componentes de larga y corta latencia tienen diferente origen cortical. A* representación esquemática de los diferentes sitios de estimulación en la corteza sensorimotora donde se localizan las neuronas que proyectan a C4 superpuestos en un atlas de rata de resonancia magnética (Papp et al., 2014). Los EFPs intraespinales registrados en C4 para un experimento producido por la estimulación de diferentes zonas de la corteza contralateral anterior (rojo) y posterior (verde), muestra los componentes tardíos y lentos de los componentes indicados con las

áreas en gris. **B** mapa isotopotencial promedio (n=3) calculado de la amplitud de las respuestas de corta (rojo) y lenta (verde) latencia, de los EFP-Cx intraespinales provocado por estimular diferentes zonas de la corteza sensorimotora. Podemos observar que el componente de corta latencia se localiza en zonas posteriores y el de larga latencia en zonas anteriores. **C**, lo mismo que en A pero correspondiente a L4. **D** Podemos observar que ambos componentes se localizan en sitios similares.

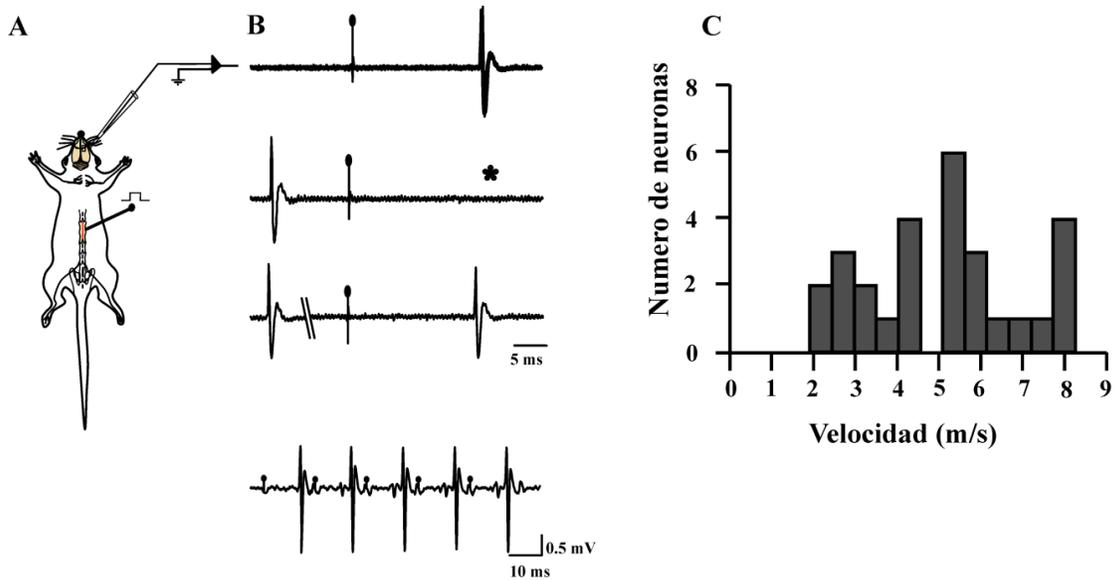
Adicionalmente investigamos si la proyección corticoespinal produce ambos componentes del EFP-Cx. Ambos componentes se reducen de forma significativa después de la lesión electrolítica del tracto piramidal (el de larga latencia  $75.46 \pm 9.72$  % con respecto al control,  $p=0.0002$ ; el de corta latencia  $57.6 \pm 7.51$  % con respecto al control,  $p=0.0004$ , Man-Whitney U) (**figura 25**). Esto indica que el tracto corticoespinal modula diferentes interneuronas en la médula espinal.



**Figura 25.** Los EFP-Cx son abolidos después de la lesión del tracto piramidal. EFP-Cx registrados a nivel cervical (C4) y lumbar (L4) antes (trazos en negro) y después (trazos en rojo) de la lesión electrolítica en el tracto piramidal a nivel de la decusación piramidal en el bulbo raquídeo. El esquema muestra la lesión producida en el tracto piramidal. Se puede observar que ambos componentes de las respuestas se abolen después de la estimulación del tracto piramidal.

Para investigar con mayor detalle el origen de los componentes de corta y larga latencia de los EFPs-Cx, analizamos la velocidad de conducción de neuronas corticoespinales. Registramos respuestas unitarias antidrómicas provocadas por

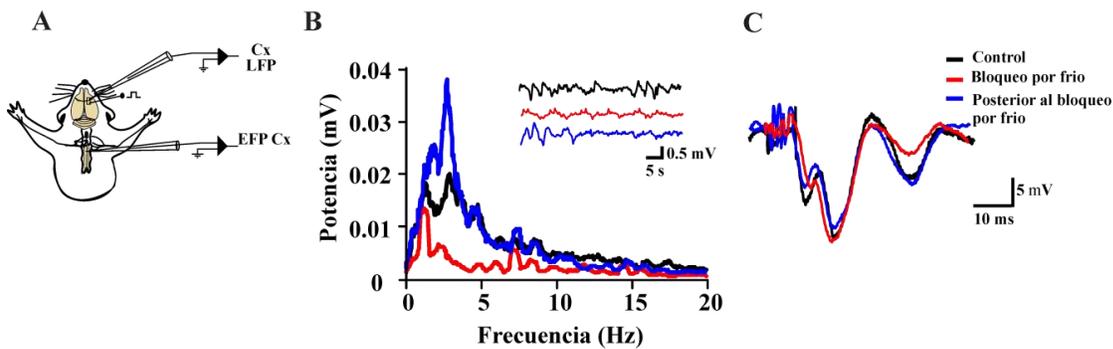
estimulación de la médula espinal lumbar y medimos la velocidad de conducción. Registramos 30 neuronas corticoespinales y la velocidad de conducción medida se distribuyó en el rango de 2 a 8 m/s (media  $4.8 \pm 0.3$ ) (**figura 26**).



**Figura 26.** *Velocidad de conducción de las neuronas corticoespinales.* **A** diseño experimental. **B**, respuestas representativas evocadas por la estimulación del funículo contralateral a nivel lumbar L4. De forma secuencial. El primer trazo muestra 5 registros superpuestos del registro de una neurona corticoespinal en la cual se evocan potenciales de acción con una latencia fija (19ms) después del artefacto de estimulación (representado con la línea vertical y el círculo). El segundo trazo muestra la prueba de colisión donde el potencial de acción ortodrómico es precedido por el potencial de acción antidrómico en el periodo crítico. El asterisco indica el tiempo en que debía ocurrir el potencial de acción. El tercer trazo muestra lo que ocurre cuando el potencial de acción ortodrómico ocurre fuera del periodo crítico, la colisión de la respuesta antidrómica no ocurre. **C** el histograma de la distribución de las velocidades de conducción medidas de todas las neuronas corticoespinales registradas (n=30).

La velocidad de conducción calculada a partir de las latencias de los EFPs está en ese mismo rango (cervical larga latencia  $6.5 \pm 0.2$  m/s; cervical corta latencia:  $1.2 \pm 0.01$  m/s; n= 6; lumbar larga latencia:  $5.1 \pm 0.06$  m/s; lumbar corta latencia:  $2.2 \pm 0.06$  m/s; n=7). Este resultado indica que las respuestas de corta y larga latencia registradas en la médula espinal pueden ser provocadas por la activación de neuronas corticoespinales con diferente velocidad de conducción sin embargo, la distribución de las velocidades de conducción no mostró un perfil bimodal **figura 26 C**.

Otra posibilidad es que las neuronas de larga latencia sean producidas secundariamente por interacción con otros circuitos corticocorticales o incluso subcorticales. Para investigar eso realizamos un bloqueo cortical por frío, utilizando líquido cerebrospinal congelado sobre la superficie cortical. De esta manera, registramos la actividad de campo espontánea cortical con un electrodo localizado en 1000  $\mu\text{m}$  de profundidad antes, durante y después del bloqueo por frío. Este procedimiento redujo la temperatura cortical a 24°C durante 3 minutos, tiempo durante el cual la magnitud de la potencia media de la señal entre 1 y 20 Hz disminuyó 43.3  $\pm$  3.2 % con respecto al control. De la misma forma la amplitud del componente de larga latencia del EFP-Cx disminuyó significativamente 89.5%  $\pm$  24.13 % ( $p= 0.0044$  Kruskal-Wallis;  $n=5$ ) con respecto al control. Estos resultados sugieren que las neuronas corticoespinales que producen la respuestas neuronales intraespinales de larga latencia podían generarse secundariamente por interacciones intracorticales (**figura 27**).



**Figura 27.** El bloqueo por frío cortical suprime las respuestas de larga latencia del EFP-Cx. **A.** Diseño experimental. La actividad espontánea cortical fue registrada a una profundidad de 1000  $\mu\text{m}$  (3mm rostral a bregma y a 5mm de la línea media) el sitio de estimulación se localizó (1000  $\mu\text{m}$  de profundidad, 1mm caudal a bregma y 5 mm de la línea media). De forma simultánea, el EFP-Cx fue registrado. **B,** el espectro de potencia de la actividad espontánea cortical se registró por 30 s en condiciones control (negro), durante el bloqueo cortical (rojo) y durante la recuperación (azul). El inserto muestra los ejemplos de la actividad espontánea cortical. **C,** EFP-Cx registrados en la médula cervical (C4) antes (trazo negro), durante (trazo rojo) y después (Trazo azul) del bloqueo por frío. Podemos observar que disminuye el componente de larga latencia durante el bloqueo por frío.

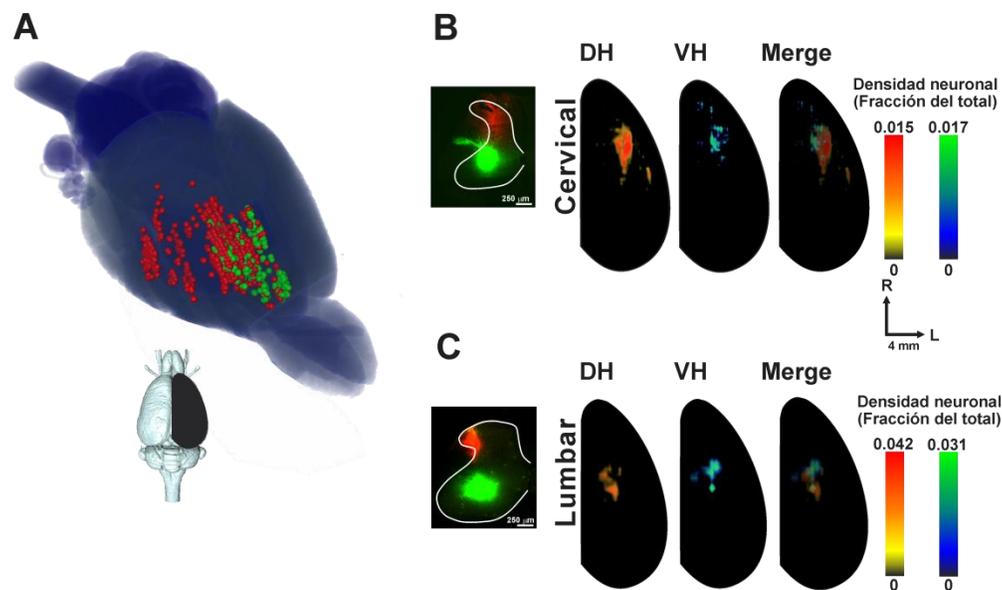
## 2.9. DISCUSIÓN

### *Respuestas rápidas y lentas provocadas por el tracto corticoespinal*

Nuestros resultados sugieren que diferentes grupos de neuronas corticoespinales activan con distintas latencias a poblaciones diversas de neuronas segmentales, indicando que el TCE está compuesto por subsistemas que controlan diferentes circuitos espinales que modulan las salidas motoras y las entradas sensoriales de forma coordinada.

Las diferencias en las latencias de las neuronas Cx-On pueden ser explicadas por diferencias en la velocidad de conducción de las neuronas corticoespinales. La velocidad de conducción basada solo en el latencia entre la estimulación cortical y el pico máximo del EFP-Cx y asumiendo una conexión directa, la velocidad de conducción calculada indica que las neuronas que proyectan al nivel al asta dorsal cervical es de  $1.2 \pm 0.01$  m/s y a la lumbar es de  $2.2 \pm 0.06$  m/s (promedio 1.7 m/s), mientras que las neuronas que proyectan a las láminas profundas cervical es de  $6.5 \pm 0.2$  m/s y lumbar es de  $5.1 \pm 0.06$  m/s (promedio 5.8 m/s). Es importante mencionar que nuestros resultados sugieren que estas respuestas tienen distintos orígenes (**figura 23**) nosotros encontramos que la estimulación de regiones más anteriores de la corteza sensorimotora, correspondientes a la corteza motora primaria (M1) producen mayor amplitud de los componentes larga latencia del EFPs-Cx. Y cuando se estimulan regiones posteriores de la corteza sensorimotora correspondientes a la corteza somatosensorial primaria (S1) la respuesta de corta latencia del EFPs-Cx tiene mayor amplitud **figura 23**. Estos resultados están de acuerdo con la descripción anatómica de las proyecciones corticoespinales a los segmentos C4 y L4 de la medula espinal, donde se ha encontrado que las neuronas de M1 proyectan principalmente a la sustancia gris intermedia

y las neuronas de S1 proyectan al asta dorsal (Olivares-Moreno R. et al., 2016). Todo lo anterior sugiere que las neuronas de M1 controlan neuronas espinales que se localizan en la sustancia gris intermedia que posiblemente participen regulando los comandos motores y las neuronas de S1 controlen las señales sensoriales a través de modular neuronas del asta dorsal, **figura 28**



**Figura 28.** Mapas de distribución de las neuronas corticoespinales que proyectan al asta dorsal y a la sustancia gris intermedia. **A**, representación 3D de las neuronas corticoespinales que proyectan a la medula cervical contralateral en un experimento (el sitio de inyección de este experimento se muestra en la figura). Las imágenes histológicas que contenían a las neuronas corticoespinales fueron alineadas a un atlas de resonancia magnética de cerebro de rata (Papp et al., 2014) para representar la densidad de neuronas. **B**, densidad relativa promedio (n=3 animales) en el plano horizontal, se muestran las neuronas corticoespinales que proyectan al nivel cervical C4 al asta dorsal (DH- rojo) y a la sustancia gris intermedia (IZ-verde). La densidad neuronas esta expresada como fracción del total del número de neuronas marcadas retrógradamente. El mapa (derecha) muestra tres grupos de neuronas: un grupo en M2 con neuronas que proyectan principalmente a la sustancia gris intermedia; un grupo en M1-S1 donde se localizan neuronas entremezcladas; un grupo en S2 donde solo se localizan neuronas que proyectan al asta dorsal. **C**, lo mismo que en B

pero para neuronas corticoespinales que proyectan al segmento lumbar L4 (Modificado de Olivares-Moreno et al 2016).

Adicionalmente, la velocidad de conducción medida de las neuronas corticoespinales vario entre 2 y 8 m/s (**figura 26**). Estos datos están de acuerdo con las velocidades de conducción en la rata reportados previamente. Las fibras registradas con velocidad de conducción más rápida en la rata conducen a  $\sim 20$  m/s (promedio 9-13 m/s) (Mediratta and Nicoll, 1983; Stewart et al., 1990; Babalian et al., 1993; Baker et al., 2001). Sin embargo, basados en el diámetro de las fibras de las neuronas piramidales de las ratas (0.5 – 1  $\mu\text{m}$ ) (Mediratta and Nicoll, 1983; Stewart et al., 1990; Babalian et al., 1993; Baker et al., 2001), las velocidades de conducción se estimaron entre 2.4 y 6 m/s, (Towe and Harding, 1970) que corresponde con lo reportado en esta tesis. Además, han sido reportado dos clases de axones corticoespinales: mielinizados y no mielinizados (Joosten and Gribnau, 1988), lo que soporta la idea de que distintas poblaciones de neuronas corticoespinales ejercen un control diferencial a nivel segmental.

