



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DISTRIBUCIÓN DE LAS NEURONAS OXITOCINÉRGICAS, VASOPRESINÉRGICAS,  
ENCEFALINÉRGICAS Y DINORFINÉRGICAS DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL  
HIPOTÁLAMO QUE PROYECTAN AL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA ESPINAL DE LA  
RATA.

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

**CECILIA MÁRQUEZ MORALES**

TUTOR:

**DRA. MARÍA GUADALUPE MARTÍNEZ LORENZANA**  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CO-TUTOR:

**DR. MIGUEL CONDÉS Y LARA**  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

JURIQILLA QUERÉTARO, DICIEMBRE 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Neurobiología

Los miembros del jurado de examen certificamos que la tesis elaborada por: Cecilia Márquez Morales, cuyo título es: **“Distribución de las neuronas oxitocinérgicas, vasopresinérgicas, encefalinérgicas y dinorfinérgicas del núcleo paraventricular del hipotálamo que proyectan al asta dorsal de la médula espinal de la rata.”** se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Manuel Salas Alvarado

Secretario

Dra. María Guadalupe Martínez Lorenzana

Vocal

Dra. Martha María de la Salud León Olea

Suplente

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

Suplente

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Aprobado por el Comité Académico

---

Coordinador del Programa

## Resumen

Desde los años setentas se describió la vía del Núcleo Paraventricular del Hipotálamo (NPV) a la Médula Espinal (ME), la cual ha tomado importancia en los estudios de modulación de la nocicepción ya que se describió la participación de la oxitocina (OT) y la vasopresina (VP) como moduladores de la transmisión de la información nociceptiva. En este estudio se inyectó el trazador neuronal retrógrado en las láminas superficiales del segmento lumbar 3 (L3) de la ME, y se efectuó un doble marcaje inmunofluorescente para conocer la naturaleza peptidérgica de las neuronas de esta vía. Los resultados muestran que además de la inervación oxitocinérgica a las láminas superficiales de la ME, la cual fue del 11.06% del área total marcada con el trazador en el NPV, existen otras proyecciones: una vasopresinérgica del 15.01%, otra proyección dinorfinérgica del 11.46% (comparable con la oxitocinérgica) y una encefalinérgica del 13.04%. Por otra parte, en el área del NPV marcada con el trazador neuronal también se obtuvieron colocalizaciones dobles: de 9.10% entre la OT-VP, 9.52% entre la OT y la dinorfina (DIN), 7.64% entre VP-encefalina (ENC), y un 8.10% para DIN y ENC.

El dolor es la principal causa de consultas, en la mayoría de los casos este síntoma desaparece al curar la patología, sin embargo, en algunas enfermedades como el cáncer, la diabetes mellitus, la artritis o la enfermedad de Parkinson aún no se puede aliviar el dolor, lo cual evidencia la necesidad de estudiar los mecanismos de modulación de la nocicepción.

Diversos núcleos del encéfalo modulan la nocicepción a nivel de la ME, en el caso del NPV dicha modulación podría estar dada por la secreción de dos neuropéptidos, ya que en la vía del NPV-ME encontramos colocalizaciones entre OT-DIN, OT-VP, VP-ENC y ENC-DIN, dicha proyección parecería hacer redundante el sistema, sin embargo, podría ser la manera de asegurar la expresión del mecanismo homeostático de la analgesia endógena en diferentes tipos de dolor e incluso esta proyección podría estar regulando otro tipo de información sensorial.

## Summary

Since the seventies was described the NPV-ME projection, however it is not well known the peptidergic nature of these projections. This projection has recently become important in studies of modulation of nociception because it has been described an involvement of oxytocin and vasopresin as a modulator of the transmission of painful information. In this study, retrograde neuronal tracers were injected in the superficial laminae of the spinal cord in segment L3, and a double immunofluorescence was subsequently made to study the peptidergic nature of the neurons of this pathway. The results show that besides the oxytocinergic innervation to the superficial laminae of the ME which was 11.06% of the total area marked with the tracer in the NPV there are mainly vasopresinergic projection which was of 15.01%, a dynorphinergic projection comparable to the oxytocinergic innervation of 11.46%, and enkephalinergic innervation of 13.04%. In the area of the NPV marked with the tracer neuronal also a percentage was obtained of colocalization of 9.10% between the OT-VP, 9.52% between the OT and DIN, 7.64% of colocalization for VP- ENC, and 8.10 % for DIN and ENC.

Pain is the main cause of consultation, in most cases this symptom disappears when curing the pathology, however, in some diseases such as cancer, diabetes mellitus, arthritis or Parkinson's disease pain cannot yet be alleviated, which evidences the need to study the mechanisms of modulation of nociception.

Several nuclei of the brain modulate the nociception at the level of the ME, in the case of NPV such modulation could be given by the secretion of two neuropeptides, since in the NPV-ME pathway we find colocalizations between OT-DIN, OT-VP, VP-ENC and ENC-DIN, this projection would seem to make the system redundant, however, could be the way to ensure the expression of the homeostatic mechanism of endogenous analgesia in different types of pain and even this projection might be regulating other sensory information.

## **Agradezco**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo que me brindó para realizar mis estudios de Maestría. Número de Becario: 330377.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por haber contribuido en mi formación profesional. Becario Número: 55002051.

Al Dr. Luis Villanueva por sus enseñanzas durante mi estancia en su laboratorio de la unidad 894 del INSERM, Hospital Pitié Salpêtrière, 75634, Paris, Francia.

A la Dra. Guadalupe Martínez Lorenzana por su colaboración en la captura de imágenes y por sus enseñanzas para la realización de esta tesis de maestría.

Al Dr. Miguel Condés y Lara por sus enseñanzas en la realización del presente trabajo.

Al MVZ. Javier Rodríguez Jiménez técnico del laboratorio de Dolor y Epilepsia por su apoyo en las cirugías estereotáxicas.

A la Dra. Teresa Morales Guzmán y al Dr. Víctor Ramírez Amaya por sus sugerencias en el análisis de las imágenes, así como por fungir como comité tutelar durante la realización del presente trabajo.

Al personal de la Biblioteca de la UNAM Campus Juriquilla, Lic. Teresita de Jesús Pérez Cruz y al Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela por el apoyo que me brindaron para la recopilación de información bibliográfica.

A todos los integrantes del laboratorio de dolor y epilepsia, por sus pláticas tan constructivas.

Al departamento académico del INB por su asesoría en los tramites de titulación.

A mi hijo Zadorov Amín por ser tan fuerte y darme la energía necesaria para terminar este proyecto e iniciar muchos más.

A mis padres Clara Luz y Faustino, por su amor y por apoyarme en los momentos más difíciles.

A mis hermanos: Lucía, Elideth, Yareli, Faustino, Rusbel y Alberto, por lo que hemos compartido y por la familia que llegaremos a ser.

A mis primas Flor Lucía y Reina Melina y a mi tía Lilia por su apoyo fraternal y ejemplo de superación.

A José Ignacio por compartir conmigo más alegrías que tristezas.

*Dedico esta tesis a mi hijo Zadorov Amín Peralta Márquez*

## Índice de abreviaturas

CeC, Núcleo cervical central

DIN, Dinorfina

ENC, Encefalina

IML, Columna intermedio lateral

IMM, Columna intermedio medial

Leu,-ENC Leucina-encefalina

MA, Magnocelular anterior

ME, Médula Espinal

Met-ENC, Metionina-encefalina

ML, Magnocelular lateral

NPV, Núcleo Paraventricular del Hipotálamo

OT, Oxitocina

PA, Parvocelular anterior

PBS, Buffer fosfato salino

PD, Parvocelular dorsal

PM, Parvocelular medial

PP, Parvocelular posterior

PV, Parvocelular ventral

SNC, Sistema nervioso central

TB, True blue

VP, Vasopresina

# Índice

Resumen.....	iii
Summary.....	iv
Índice de abreviaturas.....	vii
Introducción.....	1
1. Antecedentes.....	3
1.1. Médula espinal (ME).....	3
1.1.1 Láminas de la ME.....	4
1.2. Hipotálamo.....	6
1.2.1. División del hipotálamo.....	6
1.2.2. Funciones del hipotálamo .....	6
1.2.3 Núcleo paraventricular hipotalámico (NPV).....	7
1.3. Conexiones del NPV con la ME.....	10
1.3.1. El NPV, la ME y los péptidos.....	12
1.4. Modulación de la nocicepción en la ME, producida por OT, VP, ENC y DIN.....	14
2. Justificación.....	16
3. Hipótesis.....	16
4. Objetivos.....	17
General y específicos.....	17
5. Material y Métodos.....	18
5.1 Cirugía e inyección del trazador neuronal.....	18
5.2 Inyección de colchicina.....	19
5.3 Perfusión.....	19
5.4 Cortes histológicos del tejido.....	19
5.5 Inmunofluorescencia para OT, VP, EN y DIN.....	20
5.6 Deshidratación.....	20
5.7 Tinción con Violeta de Cresilo.....	20
5.8 Análisis Histológico.....	21
5.9 Análisis estadístico.....	22

6. Resultados.....	23
6.1 OT, VP, DIN y ENC en el NPV.....	23
6.2 Colocalización de dos péptidos.....	26
6.3 Proyección del NPV a la ME.....	32
6.4 Péptidos en neuronas del NPV con proyección a la ME.....	33
7. Discusión.....	45
7.1. Proyección del NPV a la ME.....	45
7.2. Expresión de OT, VP, DIN y ENC en el NPV.....	46
7.3. Inmunorreactividad de las neuronas del NPV con proyección al segmento L3 de la ME.....	47
7.4. Mecanismos descendentes de la modulación de la nocicepción.....	50
8. Conclusiones.....	52
9. Referencias.....	53
10. Índice de tablas y figuras .....	63
11. Apéndices .....	65
11.1. Trazadores neuronales.....	65
11.2. Inmunofluorescencia.....	66
11.3. Síntesis y transporte de neuropéptidos .....	68

## Introducción

Los procesos de transmisión y de modulación que ocurren en el sistema nervioso central (SNC) son muy diversos y su función principal es informar de los eventos medioambientales y modular los mismos. En el caso del sistema somatosensorial la información con contenido de dolor o nociceptiva alerta al organismo pero también activa a los sistemas endógenos de analgesia. Estos últimos se encargan de ejercer una acción moduladora para mantener un equilibrio homeostático en el organismo.

El objetivo principal de estudio del laboratorio donde se realizó el presente trabajo es conocer los mecanismos que participan en la transmisión de la información con características nociceptivas y describir las estructuras del SNC que participan en la modulación de este tipo de información sensorial. Así, se ha descrito que el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) tiene una acción inhibitoria de las aferentes primarias, que transmiten desde la superficie tisular la información nociceptiva.

El hipotálamo es importante para la regulación neuroendocrina, autonómica, conductual y además es una estructura clave en el mantenimiento de la homeostasis. Dentro de la regulación homeostática del dolor se tendría que incluir una modulación de señales a nivel de la médula espinal (ME). La vía del núcleo paraventricular a la médula espinal (NPV-ME) se ha relacionado, entre otras funciones, con la supresión de la información nociceptiva, al modular la información de las fibras aferentes primarias. Sin embargo, el NPV no es una estructura homogénea ya que tiene distintas subdivisiones anatómicas y funcionales.

De la misma forma que el NPV envía fibras a la ME, recibe información de la ME tanto del sistema somatosensorial como del sistema nervioso autónomo. Las eferencias directas del NPV llegan a las capas superficiales del asta dorsal de la ME, a la columna intermedio lateral y a la lámina X de Rexed, sin embargo aún no se ha explorado el contenido peptídico y la distribución de estas eferencias a lo largo de la ME.

En este estudio se inyectó un trazador neuronal retrógrado (True Blue), en las capas superficiales de los segmentos lumbares, lo cual permitió describir la localización y destino de las proyecciones del NPV hacia la ME, mientras que el uso de la técnica de inmunofluorescencia permitió describir el tipo de péptidos utilizados por la proyección

del NPV-ME. Se utilizó la técnica de inmunofluorescencia para detectar los neuropéptidos oxitocina (OT), vasopresina (VP), dinorfina (DIN) y encefalina (ENC) con la finalidad de cuantificar el área del NPV que proyecta a las láminas superficiales del asta dorsal de la ME, inmunorreactivas a estos péptidos.

Así mismo el conocimiento de la naturaleza peptídica de las neuronas del NPV que proyectan a las láminas superficiales de la ME permite inferir si los péptidos estudiados intervienen en la modulación de la percepción sensorial. La proyección oxitocinérgica NPV-ME aumenta el umbral al dolor, y los otros péptidos, VP, DIN y ENC aseguran la analgesia endógena.

# 1. Antecedentes

El SNC es el encargado de recibir y procesar la información del medio ambiente interno y externo en los organismos, de la misma forma se encarga de producir respuestas ante las variaciones del medio externo e interno. Las porciones que lo constituyen son el telencéfalo, el diencéfalo, el mesencéfalo, el cerebelo, el rombencéfalo y la ME (Afifi y Bergman, 2006; Puelles et al., 2008).

La información aferente tanto somática como visceral que viaja por las prolongaciones de las neuronas aferentes entra al SNC a través de las astas posteriores de la ME, en algunas vías las neuronas aferentes viajan hasta llegar al tallo cerebral o a estructuras superiores. Otras vías aferentes hacen sinapsis con neuronas de las láminas de la ME y son los axones de estas neuronas los que ascienden hacia el encéfalo. Las vías pueden ser ipsilaterales o contralaterales pero su representación será fundamentalmente contralateral (Clark, 1984).

Algunas respuestas de la integración de la información somática o visceral del SNC salen a través de las astas anteriores de la ME, pudiendo ser de una orden motora o de modulación del sistema nervioso autónomo tanto simpático como parasimpático (Afifi y Bergman, 2006; Clark, 1984).

Debido a que la ME es una estructura a través de la cual llega la información nociceptiva hacia niveles supramedulares, es importante conocer su citoarquitectura, que a continuación se describe brevemente.

## 1.1. Médula espinal (ME)

La ME y el núcleo principal del trigémino son los primeros sitios de relevo en la transmisión de información nociceptiva, siendo en el caso de la superficie corporal correspondiente al tronco y las extremidades en la ME donde se realiza la primera sinapsis. En este sitio de la ME se ejercen funciones de regulación por mecanismos locales, segmentales, intrasegmentales y supraespinales (Heinricher et al., 2009; D'Mello y Dickenson, 2008). La transmisión de la información nociceptiva desde la ME, por medio de las neuronas de proyección depende de varios mecanismos que pueden

aumentar o disminuir la actividad de estas neuronas del asta dorsal (mecanismos excitatorios e inhibitorios). De la misma forma, la transmisión hacia estructuras supramedulares depende de la actividad de interneuronas locales o de los mecanismos descendentes de estructuras supraespinales (Melzack y Wall, 1965; D'Mello y Dickenson, 2008).

Debido a que las funciones de la ME se encuentran parceladas, la citoarquitectura de la ME ha sido dividida en diferentes láminas de acuerdo a la morfología y función de las distintas capas que se han descrito por Rexed, que a continuación describiré para facilitar la comprensión de este documento.

### **1.1.1. Organización laminar de la ME**

Las láminas I y II, son las más superficiales del asta dorsal de la ME; la lámina I es delgada comparada con la lámina II (o sustancia gelatinosa), la cual se subdivide en externa e interna. A estas dos láminas llegan las fibras aferentes no mielinizadas que llevan información nociceptiva y fibras aferentes delgadas mielinizadas que llevan información de mecanorreceptores de alto umbral (Nagy y Hunt, 1983).

Las láminas III-VI, reciben fibras mielinizadas más gruesas de las neuronas aferentes primarias. La lámina III es diferente a la lámina II porque su organización es menos compacta (Brichta y Grant, 1985). En los segmentos torácicos medios, lumbares caudales y sacros, la porción medial de la lámina IV se continúa de manera ventral para unirse con la contralateral. En los segmentos torácicos caudales y en los lumbares rostrales el núcleo dorsal de Clark se extiende más dorsalmente bloqueando el cruce de la línea media (Molander et al., 1984). Esta lámina recibe aferentes primarias de otras láminas de la ME (Brushart y Mesulam, 1980). La lámina V forma el cuello del asta dorsal, cruza la línea media en las porciones lumbares caudales y sacras. En los segmentos torácicos y lumbares rostrales rodea la columna de Clark. La lámina VI sólo existe en los engrosamientos cervicales y lumbares (Brichta y Grant, 1985).

Lámina VII es parte de la sustancia gris intermedia y se encuentra presente en toda la ME. Dentro de ésta se encuentran la columna dorsal de Clarke, la columna intermedio medial (IMM) y la columna intermedio lateral (IML). Las láminas IMM y IML están presentes solo en los segmentos torácicos y corresponden a una inervación

visceral. Además, esta lámina tiene un componente ventral que se extiende entre la lámina VIII y IX (Brichta y Grant, 1985; Clark, 1984).

La columna dorsal de Clarke abarca desde los últimos segmentos torácicos hasta el segmento lumbar 2. El núcleo IML se encuentra presente de los últimos segmentos torácicos hasta los primeros segmentos lumbares, también aparece de L6 a S1 donde se le conoce como núcleo parasimpático sacro. El núcleo IMM, se localiza en la parte medial, adyacente al canal central. En los segmentos cervicales superiores se encuentra el núcleo cervical central (CeC), el cual se localiza lateral al canal central (Brichta y Grant, 1985).

Se ha mostrado que el núcleo Dorsal de Clarke y el núcleo CeC reciben proyecciones aferentes primarias de los músculos (Brushart y Mesulam, 1980; Ammann et al., 1983). El núcleo parasimpático sacro recibe aferentes primarias viscerales en los roedores (Nadelhaft y Booth, 1984).