Alternativamente, las diferencias entre los componentes de corta latencia y larga latencia del EFP-Cx pueden ser debidas a interacciones intracorticales entre áreas que proyectan a la médula espinal (Suter and Shepherd, 2015). El hecho de que el bloqueo por frio en la corteza suprime selectivamente la respuesta lenta (**figura 27**) indica que la estimulación cortical activa otras zonas que a su vez proyectan a la médula espinal a través del TCE. En cualquier caso las diferencias en las latencias de las respuestas de la médula espinal mediadas por el TCE podrían ser importantes durante el movimiento voluntario. En este caso las neuronas corticoespinales y otras vías descendentes que inhiben la retroalimentación sensorial (ruido sensorial), provocarían un incremento de la relación señal-ruido en las motoneuronas y así aumentaría la eficacia de los comandos motores

(Seki et al., 2003). Finalmente queda por dilucidar si las diferencias en las latencias de activación sea debida a interacciones intraespinales y la importancia que esta activación diferencial tiene para el movimiento voluntario.

#### *Interneuronas que modula el TCE*

Nuestros resultados sugieren que la corteza tiene diversas salidas vía el TCE a través de las cuales se modula de forma segregada diferentes clases de interneuronas de la médula espinal que participan en la integración sensorimotora.

Las conexiones cortico–motoneurona observadas en primates son importantes para el movimiento fraccionado de los dedos que permite tener movimientos que permiten manipular objetos y muy precisos. Sin embargo, también se han descrito conexiones a las motoneuronas indirectas, a través de interneuronas premotoras en primates (Lemon, 2008) y en el ratón (Alstermark et al., 2004).

Por otro lado, el TCE directamente modula interneuronas segmentales que participan en producir PAD y por lo tanto en regular la retroalimentación sensorial (Carpenter et al., 1963) o bien, en la médula espinal la información sensorial se modula además por una compleja red de interneuronas excitatorias e inhibitorias que regulan la excitabilidad de las neuronas del asta dorsal. Se ha propuesto que la PAD esta mediada por interneuronas GABAérgicas que actúan sobre receptores GABA<sub>A</sub> localizados en las fibras aferentes primarias (Rudomin and Schmidt, 1999). Recientemente se reportaron DRP mediados por GABA en fibras aferentes nociceptivas en el ratón (Witschi et al., 2011), lo que permite sugerir que estas fibras de conducción lenta están sujetas a controles inhibitorios presinápticos. Resulta interesante que las neuronas Cx–On reciban información

sensorial de aferentes A $\beta$ , como las neuronas descritas en la teoría de la compuerta propuesta Melzack y Wall (1965). En esta teoría se propone que la información sensorial es modulada por un sistema de compuerta en el asta dorsal. Así, un estímulo cutáneo produce la activación de fibras mielinizadas que en la lámina I-II activan neuronas que inhiben la transmisión de la información sensorial nociceptiva (Melzack and Wall, 1965). Además, este sistema en el asta dorsal está modulado por sistemas centrales, por lo que las neuronas Cx-On podrían participar en un sistema inhibitorio de compuerta modulado por la corteza sensorimotora.

Adicionalmente, las neuronas de las columnas de Clark (dSC), que forman parte del tracto espinocerebeloso dorsal y que reciben entradas sensoriales propioceptivas, pueden ser activadas directamente por el TCE o indirectamente inhibidas por entradas interneuronas glicinérgicas y GABAérgicas que son activadas por el TCE. Esto significa que el TCE ejerce inhibición presináptica sobre un sistema complejo de interneuronas que median la transmisión en las terminales de fibras aferentes primarias a neuronas espinocerebelares (Hantman and Jessell, 2010). Recientemente se reportó que neuronas ROR $\alpha$ , que integran información sensorial cutánea de mecanorreceptores de bajo umbral y comandos motores descendentes, son blanco del TCE, reforzando la importancia que tiene la modulación de las entradas sensoriales para la apropiada ejecución del movimiento (Bourane et al., 2015). Así, existe la posibilidad de que la corteza segregue sus comandos a diferentes poblaciones de interneuronas segmentales inhibitorias o excitatorias como las ROR $\alpha$  (Bourane et al., 2015) y las dSC (Hantman and Jessell, 2010), las interneuronas que median la PAD (Rudomin and Schmidt, 1999) y otras que aún no se han explorado. En este trabajo nosotros encontramos neuronas que se activan con la corteza que además tienen

aferentes de fibras rápidas ( $A\beta$ ), sin embargo, queda por dilucidar su identidad molecular, si estas son del tipo  $ROR\alpha$ , GABAérgicas, glutamatérgicas o algún tipo no explorado.

## 2.10. CONCLUSIONES

- La corteza activa neuronas con diferente latencia en los segmentos cervical C4 y L4 de la medula espinal que reciben entradas de fibras  $A\beta$ .
- Las neuronas que se activan con latencia corta se localizan en el asta dorsal y las que se activan con larga latencia se localizan en la sustancia gris intermedia.
- La amplitud de las respuestas de latencia corta del EFP-Cx es mayor cuando se estimulan las zonas corticales donde se localizan las neuronas que proyectan al asta dorsal.
- La amplitud de las respuestas de latencia lenta del EFP-Cx es mayor cuando se estimulan las zonas corticales donde se localizan las neuronas que proyectan la sustancia gris intermedia.
- La lesión del tracto piramidal abole las respuestas rápidas y lentas de los EFP-Cx en la medula espinal.
- La velocidad de conducción de las neuronas corticoespinales podría explicar las diferencias en las latencias de activación de las neuronas de la medula espinal.
- El bloqueo por frío disminuye la amplitud de la respuesta lenta del EFP-Cx.

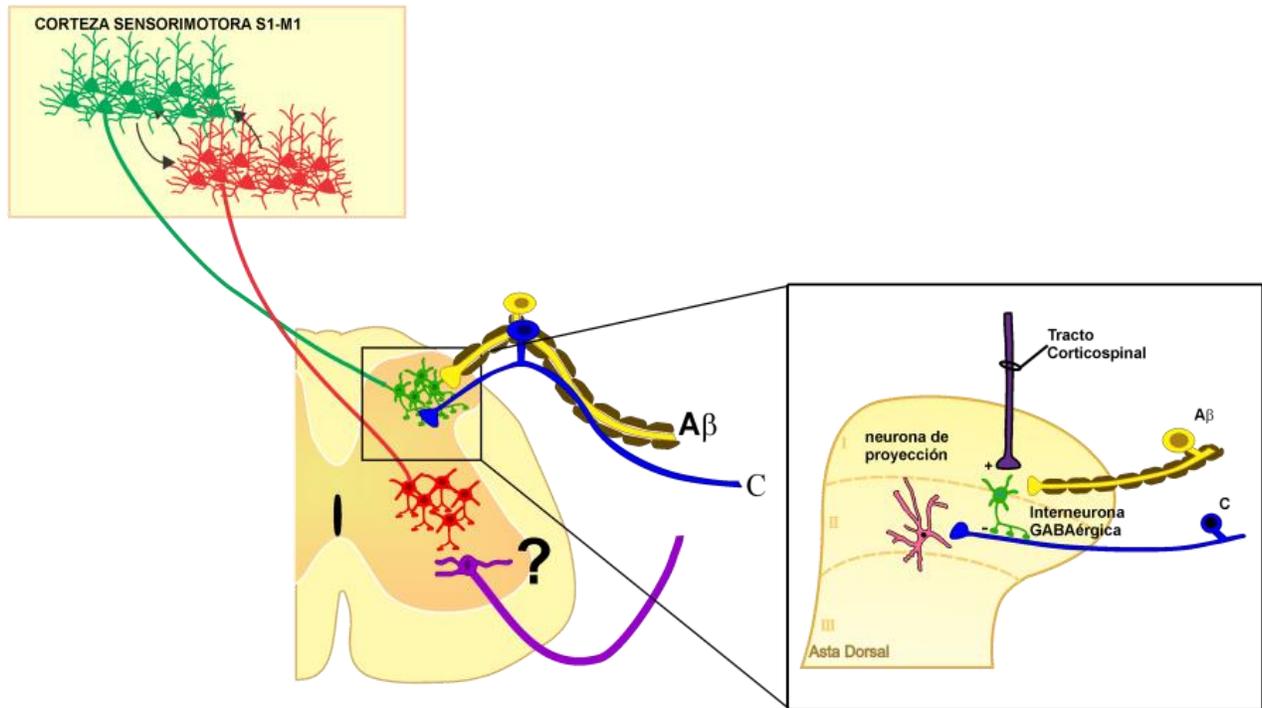
## CONCLUSIONES GENERALES

La presente tesis constituye un estudio detallado de los mecanismos a través de los cuales el TCE modula el flujo de información sensorial. Nuestros resultados sugieren que el TCE se encuentra segregado anatómicamente y funcionalmente en subsistemas que modulan distintos circuitos neuronales dentro de un mismo segmento espinal. Por un lado regulando el flujo de información sensorial a nivel del asta dorsal y por el otro ejerciendo control sobre interneuronas en la sustancia gris intermedia.

La corteza sensorimotora modula la información transmitida por fibras C amielínicas muy probablemente a través de un mecanismo GABAérgico que involucra la activación de interneuronas y despolarización de aferentes primarias.

También encontramos que la corteza sensorimotora modula diferentes poblaciones de neuronas intraespinales que se localizan en el asta dorsal y sustancia gris intermedia, que corresponden a sitios donde se procesa información sensorial y donde se localizan interneuronas premotoras respectivamente.

Nuestros resultados y los descritos en Olivares-Moreno et al 2016 sugieren que el tracto corticoespinal está conformado por al menos dos subsistemas que posiblemente controlan diferentes funciones: motoras y sensoriales de forma coordinada. Esto implica que existe una jerarquía funcional en la organización **figura 29** de las neuronas corticoespinales.



**Figura 29.** *El sistema corticoespinal.* Las neuronas de la corteza sensorimotora proyectan de forma segregada a la medula espinal donde modulan al menos a dos tipos de neuronas espinales localizadas en el asta dorsal y la sustancia gris intermedia. En el asta dorsal la proyección corticoespinal modula las respuestas neuronales de fibras C amielínicas de forma presináptica a través de un mecanismo GABAérgico y la participación de interneuronas inhibitorias. Queda por dilucidar si las neuronas localizadas en la sustancia gris intermedia participan modulando la salida motora.

## REFERENCIAS

- Abdelmoumene M, Besson JM, Aleonard P (1970) Cortical areas exerting presynaptic inhibitory action on the spinal cord in cat and monkey. *Brain Res* 20:327-329.
- Aggelopoulos NC, Chakrabarty S, Edgley SA (2008) Presynaptic control of transmission through group II muscle afferents in the midlumbar and sacral segments of the spinal cord is independent of corticospinal control. *Exp Brain Res* 187:61-70.
- Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S (2004) Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* 1000:40-56.
- Alstermark B, Pettersson LG (2014) Skilled reaching and grasping in the rat: lacking effect of corticospinal lesion. *Front Neurol* 5:103.
- Alstermark B, Ogawa J, Isa T (2004) Lack of monosynaptic corticomotoneuronal EPSPs in rats: disynaptic EPSPs mediated via reticulospinal neurons and polysynaptic EPSPs via segmental interneurons. *J Neurophysiol* 91:1832-1839.
- Alstermark B, Lindstrom S, Lundberg A, Sybirska E (1981) Integration in descending motor pathways controlling the forelimb in the cat. 8. Ascending projection to the lateral reticular nucleus from C3-C4 propriospinal also projecting to forelimb motoneurons. *Exp Brain Res* 42:282-298.
- Andersen P, Eccles JC, Sears TA (1964) Cortically Evoked Depolarization of Primary Afferent Fibers in the Spinal Cord. *J Neurophysiol* 27:63-77.
- Arber S (2012) Motor circuits in action: specification, connectivity, and function. *Neuron* 74:975-989.
- Armand J (1982) The origin, course and terminations of corticospinal fibers in various mammals. *Progress in brain research* 57:329-360.
- Babalian A, Liang F, Rouiller EM (1993) Cortical influences on cervical motoneurons in the rat: recordings of synaptic responses from motoneurons and compound action potential from corticospinal axons. *Neuroscience research* 16:301-310.
- Baker MR, Javid M, Edgley SA (2001) Activation of cerebellar climbing fibres to rat cerebellar posterior lobe from motor cortical output pathways. *J Physiol* 536:825-839.
- Bardoni R, Takazawa T, Tong CK, Choudhury P, Scherrer G, Macdermott AB (2013) Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1279:90-96.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267-284.
- Biane JS, Scanziani M, Tuszynski MH, Conner JM (2015) Motor Cortex Maturation Is Associated with Reductions in Recurrent Connectivity among Functional Subpopulations and Increases in Intrinsic Excitability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:4719-4728.
- Bourane S, Grossmann KS, Britz O, Dalet A, Del Barrio MG, Stam FJ, Garcia-Campmany L, Koch S, Goulding M (2015) Identification of a spinal circuit for light touch and fine motor control. *Cell* 160:503-515.
- Braz J, Solorzano C, Wang X, Basbaum AI (2014) Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron* 82:522-536.
- Brown JA, Barbaro NM (2003) Motor cortex stimulation for central and neuropathic pain: current status. *Pain* 104:431-435.

- Bui TV, Stifani N, Panek I, Farah C (2015) Genetically identified spinal interneurons integrating tactile afferents for motor control. *J Neurophysiol* 114:3050-3063.
- Canedo A (2003) [Functional heterogeneity of the pyramidal system: corticobulbar and corticospinal tracts]. *Revista de neurologia* 36:438-452.
- Carpenter D, Lundberg A, Norrsell U (1963) Primary Afferent Depolarization Evoked from the Sensorimotor Cortex. *Acta Physiol Scand* 59:126-142.
- Casale EJ, Light AR, Rustioni A (1988) Direct projection of the corticospinal tract to the superficial laminae of the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 278:275-286.
- Catela C, Shin MM, Dasen JS (2015) Assembly and function of spinal circuits for motor control. *Annual review of cell and developmental biology* 31:669-698.
- Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18-41.
- Condes-Lara M, Rojas-Piloni G, Martinez-Lorenzana G, Lopez-Hidalgo M, Rodriguez-Jimenez J (2009) Hypothalamospinal oxytocinergic antinociception is mediated by GABAergic and opiate neurons that reduce A-delta and C fiber primary afferent excitation of spinal cord cells. *Brain Res* 1247:38-49.
- Chiou RJ, Chang CW, Kuo CC (2013) Involvement of the periaqueductal gray in the effect of motor cortex stimulation. *Brain Res* 1500:28-35.
- Chiou RJ, Lee HY, Chang CW, Lin KH, Kuo CC (2012) Epidural motor cortex stimulation suppresses somatosensory evoked potentials in the primary somatosensory cortex of the rat. *Brain Res* 1463:42-50.
- D'Mello R, Dickenson AH (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *British journal of anaesthesia* 101:8-16.
- Eguibar JR, Quevedo J, Rudomin P (1997) Selective cortical and segmental control of primary afferent depolarization of single muscle afferents in the cat spinal cord. *Exp Brain Res* 113:411-430.
- Eguibar JR, Quevedo J, Jimenez I, Rudomin P (1994) Selective cortical control of information flow through different intraspinal collaterals of the same muscle afferent fiber. *Brain Res* 643:328-333.
- Fields H (2004) State-dependent opioid control of pain. *Nature reviews Neuroscience* 5:565-575.
- Fitzgerald M, Woolf CJ (1981) Effects of cutaneous nerve and intraspinal conditioning of C-fibre afferent terminal excitability in decerebrate spinal rats. *J Physiol* 318:25-39.
- Fonoff ET, Pereira JF, Jr., Camargo LV, Dale CS, Pagano RL, Ballester G, Teixeira MJ (2009) Functional mapping of the motor cortex of the rat using transdural electrical stimulation. *Behav Brain Res* 202:138-141.
- Gauriau C, Bernard JF (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.
- Goulding M, Bourane S, Garcia-Campmany L, Dalet A, Koch S (2014) Inhibition downunder: an update from the spinal cord. *Current opinion in neurobiology* 26:161-166.
- Grudt TJ, Perl ER (2002) Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol* 540:189-207.
- Hantman AW, Jessell TM (2010) Clarke's column neurons as the focus of a corticospinal collatory circuit. *Nature neuroscience* 13:1233-1239.
- Harper AA, Lawson SN (1985) Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities. *J Physiol* 359:47-63.
- Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM (2009) Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain research reviews* 60:214-225.

- Hentall ID, Fields HL (1979) Segmental and descending influences on intraspinal thresholds of single C-fibers. *J Neurophysiol* 42:1527-1537.
- Hochman S, Shreckengost J, Kimura H, Quevedo J (2010) Presynaptic inhibition of primary afferents by depolarization: observations supporting nontraditional mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1198:140-152.
- Hultborn H, Meunier S, Morin C, Pierrot-Deseilligny E (1987a) Assessing changes in presynaptic inhibition of Ia fibres: a study in man and the cat. *J Physiol* 389:729-756.
- Hultborn H, Meunier S, Pierrot-Deseilligny E, Shindo M (1987b) Changes in presynaptic inhibition of Ia fibres at the onset of voluntary contraction in man. *J Physiol* 389:757-772.
- Isa T, Kinoshita M, Nishimura Y (2013) Role of Direct vs. Indirect Pathways from the Motor Cortex to Spinal Motoneurons in the Control of Hand Dexterity. *Front Neurol* 4:191.
- Joosten EA, Gribnau AA (1988) Unmyelinated corticospinal axons in adult rat pyramidal tract. An electron microscopic tracer study. *Brain Res* 459:173-177.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.
- Kamiyama T, Kameda H, Murabe N, Fukuda S, Yoshioka N, Mizukami H, Ozawa K, Sakurai M (2015) Corticospinal tract development and spinal cord innervation differ between cervical and lumbar targets. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:1181-1191.
- Kandel ER (2013) *Principles of neural science*, 5th Edition. New York: McGraw-Hill Medical.
- Kawai R, Markman T, Poddar R, Ko R, Fantana AL, Dhawale AK, Kampff AR, Olveczky BP (2015) Motor Cortex Is Required for Learning but Not for Executing a Motor Skill. *Neuron*.
- Kuroda R, Kawabata A, Kawao N, Umeda W, Takemura M, Shigenaga Y (2000) Somatosensory cortex stimulation-evoked analgesia in rats: potentiation by NO synthase inhibition. *Life Sci* 66:PL271-276.
- Kuroda R, Kawao N, Yoshimura H, Umeda W, Takemura M, Shigenaga Y, Kawabata A (2001) Secondary somatosensory cortex stimulation facilitates the antinociceptive effect of the NO synthase inhibitor through suppression of spinal nociceptive neurons in the rat. *Brain Res* 903:110-116.
- Kuypers HG (1978) The motor system and the capacity to execute highly fractionated distal extremity movements. *Electroencephalography and clinical neurophysiology Supplement*:429-431.
- Lebedev MA, Nelson RJ (1996) High-frequency vibratory sensitive neurons in monkey primary somatosensory cortex: entrained and nonentrained responses to vibration during the performance of vibratory-cued hand movements. *Exp Brain Res* 111:313-325.
- Lemon RN (2008) Descending pathways in motor control. *Annual review of neuroscience* 31:195-218.
- Lemon RN, Griffiths J (2005) Comparing the function of the corticospinal system in different species: organizational differences for motor specialization? *Muscle & nerve* 32:261-279.
- Lemon RN, Kirkwood PA, Maier MA, Nakajima K, Nathan P (2004) Direct and indirect pathways for corticospinal control of upper limb motoneurons in the primate. *Progress in brain research* 143:263-279.
- Lomeli J, Quevedo J, Linares P, Rudomin P (1998) Local control of information flow in segmental and ascending collaterals of single afferents. *Nature* 395:600-604.
- Lundberg A (1979) Multisensory control of spinal reflex pathways. *Progress in brain research* 50:11-28.
- Mediratta NK, Nicoll JA (1983) Conduction velocities of corticospinal axons in the rat studied by recording cortical antidromic responses. *J Physiol* 336:545-561.
- Melzack R, Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150:971-979.

- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Progress in neurobiology* 57:1-164.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Progress in neurobiology* 66:355-474.
- Miller MW (1987) The origin of corticospinal projection neurons in rat. *Exp Brain Res* 67:339-351.
- Miri A, Azim E, Jessell TM (2013) Edging toward entelechy in motor control. *Neuron* 80:827-834.
- Molander C, Xu Q, Grant G (1984) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J Comp Neurol* 230:133-141.
- Moreno-Lopez Y, Perez-Sanchez J, Martinez-Lorenzana G, Condes-Lara M, Rojas-Piloni G (2013) Cortical presynaptic control of dorsal horn C-afferents in the rat. *Plos One* 8:e69063.
- Nudo RJ, Frost SB (2009) The Evolution of motor cortex and motor systems. In: *Evolutionary Neuroscience* (Kaas JH, ed), pp 727-756. Oxford UK: Academic Press
- Olivares-Moreno R., Moreno-Lopez Y., Concha L., Martínez-Lorenzana G., Condés-Lara M., Cordero-Erausquin., Rojas-Piloni. (2016) FUNCTIONAL SEGREGATION OF RAT CORTICOSPINAL SYSTEM. In.
- Pagano RL, Fonoff ET, Dale CS, Ballester G, Teixeira MJ, Britto LR (2012) Motor cortex stimulation inhibits thalamic sensory neurons and enhances activity of PAG neurons: possible pathways for antinociception. *Pain* 153:2359-2369.
- Pagano RL, Assis DV, Clara JA, Alves AS, Dale CS, Teixeira MJ, Fonoff ET, Britto LR (2011) Transdural motor cortex stimulation reverses neuropathic pain in rats: a profile of neuronal activation. *European journal of pain* 15:268 e261-214.
- Papp EA, Leergaard TB, Calabrese E, Johnson GA, Bjaalie JG (2014) Waxholm Space atlas of the Sprague Dawley rat brain. *NeuroImage* 97:374-386.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th Edition. San Diego: Academic Press.
- Perez-Sanchez J (2012) Caracterización de la inhibición corticoespinal sobre las respuestas nociceptivas segmentales. In. Querétaro, México: INB-UNAM.
- Purves D (2004) *Neuroscience*, 3rd Edition. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Publishers.
- Rexed B (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96:414-495.
- Rojas-Piloni G, Martinez-Lorenzana G, Condes-Lara M, Rodriguez-Jimenez J (2010) Direct sensorimotor corticospinal modulation of dorsal horn neuronal C-fiber responses in the rat. *Brain Res* 1351:104-114.
- Rudomin P (1999) Presynaptic selection of afferent inflow in the spinal cord. *J Physiol Paris* 93:329-347.
- Rudomin P (2009) In search of lost presynaptic inhibition. *Exp Brain Res* 196:139-151.
- Rudomin P, Schmidt RF (1999) Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp Brain Res* 129:1-37.
- Rudomin P, Solodkin M, Jimenez I (1986) PAD and PAH response patterns of group Ia- and Ib-fibers to cutaneous and descending inputs in the cat spinal cord. *J Neurophysiol* 56:987-1006.
- Rusina R, Vaculin S, Yamamotova A, Barek S, Dvorakova H, Rokyta R (2005) The effect of motor cortex stimulation in deafferentated rats. *Neuro endocrinology letters* 26:283-288.
- Scott SH (2004) Optimal feedback control and the neural basis of volitional motor control. *Nature reviews Neuroscience* 5:532-546.
- Scott SH, Crevecoeur F (2014) Neuroscience: Feedback throttled down for smooth moves. *Nature* 509:38-39.
- Schieber MH (2007) Chapter 2 Comparative anatomy and physiology of the corticospinal system. *Handbook of clinical neurology* 82:15-37.
- Seki K, Perlmutter SI, Fetz EE (2003) Sensory input to primate spinal cord is presynaptically inhibited during voluntary movement. *Nature neuroscience* 6:1309-1316.

- Senapati AK, Huntington PJ, Peng YB (2005a) Spinal dorsal horn neuron response to mechanical stimuli is decreased by electrical stimulation of the primary motor cortex. *Brain Res* 1036:173-179.
- Senapati AK, Huntington PJ, LaGraize SC, Wilson HD, Fuchs PN, Peng YB (2005b) Electrical stimulation of the primary somatosensory cortex inhibits spinal dorsal horn neuron activity. *Brain Res* 1057:134-140.
- Silva GD, Lopes PS, Fonoff ET, Pagano RL (2015) The spinal anti-inflammatory mechanism of motor cortex stimulation: cause of success and refractoriness in neuropathic pain? *Journal of neuroinflammation* 12:10.
- Stewart M, Quirk GJ, Amassian VE (1990) Corticospinal responses to electrical stimulation of motor cortex in the rat. *Brain Res* 508:341-344.
- Suter BA, Shepherd GM (2015) Reciprocal interareal connections to corticospinal neurons in mouse M1 and S2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:2959-2974.
- Todd AJ (1990) An electron microscope study of glycine-like immunoreactivity in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat. *Neuroscience* 39:387-394.
- Todd AJ (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature reviews Neuroscience* 11:823-836.
- Todd AJ, Hughes DI, Polgar E, Nagy GG, Mackie M, Ottersen OP, Maxwell DJ (2003) The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *The European journal of neuroscience* 17:13-27.
- Towe AL, Harding GW (1970) Extracellular microelectrode sampling bias. *Experimental neurology* 29:366-381.
- Ullan J, Artieda J (1981) Somatotopy of the corticospinal neurons in the rat. *Neurosci Lett* 21:13-18.
- Wall PD (1958) Excitability changes in afferent fibre terminations and their relation to slow potentials. *J Physiol* 142:1-21.
- Wall PD, Lidiert M (1997) Five sources of a dorsal root potential: their interactions and origins in the superficial dorsal horn. *J Neurophysiol* 78:860-871.
- Wang N, Wang JY, Luo F (2009) Corticofugal outputs facilitate acute, but inhibit chronic pain in rats. *Pain* 142:108-115.
- West SJ, Bannister K, Dickenson AH, Bennett DL (2015) Circuitry and plasticity of the dorsal horn--toward a better understanding of neuropathic pain. *Neuroscience* 300:254-275.
- Witschi R, Punnakkal P, Paul J, Walczak JS, Cervero F, Fritschy JM, Kuner R, Keist R, Rudolph U, Zeilhofer HU (2011) Presynaptic alpha2-GABAA receptors in primary afferent depolarization and spinal pain control. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:8134-8142.
- Wyart C, Knafo S (2015) Sensorimotor integration in the spinal cord from behaviours to circuits: new tools to close de loop. In: *New techniques in system neuroscience (A D, ed)*. USA: Springer
- Yang HW, Lemon RN (2003) An electron microscopic examination of the corticospinal projection to the cervical spinal cord in the rat: lack of evidence for cortico-motoneuronal synapses. *Exp Brain Res* 149:458-469.
- Yasaka T, Tiong SY, Hughes DI, Riddell JS, Todd AJ (2010) Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 151:475-488.

Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110.

Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annual review of physiology* 64:355-405.

# Cortical Presynaptic Control of Dorsal Horn C-Afferents in the Rat

Yunuen Moreno-López<sup>1</sup>, Jimena Pérez-Sánchez<sup>1</sup>, Guadalupe Martínez-Lorenzana, Miguel Condés-Lara, Gerardo Rojas-Piloni\*

Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, México

## Abstract

Lamina 5 sensorimotor cortex pyramidal neurons project to the spinal cord, participating in the modulation of several modalities of information transmission. A well-studied mechanism by which the corticospinal projection modulates sensory information is primary afferent depolarization, which has been characterized in fast muscular and cutaneous, but not in slow-conducting nociceptive skin afferents. Here we investigated whether the inhibition of nociceptive sensory information, produced by activation of the sensorimotor cortex, involves a direct presynaptic modulation of C primary afferents. In anaesthetized male Wistar rats, we analyzed the effects of sensorimotor cortex activation on post tetanic potentiation (PTP) and the paired pulse ratio (PPR) of dorsal horn field potentials evoked by C-fiber stimulation in the sural (SU) and sciatic (SC) nerves. We also explored the time course of the excitability changes in nociceptive afferents produced by cortical stimulation. We observed that the development of PTP was completely blocked when C-fiber tetanic stimulation was paired with cortex stimulation. In addition, sensorimotor cortex activation by topical administration of bicuculline (BIC) produced a reduction in the amplitude of C-fiber responses, as well as an increase in the PPR. Furthermore, increases in the intraspinal excitability of slow-conducting fiber terminals, produced by sensorimotor cortex stimulation, were indicative of primary afferent depolarization. Topical administration of BIC in the spinal cord blocked the inhibition of C-fiber neuronal responses produced by cortical stimulation. Dorsal horn neurons responding to sensorimotor cortex stimulation also exhibited a peripheral receptive field and responded to stimulation of fast cutaneous myelinated fibers. Our results suggest that corticospinal inhibition of nociceptive responses is due in part to a modulation of the excitability of primary C-fibers by means of GABAergic inhibitory interneurons.

**Citation:** Moreno-López Y, Pérez-Sánchez J, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M, Rojas-Piloni G (2013) Cortical Presynaptic Control of Dorsal Horn C-Afferents in the Rat. PLoS ONE 8(7): e69063. doi:10.1371/journal.pone.0069063

**Editor:** Shawn Hochman, Emory University, United States of America

**Received:** November 27, 2012; **Accepted:** June 10, 2013; **Published:** July 30, 2013

**Copyright:** © 2013 Moreno-López et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Work was supported by CONACYT 176782 (GRP) and 164536 (MCL), PAPIIT IN202610 (GRP). YML and JPS received a scholarship from CONACYT (233849 and 245641). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: piloni@unam.mx

† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

The cortico-spinal tract performs multiple functions, including motor control as well as the modulation of different types of sensory information at the spinal cord level, including nociception [for review see [1]]. However, the modulation of nociceptive sensory information mediated by the corticospinal system has been poorly studied, and the mechanisms are not well understood. Existing studies in animal models have reported that the stimulation of sensorimotor cortices modulates the activity of nociceptive dorsal horn cells in monkeys [2,3] and rats [4,5], as well as synaptic C-fiber-evoked responses in the rat dorsal horn [6]. Additionally, clinical studies have shown that the stimulation of the motor cortex can be used successfully to manage chronic and drug-resistant peripheral neuropathic pain of various origins [7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18].

Conversely, primary afferent depolarization (PAD), leading to presynaptic inhibition of sensory fibers and mediated by the cortical descending projection, has been documented since the 1960's [19,20,21,22,23,24]. The cortico-spinal modulation of

sensory inputs can be mediated directly by activation of segmental interneurons [22] or indirectly by extrapyramidal pathways [25]. In particular, sensorimotor cortex stimulation produces dorsal root potentials (DRP) and PAD in muscular and fast cutaneous afferents [22,24,26] without affecting group II afferents [27]. Presynaptic inhibition mediated by PAD has been proposed as one of the mechanisms underlying the modulation of nociceptive information mediated by the sensorimotor cortex. However, whether a cortical control is exerted on thinly myelinated and unmyelinated nociceptive fibers is still unknown.

The purpose of the present study was to evaluate if the inhibition of nociceptive sensory information, carried by C primary afferents and produced by activation of the sensorimotor cortex, involves presynaptic GABAergic control. To this end, we evaluated the effects of sensorimotor cortex activation on the post tetanic potentiation (PTP) and paired pulse ratio (PPR) of C-fiber evoked dorsal horn responses [28]. Furthermore, we tested the effect of sensorimotor cortex stimulation on the excitability of C-fiber terminal arborizations [28,29]. We also analyzed the effects of bicuculline (BIC), applied to the surface of the spinal cord, on

the inhibition of C-fiber neuronal responses mediated by cortical stimulation. Finally, we explored the location of dorsal horn neurons that are activated by the stimulation of the sensorimotor cortex.

## Methods

### Ethic statement

All procedures were carried out in strict accordance with the recommendations of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Experimental Animals and were approved by the local Animal Research Committee of the Instituto de Neurobiología at Universidad Nacional Autónoma de México. 76 Wistar rats (280–310 g) were used for this study and all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering during the experiments. Additionally, in order to minimize trauma and the length of anesthesia, only one experimental protocol was performed per animal. The animals were housed individually in a temperature-controlled (24°C) colony room and maintained on a 12-h/12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 A.M.). Food and water were provided ad libitum. At the end of the experiments the animals were euthanized by means of pentobarbital overdose (>120 mg/kg, i.v.).