Lámina VIII, en los engrosamientos cervical y lumbar se encuentra en la parte medial de las astas anteriores, mientras que en los niveles torácicos se distribuye en la base del asta anterior. Esta lámina origina muchas fibras comisurales que pasan al lado opuesto de la ME (Clark, 1984; Brichta y Grant, 1985).

Lámina IX, se localiza en el asta ventral y está formada por los núcleos de motoneuronas alfa y gamma así como por interneuronas (Clark, 1984).

Lámina X, es parte de la sustancia gris intermedia, rodea el canal central y comprende las comisuras grises ventral y dorsal (Brichta y Grant, 1985). Esta lámina contiene pocos cuerpos celulares, los cuales son de tres tipos de neuronas: piramidales, fusiformes y estrelladas (Nahin y Giesler, 1982), recibe aferentes primarias viscerales (Nadelhaft y Booth, 1984). Además Light A. y Perl E. (1979) proponen que llegan a esta zona aferentes primarias relacionadas con funciones sensoriales.

La vía del NPV a la ME es de nuestro interés ya que es una vía que se ha relacionado con la modulación de la información nociceptiva por lo que es importante, para los objetivos de esta tesis, hacer una descripción de la anatomía y las subdivisiones de este núcleo.

## 1.2. Hipotálamo

El hipotálamo es un centro de regulación neuroendocrino, autonómico y motor somático, que está interconectado con diferentes estructuras del SNC. Delimita al tercer ventrículo en su parte media y se origina a partir del diencéfalo (Bleier y Byne, 1982).

### 1.2.1. División del hipotálamo

Se divide longitudinalmente en tres zonas: periventricular, medial y lateral, y rostrocaudalmente se divide en las regiones preóptica, anterior, tuberal, y posterior o mamilar, esta división se realizó basandose en la organización de los grupos celulares en la zona medial (Armstrong, 2004) ver tabla 1.

	Preóptico	Anterior	Tuberal	Mamilar
Periventricular	Núcleo preóptico periventricular Núcleo preóptico mediano Núcleo periventricular anteroventral Núcleo preóptico supraquiasmático	Núcleo periventricular anterior Núcleo supraquiasmático Núcleo paraventricular	Núcleo periventricular tuberal Núcleo arcuato o infundibular	Núcleo periventricular posterior Núcleo tuberomamilar dorsal
Medial	Área preóptica medial Núcleo preóptico medial Núcleo preóptico anterodorsal Núcleo preóptico anteroventral Núcleo parastrial Núcleo preóptico posterodorsal	Área hipotalámica anterior Núcleo hipotalámico anterior Área retroquiasmática Núcleo circularis	Área tuberal Núcleo ventromedial Núcleo dorsomedial	Núcleo premamilar dorsal Núcleo premamilar ventral Complejo mamilar
Lateral	Área preóptica lateral Núcleo preóptico magnocelular	Área hipotalámica lateral Núcleo supraóptico	Área hipotalámica lateral Núcleo tuberal	Área hipotalámica lateral

**Tabla 1.** Divisiones del hipotálamo.

Los núcleos de esta estructura son heterogéneos en el tamaño y la forma de las neuronas, lo cual sugiere, que además de múltiples interconexiones, estén involucrados en diferentes funciones (Bleier y Byne, 1982); en seguida mencionaré algunas funciones de esta estructura.

### 1.2.2. Funciones del hipotálamo

Entre las funciones reguladas por esta área del sistema límbico, se encuentra la temperatura corporal, la frecuencia cardiaca, la presión arterial, la osmolaridad sanguínea, el metabolismo, la digestión, el consumo de agua y de alimentos, además regula la función sexual, la reproductiva y el crecimiento, y participa en la respuesta del

organismo al estrés. Las funciones parasimpáticas del hipotálamo están relacionadas con regiones anteriores y mediales de este núcleo. Mientras que la regulación de actividades simpáticas involucra regiones laterales y posteriores. El área preóptica-anterior es necesaria para la activación de mecanismos que regulan la temperatura mediante la sudoración y la vasodilatación, mientras que el hipotálamo posterior activa mecanismos para conservar el calor como la vasoconstricción (Bleier y Byne, 1982).

El área preóptica anterior y el núcleo infundibular están involucrados en funciones reproductivas endocrinas y en el comportamiento estereotípico, mientras que el área ventromedial y regiones laterales adyacentes regulan el peso y el comportamiento de la ingesta de alimentos (Bleier y Byne, 1982).

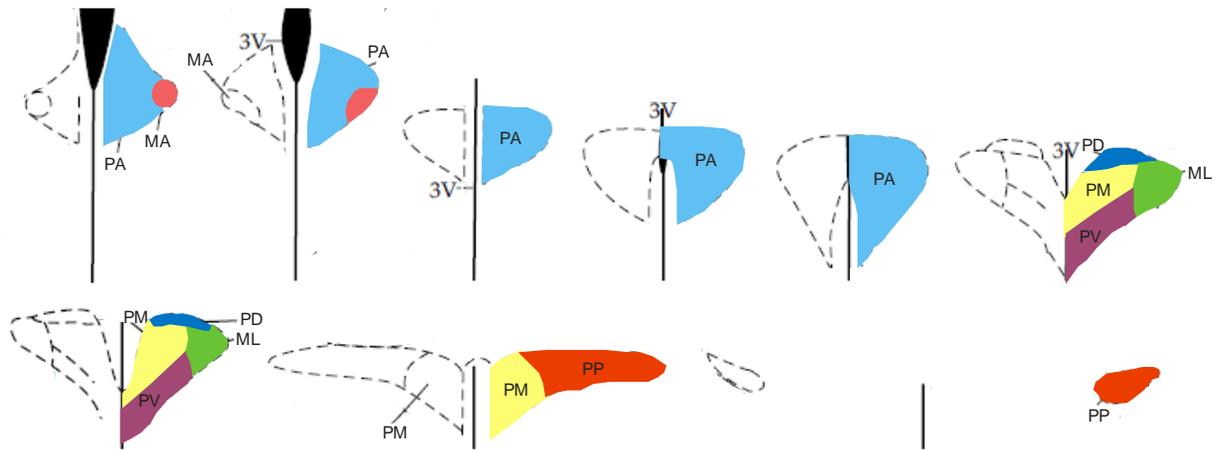
El núcleo supraóptico y la porción magnocelular del NPV regulan la osmolaridad del plasma, mientras que las zonas del hipotálamo basal y medial regulan a la hipófisis ya que secretan las hormonas liberadoras de las hormonas de la adenohipófisis. Además la glándula pituitaria también es regulada por la porción parvocelular del NPV y el área preóptica media (Bleier y Byne, 1982).

La proyección de nuestro interés es la del NPV a la ME, por lo que a continuación se describen las principales subdivisiones de este núcleo hipotalámico.

### **1.2.3. Núcleo Paraventricular Hipotalámico (NPV)**

Los grupos neuronales del NPV se caracterizan anatómicamente por sus eferencias y aferencias (Armstrong, 2004), por sus neuronas locales y neuronas de proyección o principales, por el contenido neuroquímico de las neuronas (Swanson et al., 1986), el tamaño de las neuronas, la densidad de las vesículas (Kiss et al., 1991), y la morfología de las dendritas (Armstrong y Hatton, 1980) ver figura 1.

Las neuronas secretoras del NPV se subdividen en tres componentes: neurosecretor magnocelular, neurosecretor parvocelular y neuronas de proyección no endocrinas.



**Figura 1.** Divisiones del NPV. En esta imagen se pueden observar los subnúcleos del NPV, MA es magnocelular anterior, ML magnocelular lateral, PA parvocelular anterior, PD parvocelular dorsal, PM parvocelular medial, PP parvocelular posterior y PV parvocelular ventral. Tomada y modificada de Paxinos y Watson 1997.

Las neuronas del componente magnocelular miden de 20 a 35  $\mu\text{m}$  y envían sus axones al lóbulo neuronal de la hipófisis. Este componente incluye a la porción magnocelular anterior (MA) y a la división magnocelular lateral (ML), la primera contiene principalmente neuronas OT y se encuentra anteromedialmente en el NPV, la segunda contiene principalmente neuronas vasopresinérgicas que se encuentran posterior y dorsolateral a la MA y un anillo de neuronas OT que rodea a la ML. Tanto MA como ML están conformados por células de dos o tres dendritas con ramificaciones simples (Hatton et al., 1976; Armstrong, 2004).

El componente parvocelular está conformado por neuronas pequeñas y medianas que se localizan en la porción anterior (PA) y medial (PM) del NPV, envían proyecciones a la eminencia media o a regiones extrahipotalámicas, este componente se caracteriza por contener neuronas inmunorreactivas a VP, sin embargo también pueden ser inmunorreactivas a un transcrito regulado por anfetaminas y cocaína, a colecistoquinina, a la hormona liberadora de corticotropina, al polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria, a la angiotensina II, al péptido natriurético atrial, a bombesina, a GRF, a tirosina hidroxilasa, al ácido gamma-aminobutírico, a encefalinas, a galanina, a la hormona liberadora de la hormona de crecimiento, a neurotensina, al péptido histidina leucina, a somatostatina, a la hormona liberadora de tirotrina y al péptido intestinal vasoactivo.

Las neuronas parvocelulares vasopresinérgicas están involucradas en el control del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, dicho eje es activado por estresores físicos o fisiológicos y permite que los organismos se adapten a los cambios del medio ambiente (Swanson y Sawchenko, 1983).

Las neuronas de proyección son de tamaño variable, proyectan de manera caudal al tallo cerebral y a la ME, y están separadas de los otros dos grupos (Armstrong y Hatton, 1980). Estas neuronas se conectan principalmente con núcleos autonómicos preganglionares y las regiones en donde se encuentran son; la región dorsomedial (PD), la región ventral (PV) y el subnúcleo posterior (PP). La región PD proyecta principalmente hacia la columna celular intermediolateral mientras que la parte PV y PP envían fibras hacia la ME y a varias regiones del tallo cerebral entre las que se encuentran el área postrema, la sustancia gris periacueductal, los núcleos preganglionares autonómicos, reticular ventrolateral, motor dorsal del vago, rafe dorsal, locus coeruleus, parabraquial y pedúnculo pontino. Las neuronas de estos núcleos varían pero muchas son medianas o aún más grandes que las que se encuentran en las porciones neuroendocrinas magnocelulares, además estas neuronas tienen dendritas grandes y ramificaciones menos espinosas que las neuronas neuroendocrinas. Otras neuronas del NPV proyectan hacia el tálamo, la amígdala, la sustancia gris periacueductal, el rafe, al núcleo parabraquial, al locus coeruleus, a la médula oblongada ventral y dorso lateral, al área postrema, al complejo dorsal vagal, al área preóptica media, al núcleo de la cama del lecho de la estría terminalis, al órgano vasculoso de la lámina terminal, al órgano subfornical y a la ME, a través del funículo dorsolateral.

Se ha relacionado la expresión de la proteína c-fos en la zona parvocelular medial del núcleo paraventricular del hipotálamo con la estimulación de masajes parecidos a caricias en la parte dorsal de la rata, este resultado puede ser muy contradictorio, sin embargo el grupo de trabajo argumenta que las vocalizaciones que hacían las ratas durante el experimento eran de una frecuencia alta 50 kHz, lo que coincide con estímulos placenteros ya que las frecuencias bajas, 22 kHz son características durante estímulos negativos (Okabe et al., 2015). Los autores de este trabajo están conscientes que gran parte de los efectos del NPV se deben al aumento

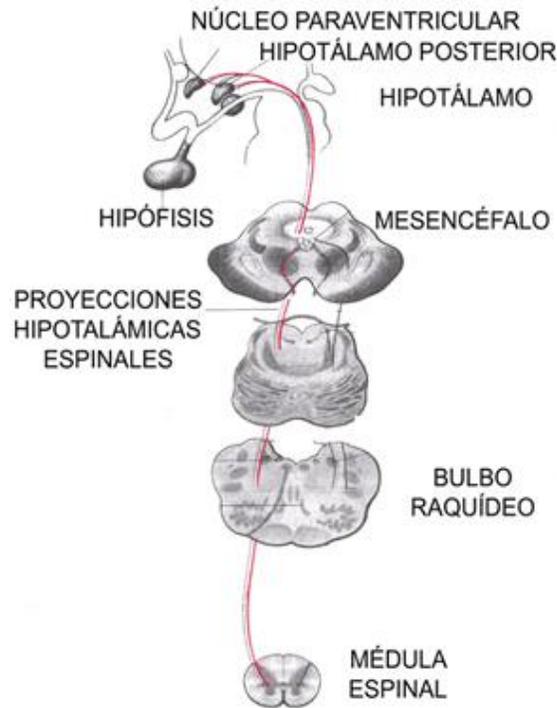
de la concentración de oxitocina en el plasma, sin embargo consideran que es importante verificar la existencia de una modulación directa del NPV a la ME en respuesta a masajes parecidos a caricias.

Como se ha mencionado, tanto la ME como el NPV tienen varias subdivisiones, así que en la siguiente sección se describirá mejor esta vía y se mencionarán los péptidos que son transportados a través de la misma. En un trabajo reciente se estudiaron 30 neuronas parvocelulares del NPV e identificaron proyecciones hacia las neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico contralateral, además encontraron que las mismas células proyectan hacia las láminas profundas de la médula espinal lo que se relaciona con supresión de la nocicepción y promoción de la analgesia (Eliava M. et al., 2016)

### **1.3. Conexiones del NPV con la ME**

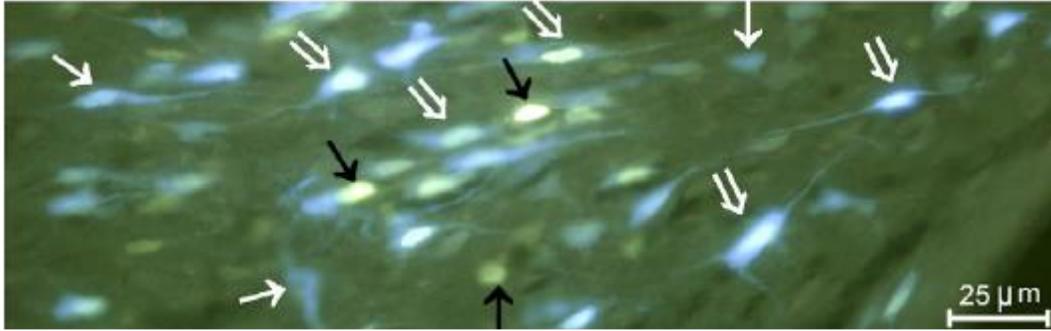
Se describieron proyecciones del NPV a las astas dorsales de la ME (Swanson y McKellar, 1979; Condés-Lara et al., 2007), al núcleo intermedio lateral (Saper et al., 1976; Swanson y McKellar, 1979) y a la lámina X de Rexed (Swanson, 1977). De la misma forma con técnicas inmunohistoquímicas se ha demostrado que las neuronas del NPV y del núcleo supraóptico son oxitocinérgicas o vasopresinérgicas (Buijs, 1978). Y con técnicas de hibridación in situ se ha reportado que neuronas del NPV que proyectan al asta dorsal de la ME a nivel del segmento C2, expresan 40% de OT, 40% DIN y 20% ENC (Hallbeck et al., 2001).

La vía del NPV a la ME observada en la figura 2, se caracterizó con el trazador neuronal peroxidasa de rábano (HRP) y se observó que hay menos neuronas marcadas cuanto más caudal es el sitio de inyección, la región explorada fue de T7 a T12 (Saper et al., 1976), y en los segmentos C3-C4 y L4-L5 específicamente en las láminas superficiales (Condés-Lara et al., 2007).



**Figura 2.** Proyección ipsilateral del núcleo paraventricular a la médula espinal, imagen modificada de Carpenter M. 1994.

Se ha visto que las neuronas parvocelulares del NPV tienen proyecciones que se distribuyen a todo lo largo de las láminas del asta dorsal de la ME, especialmente en las láminas superficiales I y II. Esta vía fue descrita por Swanson y McKellar desde 1979, (Swanson et al. 1980, Sofroniew et al. 1981, Sawchenko y Swanson 1982) y actualmente forma parte de nuestros estudios (Condés-Lara et al., 2007; Hurtado-Santiago, 2009; Hernández-Linares, 2010). En el 2007 Condés-Lara et al., inyectaron el trazador neuronal retrógrado diamidino yellow en las astas dorsales a nivel de los segmentos cervicales y el trazador neuronal retrógrado “true blue” en las astas dorsales de la ME a nivel lumbar y observaron en el NPV que los dos trazadores colocalizan, por lo que se propone que la proyección es difusa, ver figura 3. Nuestro grupo de trabajo también ha demostrado una proyección difusa del NPV a la región T5-L1 de las capas superficiales del asta dorsal y núcleo IML (Hurtado-Santiago, 2009).



**Figura 3.** En la fotomicrografía del núcleo paraventricular las flechas negras muestran las células marcadas con diamidino yellow y las flechas blancas muestran las células marcadas con true blue, mientras que las flechas dobles muestran las células doblemente marcadas, por lo tanto esta vía es difusa a lo largo de la ME. Obtenida de Condés-Lara et al. 2007.

Además de los péptidos ya mencionados como la OT y la VP, se sabe que las neuronas de proyección del NPV a la ME también contienen neuropéptidos opioides como la ENC y la DIN.

### 1.3.1. El NPV, la ME y los péptidos

Un efecto analgésico potente de drogas opiáceas toma lugar en gran parte del asta dorsal de la ME, donde es mediada por receptores opioides mu, kapa y delta (Zorman et al., 1982; Jensen y Yaksh, 1984; Morgan et al., 1991; Yaksh, 1997; Budai y Fields, 1998; Chen y Pan, 2006). Sin embargo, una pregunta importante y aún no resuelta es la de qué circuito neuronal libera los péptidos opioides que activan estos receptores.

Diferentes trabajos mostraron fibras y neuronas con  $\beta$ -endorfina en el asta ventral así como fibras en el funículo lateral y lámina X, pero no en el asta dorsal de la ME. Además, con un anticuerpo anti-encefalina el cual reconoce Leu-ENC (leucina-encefalina) y Met-ENC (metionina-encefalina) se demostró la presencia de estos péptidos en las láminas I-III y V del asta dorsal. Con respecto a la DIN y prodinorfina solamente se han visto fibras marcadas en la lámina I, II y V. Sin embargo, no existe una colocalización de DIN y prodinorfinas con ENC. También se ha visto que la inmunorreactividad encontrada para ENC no colocaliza con fibras C, en contraste se ha visto que algunas fibras C sí colocalizan con DIN. Estos resultados indican que la ENC y DIN están presentes en diferentes poblaciones de neuronas y fibras en el asta dorsal de la ME (Botticelli et al., 1981; LaMotte y de Lanerolle, 1983; Tsou et al., 1986; Gutstein et al., 1992; Marvizón et al., 2009). En 1997 Ma et al. publicaron que la

mayoría de las neuronas nociceptivas (ya sea nociceptivo específico o de amplio rango dinámico) presentaron inmunorreactividad a encefalina, pero ninguna de las neuronas no nociceptivas fueron inmunorreactivas, además reportaron botones axonales inmunorreactivos a la sustancia P y a ENC en las dendritas distales de las neuronas nociceptivas, en las mismas neuronas encuentran botones sinápticos en los cuerpos celulares y en las dendritas proximales inmunorreactivos a ENC. Sin embargo, la procedencia supra espinal o espinal de estos péptidos está en discusión (Botticelli et al., 1981; Basbaum et al., 1986; Tuchscherer y Seybold, 1989; Gutstein et al., 1992; Marvizón et al., 2009).

Se sabe que la DIN se encuentra distribuida ampliamente y con alta concentración en el hipotálamo (Höllt et al., 1980; Watson et al., 1981). El péptido opioide DIN es importante para la regulación de la actividad neuronal en la ME. Esta DIN está implicada en varios mecanismos viscerales y sensoriales, además se ha sugerido estar involucrada en la analgesia (Han y Xie, 1982; Tan-No et al., 1985; Tan-No et al., 1996; Vanderah et al., 1996), así como en el incremento de la sensibilidad al dolor, tal como la alodinia (Laughlin et al., 1997).

Hallbeck et al., (2001) reportaron que más del 40% de neuronas del NPV que proyectan a la ME mediante el funículo dorsolateral expresan ARNm para DIN. Lo que sugiere que en ésta vía la DIN supraespinal puede ser de gran importancia para el procesamiento del dolor e información visceral. Por otro lado, se sugiere que la presencia de fibras positivas a DIN en la ME proviene de cuerpos localizados en las capas superficiales del asta dorsal (Merchenthaler et al., 1997), pero también, estas fibras pueden tener otro origen (Watson et al., 1981; Code y Fallon, 1986), es decir que pueden provenir del NPV el cual proyecta de manera extensa al asta dorsal y a la columna celular intermedio lateral (Zheng et al., 1995).

Al realizar inmunohistoquímica contra OT o VP la mayoría de las neuronas del NPV resultan ser inmunorreactivas solo a uno de los péptidos, además se sabe que el grupo vasopresinérgico expresa en mayor grado DIN y Leu-ENC, mientras que el grupo oxitocinérgico expresa ambos péptidos en menor grado (Meister et al., 1990). Conjuntamente, se ha visto que en el NPV existen poblaciones independientes de met-

ENC y VP (Hökfelt et al., 1983; Sawchenko, 1987). Estos trabajos señalan que distintos grupos de neuronas del NPV expresan varios péptidos, por lo que estas células pueden enviar proyecciones con más de un péptido a otras áreas del encéfalo y ME.

Nuestro grupo de trabajo también ha demostrado mediante trazadores neuronales la proyección del NPV a las capas superficiales del asta dorsal a nivel L4 y ha verificado que un 34% de esta proyección es exclusivamente oxitocinérgica y no vasopresinérgica (Hernández-Linares, 2010). Sin embargo, queda la pregunta acerca de que pasa con el otro 66% de dicha proyección y cual otro péptido podría estar implicado sino es la VP. En el mismo trabajo, se observó que un 43% del total de células vasopresinérgicas del NPV proyectan al área gris periacueductal, sin embargo del otro 57% no se sabe su curso, el cual podría estar dado hacia la sustancia gris intermedia de la ME. Sin embargo, una descripción detallada de la proyección y contenido peptídico del NPV a las láminas superficiales de la ME no se ha descrito.

La información anterior hace una invitación al estudio de los diferentes neuropéptidos en el NPV, que puedan estar siendo transportados hasta la ME, y en el presente trabajo se decidió estudiar la proyección oxitocinérgica, vasopresinérgica, dinorfinérgica y encefalinérgica debido a que estos péptidos están involucrados en la modulación de la nocicepción.

#### **1.4. Modulación de la nocicepción en la ME, producida por OT, VP, ENC y DIN**

El receptor de OT está acoplado a proteínas G, pertenece a la familia de los receptores de rodopsina, y al unirse a su ligando activa a la fosfolipasa C beta. En los últimos años se ha relacionado a la OT con la modulación de la nocicepción a nivel de la ME, sin embargo no se conoce el mecanismo por el cual se logra esta modulación.

En un trabajo en el que utilizaron animales knock out para el receptor de OT y ratones knock out del receptor de VP tipo 1A, receptor a través del cual se ejercen los mayores efectos de la VP a nivel central. Los resultados son que los efectos de la OT en la modulación de la nocicepción en la ME se deben a la activación de los receptores de VP tipo 1A (Schorscher-Petcu et al., 2010). Aunque estos resultados en ratones knock out al receptor de OT presentan una dificultad para su interpretación, ya que no conocemos cuales puedan ser los mecanismos plásticos que se promueven después

de efectuar el knock out a OT, y si bien la VP-1A actúa en el receptor de la analgesia producida por la OT hasta el momento no podemos establecer una comparación entre ratones knock out y la rata.

En ratas transgénicas que expresan la proteína roja fluorescente asociada a la OT, encontraron que con la aplicación de sustancias que inducen artritis reumatoide, un modelo de dolor crónico, aumentan las concentraciones de OT en el núcleo paraventricular tanto en las neuronas magnocelulares como parvocelulares, en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal y en fibras localizadas en las láminas superficiales de la médula espinal (Matsuura et al., 2015).

Por otro lado, las encefalinas activan receptores delta, mientras que la DIN se une a los receptores kappa, los opioides están involucrados en la modulación de la nocicepción a nivel de la ME, ya que al estimular con una inyección de glutamato el NPV, se produce aumento de la concentración de los opioides endógenos a nivel de la ME, lo cual aumenta el umbral a los estímulos nociceptivos (Yang et al., 2009).

## **2. Justificación**

Se ha demostrado que el NPV tiene conexiones oxitocinérgicas directas a las láminas superficiales de la ME; en el segmento lumbar, sin embargo, no se ha reportado una proyección dinorfinérgica o encefalinérgica a este nivel. Con respecto a la proyección vasopresinérgica del NPV-ME se ha reportado que dicha proyección es escasa hacia los segmentos lumbares.

Las neuronas de la vía NPV-ME son tanto magnocelulares como parvocelulares. En las neuronas magnocelulares del NPV se ha encontrado colocalización entre VP y DIN, así como colocalización entre VP y ENC, pero la colocalización entre OT y DIN u OT y ENC es escasa.

Por lo anterior, se pretende demostrar la naturaleza peptídica de las neuronas del NPV que proyectan a las láminas superficiales de la ME al segmento L3, así como la existencia de colocalización entre dichos péptidos.

## **3. Hipótesis**

El componente oxitocinérgico de la vía NPV-ME será mayor a nivel del segmento lumbar L3 en las capas superficiales del asta dorsal al ser comparado con el componente vasopresinérgico.

Los péptidos ENC y DIN estarán presentes en grupos celulares del NPV que proyectan al segmento L3 del asta dorsal de la ME y se encontrarán independientes de la OT. Sin embargo, las ENC y DIN colocalizarán con grupos celulares vasopresinérgicos.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo General**

Marcar las proyecciones del NPV hacia las astas dorsales de la ME a nivel del segmento L3 e identificar la naturaleza peptídica de las neuronas que conforman dicha proyección.

### **4.2. Objetivos Específicos**

Trazar la vía del NPV a las láminas superficiales del asta dorsal de la ME a nivel del segmento L3.

Caracterizar la localización de las neuronas marcadas con el trazador neuronal retrógrado en el NPV, mediante microscopía de fluorescencia.

Identificar con marcajes múltiples la colocalización del trazador neuronal retrógrado y los péptidos OT, VP, EN y DIN, mediante microscopía confocal.

## 5. Material y Métodos

Los experimentos fueron realizados siguiendo las normas del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM y bajo los lineamientos para experimentación en animales de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) (Zimmermann, 1983).

Se utilizaron 26 ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 280 y 300 g. Obtenidas del Bioterio del Instituto de Neurobiología UNAM, los cuales crecieron en un ciclo de luz oscuridad 12/12hrs y fueron expuestos a una dieta *ad libitum*.

### 5.1. Cirugía e inyección del trazador neuronal

Para iniciar la cirugía, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de Ketamina/Xilacina (70/6 mg/kg). Se realizó una laminectomía para extraer la lámina izquierda de una vértebra a nivel de T12 a L1 y así dejar expuesta la región lumbar de la ME que corresponde al segmento L3. La cirugía consistió en cortar la piel, hacer una incisión en los músculos que se encuentran dorsales a la columna vertebral y extraer parte de la lámina vertebral. Una vez hecha la laminectomía, se retiraron las meninges para aplicar el trazador neuronal retrógrado.

Se aplicaron gránulos de True Blue (TB) en las láminas superficiales del asta dorsal en el segmento L3 de la ME. Los gránulos de TB fueron colocados en el sitio deseado con la ayuda de un electrodo de tungsteno que se acopló a una torre milimétrica.

Una vez introducido el trazador se colocó un trozo pequeño de Gel Foam en la región donde se realizó la laminectomía y se procedió a suturar el músculo y la piel. Al terminar la cirugía los animales fueron colocados en cajas individuales de plástico (50x30x20cm), en donde se mantuvieron por 13 días con agua y alimento *ad libitum*. En el laboratorio han comprobado que con trece días se marca la vía del NPV a los segmentos lumbares de la ME en la rata.

## **5.2. Inyección de colchicina**

Para una mejor detección de las células dinorfinérgicas y encefalinérgicas se realizó una cirugía estereotáxica para inyectar colchicina en el ventrículo lateral derecho, ya que la colchicina despolimeriza a los microtúbulos e interrumpe el transporte axonal y por lo tanto, en el soma se incrementan las concentraciones de las moléculas que sintetizan las neuronas (Fink et al., 1973). La dosis empleada fue de 240 µg de colchicina en 240 µl de agua destilada y la cirugía se realizó 24 hrs antes del sacrificio del animal.

## **5.3. Perfusión**

Las ratas inyectadas con el trazador neuronal fueron sacrificadas un día después de la administración de la colchicina, con este propósito se les aplicó de manera intraperitoneal una sobredosis de pentobarbital sódico (45 mg/kg). Se les realizó una perfusión vía intracardiaca, la cual consistió en abrir la cavidad torácica y realizar una punción en el corazón para tener una vía directa a la arteria aorta. Inicialmente se perfundió con solución de NaCl al 0.9%, y posteriormente con paraformaldehído al 4 % en (buffer de fosfatos PB) (0.1 M, pH 7.4). Se obtuvo la ME y el cerebro, los cuales se colocaron por 2 horas en postfijación en paraformaldehído al 4 %, finalmente los tejidos fueron introducidos por 24 hrs. en sacarosa al 30% en PB para su crioprotección.

## **5.4. Cortes Histológicos del Tejido**

Para obtener los cortes coronales del cerebro y de la ME se utilizó un Micrótopo de congelación (LEICA SM 2000 R). Del encéfalo se obtuvieron cortes de 40 µm desde -0.80 mm hasta -2.30 mm de Bregma, de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas del atlas de Paxinos y Watson 1997, los cortes fueron recolectados en 5 series por lo que cada serie contuvo 8 cortes. La serie 1 del cerebro fue utilizada para observar las células marcadas con el trazador en el NPV, en las series 2, 3, 4 y 5 se realizó la técnica de inmunofluorescencia doble para OT, VP, ENC y DIN, según fuera el caso. Las series de la ME se utilizaron para verificar el sitio de inyección del trazador neuronal.

### **5.5. Inmunofluorescencia para OT, VP, EN y DIN**

Para la detección y observación de células inmunorreactivas a OT, VP, EN y DIN, se realizó lo siguiente: cuatro de las cinco series obtenidas del NPV por cada rata, se utilizaron para la detección y observación de células inmunorreactivas a OT, VP, ENC y DIN. Cada serie constó de 8 cortes coronales del NPV, éstos fueron preincubados en suero de cabra al 5% en buffer fosfato salino (PBS) con tritón al 0.5% por 20 min. Posteriormente, se retiró el líquido y los cortes fueron incubados con un anticuerpo primario anti- OT neurofisiña desarrollado en ratón (dilución 1:250, PS60, monoclonal, proporcionado por el Dr. H. Gainer, NIH Institute of Neurological Disorders and Stroke, OH, USA), anti-VP desarrollado en conejo (dilución 1:500 policlonal, marca chemicon), anti-encefalinas desarrollado en ratón (dilución 1:1000 monoclonal, marca Millipore) y anti-DIN A desarrollado en conejo (dilución 1:200 policlonal, marca Bachem), la incubación se realizó durante toda la noche a 4° C. Las combinaciones para las inmunofluorescencias dobles fueron: OT-VP, OT-DIN, VP-ENC y DIN-ENC. No se hicieron las combinaciones de OT-ENC ni VP-DIN debido a que los anticuerpos primarios en estas combinaciones están desarrollados en el mismo animal. Posteriormente, los cortes fueron lavados en PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios Alexa 488 y Alexa 555 (dilución 1:300, Molecular Probes) según fuera el caso. Consecutivamente los cortes fueron lavados, deshidratados, aclarados y montados con DPX en portaobjetos gelatinizados, para su observación. Todos los experimentos contaron con su propio control, los cuales fueron tratados de la misma manera excepto que el primer anticuerpo fue omitido, se anexa más información sobre la técnica de inmunofluorescencia y sobre los péptidos en los apéndices anexos.

### **5.6. Deshidratación**

Para la deshidratación los cortes fueron pasados por un tren de alcoholes de menor a mayor concentración: 70%, 80%, 96%, y 100% y por Xilol absoluto. Finalmente se les aplicó la resina DPX y un cubreobjetos para su conservación.

### **5.7. Tinción con Violeta de Cresilo**

Para teñir los cortes con Violeta de Cresilo fue necesario hidratar las muestras con un tren que consiste de Xilol absoluto y de alcohol al 100%, 96%, 80%, 70%. Una vez

hidratados fueron sumergidos en una solución de Violeta de Cresilo al 0.5 %, finalmente fueron deshidratados y cubiertos con un cubreobjetos con la resina entellan.

### **5.8. Análisis Histológico**

Las secciones del tejido con los fluorocromos fueron procesadas en un microscopio confocal invertido Zeiss LSM 510 Meta, se utilizaron los filtros de Fluoresceína, Rodamina y UV. Los picos de las longitudes de onda para la excitación/emisión del TB son 365 nm y 425 nm, mientras que los picos de excitación/emisión de fluoresceína son de 490/514 nm, y para Rodamina son de 553/627 nm respectivamente. Para capturar la imagen del NPV en cada uno de los 8 cortes rostro-caudales de cada serie, se utilizó una cámara LEICA DFC320, las tres fotomicrografías del mismo tejido pero obtenidas con diferente filtro fueron traslapadas en el programa Adobe Photoshop 5.5. En algunos cortes fue necesario tomar dos fotomicrografías con cada uno de los filtros para obtener el NPV completamente, en estos casos primero se hizo el traslape de las fotomicrografías obtenidas con diferente filtro y en seguida se reconstruyó la imagen del NPV, al reconstruir la imagen el traslape fue de aproximadamente el 4%.