### General procedures

The rats were anesthetized with urethane (1.4 g/kg, i.p.), paralyzed with pancuronium (0.5 mg/kg, i.v.) and artificially respired. Tidal air volume was adjusted to have an end tidal CO<sub>2</sub> concentration of 2–4%. The electrocardiogram was monitored during the experiment, and the core temperature was kept at 37°C by means of a heating pad. In some experiments, the left sciatic nerve (SN) was carefully exposed and isolated at the mid-thigh level. A pair of silver hook electrodes was placed around the SN for stimulation (Wire, Silver, Teflon coated, PHYMED s.a.r.l. Paris). The exposed nerve was covered with mineral oil at 37°C. For the primary afferent excitability tests, the sural (SU) nerve was dissected free at the level of the popliteal fossa and cut at the periphery. The rats were fixed in a stereotaxic apparatus (Narishige SR-6R) and secured in a spinal cord unit frame (Narishige STS-B), thus fixing lumbar vertebrae to improve stability at the recording site. A laminectomy was performed to expose spinal cord segments L4–L6, and the surface of the exposed spinal cord was irrigated with saline solution.

### Recording and stimulation

Intraspinal potentials were recorded with the preamplifier filters set to a bandwidth of 0.3 Hz–10 kHz. During the experiment, all recordings were digitalized and stored for further processing. C-fiber and cortical evoked field potentials (EFPs) were recorded with glass micropipettes filled with 1.2 M NaCl (tip diameter, 1.0–2.5 μm; 1.2–1.7 MΩ). For the intraspinal recordings, micropipettes were placed at depths where negative C-fiber EFPs reached their maximal amplitude (300–400 μm; Lamina II–III). Spinal EFPs were produced by stimulation of the SU and SN with single pulses (0.1 ms), and the stimulation strength was adjusted to elicit a C-fiber response of 40 to 60% of the maximal amplitude (0.5–0.8 mA). In some experiments, intraspinal EFPs, DRPs, as well as single-unit extracellular recordings, produced by contralateral cortical stimulation were analyzed.

Cortical stimulation consisting of trains of 5 pulses (pulse duration 0.1 ms, 100 Hz, 100 μA) was carried out with bipolar stainless steel electrodes (0.5-mm separation between the tips) inserted 1000 μm below the cortical surface (around cortical layer 5). The stimulation electrodes were placed in the region where

intraspinal EFPs evoked by cortical stimulation are maximal (3 mm from the midline and 2.5 mm posterior to Bregma) (Figure S1 A). As reported previously [22], a single cortical stimulus evokes negligible dorsal root potentials, and a repetitive stimulation is required to produce large responses. Control C-fiber EFPs evoked by SN stimulation were compared with those that occurred 25 to 100 ms after cortex stimuli. Due to the variability in the location of stimulating and recording electrodes in each experiment, the time interval between SN stimulation and cortex stimulation was adjusted in each experiment.

Using the same protocol, we tested the effects of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist BIC (20 μM dissolved in the saline solution irrigating the surface of the spinal cord) on the inhibition of C-fiber EFPs produced by sensorimotor cortex stimulation. The cortex-mediated inhibition of C-fiber EFPs was tested before, every 10 min during BIC administration, and after the wash.

### Post tetanic potentiation of C-fiber evoked responses

C-fiber EFPs were evoked by single constant current pulses delivered every 10 s. Following a 15-min baseline period, a high frequency stimulation (HFS) was delivered in one (100–ms or 250–ms) train (pulse duration 0.1 ms, 100 Hz, 100 μA). Recordings of the C-fiber EFPs then continued for 1 h post-tetanus. In order to analyze the cortical stimulation effects, the time course of post tetanic potentiation (PTP) produced by SN alone was compared with the PTP produced by the tetanic stimulation of SN delivered together with a cortical stimulation train. Cortical stimulation preceded the HFS to the SN by 50 ms.

### Paired pulse test

To determine the influence of the sensorimotor cortex on paired pulse depression or facilitation of C-fiber EFPs, two consecutive SN stimuli were applied, separated by a 200-ms interval. In this way, BIC (100 μM, 50 μl) was applied onto the surface of the sensorimotor cortex. Changes in the ongoing cortical and dorsal horn activity evoked by cortical BIC administration were correlated with changes in the PPR C-fiber responses evoked by sciatic nerve stimulation.

### Measurement of excitability of terminal arborizations

These experiments were conducted according to the method developed by Wall [30] and described in the rat later on [26,31]. Briefly, the SU nerve was mounted on silver hook electrodes for recording compound antidromic responses. The antidromic responses were produced by stimulating the afferent terminals by means of coated tungsten micro-electrodes located in L4–L5 at the entry zone of dorsal roots in the superficial dorsal horn. The stimulation electrodes were located at the site where maximal antidromic responses in the SU nerve were recorded (300–400 μm deep), corresponding to the negative focus of SU nerve EFPs (Figure S2 C). Stimulus strengths (<500 μA; 100 μs; 0.7 Hz) were adjusted until a stable compound action potential was recorded on the SU nerve; the stimulation strength was always submaximal. The conduction velocity and activation threshold of this compound action potential were in the C-fiber range. Conduction velocities (1.88±0.36 m/s) were computed using the latency shifts and the distance between the two recording electrodes located in the SU nerve (Figure S2 A). Additionally, to further demonstrate that the fibers involved had a high activation threshold, a collision test was performed. In this way, the stimulus intensity necessary to evoke a collision of the slow antidromic compound action potential produced by dorsal horn stimulation, exceeded the threshold of the most excitable fibers in the nerve by 30 fold (Figure S2 B). When primary afferent axons were depolarized, they became

more excitable, and fixed-intensity stimulation activates more axons; thus, the compound antidromic action potential increases. The size of the antidromic compound action potential evoked by dorsal horn stimulation was evaluated at different intervals preceding cortical stimulation.

#### Data analysis

All the recorded EFPs were averaged (16–24 sweeps) and analyzed off line with the Clamfit software (pCLAMP 10.0, Molecular Devices). Statistical analyses were computed using non-parametric tests. The amplitudes of the control C-fiber EFPs, preceded or not by cortical stimulation, were compared using a Wilcoxon test. For multiple comparisons a Kruskal-Wallis ANOVA and Friedman test were performed. Differences were considered significant starting at  $p < 0.05$ .

#### Results

Intraspinal EFPs produced by SU and SN stimulation with long latencies (80–150 ms) were analyzed. In order to better estimate the conduction velocity of the fibers producing C-fiber EFPs, the responses produced by two separate stimulating electrodes were compared to calculate the latency difference in 5 experiments. The conduction velocity estimated in this way corresponds to the activation of C-fibers ( $1.3 \pm 0.2$  m/s) (Figure S3 A). Additionally, the electrodes were situated 300–400  $\mu$ m deep, where the maximal amplitude responses were recorded (Figure S3 C) [32]. We assumed that EFPs produced by SN stimulation are due to C-fiber activation based on their long latencies (80–150 ms), high thresholds (0.3–0.6 mA with 0.1-ms pulse duration) and maximal negativity in the superficial dorsal horn [6,32,33,34]. In each experiment, the SN stimulation strength was adjusted to produce a C-fiber EFP between 40 and 60% of the maximal response (0.5–0.8 mA) (Figure S2 B).

#### Sensorimotor cortex stimulation inhibits dorsal horn C-fiber EFPs

As a first step, the effect of cortical stimulation on C-fiber EFPs was analyzed. Thus, the control nociceptive responses alone were compared with the C-fiber EFPs preceded by cortical stimulation. We observe a significant inhibition of C-fiber EFPs. However, as reported previously, the magnitude of the inhibition depended on the time interval between cortical stimulation and C-fiber EFP [6]. Here, the significant inhibition effects ( $39.2 \pm 4.2\%$  with respect to control;  $p = 0.0003$ , Wilcoxon test;  $n = 17$ ) were obtained when cortical stimulation preceded C-fiber EFPs with time intervals between 25 to 100 ms (Figure 1).

#### Effects of sensorimotor cortex stimulation on PTP of C-fiber EFPs

To analyze the mechanisms by which sensorimotor cortex stimulation inhibits C-fiber EFPs, we first tested whether cortical stimulation modulated the time course of PTP of C-fiber EFPs. PTP principally occurs due to an increase in the release probability in response to an action potential resulting, in large part, from the buildup of calcium in the presynaptic terminals during the stimulus trains [28]. In order to exclude the possibility that postsynaptic mechanisms are involved in the augmentation of the amplitude observed following tetanic stimulation, the effects of an NMDA receptor antagonist CPP ((2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-l-phosphonic acid; 10  $\mu$ M, Sigma) were tested. No statistical differences were observed in the PTP produced by a 100-ms stimulating train in the presence of CPP (Figure S4 B),

suggesting that postsynaptic NMDA receptors are not involved in the augmentation of the C-fiber EFPs.

When a 100-ms, high-frequency (100 Hz) stimulation (HFS) train was applied to the SN, the amplitude of the C-fiber EFPs increased significantly (Figure 2), reaching a maximum 10 min after the train ( $182.9 \pm 25.1\%$  with respect to control values;  $p < 0.0001$ , Friedman Test;  $n = 6$ ). Gradually, the amplitude of the C-fiber EFPs returned to basal levels and 20 min after HFS of the SN, there was no statistical difference with respect to pre-stimulation amplitudes.

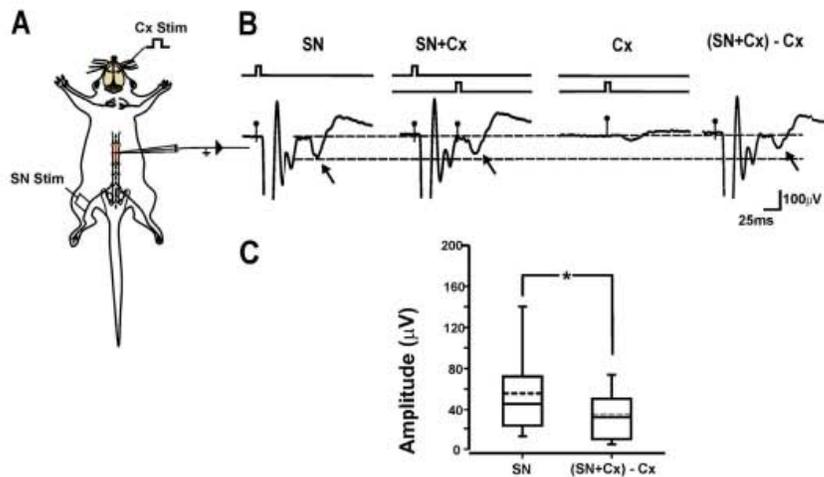
However, when the HFS to the SN was applied simultaneously with HFS to the contralateral sensorimotor cortex (pulse duration 0.1 ms, 100 Hz, 100–300  $\mu$ A), the amplitude of the C-fiber EFPs did not increase when compared to the control ( $p = 0.25$ , Friedman test,  $n = 6$ ) (Figure 2). In addition, cortical stimulation significantly reduced the duration of PTP produced by a longer stimulation train (250 ms) (Figure S4 A).

#### Effects of sensorimotor cortex activation on PPR of C-fiber EFPs

We analyzed the changes in the PPR during different levels of background activity in the sensorimotor cortex. After a control period, BIC (100  $\mu$ M) was administered on the surface of the sensorimotor cortex (Figure 3A). The PPR as well as the cortical and spinal cord background activities were tested every 10 min. We observed a gradual increase in the area under the curve of the power spectrum computed from cortical and spinal cord activities, reaching a maximum 20 min after starting BIC administration, then gradually decreasing, and returning to basal levels 60 min after BIC withdrawal (Figure S5 A–H). A significant correlation (Spearman  $r = 0.6$ ,  $p = 0.03$ ) was observed between the cortical and spinal cord activities, following BIC administration in the sensorimotor cortex (Figure S5 I). During this time, the amplitude and PPR of the C-fiber EFP were tested. The amplitude of C-fiber EFPs decreased after 20 min of BIC cortical administration ( $54.4 \pm 10.1\%$ ;  $p = 0.01$ ; Kruskal-Wallis test;  $n = 7$ ) along with by an increase in the PPR (Figure 3J). Similar time courses were observed for the PPR and for the area under the curve computed from the cortical activity power spectrum before and after BIC cortical administration (Figure 3H). Moreover, a significant, positive correlation (Spearman  $r = 0.86$ ;  $p = 0.002$ ) between the PPR and the power spectrum was observed (Figure 3I), suggesting a presynaptic modulation of C primary afferents that is mediated by the sensorimotor cortex. The administration of vehicle (saline solution) did not change the cortical activity (data not shown). The amplitude of the C-fiber evoked responses was reduced during the period of increased cortical activity.

#### Sensorimotor cortex modulates intraspinal excitability of C afferent terminals

To investigate whether the corticospinal projection modulates the excitability of afferent terminal arbors of C primary afferents, we analyzed the effects of cortical stimulation on the slow antidromic SU compound action potentials evoked by dorsal horn stimulation (threshold  $320 \pm 54$   $\mu$ A), and recorded in the SU nerve. The excitability of the C afferent terminals, inferred from the height of the compound action potential (conduction velocities less than 2 m/s), was then calculated at different time intervals between cortical and dorsal horn stimulation (Figure 4A–B). We observed a significant increase in the amplitude of the slow antidromic action potential at time intervals between 70 and 120 ms ( $p < 0.0003$ ; Kruskal-Wallis test;  $n = 12$ ). The time course



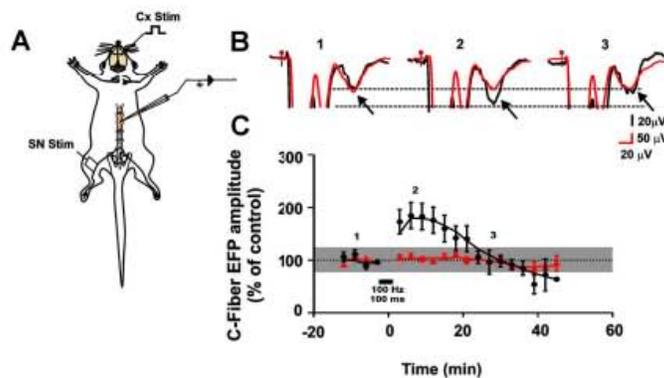
**Figure 1. Sensorimotor cortex stimulation inhibits C-fiber dorsal horn EFPs.** A, Schematic diagram of the experimental arrangement. B, electrophysiological recordings show: the averaged ( $n = 16$  sweeps) C-fiber EFPs (arrow) generated by stimulation of the sciatic nerve (SN) (first trace); averaged C-fiber EFP evoked by an SN stimulus preceded by cortical stimulation (Cx+SN) (second trace); Cortex-evoked potentials (Cx) (third trace); averaged C-fiber EFP preceded by cortical stimulation minus cortex-evoked potentials ((Cx+SN)-Cx) (fourth trace) C, box plot computed from the amplitudes of C-fiber EFPs evoked by SN stimulation alone and when C-fiber EFPs were preceded (25 to 100 ms) by cortical stimulation ((Cx+SN)-Cx). \* $p < 0.05$ , Wilcoxon test. doi:10.1371/journal.pone.0069063.g001

of the changes in excitability is similar to that of the dorsal root potentials (DRP) evoked by cortical stimulation.