Las imágenes del NPV en cada nivel rostro-caudal fueron procesadas en el programa Image J, primero se separaron los tres canales de la imagen, en cada imagen se estableció el umbral de la señal. Posteriormente se ejecutó el pluging ColocalizeRGB, el cual devuelve imágenes con la colocación entre los tres canales: verde-rojo, verde-azul, rojo-azul, verde-rojo-azul. Finalmente se cuantificó el área con señal en las imágenes de los canales verde, rojo y azul, y en las imágenes de las colocaciones. Se realizó una regla de tres para conocer que porcentaje del área total del NPV era el área con marca para cada uno de los fluorocromos, el área total del NPV se obtuvo delimitando el área del NPV en cada uno de los ocho cortes de una serie que se tiñó con Violeta de Cresilo, por lo que para sacar el porcentaje de área inmunorreactiva a OT, VP, DIN, ENC, así como para conocer el porcentaje de área marcada con el TB en el NPV se sumaron los 8 cortes de cada serie. Todas las imágenes del presente trabajo se obtuvieron por microscopia confocal sin embargo las imágenes analizadas son la suma de todo el tejido, el cual tuvo un grosor 40  $\mu\text{m}$ , por lo que se debe considerar este hecho en la interpretación de los resultados de colocación puesto que con la técnica

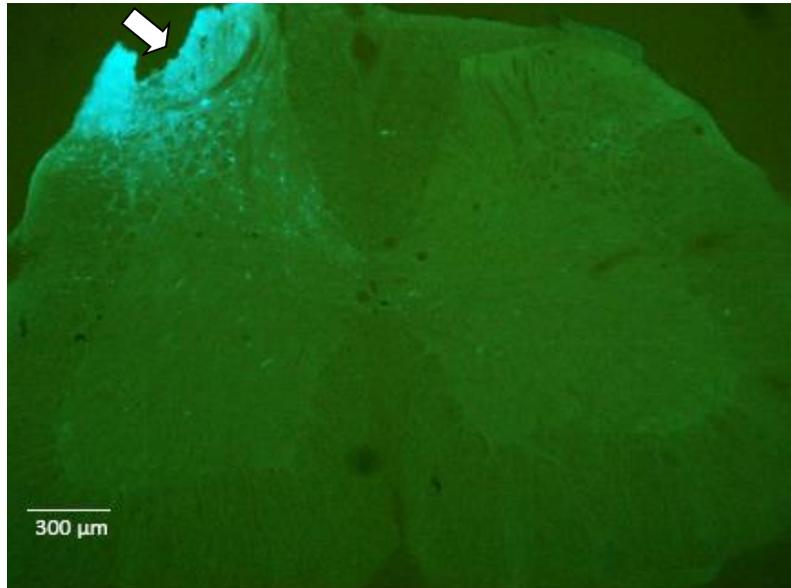
empleada es posible considerar colocación donde en realidad solo es traslape entre dos puntos con diferente profundidad.

### **5.9. Análisis estadístico**

Se aplicó la prueba de Kruskal Wallis, y en los casos necesarios la prueba *Post hoc* de comparación múltiple de Dunn.

## 6. Resultados

En el siguiente corte histológico de la ME se muestra que la inyección del trazador neuronal retrogrado true blue se localizó a nivel del segmento lumbar L3, en las láminas superficiales del asta dorsal, ver figura 4.

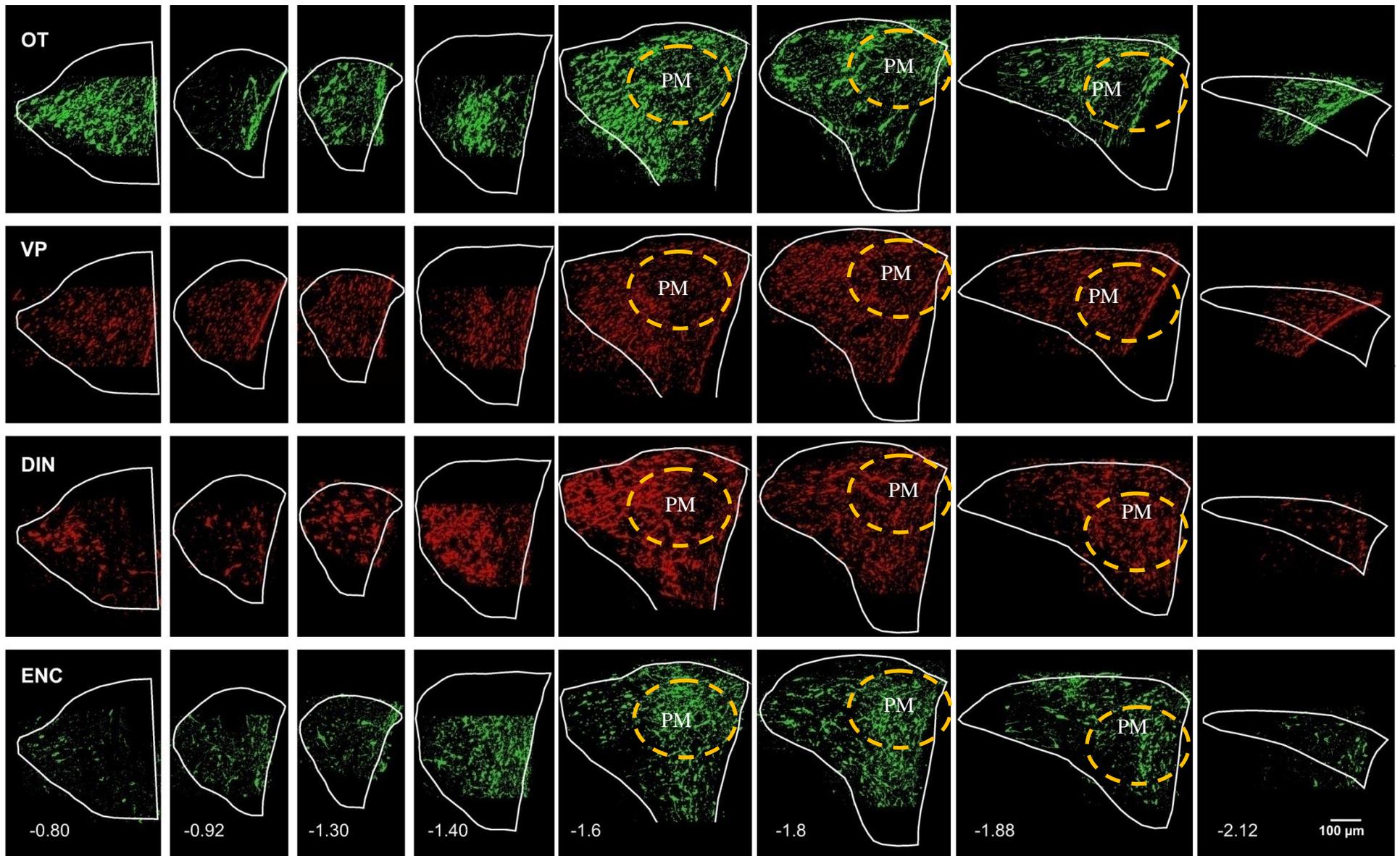


**Figura 4.** Fotomicrografía del sitio de inyección del trazador neuronal TB en la ME. En la parte superior izquierda de la figura se señala con la flecha el sitio de inyección, el cual se localizó en las láminas superficiales del asta dorsal, del segmento L3 de la ME.

Las inmunofluorescencias realizadas en el NPV para OT, VP, DIN y ENC permitieron conocer la naturaleza peptídica de las neuronas de proyección y analizar de manera cuantitativa la distribución de cada uno de los péptidos en el NPV. A continuación se presentan los resultados de las inmunofluorescencias sin tomar en cuenta la vía del NPV a la ME.

### 6.1. OT, VP, DIN y ENC en el NPV

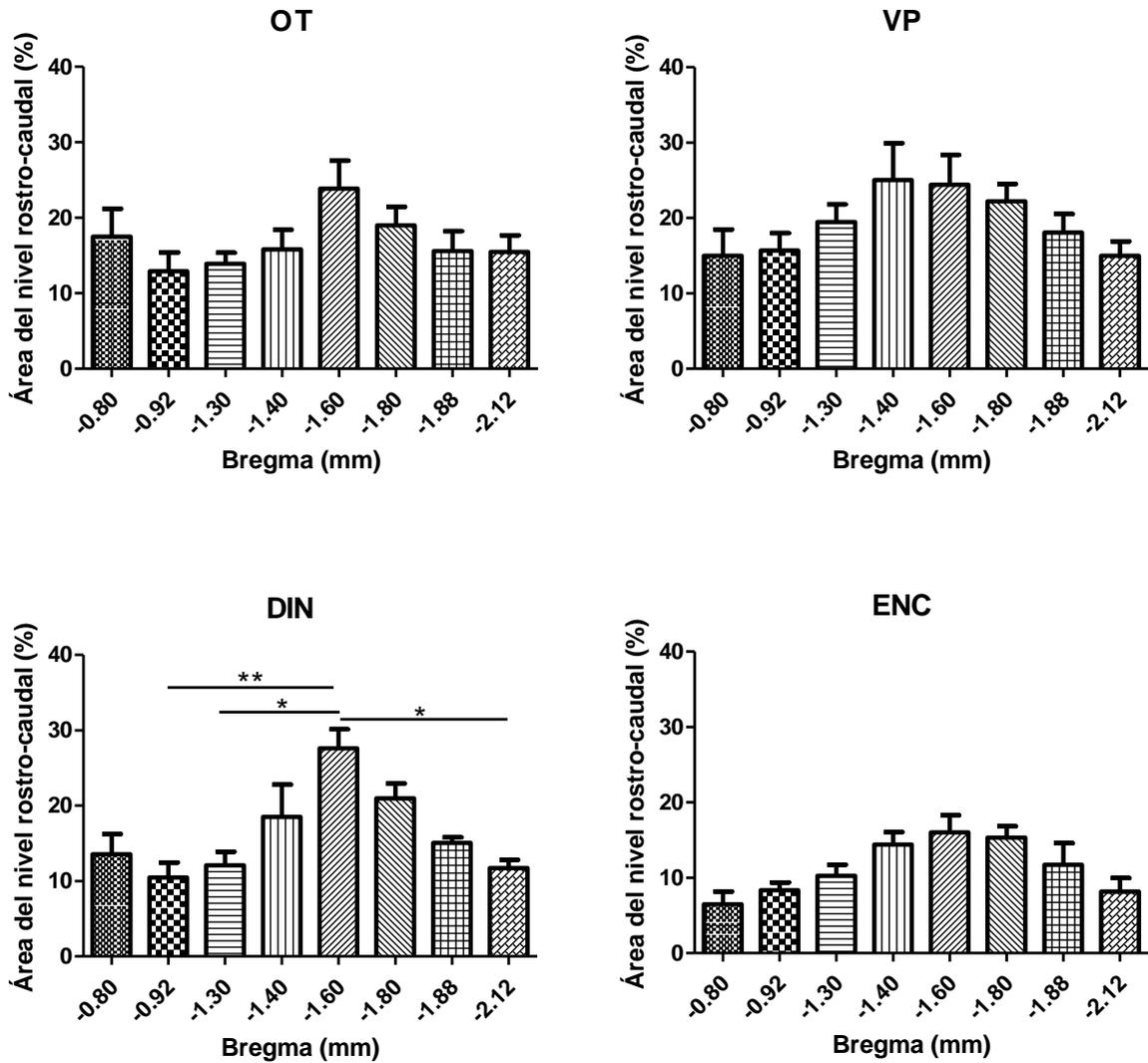
Cada uno de los péptidos estudiados se puede localizar a lo largo de la extensión rostro-caudal del NPV, la distribución de cada péptido a cada nivel de Bregma se puede observar en la figura 4, en donde se aprecia que a -1.6 y -1.8 de Bregma, en PM, hay poca marca inmunorreactiva a OT y a VP sin embargo esa área es inmunorreactiva a DIN y principalmente a ENC.



**Figura 5.** Fotomicrografías de la inmunoreactividad de OT, VP, DIN Y ENC a lo largo del NPV. A -1.6 y -1.8 mm con respecto a Bregma se puede observar en PM poca marca inmunorreactiva a OT y VP, sin embargo, la misma región resultó ser inmunorreactiva a DIN y principalmente a ENC (línea puntada amarilla). Las imágenes de la inmunoreactividad de OT y VP fueron obtenidas del mismo animal, mientras que las imágenes de inmunoreactividad de DIN y ENC fueron obtenidas de un animal distinto.

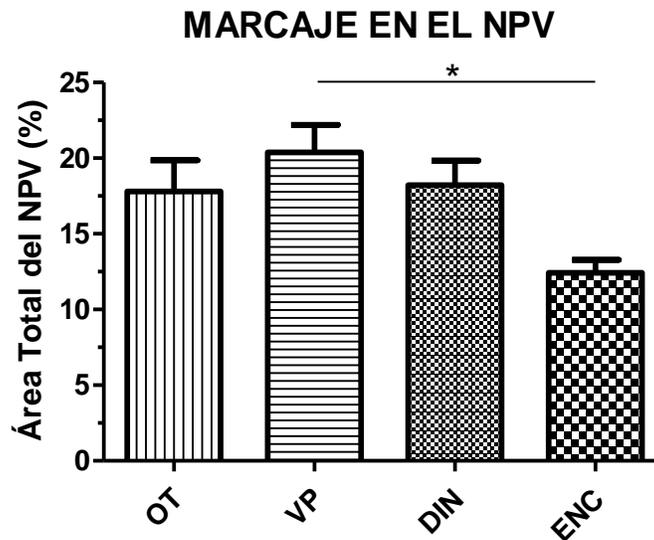
En regiones posteriores -1.88 de Bregma se puede observar en PM un hueco en la fotomicrografía de la inmunorreactividad de OT, dicho espacio muestra inmunorreactividad a ENC, ver figura 5.

En la figura 6 se observa que la inmunorreactividad de cada uno de los péptidos estudiados es mayor en la antero posterioridad -1.60 mm de Bregma.



**Figura 6.** Gráficas de la inmunorreactividad a OT, VP, DIN y ENC a diferente nivel rostro-caudal del NPV. Se observa mayor inmunorreactividad para todos los péptidos en los niveles de -1.60 y -1.80 con respecto a Bregma, N=3.

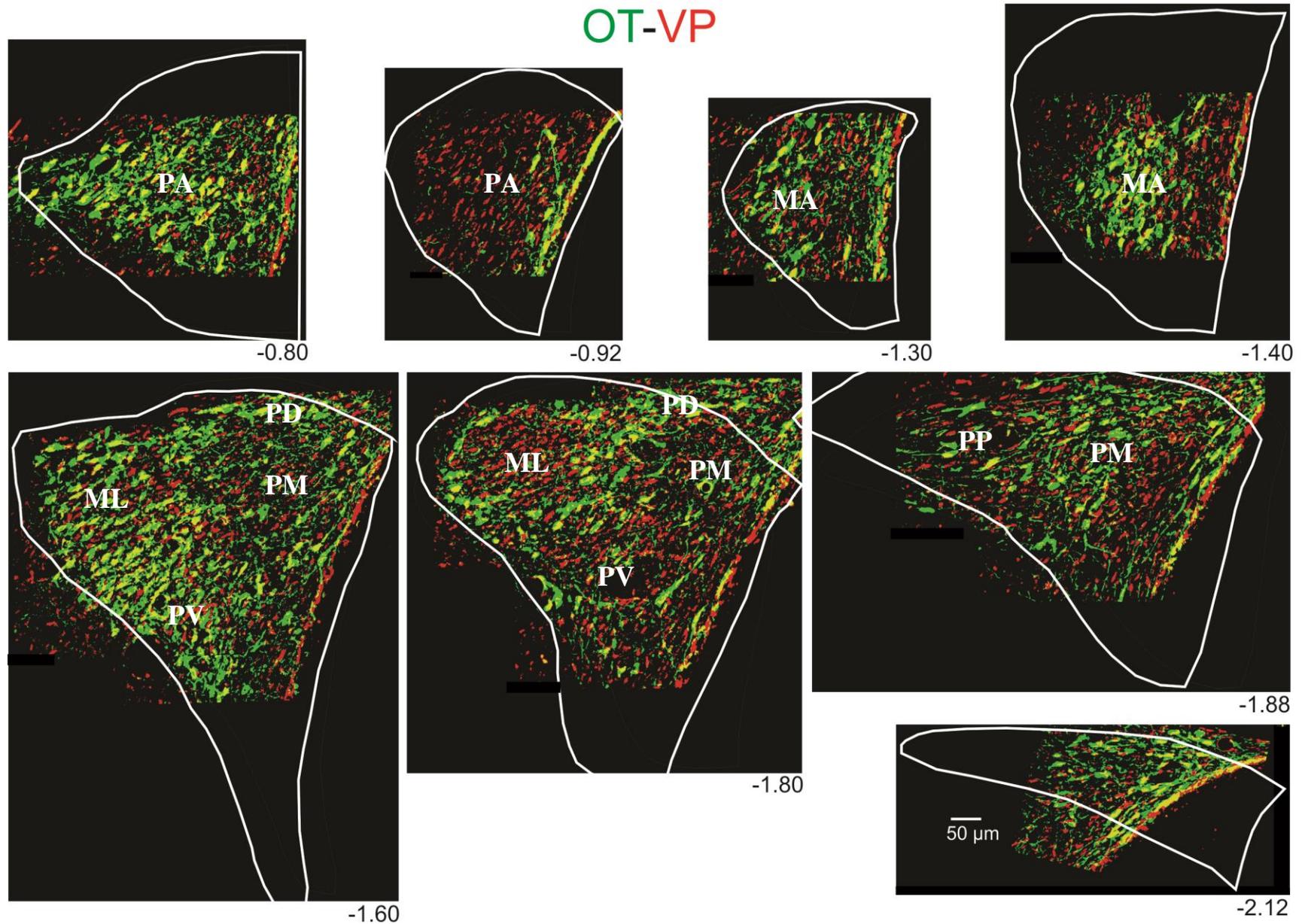
Al cuantificar la inmunorreactividad del área total del NPV encontramos que el 17.80% del área del NPV es inmunorreactiva a OT, el 20.39% del área del NPV es inmunorreactiva a VP, el 18.21% del área del NPV es inmunorreactiva a DIN y el 12.43% del NPV es inmunorreactiva a ENC, ver figura 7. El área total del NPV a la cual nos referimos se obtuvo delimitando el área del NPV de cada uno de los 8 cortes coronales que conformaron una serie teñida con Violeta de Cresilo.