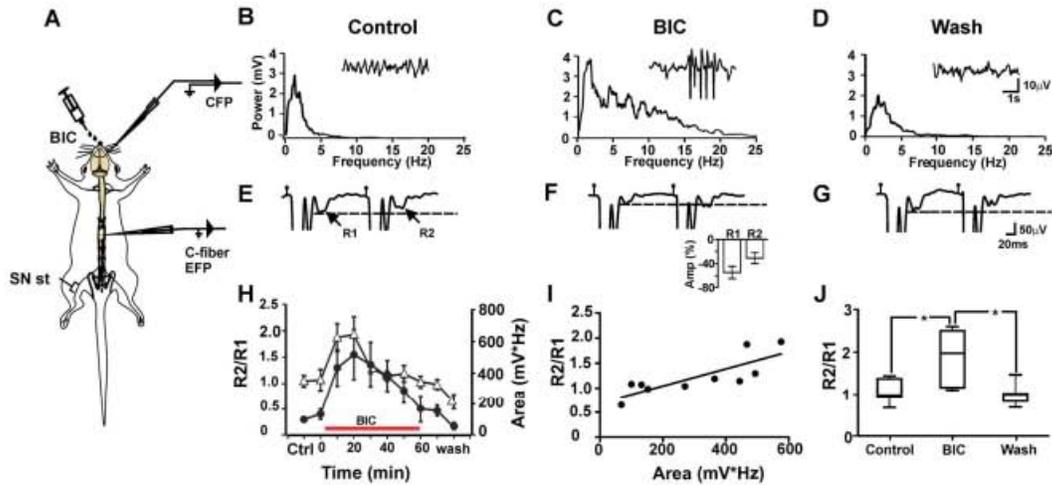
#### GABA<sub>A</sub> receptors are involved in the corticospinal modulation of C-fiber EFPs

To analyze if GABA<sub>A</sub> receptor activation is involved in the modulation of C-fiber EFPs mediated by the sensorimotor cortex, the effect of intrathecal BIC was evaluated in 6 experiments. The

inhibition of C-fiber EFP amplitude produced by sensorimotor cortex electrical stimulation ( $27.9 \pm 4.5\%$  with respect to control) was significantly blocked after 30 min of BIC administration ( $p = 0.001$ , Friedman test,  $n = 6$ ). Moreover, 60 min after washing, the block of the inhibition in C-fiber responses produced by cortical stimulation was completely reversed (Figure 5). Additionally, the amplitude of the C-fiber evoked responses did not change significantly before ( $42.7 \pm 5.18 \mu\text{V}$ ) or during ( $39.3 \pm 6.0 \mu\text{V}$ ) BIC



**Figure 2. Effect of sensorimotor cortex stimulation on PTP of C-fiber EFPs.** A, Schematic diagram of the experimental arrangement. B, averaged ( $n = 16$ ) electrophysiological recordings obtained before (1), after 10 min (2), and after 20 min (3) of high-frequency stimulation of the SN in control conditions (black) and when the SN high-frequency stimulation was applied in parallel with high-frequency stimulation of the contralateral sensorimotor cortex (red). C, PTP temporal course of C-fiber EFPs after a stimulation train of 100 ms delivered to the SN alone (black symbols) and when the SN high-frequency stimulation was applied in parallel with high-frequency stimulation to the contralateral sensorimotor cortex (red symbols). The symbols outside the gray band are statistically different from the basal responses (Friedman test,  $p < 0.05$ ). doi:10.1371/journal.pone.0069063.g002



**Figure 3. Sensorimotor cortex modulates the PPR of C-fiber EFPs.** A, Schematic diagram of the experimental arrangement. B, Power spectrum of the spontaneous cortical activity recorded for 30 sec. The insert shows a sample of spontaneous field potential recorded in the sensorimotor cortex (1000  $\mu\text{m}$  depth, 2.5 mm caudal to bregma, and 3 mm from the midline). C, the same but after 20 min of BIC topical administration (100  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) on the surface of the sensorimotor cortex. D, the same but after wash. E–G, representative electrophysiological recordings (arrows) of C-fiber evoked responses (R1 and R2) produced by a pair of consecutive stimuli in the SN in control conditions (E), after BIC administration (F), and during wash (G). The insert shows the percent inhibition of the C-fiber EFPs R1 and R2 after 20 min of BIC administration onto the cortex. H, Changes in the PPR (R2/R1) (triangles), and the area below the curve computed from the power spectra of cortical activity during BIC administration (circles). I, graph showing a significant positive correlation between the PPR and the area below the curve computed from the cortical activity power spectra ( $r = 0.86$ ). J, box plot of the PPR computed in 7 experiments in control conditions, after 20 min of BIC administration, and during wash. \* $p < 0.05$ , Kruskal–Wallis ANOVA. doi:10.1371/journal.pone.0069063.g003

administration ( $p = 1.0$ ; Wilcoxon test;  $n = 6$ ), suggesting that these effects are not due to a GABAergic tonic disinhibition.

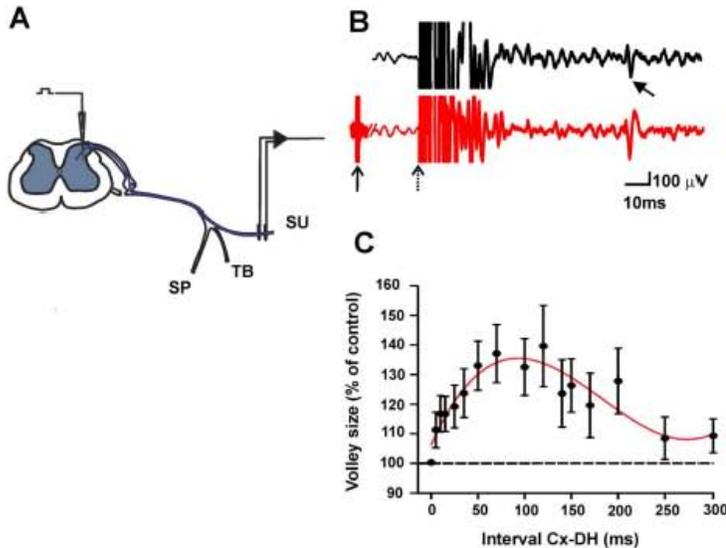
#### Sensorimotor cortex activates dorsal horn interneurons receiving synaptic input from fast conducting cutaneous afferents

Next we investigated the location of the neurons in the spinal cord that are activated by the sensorimotor cortex. In 6 experiments, intraspinal recordings were made at various depths in four parallel tracks separated by 300  $\mu\text{m}$ . Intraspinal EFPs produced by contralateral sensorimotor cortex stimulation were recorded. These cortical EFPs were negative in the superficial dorsal horn, acquired their maximal amplitude between 200 and 400  $\mu\text{m}$ , and their polarity reversed in more ventral regions of the spinal cord (Figure S1 C–D). Moreover, the extracellular unitary activity of the neurons that were activated by sensorimotor cortex stimulation demonstrated that action potentials occurred during the maximal negativity of cortical EFPs ( $n = 10$ ) (Figure 6A–C). All recorded neurons also responded to cutaneous mechanical and electrical stimulation. The receptive fields (RF) were small and when activated by electric stimulation had low activation thresholds (10–100  $\mu\text{A}$ ). The latency of activation after cutaneous electrical stimulation ( $6.8 \pm 0.8$  ms) indicates that these neurons also receive information from A $\beta$  fibers (Figure 6D). Similarly, cortical stimulation produced DRPs that started just after the maximal negativity of the cortical EFPs (Figure 7). After an electrolytic lesion of the pyramidal tract (100  $\mu\text{A}$ , 10 s), just before pyramidal decussation, there was a suppression of the cortical EFPs, as well as of the DRPs (Figure 7), suggesting that the dorsal

horn neurons were modulated directly by the corticospinal projection.

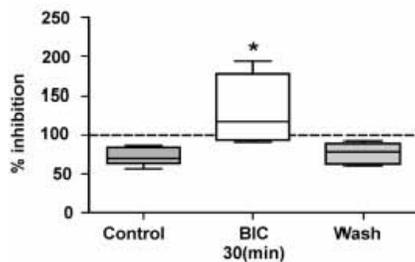
#### Discussion

In the present work we show that after sensorimotor cortex stimulation, the evoked C-fiber spinal field potentials are inhibited. Although the inhibition of nociceptive neuronal responses mediated by sensory and motor cortices has been previously reported in animal models [4,5,6], this paper describes for the first time the possible mechanisms mediating the corticospinal modulation of synaptic dorsal horn responses elicited by slow conducting primary afferents. In order to determine if the sensorimotor cortex modulates the C-fiber neuronal responses at a presynaptic level, we first analyzed the effects of cortical stimulation on PTP as well as on the PPR of C-fiber EFPs. We show that cortical stimulation prevents generation of the PTP and increases the PPR of C-fiber EFPs. These results suggest that the cortical stimulation decreases the probability of neurotransmitter release from slow-conducting afferents [28]. Also, we used Wall's method [30] to analyze whether this effect is due to a change in the excitability of terminal arborizations, and hence a PAD of nociceptive afferents. Using this method we assessed if slow conducting antidromic potentials in the SU cutaneous nerve are modulated by cortical stimulation. We found that sensorimotor cortex activation increases the excitability of nociceptive afferents with a time course similar to that of the DRPs produced by cortex stimulation, suggesting that the EFP inhibition mediated by sensorimotor cortex stimulation is due to a presynaptic control of slow conduction afferents.



**Figure 4. Time course of changes in excitability of slow conducting primary afferent terminals after stimulation of the contralateral sensorimotor cortex.** A, experimental arrangement. B, antidromic slow conducting compound action potentials (bold arrow), recorded in the SU nerve, produced by superficial L4 dorsal horn stimulation alone (black) and when this stimulation was preceded by sensorimotor cortex stimulation 70 ms earlier (red). Arrows indicate the dorsal horn (dotted arrow) and cortex (solid arrow) stimulation times. C, graph shows the amplitude of antidromic volleys at various intervals after the cortical stimulation. Amplitudes are expressed as percent of the amplitude of control antidromic action potentials. SU, Sural nerve; TB, Tibial nerve; SP, Peroneal nerve.  
doi:10.1371/journal.pone.0069063.g004

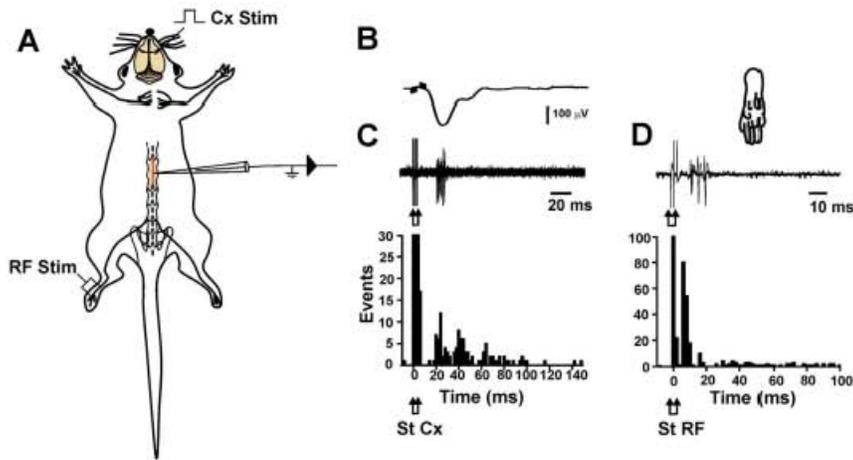
In agreement with our results, previous studies have demonstrated that long-latency (80–150 ms) potentials evoked by sural [32] and sciatic [34] nerve electrical stimulation with maximal negativity in the superficial laminae (200–400  $\mu\text{m}$  below the spinal cord surface) are generated by monosynaptic activation of C afferents. Because the second order neurons in the dorsal horn drive a heterogeneous population of neurons [35], some of them



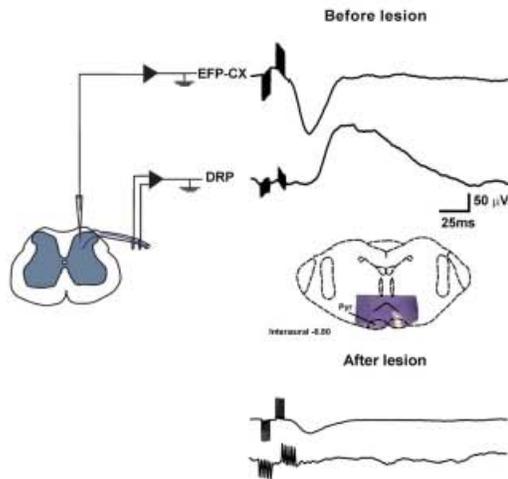
**Figure 5. GABAA receptors mediate the cortical inhibition of C-fiber EFPs.** Box plot of the inhibition of C-fiber EFPs produced by cortical stimulation before (control), 20 min after BIC administration on the surface of spinal cord, and after wash. Significant inhibition of the amplitudes of C-fiber EFPs produced by cortical stimulation, compared to controls without cortical stimulation (100%) is indicated in the gray bars ( $p < 0.05$ ; Wilcoxon test). Asterisk indicates significant differences with respect to the control ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis test). Notice that the cortical evoked inhibition is suppressed by BIC.  
doi:10.1371/journal.pone.0069063.g005

excitatory and others inhibitory, a polysynaptic pathway would not be linear. However, there is a direct relationship between the magnitudes of intraspinal field potentials in lamina II and C-fiber nerve volleys. This finding strongly suggests that these intraspinal field potentials are generated by the synapses between the C afferent fibers and the second-order neurons. In contrast, a non-linear relationship was found between the intraspinal field potentials recorded deep in lamina V and C-fiber nerve volleys, indicating a polysynaptic C-fiber input to lamina V neurons [32]. Here, we only analyzed the intraspinal evoked potentials recorded at depths between 300 and 400  $\mu\text{m}$ , corresponding to lamina II [6]. Our data suggest that the intraspinal components recorded are generated monosynaptically.

PTP is a short-term form of plasticity that is reflected in an increase of synaptic transmission produced by a presynaptic stimulation train. This phenomenon is accompanied by an increased probability of release that may result from increased calcium entry into presynaptic terminals [36]. This implies that PTP is principally due to a change in the neurotransmitter-release machinery itself [28,29]. Despite the fact that PTP is generally thought to be entirely presynaptic, a postsynaptic component has also been suggested [37]. PTP in the spinal cord has been explored in synapses between low-threshold primary afferents and spinal cord neurons [38,39]. Here we analyzed PTP responses mediated by slow-conducting afferents. In particular, the synapses between C-fibers and second order neurons are plastic and exhibit NMDA receptors dependent long term potentiation. To determine whether postsynaptic NMDA receptors contribute to the PTP seen here, we tested the effect of the NMDA receptor antagonist CPP. We found that CPP did not affect PTP produced by a 100-



**Figure 6. Dorsal horn neurons responding to sensorimotor cortex stimulation also receives input from larger cutaneous afferent fibers.** A, experimental arrangement. B, averaged cortical EFP recorded at a depth of 300  $\mu\text{m}$  (top trace). C, extracellular recording of a single neuron in the same experiment (bottom trace) and peri-stimulus time histogram computed from the action potential responses evoked by cortical stimulation of 10 recorded neurons. D, the trace shows superimposed action potential responses evoked by electric stimulation of the receptive field (RF) (represented in the paw drawing) of the same neuron recorded in C, and peri-stimulus time histogram computed from the action potential responses evoked by the RF stimulation of the same recorded neurons that respond to cortical stimulation. The arrows indicate the cortical (Cx) and RF stimulation time.  
doi:10.1371/journal.pone.0069063.g006



**Figure 7. Cortical EFPs and DRPs are suppressed after pyramidal tract lesions.** Averaged EFPs (top traces) and DRPs (bottom traces), evoked by contralateral sensorimotor cortex stimulation, recorded in the L4 spinal cord segment before and after electrolytic lesion of the ipsilateral pyramidal tract at the medullary level. The schematic drawing shows the lesion produced in the pyramidal tract. Notice that both DRPs and EFPs are suppressed after pyramidal tract lesion.  
doi:10.1371/journal.pone.0069063.g007

ms stimulation train, suggesting that postsynaptic mechanisms are not involved in this particular potentiation.

The time course of PTP depends on the stimulation train duration and stimulus frequency [29]. Here, we observed that after a 100-ms high frequency stimulation train, there is an increase of synaptic nociceptive responses that lasts for 20 min. Interestingly, we found that cortical stimulation suppressed the augmentation of nociceptive responses produced after a high-frequency stimulation. Moreover, the duration of PTP produced by a longer stimulation train (250 ms), was reduced. Diverse mechanisms could explain how cortical stimulation abolishes PTP of C-fiber EFPs. However, since PTP is principally due to a change in the presynaptic machinery for neurotransmitter release, we can presume that somatosensory cortex inhibits neurotransmitter release from primary C afferents because of a  $\text{GABA}_A$  PAD and presynaptic inhibition. If so, the same effects should be obtained producing PAD by other means, for example by stimulating other cutaneous afferents or other supraspinal structures.

Another form of short-term synaptic plasticity is the paired-pulse facilitation and depression. These forms of plasticity result from changes in the release probability, which depends on the recent history of synapse activation [28]. Changes in the PPR are an indication to assess changes in neurotransmitter release probability in patch clamp as well as in *in vivo* field potential recordings [40]. In the present study, the PPR was analyzed during different states of ongoing activity recorded in the sensorimotor cortex. To this end, BIC was administered at the surface of the sensorimotor cortex to modify the background electrical activity of the cortex. In this way, the cortical activity, measured as the area under the curve of the power spectrum, increased significantly 20 min after BIC cortical administration. In addition, the PPR of these responses increased, indicating a decrease in the probability of neurotransmitter release. Following BIC administration in the sensorimotor, not only was there an

increase in the cortical activity, but also in ongoing spinal cord activity, suggesting that corticospinal neurons were activated by BIC. Previously [6], we have shown that when ongoing cortical activity is suppressed by cortical spreading depression, C-fiber EFPs are increased. Taken together, our results indicate that the sensorimotor cortex exerts a tonic control of nociceptive responses at the dorsal horn level. Moreover, it is possible that any change in the ongoing cortical activity modifies the release probability of the slow conducting afferents that have an impact on nociceptive information. Spontaneous or background cortical activity correlates with the behavioral state [41]; hence, pain perception might depend on behavioral condition. Accordingly, the behavioral state (grooming, alertness, resting, light sleep, deep sleep) was recently reported to have a dramatic effect on pain sensitivity [42].

The effect of cortical activity on PTP and the PPR of C-fiber EFPs suggested that the corticospinal modulation of nociceptive neuronal responses might be exerted at a presynaptic level. Presynaptic control of dorsal horn noxious neuronal responses produced by sensory and motor cortex stimulation has been proposed [2,3,4,5] and the actual set of data are consistent with the presynaptic hypothesis. A well-studied mechanism of presynaptic inhibition in the spinal cord is PAD [43]. In particular, presynaptic inhibition of nociceptive information mediated by PAD, measured as an increase in the excitability of C afferent fibers, has been reported previously [31,44,45,46]. In fact, sensorimotor cortex stimulation in monkeys and cats produces DRPs [20] as well as presynaptic inhibition [21,22,23,24] in large muscular and cutaneous primary afferents. Here, we measured changes in the excitability of C afferent terminals produced by sensorimotor cortex stimulation using Wall's method [30]; since C-fibers are too small to record intraaxonally, this has never been achieved. The time course of changes in the excitability of C-fibers is similar to that reported previously in the rat [31] and follows the time course of DRP produced by contralateral sensorimotor cortex stimulation. Although DRP produced by cortical stimulation is due to PAD predominantly in large cutaneous and muscular afferents, C-fiber DRPs follows a similar temporal course [46]. Our results suggest that cortical stimulation produces PAD in C-fibers, causing an inhibition of action potential propagation into presynaptic terminals and a concomitant reduction in glutamate release to second order dorsal horn neurons [46]. However, the time course of the inhibition of C-fiber EFP conditioned by cortical stimulation [6] is not equal to the DRP produced by contralateral sensorimotor cortex stimulation. Specifically, there is a significant inhibition also at short intervals (<30 ms), suggesting that other, probably postsynaptic, mechanisms are involved as well.

The latencies of the antidromic compound action potentials ( $45.4 \pm 1.1$  ms), recorded in the SU nerve after dorsal horn stimulation, are significant lower ( $p < 0.01$ ;  $n = 41$ ; Mann-Whitney U) than conduction velocities of orthodromic C-fiber EFP recorded in the dorsal horn ( $81.2 \pm 6.2$  ms). This difference could be due to various reasons. First, the orthodromic responses have a different origin than antidromic responses. Orthodromic dorsal horn FPs are evoked by entire nerve stimulation with higher stimulation intensities (0.5–0.8 mA). In contrast, antidromic compound action potentials are evoked by more focal and low intensity (<0.5 mA) stimulation into the dorsal horn. For that reason, it is very likely that only the fastest and most excitable terminals could be activated by dorsal horn stimulation. In any case, the conduction velocities for antidromic ( $1.88 \pm 0.36$  m/s) and orthodromic ( $1.3 \pm 0.2$  m/s) responses correspond to activation of C-fibers.

The contribution of GABA<sub>A</sub> receptors in pain processing is well known [47]. However, evidence of the contribution of PAD mediated by GABA<sub>A</sub> receptors in C-fibers is scarce [43]. Recent evidence has shown that PAD mediated by GABA<sub>A</sub> receptors residing on axons or terminals of C-fibers has a significant role in spinal pain control [46]. The classical view of the neuronal circuit that mediates PAD and presynaptic inhibition involves, in the spinal cord, a minimal trisynaptic pathway with last-order GABAergic inhibitory interneurons that form axo-axonic synapses with primary afferent fibers [43]. However, the experimental evidence for this model is weak, and it is now accepted that presynaptic inhibition is more diverse than previously imagined and has distinct mechanisms for each genetically distinct afferent fiber population [48]. Nevertheless, the fact that BIC completely blocks the inhibition of C-fiber dorsal horn responses produced by sensorimotor cortex stimulation suggests that pyramidal descending fibers activate, either directly or indirectly, GABAergic interneurons that in turn produce PAD in C-primary afferent terminals. Further experiments are necessary to know if different populations of nociceptors are modulated via other mechanisms distinct from GABA-mediated PAD.

Numerous efforts to identify and characterize the PAD-mediating interneurons have been made [49,50,51]. In particular, the interneurons that are activated by sensorimotor cortex were also activated by electrical stimulation of cutaneous and muscular afferent nerves and the spike discharge follows the time course of DRP produced in large cutaneous and muscular primary afferent [22]. This suggests that a convergence exists somewhere in the pathways that produce segmentally and descending-evoked DRPs [26]. In accord with these results, here we found that the recorded neurons were activated by sensorimotor cortex stimulation also had a peripheral receptive field and were activated by slight mechanical stimulation. The calculated conduction velocity of the fibers responsible for activating these neurons, correspond to the conduction velocities of cutaneous A $\beta$  fibers reported in the rat [52]. In contrast, we found no neurons related to DRPs. Additionally, the neurons responding to sensorimotor cortex stimulation were distributed between depths of 200 and 400  $\mu$ m, corresponding to laminae II–III. It remains to be determined if the neurons receiving convergent input from sensorimotor cortex and from low-threshold primary afferents are GABAergic [53] and are responsible for increasing the excitability of slow conducting afferents.

The corticospinal projection constitutes a system with multiple functions that share one characteristic: the cortical modulation of spinal cord activity [1]. One of the most-studied functions of this descending system is motor control, which results from direct and indirect modulation of spinal cord interneurons and motoneurons [54,55,56,57]. This system is also involved in modulating sensory information at the dorsal horn [58], including nociception [6]. In this way, it has been proposed that during the onset of voluntary movements there is a complex selection of sensory information, including muscular, tactile, and nociceptive information, that is required for the proper execution of the movements [59,60,61]. However, little is known about the organization of corticospinal projections, the intracortical microcircuitry, and the synaptic interactions in the sensorimotor cortex that may encode cortical output to the spinal cord. Understanding this organization is important in order to know, in an integrative way, the special features of the human motor system that are particularly vulnerable to neurological diseases, including stroke, cerebral palsy, movement disorders, spinal cord injury, and motoneuron disease.

## Conclusion

The sensorimotor cortex modulates nociceptive information carried by C-fibers by means of a presynaptic GABAergic mechanism that involves primary afferent depolarization.

## Supporting Information

**Figure S1 Cortical EFPs.** A, averaged cortical EFPs (top traces), evoked by contralateral sensorimotor cortex stimulation, recorded in the L4 spinal cord segment. The drawing shows the relative position of the stimulation zones in the cortex. The red trace was produced by stimulating a zone located 1.5 mm medially from the blue trace. B, the graph shows the relationship between the stimulation intensity and the cortical EFP amplitude. C, amplitudes of averaged cortical EFPs recorded at different depths from the dorsal surface of the spinal cord computed in 6 experiments. D, isopotential contours of cortical EFP from a series of four parallel recording tracts. Notice that the maximal negativity occurs in the dorsal horn between depths of 200 and 400  $\mu\text{m}$ . (TIF)

**Figure S2 Antidromic responses recorded in the SU nerve following stimulation of the dorsal horn.** A, conduction velocity of the SU nerve fibers was determined with the upper experimental arrangement. The upper traces show the antidromic responses produced by dorsal horn stimulation (400  $\mu\text{A}$ ) recorded at two different locations on the SU nerve and separated by 1.5 cm. B, threshold of the SU nerve fibers producing the late responses was determined with the lower experimental arrangement. The lower traces show the antidromic responses produced by dorsal horn stimulation (solid arrow) accompanied by additional stimulation of the SU nerve (dotted arrow) with strength of  $1 \times T$  (black trace),  $15 \times T$  (blue trace) and with strength of  $30 \times T$  (red trace) of the most excitable fibers. The stimulating electrode in the SU nerve was located 4 mm from the recording electrode. Notice the collision of the antidromic response. The asterisks indicate the point at which the antidromic response would have occurred. (TIF)

**Figure S3 C-fiber EFPs.** A, averaged C-fiber EFPs (top traces) produced by two stimulating electrodes located 3 cm apart on the sciatic (SN) and sural (SU) nerves. The drawing shows the relative positions of the electrodes. Notice the similarity of the two responses. B, relationship between the stimulation intensity and

the amplitude of the C-fiber EFPs. C, relationship between EFP amplitude and recording depth. (TIF)

**Figure S4 C-fiber EFP PTP does not depend on NMDA receptor activation.** A, PTP time course of C-fiber EFPs after a stimulation train of 250 ms delivered to the SN alone (black symbols) and when the SN high-frequency stimulation was applied in parallel with high-frequency stimulation to the contralateral sensorimotor cortex (red symbols). B, PTP time course of C-fiber EFPs after a 100-ms stimulation train delivered to the SN in control conditions (black symbols) and in the presence of the NMDA receptor antagonist CPP (red symbols). The symbols outside the gray band are statistically different from the basal responses (Friedman test,  $p < 0.05$ ). (TIF)

**Figure S5 Changes in cortical and dorsal horn ongoing activity following BIC cortical administration.** A, power spectrum of the spontaneous cortical activity recorded for 30 sec. The insert shows a sample of spontaneous field potential recorded in the sensorimotor cortex (1000  $\mu\text{m}$  depth, 2.5 mm caudal to bregma and 3 mm from the midline). B, the same but after 20 min of BIC topical administration (100  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) on the surface of the sensorimotor cortex. C, the same but after wash. D–F, the same as A–C but power spectra were computed from spontaneous dorsal horn activity recorded simultaneously. G, changes in the area below the curve computed from the power spectra of cortical activity during BIC administration. H, the same as G but for the dorsal horn activity. I, graph showing a significant positive correlation between the area below the curve computed from the cortical and dorsal horn activity power spectra (Spearman  $r = 0.6$ ,  $p = 0.03$ ). (TIF)

## Acknowledgments

We thank Dr. Dorothy D. Pless for revising the grammatical aspects of the manuscript and Javier Rodríguez-Jiménez for technical assistance. This paper was part of the PhD thesis of YML in the Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GRP. Performed the experiments: YML JPS. Analyzed the data: YML JPS GRP MCL GML. Contributed reagents/materials/analysis tools: YML JPS GRP MCL GML. Wrote the paper: GRP. Equal contribution: YML JPS.

## References

- Lemon RN, Griffiths J (2005) Comparing the function of the corticospinal system in different species: organizational differences for motor specialization? *Muscle Nerve* 32: 261–279.
- Goulter JD, Maunz RA, Willis WD (1974) Effects of stimulation of sensorimotor cortex on primate spinothalamic neurons. *Brain Res* 65: 351–356.
- Yeziński RP, Gerhart KD, Schrock BJ, Willis WD (1983) A further examination of effects of cortical stimulation on primate spinothalamic tract cells. *J Neurophysiol* 49: 424–441.
- Senapati AK, Huntington PJ, LaGraize SC, Wilson HD, Fuchs PN, et al. (2005) Electrical stimulation of the primary somatosensory cortex inhibits spinal dorsal horn neuron activity. *Brain Res* 1057: 134–140.
- Senapati AK, Huntington PJ, Peng YB (2005) Spinal dorsal horn neuron response to mechanical stimuli is decreased by electrical stimulation of the primary motor cortex. *Brain Res* 1036: 173–179.
- Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Condes-Lara M, Rodríguez-Jiménez J (2010) Direct sensorimotor corticospinal modulation of dorsal horn neuronal C-fiber responses in the rat. *Brain Res* 1351: 104–114.
- Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, Hirayama T, Koyama S (1991) Chronic motor cortex stimulation for the treatment of central pain. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 52: 137–139.
- Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, Hirayama T, Koyama S (1991) Treatment of thalamic pain by chronic motor cortex stimulation. *Pacing Clin Electrophysiol* 14: 131–134.
- Meyerson BA, Lindblom U, Linderöth B, Lind G, Herregodts P (1993) Motor cortex stimulation as treatment of trigeminal neuropathic pain. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 58: 150–153.
- Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, Hirayama T, Koyama S (1993) Chronic motor cortex stimulation in patients with thalamic pain. *J Neurosurg* 78: 393–401.
- Nguyen JP, Keravel Y, Fève A, Uchiyama T, Cesaro P, et al. (1997) Treatment of deafferentation pain by chronic stimulation of the motor cortex: report of a series of 20 cases. *Acta Neurochir Suppl* 68: 54–60.
- Katayama Y, Fukaya C, Yamamoto T (1998) Poststroke pain control by chronic motor cortex stimulation: neurological characteristics predicting a favorable response. *J Neurosurg* 89: 585–591.
- Mertens P, Nuti C, Sindou M, Guenet M, Peyron R, et al. (1999) Precentral cortex stimulation for the treatment of central neuropathic pain: results of a prospective study in a 20-patient series. *Stereotact Funct Neurosurg* 73: 122–125.
- Nguyen JP, Lefaucheur JP, Decq P, Uchiyama T, Carpentier A, et al. (1999) Chronic motor cortex stimulation in the treatment of central and neuropathic