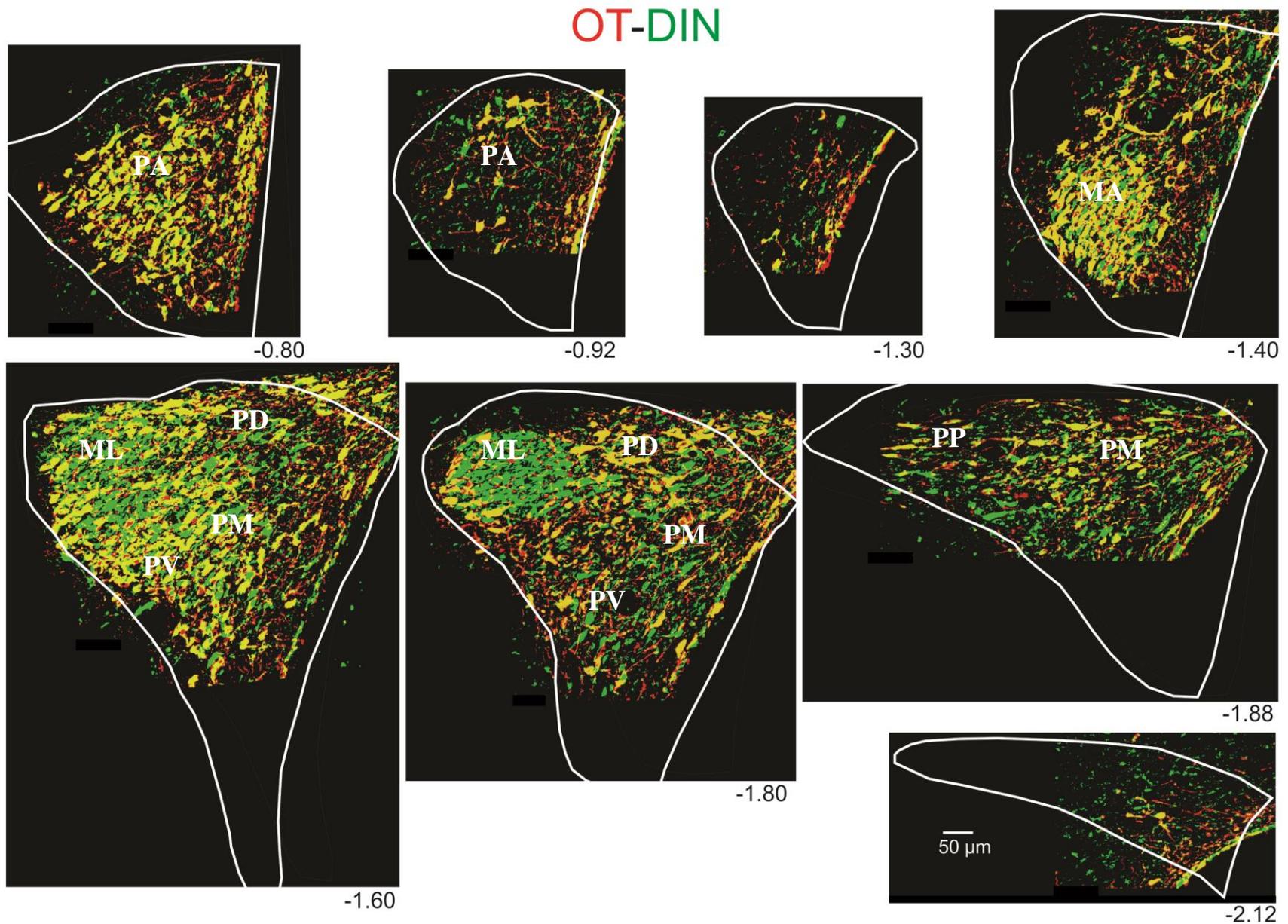
**Figura 7.** Gráfica de la inmunorreactividad a OT, VP, DIN y ENC en el NPV. Se puede observar que la inmunorreactividad del NPV hacia la ENC es menor que la inmunorreactividad que muestra este núcleo a la, OT, VP o DIN, sin embargo al realizar la prueba de comparación múltiple de Dunn se obtiene que el área inmunorreactiva a ENC solo es diferente al área inmunorreactiva a VP con una  $*P < 0.05$ ,  $N=3$ .

## 6.2. Colocalización de dos péptidos

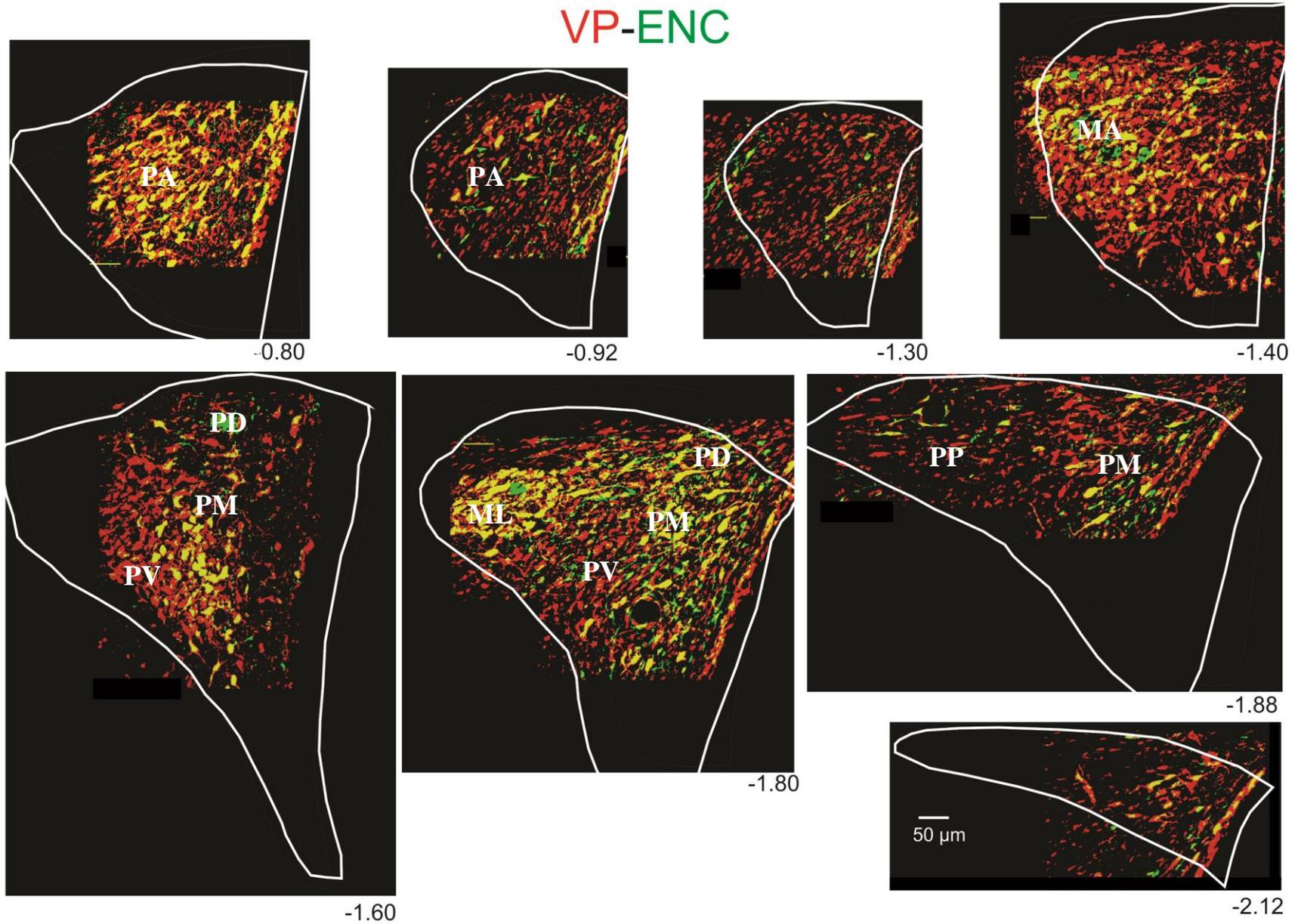
En la figura 8, se observa la colocalización entre OT-VP, en la figura 9 se observa la colocalización entre OT-DIN, en las figuras 10 y 11 se observa la de VP-ENC y de DIN-ENC respectivamente, para diferentes niveles rostro-caudal del NPV.



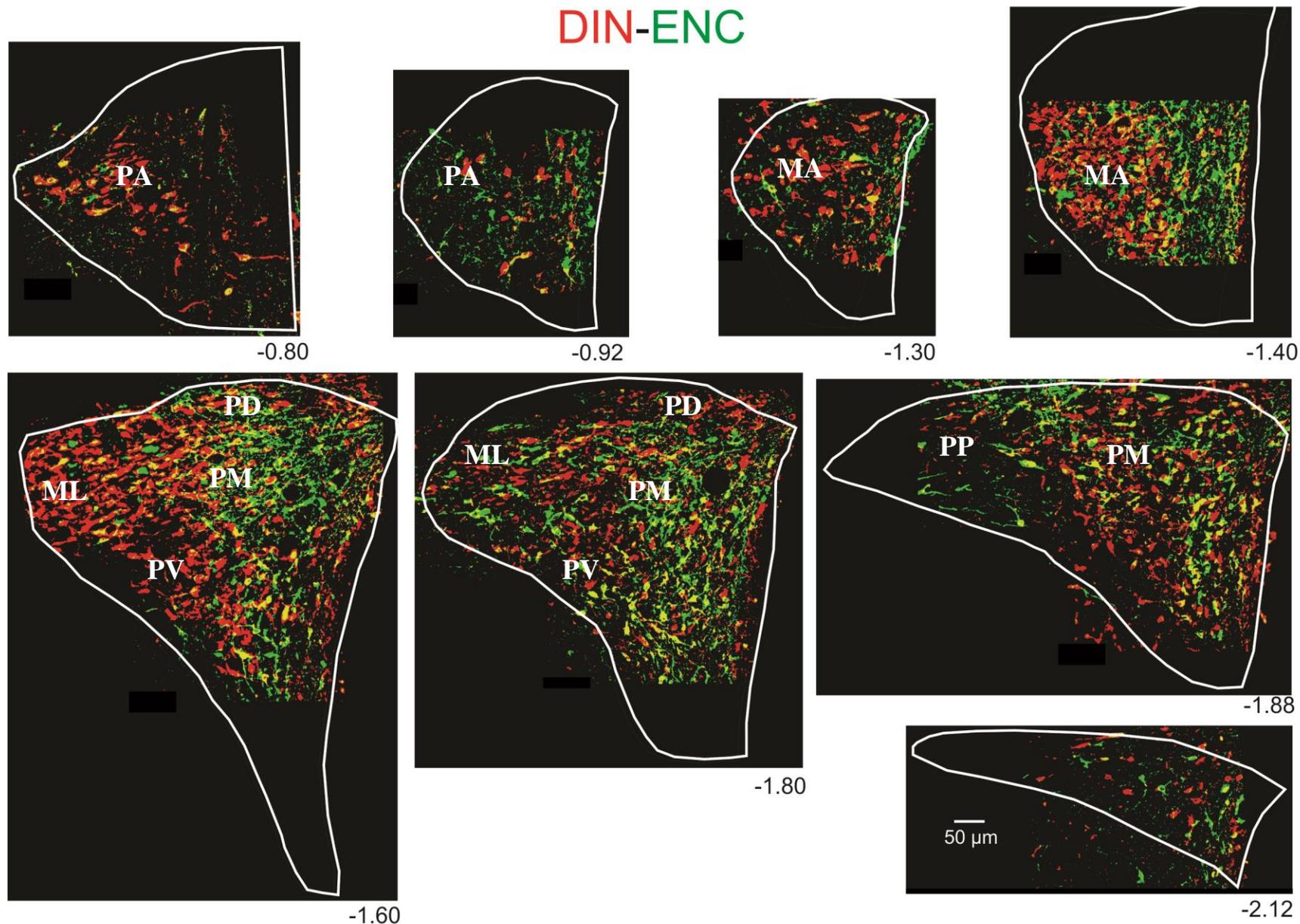
**Figura 8.** Inmunorreactividad de las neuronas del NPV a OT/VP. Imágenes obtenidas en microscopía de fluorescencia, desde -0.80 hasta -2.12 mm de Bregma. Se observan en verde células inmunopositivas a VP, en rojo células inmunopositivas a OT y en naranja células inmunorreactivas a los dos péptidos.



**Figura 9.** Inmunorreactividad de las neuronas del NPV a OT/DIN. Imágenes obtenidas en el microscopio de fluorescencia del NPV, desde -0.80 hasta -2.12mm de Bregma. En rojo se observan células oxitocinérgicas, en verde células dinorfinérgicas y en amarillo células que coexpresan ambos péptidos.

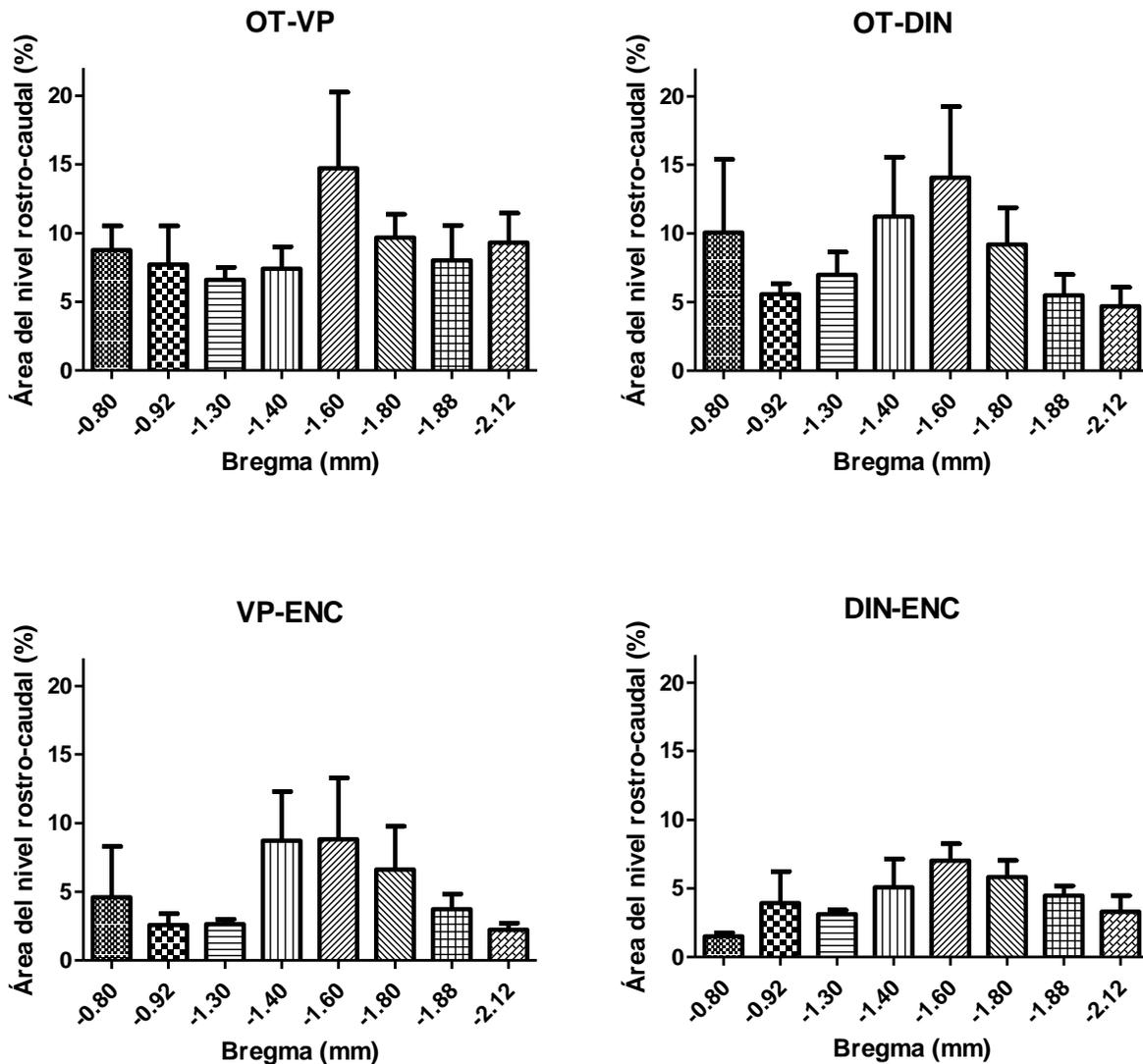


**Figura 10.** Inmunorreactividad de las neuronas del NPV a VP/ENC. Imágenes del NPV, donde se observan células encefalinérgicas (en verde), células vasopresinérgicas (rojo) y células que son inmunorreactivas a VP y a ENC (amarillo). Tomadas desde -0.80 hasta -2.12mm de Bregma y obtenidas en un microscopio de fluorescencia.



**Figura 11.** Inmunorreactividad de las neuronas del NPV a DIN/ENC. Imágenes a nivel de -0.80 hasta -2.12 mm de Bregma y obtenidas con microscopía de fluorescencia. Se observan células encefalinérgicas (en verde), células dinerfinérgicas (rojo) y células que contienen ambos péptidos (amarillo).

Para apreciar la colocación de dos péptidos a diferente nivel rostro-caudal del NPV se realizaron las siguientes gráficas, en donde se aprecia que a -1.6 de Bregma se encuentra mayor colocación, ver figura 12.