- pain. Correlations between clinical, electrophysiological and anatomical data. *Pain* 82: 243–251.
15. Lefaucheur JP, Drouot X, Nguyen JP (2001) Interventional neurophysiology for pain control: duration of pain relief following repetitive transcranial magnetic stimulation of the motor cortex. *Neurophysiol Clin* 31: 247–252.
  16. Brown JA, Barbaro NM (2003) Motor cortex stimulation for central and neuropathic pain: current status. *Pain* 104: 431–435.
  17. Notti C, Peyron R, Garcia-Larrea L, Brunon J, Laurent B, et al. (2005) Motor cortex stimulation for refractory neuropathic pain: four year outcome and predictors of efficacy. *Pain* 118: 43–52.
  18. Osenbach RK (2006) Motor cortex stimulation for intractable pain. *Neurosurg Focus* 21: E7.
  19. Lundberg A, Voorhoeve P (1962) Effects from the pyramidal tract on spinal reflex arcs. *Acta Physiol Scand* 56: 201–219.
  20. Abdelmoumene M, Besson JM, Almonard P (1970) Cortical areas exerting presynaptic inhibitory action on the spinal cord in cat and monkey. *Brain Res* 20: 327–329.
  21. Andersen P, Eccles JC, Sears TA (1962) Presynaptic inhibitory action of cerebral cortex on the spinal cord. *Nature* 194: 740–741.
  22. Andersen P, Eccles JC, Sears TA (1964) Cortically Evoked Depolarization of Primary Afferent Fibers in the Spinal Cord. *J Neurophysiol* 27: 63–77.
  23. Rudomin P, Solodkin M, Jimenez I (1986) PAD and PAH response patterns of group Ia- and Ib-fibers to cutaneous and descending inputs in the cat spinal cord. *J Neurophysiol* 56: 987–1006.
  24. Eguibar JR, Quevedo J, Rudomin P (1997) Selective cortical and segmental control of primary afferent depolarization of single muscle afferents in the cat spinal cord. *Exp Brain Res* 113: 411–430.
  25. Hongo T, Jankowska E (1967) Effects from the sensorimotor cortex on the spinal cord in cats with transected pyramids. *Exp Brain Res* 3: 117–134.
  26. Wall PD, Lidforth M (1997) Five sources of a dorsal root potential: their interactions and origins in the superficial dorsal horn. *J Neurophysiol* 78: 860–871.
  27. Aggelopoulos NC, Chakrabarty S, Edgley SA (2008) Presynaptic control of transmission through group II muscle afferents in the midlumbar and sacral segments of the spinal cord is independent of corticospinal control. *Exp Brain Res* 187: 61–70.
  28. Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33: 18–41.
  29. Fioravante D, Regehr WG (2011) Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 21: 269–274.
  30. Wall PD (1958) Excitability changes in afferent fiber terminations and their relation to slow potentials. *J Physiol* 142: 1–21.
  31. Fitzgerald M, Woolf CJ (1981) Effects of cutaneous nerve and intraspinal conditioning of C-fiber afferent terminal excitability in decerebrate spinal rats. *J Physiol* 318: 25–39.
  32. Schouboe J (1984) Functional and topographical properties of field potentials evoked in rat dorsal horn by cutaneous C-fiber stimulation. *J Physiol* 356: 169–192.
  33. Li CL, Bak A (1976) Excitability characteristics of the A- and C-fibers in a peripheral nerve. *Exp Neurol* 50: 67–79.
  34. Liu X, Sandkuhler J (1997) Characterization of long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors. *J Neurophysiol* 78: 1973–1982.
  35. Bardoni R, Takazawa T, Tong CK, Choudhury P, Scherrer G, et al. (2013) Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Ann NY Acad Sci* 1279: 90–96.
  36. Habets RL, Borst JG (2005) Post-tetanic potentiation in the rat calyx of Held synapse. *J Physiol* 564: 173–187.
  37. Bao JX, Kandel ER, Hawkins RD (1997) Involvement of pre- and postsynaptic mechanisms in posttetanic potentiation at Aplysia synapses. *Science* 275: 969–973.
  38. Eccles JC, Krnjevic K (1959) Presynaptic changes associated with post-tetanic potentiation in the spinal cord. *J Physiol* 149: 274–287.
  39. Draganic P, Miletic G, Miletic V (2001) Changes in post-tetanic potentiation of A-fiber dorsal horn field potentials parallel the development and disappearance of neuropathic pain after sciatic nerve ligation in rats. *Neurosci Lett* 301: 127–130.
  40. Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64: 355–405.
  41. Bullock TH, Basar E (1980) Comparison of ongoing compound field potentials in the brains of invertebrates and vertebrates. *Brain Res* 472: 57–75.
  42. Callahan BL, Gil AS, Levesque A, Mogil JS (2008) Modulation of mechanical and thermal nociceptive sensitivity in the laboratory mouse by behavioral state. *J Pain* 9: 174–184.
  43. Rudomin P, Schmidt RF (1999) Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp Brain Res* 129: 1–37.
  44. Hentall ID, Fields HL (1979) Segmental and descending influences on intraspinal thresholds of single C-fibers. *J Neurophysiol* 42: 1527–1537.
  45. Calvillo O, Madrid J, Rudomin P (1982) Presynaptic depolarization of unmyelinated primary afferent fibers in the spinal cord of the cat. *Neuroscience* 7: 1389–1409.
  46. Wischi R, Pannakkal P, Paul J, Walczak JS, Cervero F, et al. (2011) Presynaptic  $\alpha$ 2-GABA receptors in primary afferent depolarization and spinal pain control. *J Neurosci* 31: 8134–8142.
  47. Zellhofer HU, Wildner H, Yezzen GE (2012) Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev* 92: 193–235.
  48. Hochman S, Shreckengost J, Kimura H, Quevedo J (2010) Presynaptic inhibition of primary afferents by depolarization: observations supporting nontraditional mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 1198: 140–152.
  49. Solodkin M, Jimenez I, Rudomin P (1984) Identification of common interneurons mediating pre- and postsynaptic inhibition in the cat spinal cord. *Science* 224: 1453–1456.
  50. Rudomin P, Solodkin M, Jimenez I (1987) Synaptic potentials of primary afferent fibers and motoneurons evoked by single intermediate nucleus interneurons in the cat spinal cord. *J Neurophysiol* 57: 1288–1313.
  51. Quevedo J, Eguibar JR, Lomeli J, Rudomin P (1997) Patterns of connectivity of spinal interneurons with single muscle afferents. *Exp Brain Res* 115: 387–402.
  52. Djoufiri L, Lawson SN (2004) A-beta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 46: 131–145.
  53. Daniele CA, MacDermott AB (2009) Low-threshold primary afferent drive onto GABAergic interneurons in the superficial dorsal horn of the mouse. *J Neurosci* 29: 686–695.
  54. Everts EV, Tanji J (1976) Reflex and intended responses in motor cortex pyramidal tract neurons of monkey. *J Neurophysiol* 39: 1069–1080.
  55. Porter R, Lemon R (1993) Corticospinal function and voluntary movement. Oxford Oxford, New York: Clarendon Press; Oxford University Press, xviii, 420 p. p.
  56. Jankowska E, Padel Y, Tanaka R (1976) Disynaptic inhibition of spinal motoneurons from the motor cortex in the monkey. *J Physiol* 258: 467–487.
  57. Maier MA, Illert M, Kirkwood PA, Nielsen J, Lemon RN (1998) Does a C3–C4 propriospinal system transmit corticospinal excitation in the primate? An investigation in the macaque monkey. *J Physiol* 511 (Pt1): 191–212.
  58. Eguibar JR, Quevedo J, Jimenez I, Rudomin P (1994) Selective cortical control of information flow through different intraspinal collaterals of the same muscle afferent fiber. *Brain Res* 643: 329–333.
  59. Hultborn H, Meunier S, Pierrot-Descilligny E, Shindo M (1987) Changes in presynaptic inhibition of Ia fibers at the onset of voluntary contraction in man. *J Physiol* 389: 757–772.
  60. Hultborn H, Meunier S, Morin C, Pierrot-Descilligny E (1987) Assessing changes in presynaptic inhibition of Ia fibers: a study in man and the cat. *J Physiol* 389: 729–756.
  61. Le Pera D, Brancucci A, De Armas L, Del Percio C, Millicci R, et al. (2007) Inhibitory effect of voluntary movement preparation on cutaneous heat pain and laser-evoked potentials. *Eur J Neurosci* 25: 1900–1907.



# Sensorimotor Integration by Corticospinal System

Yunuen Moreno-López<sup>1</sup>, Rafael Olivares-Moreno<sup>1</sup>, Matilde Cordero-Erausquin<sup>2</sup> and Gerardo Rojas-Piloni<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, México, <sup>2</sup> Unité Propre de Recherche 3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR 3212 CNRS, Strasbourg, France

The corticospinal (CS) tract is a complex system which targets several areas of the spinal cord. In particular, the CS descending projection plays a major role in motor command, which results from direct and indirect control of spinal cord pre-motor interneurons as well as motoneurons. But in addition, this system is also involved in a selective and complex modulation of sensory feedback. Despite recent evidence confirms that CS projections drive distinct segmental neural circuits that are part of the sensory and pre-motor pathways, little is known about the spinal networks engaged by the corticospinal tract (CST), the organization of CS projections, the intracortical microcircuitry, and the synaptic interactions in the sensorimotor cortex (SMC) that may encode different cortical outputs to the spinal cord. Here is stressed the importance of integrated approaches for the study of sensorimotor function of CS system, in order to understand the functional compartmentalization and hierarchical organization of layer 5 output neurons, who are key elements for motor control and hence, of behavior.

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Francesco Fornai,  
University of Pisa, Italy

### Reviewed by:

Yoshiko Izawa,  
Tokyo Medical and Dental University,  
Japan

Riccardo Ruffo,  
University of Pisa, Italy

### \*Correspondence:

Gerardo Rojas-Piloni  
piloni@unam.mx

**Received:** 09 November 2015

**Accepted:** 24 February 2016

**Published:** 09 March 2016

### Citation:

Moreno-López Y, Olivares-Moreno R, Cordero-Erausquin M and Rojas-Piloni G (2016) Sensorimotor Integration by Corticospinal System. *Front. Neuroanat.* 10:24. doi: 10.3389/fnana.2016.00024

**Keywords:** corticospinal tract, spinal cord, dorsal horn, corticomotoneuronal, sensorimotor cortex, presynaptic inhibition

## THE CORTICOSPINAL TRACT AND THE SENSORIMOTOR CONTROL

The sensorimotor cortex (SMC) has improved the capacity of mammals to learn and execute new and skillful movements (Nudo and Frost, 2009). Additionally, the SMC has access to contextual, sensory and planning information from other neocortical areas that may not be independently available to subcortical and spinal motor circuits. The SMC recruits phylogenetically older neuronal circuits in the magnocellular red nucleus, reticular formation and spinal cord to execute movements properly. In particular, the corticospinal tract (CST) is a key element of the motor command. The majority of the corticospinal (CS) connections with the motoneurons are established through premotor neurons (Lemon and Griffiths, 2005; Lemon, 2008), however, the direct connections of CST to motoneurons are the basis for hand dexterity such as the potential to control fractioned digit movements (Isa et al., 2013).

Additionally, any movement produces activation of peripheral receptors (proprioceptive and cutaneous) generating self-induced activity that is transmitted to the central nervous system where it interacts with motor commands and other processes (Rudomin, 1999; Rudomin and Schmidt, 1999; Seki et al., 2003). When entering the spinal cord, primary afferents can be modulated by primary afferent depolarization (PAD) leading to presynaptic inhibition of

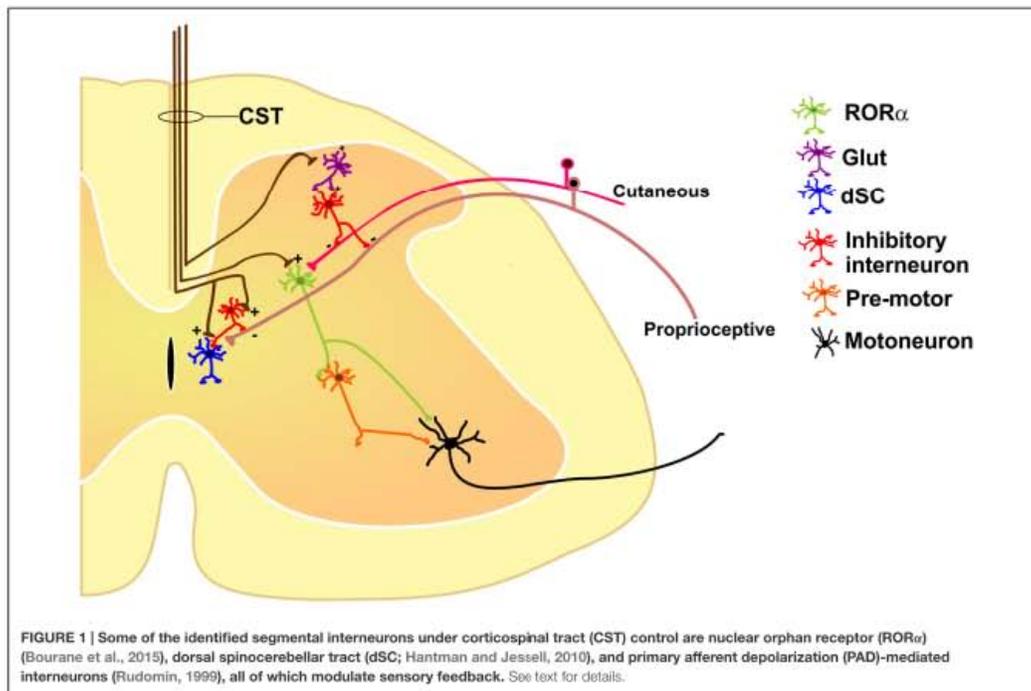
neurotransmitter release and hence modifying the inputs to second-order neurons (Hochman et al., 2010).

PAD, and hence presynaptic inhibition of different cutaneous and proprioceptive classes of sensory afferents, can be produced by stimulation of other sensory afferents (sensory feedback), but also by supraspinal structures, like the SMC (Carpenter et al., 1963; Andersen et al., 1964; Abdelmoumene et al., 1970; Aggelopoulos et al., 2008; Moreno-López et al., 2013) and pyramidal tract (Rudomin et al., 1986). This cortical control of sensory inputs in the spinal cord occurs in a very selective manner (Eguibar et al., 1994, 1997; Lomeli et al., 1998), which is crucial for motor control and for the proper execution of movements (Lebedev and Nelson, 1996). Moreover, presynaptic inhibition is important during voluntary movements (Hultborn et al., 1987a,b), and a descending system like the CST has a dominant role in producing presynaptic inhibition of sensory afferents compared to peripheral feedback resulting from movement. Furthermore, descending systems reduce specific peripheral inputs that can interfere with ascending commands and with spinal circuits during voluntary movement (Seki et al., 2003). This implies that the cerebral cortex could recruit spinal cord neuronal circuits that select the sensory information which is suitable for proper execution of a volitional movement, which is an additional level of sensorimotor integration.

## SPINAL CORD INTERNEURONS UNDER CORTICAL CONTROL

Spinal motoneurons are directly contacted by CS neurons in most primates, which is particularly important for high precision, manipulatory skills involving independent finger movements. However, an indirect cortico-motoneuronal connection through premotor interneurons has been also observed in both primates (Lemon, 2008) and in the mouse (Alstermark et al., 2004). Although, convergence from the CST and sensory afferents on segmental and propriospinal neurons projecting to motoneurons has been studied mainly in cats and primates, cellular and molecular properties of these premotor interneurons has been studied with more detail in rodents (Zagoraoui et al., 2009; Ni et al., 2014).

CST directly modulates segmental interneurons involved in sensory feedback, such that the interneurons responsible for PAD are directly activated by cortex stimulation (Carpenter et al., 1963). Moreover, a set of dorsal spinocerebellar tract (dSC) neurons, which receive proprioceptive-sensory inputs from group-I afferents also are activated by CST. Indeed the probability of dorsal root-evoked action potentials can be reduced by CS activity, and dSC neurons can also be directly inhibited by glycinergic and GABAergic inputs



from interneurons activated by CS fibers. Thus, CST exerts presynaptic inhibitory control on a complex interneuronal system mediating the transmission from terminals of primary afferent fibers to spinocerebellar neurons (Hantman and Jessell, 2010).

More recently, it was shown that interneurons expressing the nuclear orphan receptor ( $ROR\alpha$ ) participate in light-touch perception as well as in corrective foot movement and fine motor control (Bourane et al., 2015).  $ROR\alpha$  interneurons are also innervated by projection neurons of the lateral vestibular nucleus and CST. These interneurons integrate sensory inputs from cutaneous, low-threshold mechanoreceptors and descending motor signals from the cortex, suggesting an important implication of the CST in the modulation of sensory signals for the proper execution of volitive movements.

All these results suggest that the cortex has diverse outputs by means of the CST, modulating different classes of excitatory and inhibitory spinal neurons and forming distinct spinal cord neuronal circuits which, together, participate in sensorimotor integration (Figure 1).

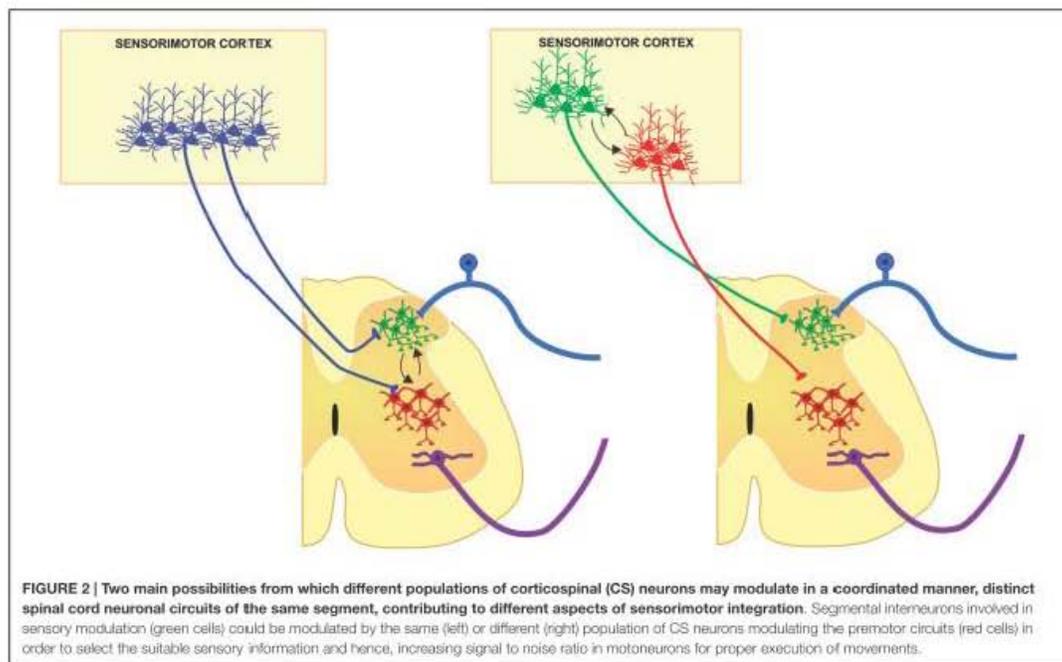
## COMPARATIVE ANATOMY AND PHYSIOLOGY OF CST

The CST is present in all mammals and the general course of the CST is well-known in different species (Armand, 1982; Lemon, 2008). It originates from multiple motor

and somatosensory cortices including premotor cortex, supplementary motor cortex, primary motor cortex, as well as primary and secondary somatosensory cortices (Ullan and Artieda, 1981; Miller, 1987; Galea and Darian-Smith, 1994; Lemon, 2008).

The CST provides the most direct pathway over which the cerebral cortex controls movement, using the primitive neuronal circuits into the spinal cord to generate motor output. CST axons terminate in all gray matter of the spinal cord (Armand, 1982), however in rodents and marsupials this influence is exerted largely upon interneurons in the dorsal horn of the spinal gray matter. Ascending the phylogenetic scale through carnivores and primates, the number of CS axons grows and CS terminations shift progressively toward the interneurons of the intermediate zone and ventral horn, ultimately forming increasing numbers of synaptic terminations directly on the motoneurons themselves in higher primates (for review, see Schieber, 2007).

CS neurons that make monosynaptic connections with motoneurons (corticomotoneuronal neurons) are a relatively new phylogenetic and ontogenetic development. Furthermore, in higher primates corticomotoneuronal cells are located in a separate part of the primary motor cortex than the CS cells contacting to spinal cord interneurons (Rathelot and Strick, 2009). These two CS cells are differentially involved in motor learning: CS cells contacting to spinal interneurons could be important during the initial stages of learning new skills by enabling the SMC to use existing spinal circuits to



rapidly construct new movement patterns. In contrast, the new corticomotoneuronal connections may be especially important during the later stages of learning a new skill by enabling the motor cortex to refine and precisely specify patterns of motor output (Rathelot and Strick, 2009; Hudson et al., 2015).

It is self-evident that some characteristic features, such as skilled forelimb control associated with bipedalism, are product of specializations of CS system, like corticomotoneuronal connections from primary motor cortex. In contrast, other sensorimotor patterns have proven extremely successful, shaped by natural selection over extended periods of time. In this way, the CS descending control of sensory inputs from somatosensory cortices to the dorsal horn is found in all mammals (Lemon and Griffiths, 2005). But beyond the phylogenetic point of view, it is clear that CST is a complex and diverse system with multiple targets within the spinal cord, in different laminae (dorsal/ventral) and/or at different segmental levels (Akintunde and Buxton, 1992; Biane et al., 2015; Kamiyama et al., 2015). In this way, sensorimotor integration mediated by CS system may have important consequences, especially considering that sensory modulation occurs within the dorsal spinal cord, and motor output triggered by premotor interneurons as well as motoneurons take place in the intermediate and ventral horn. Interestingly, in the upper cervical cord the projections of primary and secondary somatosensory cortex ramify extensively in the most dorsal and lateral regions of the spinal cord, while primary motor cortex projects more ventrally (Coulter and Jones, 1977; Suter and Shepherd, 2015).

It is tempting to propose that CST is functionally and structurally organized into different subsystems controlling in a coordinated manner distinct spinal cord circuits. This could be the case since layer 5 pyramidal neurons projecting subcortically are extremely diverse and heterogeneous class of cells. In addition to the spinal cord, they project to several structures like striatum, posteromedial thalamic nucleus, superior colliculus, pontine nuclei, red nucleus and reticular formation (Killackey et al., 1989; Akintunde and Buxton, 1992; Porter and Lemon, 1993; Hattox and Nelson, 2007; Groh et al., 2010). Moreover, all layer 5 neurons projecting to subcortical targets within the SMC form segregated populations projecting mainly individually to the subcortical structures (Jones and Wise, 1977; Akintunde and Buxton, 1992) and have electrophysiological (Hattox and Nelson, 2007) and morphological (Killackey et al., 1989) characteristics that distinguish each class. The impact of this differential projection remains to be established, although it could have functional relevance because all these targets are associated with different aspects of sensorimotor control.

## FUTURE DIRECTIONS TO UNCOVER CORTICOSPINAL FUNCTIONS

Sensory and motor functions are intimately related. Most movements give rise to an altered sensory environment (for example, proprioceptive, tactile, visual or olfactory); on

the other hand, sensation is usually not passive but rather acquired in an active context (limb or eye movement, sniffing, etc.). Conceptually, the interaction between the sensory and motor systems should rely on feedback and closed-loop circuits. At the spinal cord level, the CST terminates not only in the ventral horns containing the motoneurons, but also massively in the dorsal aspects of the cord (Lemon, 2008), traditionally viewed as the “sensory” horn. This duality of function suggests that the cortex segregates these commands through different subpopulations of CS neurons, which may drive distinct populations of segmental inhibitory or excitatory interneurons like ROR $\alpha$ , dSC and PAD-mediating interneurons or even other unexplored types (Figure 1).

Historically, CST has been considered a unitary structure controlling motoneuron function. This view is now changing thanks to anatomical evidences showing the diversity of origin and CST connections in the spinal cord obtained in different species. Moreover, the fact that different populations of sensorimotor cortical neurons project in a segregated manner to different subcortical structures support the idea that also the CST is composed by subsystems controlling different spinal cord circuits that modulate motor outputs and sensory inputs in a coordinated manner. However, in order to fully know the physiological diversity of corticospinal system, experiments combining functional and anatomical approaches should be designed to disclose if segregated populations of corticospinal neurons modulates distinct spinal cord neuronal circuits. This could imply a functional compartmentalization and hierarchical organization between layer 5 output corticospinal neurons (Figure 2); therefore, future analysis of the organization of the cortical outputs to the spinal cord during movement would be important to understand the functional organization of the cortical circuits implicated in different aspects of motor control, and finally behavior.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

YM-L and RO-M drafted the article. MC-E and GR-P edited the article. GR-P approved the final version.

## FUNDING

Supported by CONACYT (grant 176782) and PAPIIT (grant IN200615).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Dorothy D. Pless for revising the grammatical aspects of the manuscript, Cutberto Dorado for technical assistance. YM-L and RO-M are doctoral students from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowships (233849 and 317553) from CONACYT.

## REFERENCES

- Abdelmoumene, M., Besson, J. M., and Aleonard, P. (1970). Cortical areas exerting presynaptic inhibitory action on the spinal cord in cat and monkey. *Brain Res.* 20, 327–329. doi: 10.1016/0006-8993(70)90301-x
- Aggelopoulos, N. C., Chakrabarty, S., and Edgley, S. A. (2008). Presynaptic control of transmission through group II muscle afferents in the midlumbar and sacral segments of the spinal cord is independent of corticospinal control. *Exp. Brain Res.* 187, 61–70. doi: 10.1007/s00221-008-1279-y
- Akintunde, A., and Buxton, D. F. (1992). Differential sites of origin and collateralization of corticospinal neurons in the rat: a multiple fluorescent retrograde tracer study. *Brain Res.* 575, 86–92. doi: 10.1016/0006-8993(92)90427-b
- Alstermark, B., Ogawa, J., and Isa, T. (2004). Lack of monosynaptic corticomotoneuronal EPSPs in rats: disynaptic EPSPs mediated via reticulospinal neurons and polysynaptic EPSPs via segmental interneurons. *J. Neurophysiol.* 91, 1832–1839. doi: 10.1152/jn.00820.2003
- Andersen, P., Eccles, J. C., and Sears, T. A. (1964). Cortically evoked depolarization of primary afferent fibers in the spinal cord. *J. Neurophysiol.* 27, 63–77.
- Armand, J. (1982). The origin, course and terminations of corticospinal fibers in various mammals. *Prog. Brain Res.* 57, 329–360. doi: 10.1016/s0079-6123(08)64136-9
- Biane, J. S., Scanziani, M., Tuszyński, M. H., and Conner, J. M. (2015). Motor cortex maturation is associated with reductions in recurrent connectivity among functional subpopulations and increases in intrinsic excitability. *J. Neurosci.* 35, 4719–4728. doi: 10.1523/jneurosci.2792-14.2015
- Bourane, S., Grossmann, K. S., Britz, O., Dalet, A., Del Barrio, M. G., Stam, F. J., et al. (2015). Identification of a spinal circuit for light touch and fine motor control. *Cell* 160, 503–515. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.011
- Carpenter, D., Lundberg, A., and Norrsell, U. (1963). Primary afferent depolarization evoked from the sensorimotor cortex. *Acta Physiol. Scand.* 59, 126–142. doi: 10.1111/j.1748-1716.1963.tb02729.x
- Coulter, J. D., and Jones, E. G. (1977). Differential distribution of corticospinal projections from individual cytoarchitectonic fields in the monkey. *Brain Res.* 129, 335–340. doi: 10.1016/0006-8993(77)90012-9
- Eguibar, J. R., Quevedo, J., and Rudomin, P. (1997). Selective cortical and segmental control of primary afferent depolarization of single muscle afferents in the cat spinal cord. *Exp. Brain Res.* 113, 411–430. doi: 10.1007/pl00005595
- Eguibar, J. R., Quevedo, J., Jimenez, I., and Rudomin, P. (1994). Selective cortical control of information flow through different intraspinal collaterals of the same muscle afferent fiber. *Brain Res.* 643, 328–333. doi: 10.1016/0006-8993(94)90042-6
- Galea, M. P., and Darian-Smith, I. (1994). Multiple corticospinal neuron populations in the macaque monkey are specified by their unique cortical origins, spinal terminations and connections. *Cereb. Cortex* 4, 166–194. doi: 10.1093/cercor/4.2.166
- Groh, A., Meyer, H. S., Schmidt, E. F., Heintz, N., Sakmann, B., and Krieger, P. (2010). Cell-type specific properties of pyramidal neurons in neocortex underlying a layout that is modifiable depending on the cortical area. *Cereb. Cortex* 20, 826–836. doi: 10.1093/cercor/bhp152
- Hantman, A. W., and Jessell, T. M. (2010). Clarke's column neurons as the focus of a corticospinal collaterals circuit. *Nat. Neurosci.* 13, 1233–1239. doi: 10.1038/nn.2637
- Hattox, A. M., and Nelson, S. B. (2007). Layer V neurons in mouse cortex projecting to different targets have distinct physiological properties. *J. Neurophysiol.* 98, 3330–3340. doi: 10.1152/jn.00397.2007
- Hochman, S., Shreckengost, J., Kimura, H., and Quevedo, J. (2010). Presynaptic inhibition of primary afferents by depolarization: observations supporting nontraditional mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1198, 140–152. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05436.x
- Hudson, H. M., Griffin, D. M., Belhaj-Saif, A., and Cheney, P. D. (2015). Properties of primary motor cortex output to hindlimb muscles in the macaque monkey. *J. Neurophysiol.* 113, 937–949. doi: 10.1152/jn.00099.2014
- Hultborn, H., Meunier, S., Morin, C., and Pierrot-Deseilligny, E. (1987a). Assessing changes in presynaptic inhibition of Ia fibres: a study in man and the cat. *J. Physiol.* 389, 729–756. doi: 10.1113/jphysiol.1987.sp016680
- Hultborn, H., Meunier, S., Pierrot-Deseilligny, E., and Shindo, M. (1987b). Changes in presynaptic inhibition of Ia fibres at the onset of voluntary contraction in man. *J. Physiol.* 389, 757–772. doi: 10.1113/jphysiol.1987.sp016681
- Isa, T., Kinoshita, M., and Nishimura, Y. (2013). Role of direct vs. indirect pathways from the motor cortex to spinal motoneurons in the control of hand dexterity. *Front. Neurol.* 4:191. doi: 10.3389/fneur.2013.00191
- Jones, E. G., and Wise, S. P. (1977). Size, laminar and columnar distribution of efferent cells in the sensory-motor cortex of monkeys. *J. Comp. Neurol.* 175, 391–438. doi: 10.1002/cne.901750403
- Kamiyama, T., Kameda, H., Murabe, N., Yoshioka, N., Mizukami, H., et al. (2015). Corticospinal tract development and spinal cord innervation differ between cervical and lumbar targets. *J. Neurosci.* 35, 1181–1191. doi: 10.1523/jneurosci.2842-13.2015
- Killackey, H. P., Koralek, K. A., Chiaia, N. L., and Rhodes, R. W. (1989). Laminar and areal differences in the origin of the subcortical projection neurons of the rat somatosensory cortex. *J. Comp. Neurol.* 282, 428–445. doi: 10.1002/cne.902820309
- Lebedev, M. A., and Nelson, R. J. (1996). High-frequency vibratory sensitive neurons in monkey primary somatosensory cortex: entrained and nonentrained responses to vibration during the performance of vibratory-cued hand movements. *Exp. Brain Res.* 111, 313–325. doi: 10.1007/bf00228721
- Lemon, R. N. (2008). Descending pathways in motor control. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 195–218. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125547
- Lemon, R. N., and Griffiths, J. (2005). Comparing the function of the corticospinal system in different species: organizational differences for motor specialization? *Muscle Nerve* 32, 261–279. doi: 10.1002/mus.20333
- Lomeli, J., Quevedo, J., Linares, P., and Rudomin, P. (1998). Local control of information flow in segmental and ascending collaterals of single afferents. *Nature* 395, 600–604. doi: 10.1038/26975
- Miller, M. W. (1987). The origin of corticospinal projection neurons in rat. *Exp. Brain Res.* 67, 339–351. doi: 10.1007/bf00248554
- Moreno-López, Y., Perez-Sanchez, J., Martínez-Lorenzana, G., Condes-Lara, M., and Rojas-Piloni, G. (2013). Cortical presynaptic control of dorsal horn C-afferents in the rat. *PLoS One* 8:e69063. doi: 10.1371/journal.pone.0069063
- Ni, Y., Nawabi, H., Liu, X., Yang, L., Miyamichi, K., Tedeschi, A., et al. (2014). Characterization of long descending premotor propriospinal neurons in the spinal cord. *J. Neurosci.* 34, 9404–9417. doi: 10.1523/jneurosci.1771-14.2014
- Nudo, R. J., and Frost, S. B. (2009). "The Evolution of motor cortex and motor systems", in *Evolutionary Neuroscience*, ed. J. H. Kaas (Oxford: Academic Press), 727–756.
- Porter, R., and Lemon, R. (1993). *Corticospinal Function and Voluntary Movement*. Oxford, NY: Clarendon Press, Oxford University Press.
- Rathelot, J. A., and Strick, P. L. (2009). Subdivisions of primary motor cortex based on cortico-motoneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 918–923. doi: 10.1073/pnas.0808362106
- Rudomin, P. (1999). Presynaptic selection of afferent inflow in the spinal cord. *J. Physiol. Paris* 93, 329–347. doi: 10.1016/s0928-4257(00)80061-3
- Rudomin, P., and Schmidt, R. F. (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp. Brain Res.* 129, 1–37. doi: 10.1007/s002210050933
- Rudomin, P., Solodkin, M., and Jimenez, I. (1986). PAD and PAH response patterns of group Ia- and Ib-fibers to cutaneous and descending inputs in the cat spinal cord. *J. Neurophysiol.* 56, 987–1006.

- Schieber, M. H. (2007). Chapter 2 comparative anatomy and physiology of the corticospinal system. *Handb. Clin. Neurol.* 82, 15–37. doi: 10.1016/S0072-9752(07)80005-4
- Seki, K., Perlmutter, S. L., and Fetz, E. E. (2003). Sensory input to primate spinal cord is presynaptically inhibited during voluntary movement. *Nat. Neurosci.* 6, 1309–1316. doi: 10.1038/nn1154
- Suter, B. A., and Shepherd, G. M. (2015). Reciprocal interareal connections to corticospinal neurons in mouse M1 and S2. *J. Neurosci.* 35, 2959–2974. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4287-14.2015
- Ullan, J., and Artieda, J. (1981). Somatotopy of the corticospinal neurons in the rat. *Neurosci. Lett.* 21, 13–18. doi: 10.1016/0304-3940(81)90049-5
- Zagoraïou, L., Akay, T., Martin, J. F., Brownstone, R. M., Jessell, T. M., and Miles, G. B. (2009). A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity. *Neuron* 64, 645–662. doi: 10.1016/j.neuron.2009.10.017

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer RR and handling Editor declared their shared affiliation, and the handling Editor states that the process nevertheless met the standards of a fair and objective review.

Copyright © 2016 Moreno-López, Ollvares-Moreno, Cordero-Erausquin and Rojas-Piloni. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