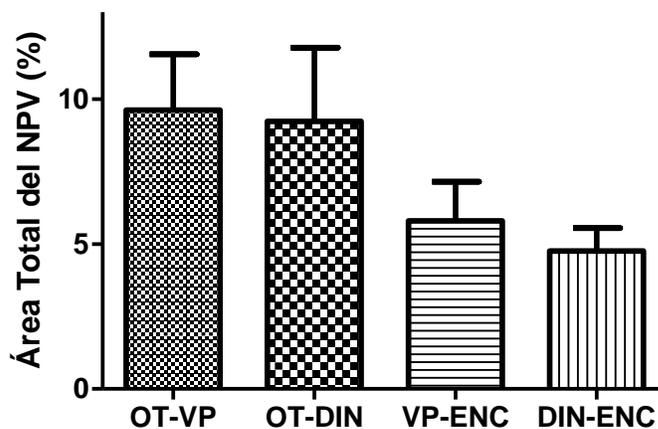


**Figura 12.** Gráficas de la colocación de dos péptidos en el NPV en cada nivel rostro-caudal. Se observa que la colocación de DIN-ENC es menor, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la prueba de Kruskal Wallis,  $P < 0.05$ .

Se encontró colocación del 9.62% del área total del NPV entre la OT y la VP, esta colocación es proporcional al área del NPV, es decir hay mayor colocación entre estos péptidos a nivel de -1.60, donde el NPV ocupa mayor área. La colocación de los péptidos OT y DIN fue del 9.23% del área del NPV y al igual que

para los demás péptidos es en las regiones posteriores del núcleo donde hay mayor colocalización. El 5.79% del área total del NPV colocaliza para VP y ENC, la distribución de esta colocalización es igual a las anteriores, es decir hay mayor colocalización en las regiones posteriores del NPV. La colocalización de ENC-DIN ocupa el 4.76% del área total del NPV, es la colocalización que ocupa menor área, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa, ver gráfica de la figura 13.

### COLOCALIZACIÓN ENTRE DOS PÉPTIDOS EN EL NPV

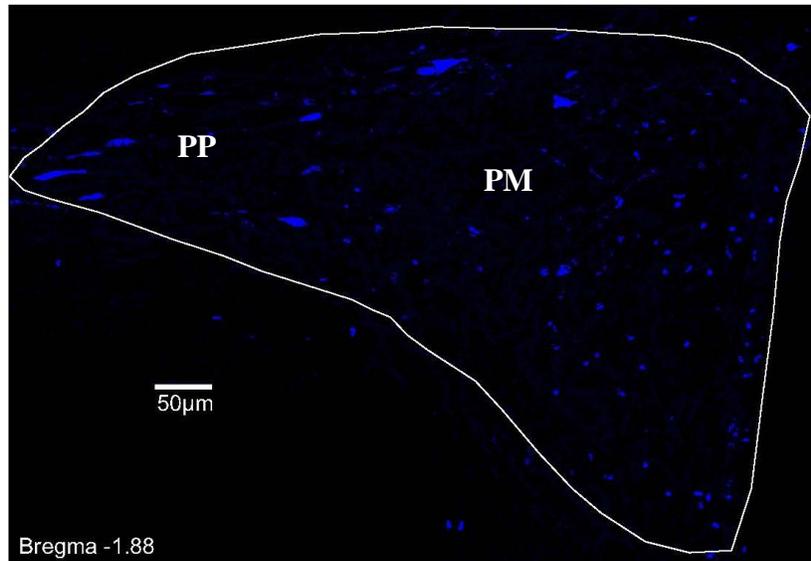


**Figura 13.** Gráfica de la colocalización de dos péptidos en el NPV. Se observa mayor colocalización de OT-VP y de OT-DIN, sin embargo no hay diferencias estadísticamente significativas, N=3.

En las páginas anteriores se expusieron los resultados de la inmunorreactividad a algún péptido en el NPV, a continuación se presentan los resultados de la proyección del NPV al segmento L3 de la ME y finalmente, se exponen los resultados de la inmunorreactividad de las neuronas que conforman la proyección del NPV-ME a las láminas superficiales del segmento L3.

### 6.3. Proyección del NPV a la ME

El área del NPV marcada con el trazador neuronal TB, inyectado en el segmento lumbar L3 de la médula espinal, constituye el 5.06% del área total del NPV. Dicha área se localizó en toda la extensión rostro-caudal del NPV, sin embargo, su presencia aumenta en -1.40, -1.60, -1.80 y -1.88 mm de Bregma, en PM y en menor proporción en PP (ver figura 14).

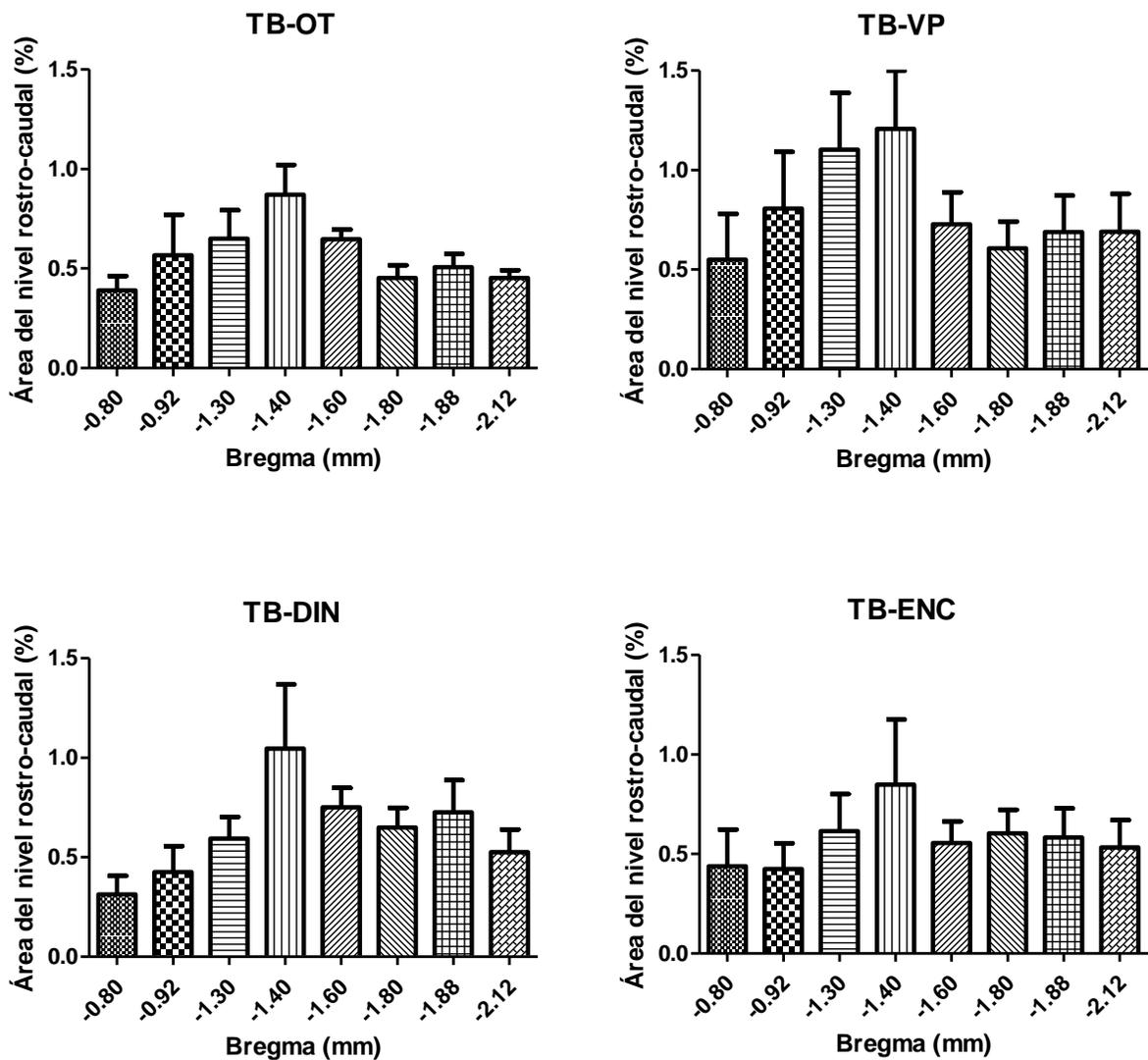


**Figura 14.** Proyección del NPV a la ME. En esta imagen del NPV se pueden observar en azul neuronas que proyectan a las láminas superficiales del asta dorsal de la ME al segmento L3. Imagen reconstruida de fotomicrografías tomadas con un microscopio de fluorescencia y un objetivo de 20X.

La colocalización del TB con cada uno de los péptidos revela la naturaleza peptídica de estas neuronas de proyección hacia la ME, en algunas ocasiones las neuronas marcada con TB colocalizan con dos de los péptidos estudiados.

#### **6.4. Péptidos en neuronas del NPV con proyección a la ME**

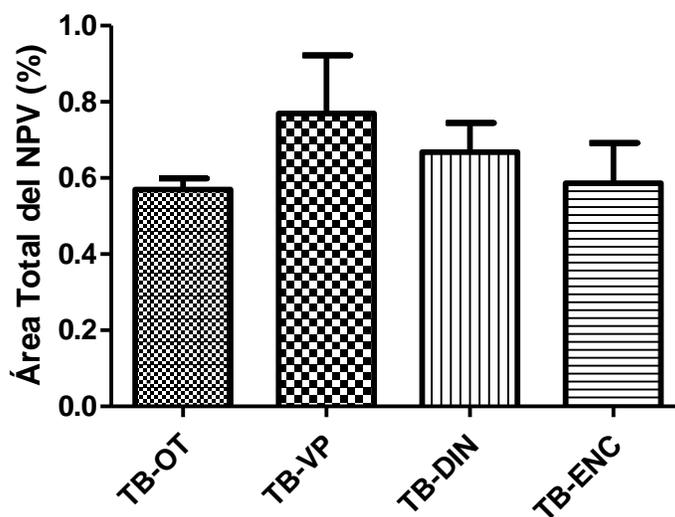
En la figura 15 se muestran gráficas de la colocalización del TB con cada uno de los péptidos estudiados en los diferentes niveles rostro-caudal del NPV, nótese que en -1.40, -1.60, -1.80 y -1.88 mm de Bregma es donde se encuentra la mayor colocalización.



**Figura 15.** Gráficas de colocalización. En la gráfica superior izquierda se observa la colocalización de TB-OT, en gráfica superior derecha la colocalización de TB-VP en la gráfica inferior izquierda la colocalización de TB y DIN, y en la gráfica inferior derecha la colocalización de TB y ENC.

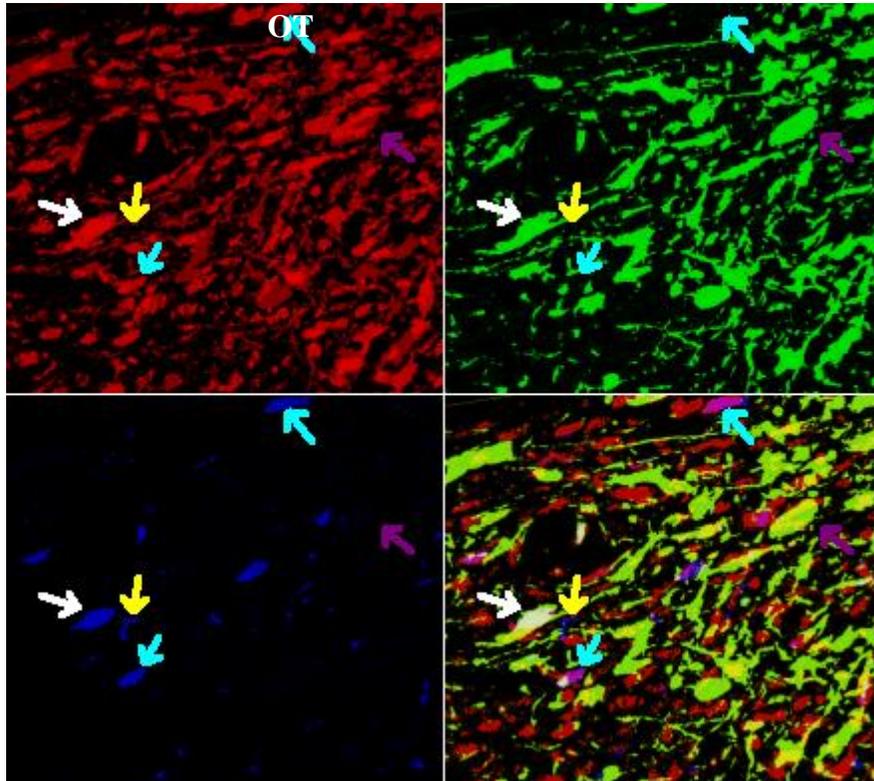
En resumen los porcentaje de las áreas marcadas con TB que colocalizan con cada uno de los péptidos estudiados son los siguientes: el 0.56% del área total del NPV que colocalizó con el trazador neuronal fue la OT (TB-OT), el 0.76% del área total colocalizó con la VP (TB-VP), el 0.66% colocalizó con la DIN (TB-DIN) y el 0.58% colocalizó con la ENC (TB-ENC), por lo que al menos la mitad del área marcada con TB no colocaliza con ninguno de los péptidos estudiados, ver figura 16.

## COLOCALIZACIÓN DE TB CON CADA UNO DE LOS PÉPTIDOS EN EL NPV

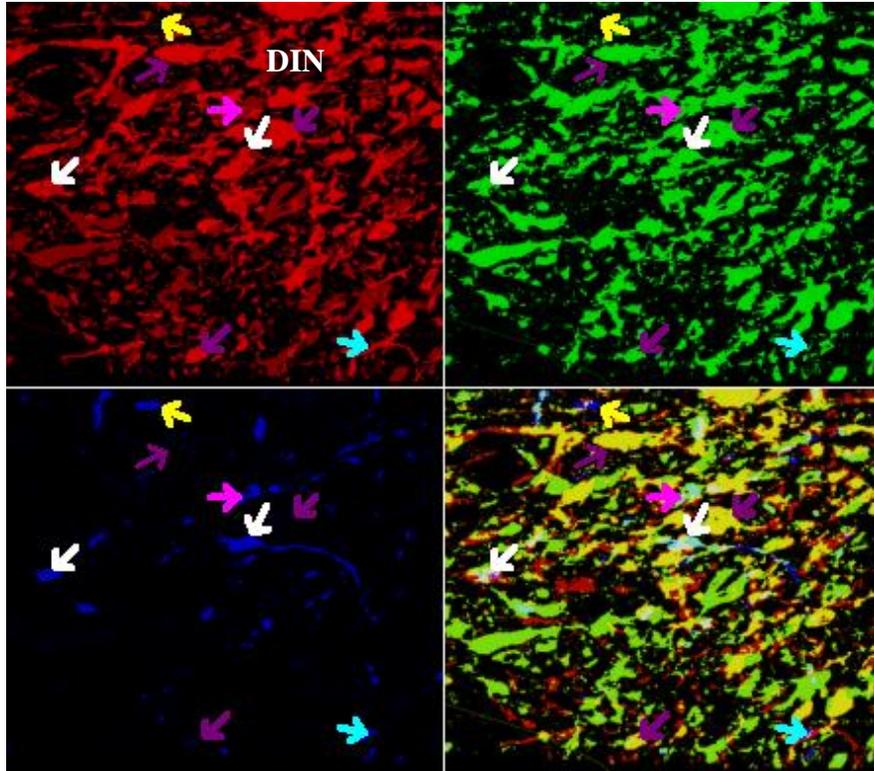


**Figura 16.** Gráfica de la colocalización de TB con OT, VP, DIN o ENC en el NPV, al sumar las áreas se obtiene un total de 2.56 %, por lo que al menos la mitad del área marcada con TB no colocaliza con los péptidos estudiados. N=3.

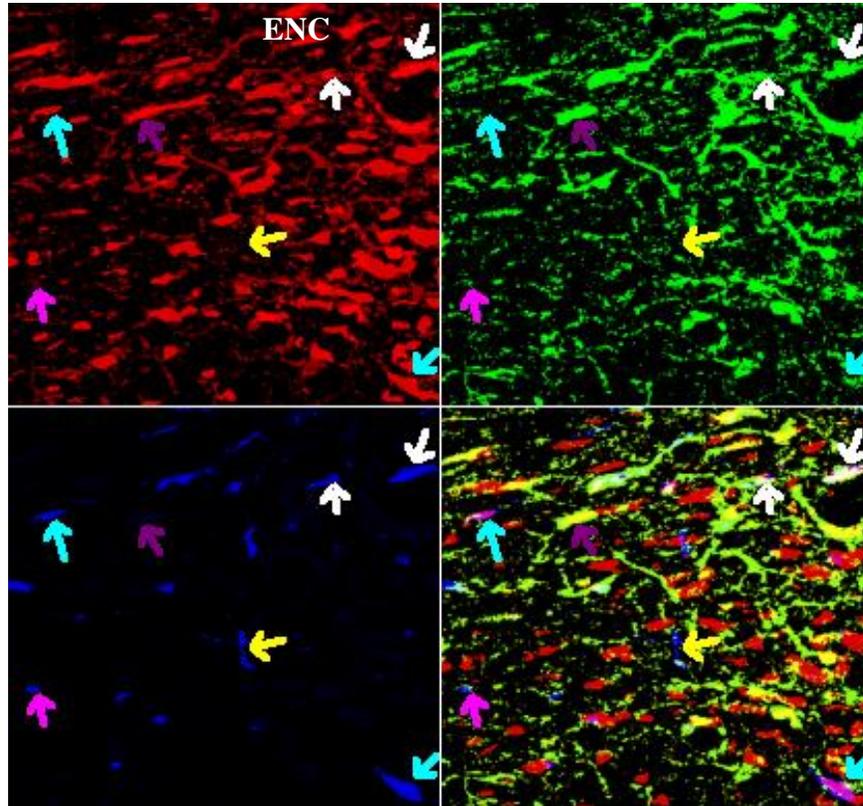
Además de la colocalización entre el TB y un péptido, se encontrarán colocalización triple, es decir regiones del NPV que colocalizan para TB y dos péptidos, ejemplos gráficos de colocalización doble o triple en el NPV se observan en las figuras, 17, 18, 19 y 20.



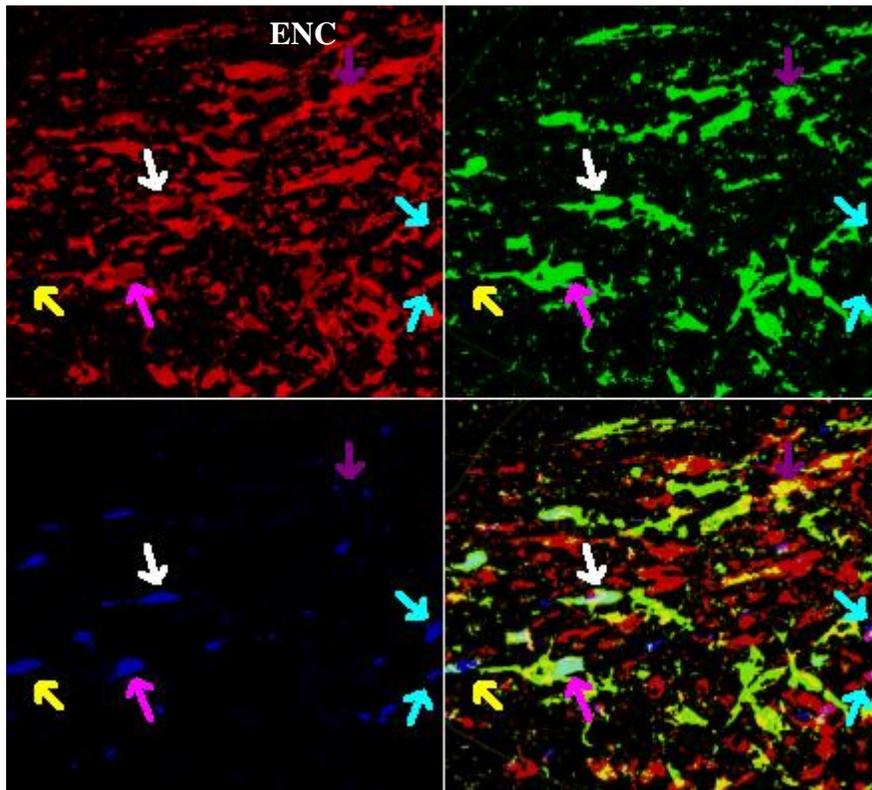
**Figura 17.** Inmunorreactividad a VP/OT de las neuronas de proyección del NPV a la ME. En la imagen superior izquierda se muestra la inmunorreactividad a VP, en la imagen superior derecha se puede observar la inmunorreactividad a OT, en la imagen inferior izquierda se muestran neuronas de proyección al segmento L3 de la ME y en la imagen inferior derecha se muestra un traslape de las tres fotomicrografías anteriores. La neuronas que colocalizan VP, OT, y TB se señalan con flechas blancas, las neuronas que colocalizan TB y VP se señalan con flechas azules, las neuronas que colocalizan para VP y OT se señalan con flechas moradas y las neuronas que solo contienen TB se señalan con flechas amarillas.



**Figura 18.** Proyección oxitocinérgica (OT) y dinorfinérgica (DIN) de las neuronas del NPV a la ME. En la imagen superior izquierda se muestra una fotomicrografía de la inmunorreactividad a OT, en la imagen superior derecha se puede observar la inmunorreactividad a DIN, en la imagen inferior izquierda se muestran neuronas de proyección al segmento L3 de la ME y en la imagen inferior derecha se muestra un traslape de las tres fotomicrografías anteriores. Las neuronas que colocalizan OT, DIN y TB se señalan con flechas blancas, las neuronas que colocalizan TB y OT se señalan con flechas azules, las neuronas que colocalizan TB y DIN se señalan con flechas rosas, las neuronas que colocalizan para OT y DIN se señalan con flechas moradas y las neuronas que solo contienen TB se señalan con flechas amarillas.

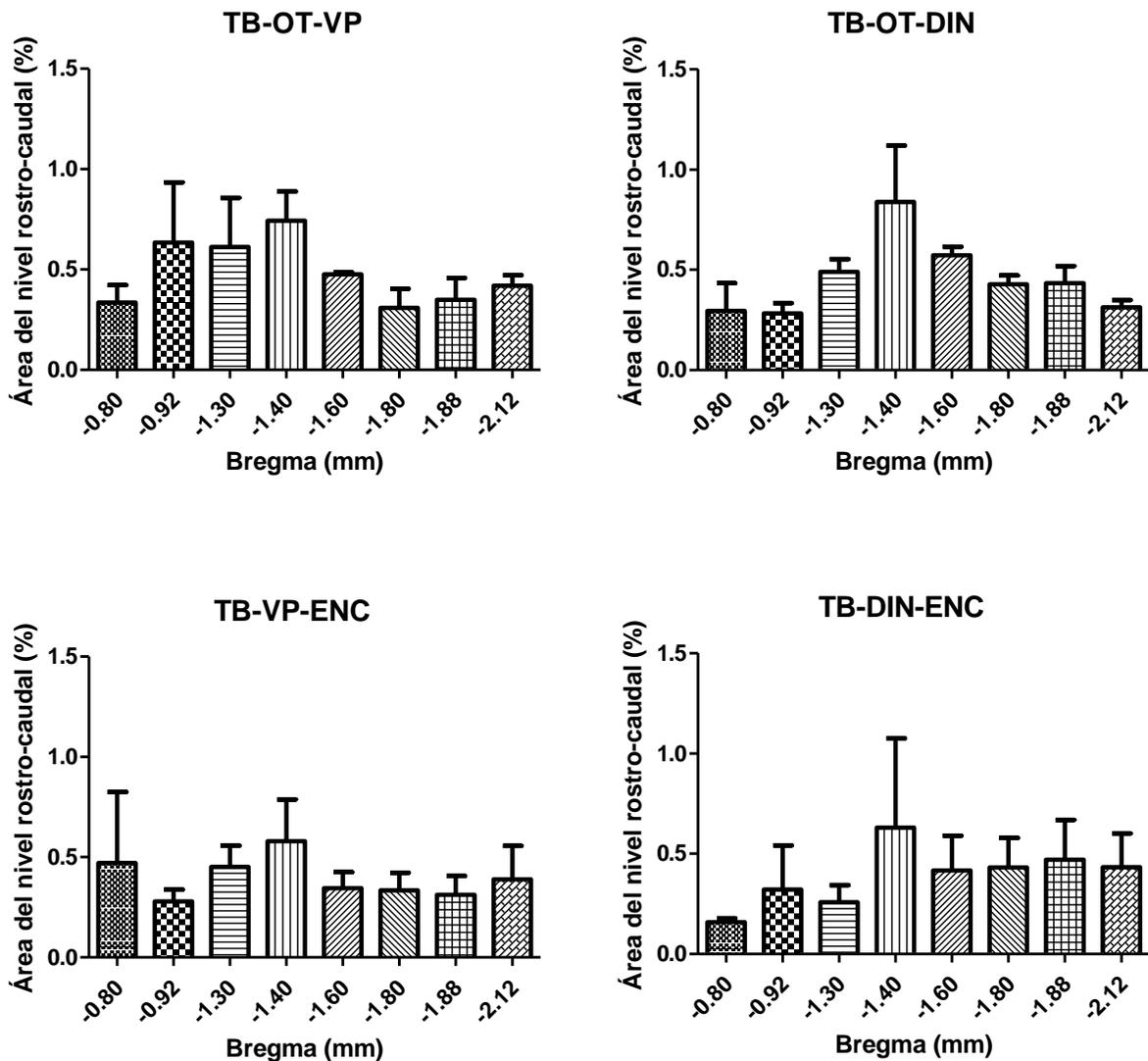


**Figura 19.** Proyección vasopresinérgica (VP) y encefalinérgica (ENC) de las neuronas del NPV a la ME. En la imagen superior izquierda se muestra una fotomicrografía de la inmunorreactividad a VP, en la imagen superior derecha se observa la inmunorreactividad a ENC, en la imagen inferior izquierda se muestran neuronas de proyección al segmento L3 de la ME y en la imagen inferior derecha se muestra un traslape de las tres fotomicrografías anteriores. Las neuronas que colocalizan VP, ENC y TB se señalan con flechas blancas, las neuronas que colocalizan TB y VP se señalan con flechas azules, las neuronas que colocalizan TB y ENC se señalan con flechas rosas, las neuronas que colocalizan para VP y ENC se señalan con flechas moradas y las neuronas que solo contienen TB se señalan con flechas amarillas.



**Figura 20.** Inmunorreactividad a DIN y ENC de las neuronas del NPV que proyectan a la ME. En la imagen superior izquierda se muestra una fotomicrografía de la inmunorreactividad a DIN, en la imagen superior derecha se puede observar la inmunorreactividad a ENC, en la imagen inferior izquierda se muestran neuronas de proyección al segmento L3 de la ME y en la imagen inferior derecha se muestra un traslape de las tres fotomicrografías anteriores. Las neuronas que colocalizan DIN, ENC y TB se señalan con flechas blancas, las neuronas que colocalizan TB y DIN se señalan con flechas azules, las neuronas que colocalizan TB y ENC se señalan con flechas rosas, las neuronas que colocalizan para DIN y ENC se señalan con flechas moradas y las neuronas que solo contienen TB se señalan con flechas amarillas.

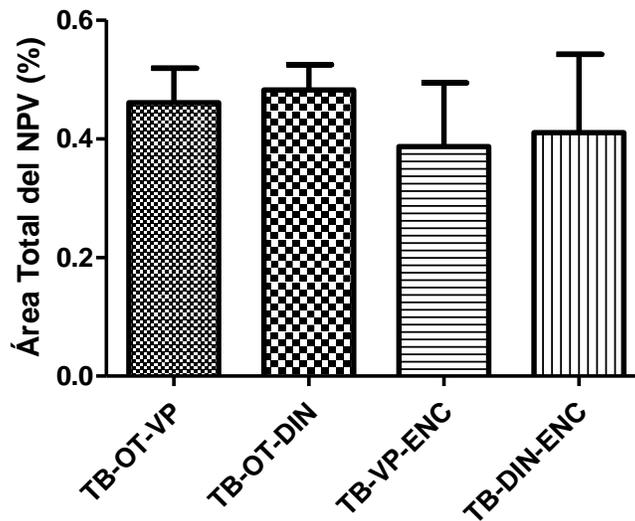
En la figura 21 se pueden comparar la colocación triple (TB-OT-VP, TB-OT-DIN, TB-VP-ENC y TB-DIN-ENC) para cada nivel rostro-caudal del NPV.



**Figura 21.** Gráfica de colocaciones triples para diferentes niveles rostro-caudal del NPV, N=3.

Al analizar los resultados de la colocación triple se obtuvo que el 0.46% del área total del NPV colocaliza para TB-OT-VP, el 0.48% colocaliza para TB-OT-DIN, el 0.38% colocaliza para TB-VP-ENC y el 0.41% colocaliza para TB-DIN-ENC, figura 22.

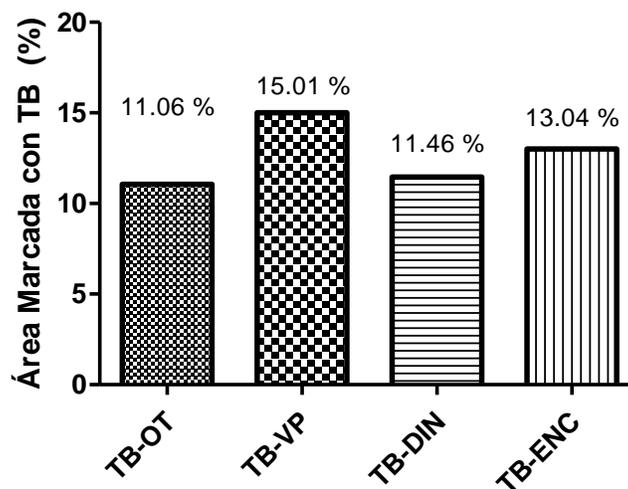
### COLOCALIZACIÓN DE TB Y DOS PÉPTIDOS EN EL NPV



**Figura 22.** Gráfica del área de colocalización de TB y dos péptidos en el NPV, al compararla con la figura 15 se puede observar que la colocalización entre dos péptidos es muy alta dentro de la vía de proyección del NPV-ME. N=3

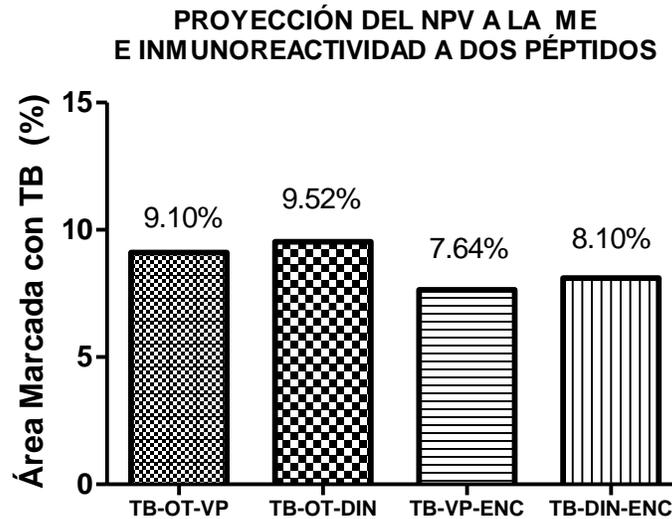
En resumen se obtuvo que del área marcada con TB, el 11.06% colocalizó con OT, el 15.01% con VP, el 11.46% con DIN y el 13.04% con ENC, ver figura 23.

### PROYECCIÓN DEL NPV A LA ME E INMUNOREACTIVIDAD A UN PÉPTIDO



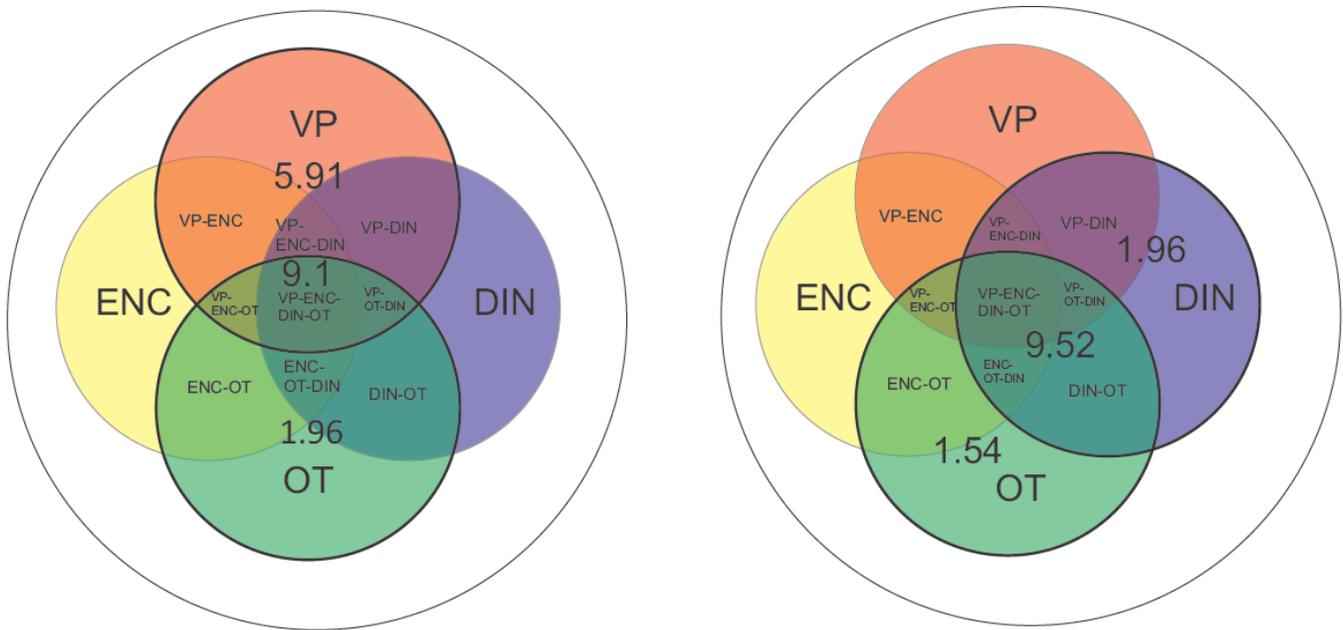
**Figura 23.** Gráfica de la inmunorreactividad a OT, VP, DIN y ENC, en las neuronas de proyección del NPV-ME, N=3.

Del área marcada con TB, el 9.10% es inmunorreactiva a OT y VP, el 9.52% es inmunorreactiva a OT y DIN, el 7.64% resultó inmunorreactiva a VP y ENC y el 8.10% es inmunorreactiva a DIN y ENC, dichos porcentajes se pueden apreciar en la gráfica de la figura 24.



**Figura 24.** Gráfica de la colocación entre dos péptidos, en las neuronas de proyección del NPV-ME. En esta gráfica se toma como el 100% únicamente el área marcada con el trazador neuronal retrógrado TB.

En las figuras 25 y 26 se presentan con diagramas de Venn los resultados de la inmunorreactividad del área del NPV con proyección a la ME. La colocación entre OT-VP es del 9.10% del área de proyección hacia la ME, por lo tanto el área inmunorreactiva a OT que no es inmunorreactiva a VP es del 1.96%, nótese que dicho porcentaje contiene el área inmunorreactiva a ENC y/o DIN. El porcentaje de área que es inmunorreactiva a VP pero no a OT es del 5.91%, obsérvese en el diagrama de la izquierda de la figura 25 que en dicho porcentaje queda contenida el área que además de ser inmunorreactiva a VP, colocaliza VP-ENC, VP-DIN e incluso VP-DIN-ENC cuyo porcentaje de área se desconoce. En la figura 25 del lado derecho se puede observar un diagrama de Venn que presenta el porcentaje de colocación entre OT y DIN el cual es del 9.52% del área con proyección a la ME, por lo que el 1.96% es inmunorreactiva a DIN pero no a OT, sin embargo, en dicho porcentaje queda contenida el área que colocaliza VP-DIN y el área que colocaliza VP-ENC-OT cuyo porcentaje se desconoce.

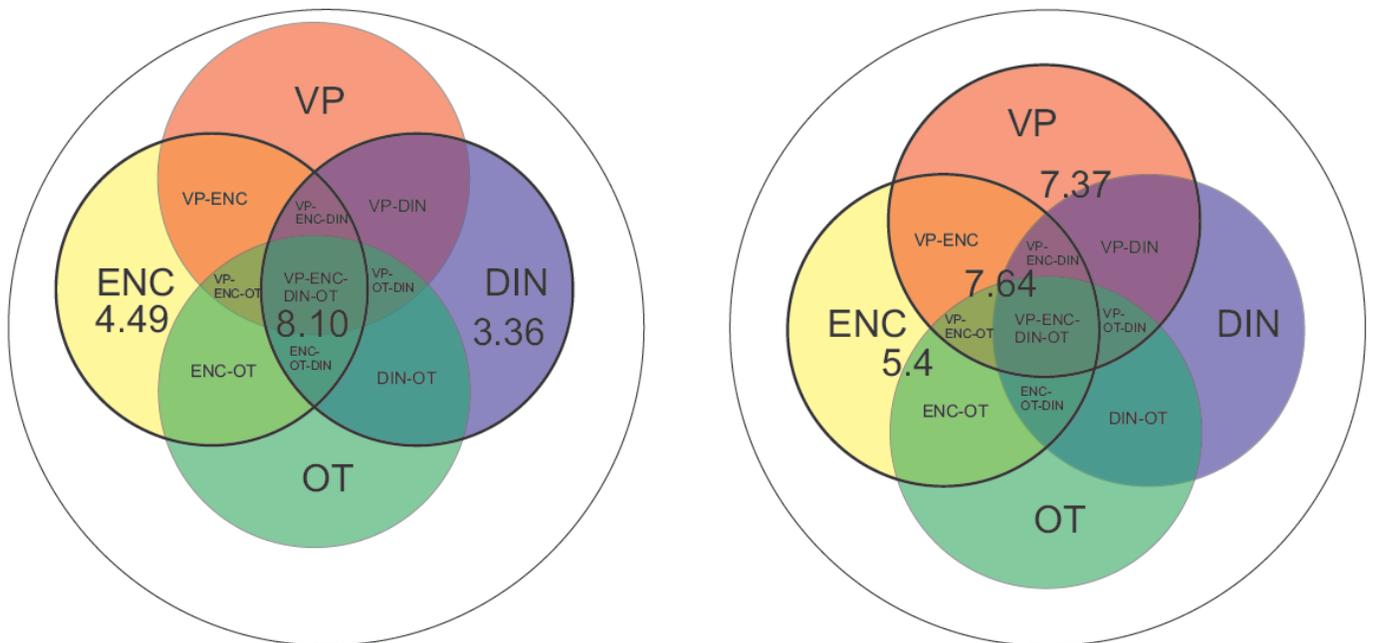


**Figura 25.** Diagrama de la colocalización entre VP/OT y OT/DIN en la proyección del NPV-ME. En el diagrama de Venn del lado izquierdo se puede observar la colocalización existente entre OT y DIN, la cual es del 9.1% del área del NPV con proyección a la ME, dicho porcentaje equivale a más de la mitad del área inmunorreactiva a OT o VP. La colocalización entre OT/DIN es del 9.52% del área total del NPV lo que equivale a más de la mitad del área inmunorreactiva a OT o DIN.

En la figura 26 se presentan diagramas de Venn que muestran la inmunorreactividad del área de proyección a ENC-DIN y la inmunorreactividad de la misma área a ENC-VP. Encontramos que del área del NPV con proyección a la ME el 8.10% colocaliza DIN-ENC, por lo que el 3.36% es área inmunorreactiva a DIN pero no a ENC y el 4.43% es área inmunorreactiva a ENC pero no a DIN. Nótese, que el área reportada como ENC pero no DIN contiene área inmunorreactiva a ENC-OT, VP-ENC y VP-ENC-OT y que el área reportada como DIN pero no ENC, contiene áreas con colocalización cuyo porcentaje no conocemos.

En el diagrama de la derecha, figura 26, se presenta el área del NPV con proyección a la ME que es inmunorreactiva a ENC pero no a VP 5.4%, el área inmunorreactiva a VP pero no a ENC 7.37% y el 7.64% que es el área de colocalización entre ENC-DIN. Nótese, que desconocemos el porcentaje de áreas con colocalización entre ENC-OT, VP-ENC-OT, VP-DIN, VP-OT-DIN, VP-ENC-DIN-OT, VP-ENC-DIN y VP-ENC-OT.

En el diagrama de la derecha, figura 26, se presenta el área del NPV con proyección a la ME que es inmunorreactiva a ENC pero no a VP 5.4%, el área inmunorreactiva a VP pero no a ENC 7.37% y el 7.64% que es el área de colocación entre ENC-DIN. Nótese, que desconocemos el porcentaje de áreas con colocación entre ENC-OT, VP-ENC-OT, VP-DIN, VP-OT-DIN, VP-ENC-DIN-OT, VP-ENC-DIN y VP-ENC-OT.



**Figura 26.** Diagrama de la colocación entre DIN/ENC y VP/ENC en la proyección del NPV-ME, en el diagrama de Venn del lado izquierdo se puede observar la colocación existente entre DIN/ENC, la cual es del 8.10% del área total del NPV lo cual equivale a más de la mitad del área inmunorreactiva a DIN o ENC. La colocación entre VP/ENC es del 7.64 % del área total del NPV lo que equivale a más de la mitad del área inmunorreactiva a VP o ENC.

## 7. Discusión

El NPV proyecta a varias regiones del encéfalo como son: la eminencia media, el área ventral tegmental, el núcleo de Edinger-Westphal, la sustancia gris periacueductal, la formación reticular, el núcleo rafe dorsal, el locus coeruleus, el núcleo parabraquial, el núcleo salivatorio superior, el núcleo retrotrapezoide, el núcleo ambiguo en su formación compacta y externa, el núcleo medial del tracto solitario (Geerling et al., 2010), el septum lateral y la amígdala (Pittman et al., 1981), además envía proyecciones a la ME (Saper et al., 1976; Swanson y Kyupers, 1980). En la ME se comprobó la existencia de fibras positivas a OT-Neurofina I en las láminas superficiales del asta dorsal, en la columna intermedio lateral y en el canal central (Swanson y McKellar, 1979), y aun cuando esto supone una proyección oxitocinérgica proveniente del NPV, fue hasta años posteriores que se comprueba la existencia de una proyección oxitocinérgica del NPV a las láminas superficiales del asta dorsal de la ME (Cechetto y Saper, 1998; Puder y Papka, 2001; Condés-Lara et al., 2007). Sin embargo, la OT no es el único péptido implicado en la proyección del NPV-ME (Cechetto y Saper, 1998), ya que con técnicas de inmunofluorescencia y de trazado neuronal retrógrado en el presente trabajo se muestra la existencia de una proyección vasopresinérgica, dinorfinérgica y encefalinérgica hacia las láminas superficiales del segmento L3 de la ME. Incluso se encontró la colocalización de dos de estos péptidos en las neuronas de proyección a la ME.

### 7.1. Proyección del NPV a la ME

Sobre la proyección del NPV a la ME se ha reportado que su densidad es mayor en los segmentos cervicales y disminuye mientras más caudal son los segmentos de la ME, (Hosoya, 1980), se ha encontrado el mismo patrón en las proyecciones del NPV a las láminas superficiales del asta dorsal, pues se encontraron 104 neuronas de proyección del NPV hacia los segmentos cervicales (Condés-Lara et al., 2007), 13 células de proyección hacia el segmento L1 (Hurtado-Santiago, 2009), 68 neuronas de proyección hacia los segmentos lumbares L4 (Hernández-Linares, 2010 ) y 57 hacia los segmentos L4, L5 (Condés-Lara et al., 2007). Con dichos resultados es posible argumentar que la

proyección del NPV a los segmentos lumbares de la ME es variable, lo cual resulta lógico si recordamos que en el ensanchamiento lumbar llega la mayor cantidad de fibras ganglionares provenientes de las extremidades inferiores y por lo tanto se requiere mayor regulación de las aferencias. El segmento estudiado L3 es la parte a la que llegan las aferencias más numerosas del plexo lumbo sacro y ya que se trata de una proyección difusa la del NPV-ME, los resultados obtenidos en este estudio se pueden establecer como una generalidad a lo largo de la ME.

Condés-Lara et al. (2007) reportaron que el 32.2% de las neuronas con proyección hacia los segmentos cervicales envían colaterales hacia los segmentos lumbares, mientras que el 58.8% de las neuronas con proyección hacia el segmento L4-L5 envían colaterales hacia el segmento C3-C4, por lo que el área que aquí se encontró que tiene proyección hacia la ME también está proyectando a otros segmentos tanto lumbares como cervicales, de acuerdo con Condés-Lara y colaboradores, quienes demuestran que esta vía es difusa. Sin embargo, falta dilucidar la proporción de la ramificación de esta proyección hacia otros segmentos de la ME, dado que ésta es variable dependiendo del segmento de la ME (Condés-Lara et al., 2007).

En este punto se deja de lado la proyección del NPV a la ME y se centra la discusión en la expresión de OT, VP, DIN y ENC en el NPV, para más adelante abordar la naturaleza peptídica de las neuronas del NPV con proyección al segmento L3 de la ME.

## **7.2. Expresión de OT, VP, DIN y ENC en el NPV**

Con la técnica de inmunofluorescencia se obtuvo que la expresión de OT, VP, DIN y ENC en el NPV es desigual, encontrándose mayor inmunorreactividad para VP, DIN, OT y ENC respectivamente.

Además se observó colocalización entre dos de los péptidos estudiados, en el caso de OT-VP la colocalización se distribuye a lo largo del NPV, de manera semejante se distribuye la colocalización de DIN-ENC, con una ligera concentración en PM. La colocalización entre OT-DIN y VP-ENC se encontró con mayor definición en PA, en ML, y en PM, y en menor medida se encontró colocalización entre la OT-DIN en la PD. Cada colocalización descrita va desde el 4.76% hasta el 9.62% del área total del NPV, y

entre éstas no se encontraron diferencias significativas. Tal porcentaje hace pensar en la importancia de la colocalización en la modulación de la nocicepción.

La colocalización entre la VP-ENC se ha reportado con anterioridad para las células magnocelulares del NPV, sin embargo, la colocalización entre OT-DIN en las células magnocelulares se reportó como escasa. En el presente trabajo se encontró que la colocalización de OT-DIN no difiere con la de VP-ENC, la razón de dicha discrepancia es la inclusión de todas las células del NPV en este trabajo. También puede deberse a que en esos trabajos se realizó un análisis por células y en el presente trabajo es por área, por tal motivo se consideró que la información obtenida sobre la colocación entre estos péptidos en el NPV es confiable.

En los párrafos anteriores abordamos la inmunorreactividad de las neuronas del NPV a OT, VP, DIN y ENC. Sin embargo, la importancia de este trabajo radica en detectar las células inmunorreactivas a cada péptido para describir la naturaleza peptídica de la vía del NPV a la ME, por lo que a continuación se discuten dichos resultados.

### **7.3. Inmunorreactividad de las neuronas del NPV con proyección al segmento L3 de la ME**

Del área del NPV con proyección a la ME encontramos que: la proyección oxitocinérgica es del 11.06%, la vasopresinérgica es del 15.01%, la dinorfinérgica es del 13.04% y la encefalinérgica es del 11.46%. Entre ellas no hay diferencias significativas por lo que el impacto de estos péptidos en las funciones que se llevan a cabo en las láminas superficiales de la ME podrían ser semejantes, o estarían dadas por la cantidad y características de los receptores a cada uno de estos péptidos en las neuronas posinápticas.

Con referencia a la proyección oxitocinérgica a nivel de las láminas superficiales del asta dorsal ésta ha sido reportada por (Condés-Lara et al., 2007) y se propone que produce analgesia en las ratas (Condés-Lara et al., 2007; Miranda-Cardenas et al., 2006; Rojas-Piloni et al., 2010). Esto a través de la excitación de interneuronas gabaérgicas (Rojas-Piloni et al., 2007).

En este trabajo se encontró que la proyección vasopresinérgica hacia las láminas superficiales de la ME es ligeramente mayor a la proyección oxitocinérgica sin ser estadísticamente diferentes. Por otro lado, Rojas-Piloni et al. 2010 reportaron que al colocar trazadores neuronales anterógrados en diferentes regiones del NPV y realizar inmunofluorescencias contra OT y VP encuentran que en la ME a nivel lumbar hay mayor probabilidad de encontrar fibras marcadas con el trazador neuronal e inmunorreactivas a OT que de encontrar fibras marcadas con el trazador neuronal e inmunorreactivas a VP, dicho resultado toma en cuenta los segmentos torácicos, lumbares y sacros de la ME. Sin embargo, a nivel del segmento L3 muestran que en las láminas superficiales del asta dorsal se produce un pico de VP, el cual rebasa las fibras oxitocinérgicas de la misma vía. Por lo que los presentes resultados son coherentes a lo reportado en ese estudio.

Los resultados electrofisiológicos aún no han destacado el papel de la VP en la modulación de la nocicepción, ya que mientras unos resultados apuntan hacia esta intervención (Thurston et al., 1992), otros la desaprueban tal es el caso del siguiente trabajo en el que al inyectar intratecalmente VP en diferentes dosis no producen analgesia (Rojas-Piloni et al., 2010). Con los resultados de este trabajo queda claro que la VP llega a las láminas superficiales de la ME de la rata específicamente al segmento L3, por tal razón se debe aclarar la función de esta proyección vasopresinérgica en la nocicepción o bien en otra vía somatosensorial, ya que se conoce una distribución de los receptores de este nanopéptido en las láminas superficiales de la ME.

En este trabajo se encontró que además de la proyección oxitocinérgica hacia las láminas dorsales del segmento L3 de la ME, existen proyecciones vasopresinérgicas, dinorfinérgicas y encefalinérgicas de la misma magnitud, por lo cual es posible argumentar que péptidos opioides como la DIN y la ENC juegan un papel importante en la analgesia producida por esta vía NPV-ME, ya que se ha reportado que la aplicación intratecal de naloxona reduce el efecto analgésico producido por la estimulación del NPV (Condés-Lara et al., 2009). Sin embargo, habría que realizar otros estudios para conocer la importancia en la nocicepción de la proyección opioide del NPV- ME encontrada en el presente estudio, sobre la expresión de DIN expresada por células localizadas en las láminas superficiales del asta dorsal (Marvizon et al., 2009).

Los resultados del presente trabajo permiten conocer qué porcentaje del área del NPV proyecta a la ME, así como conocer los porcentajes de las proyecciones OT, VP, DIN y ENC, y los porcentajes de colocalización que existen entre OT-VP, OT-DIN, VP-ENC y ENC-DIN. Pero debido a que no realizamos las 4 inmunofluorescencias sobre el mismo tejido no podemos conocer el porcentaje de área de cada colocalización posible entre estos 4 péptidos, y por lo tanto no podemos inferir qué porcentaje del área con proyección ME-NPV es inmunorreactiva a OT, VP, DIN y ENC. Sin embargo, los resultados muestran que la colocalización entre dos de estos péptidos es muy alta, y por lo tanto se infiere que la mayor parte del área con proyección hacia la ME no es inmunorreactiva a estos 4 péptidos. Esto conduce a la búsqueda de otras sustancias que estas neuronas se encuentran sintetizando y proyectando hacia las láminas superficiales del asta dorsal de la ME de la rata. Dichas sustancias podrían tener impacto en la regulación de la modulación nociceptiva o bien podrían estar regulando otro tipo de información somatosensorial, lo cual hasta el momento se desconoce.

Los hallazgos aquí presentados muestran que hay células de proyección a las láminas superficiales de la ME que coexpresan 2 neuropéptidos, dicha coexpresión abarca más de la mitad del área inmunorreactiva a cada uno de los péptidos estudiados, lo cual sugiere que al estimular eléctricamente el NPV principalmente se excitan neuronas que contienen más de un péptido. Esta coexpresión no se traduce necesariamente en una coliberación, sin embargo, aumenta las probabilidades de la misma, así como aumenta las probabilidades de que uno de esos péptidos regule la liberación del otro, tal y como sucede con las células magnocelulares del NPV y del núcleo supraóptico. Estructura cerebral en donde se encontró que la DIN finaliza las ráfagas de disparo de estas células lo cual modula la secreción de VP, mientras que los antagonistas de los receptores kappa prolongan la ráfaga de disparos (Brown y Bourque, 2004; Brown et al., 2006).

Además de la modulación que los péptidos opioides tienen sobre la secreción de VP y OT, algunos experimentos muestran que la VP y la OT también regulan la expresión de los péptidos opioides. Yang et al. (2011), describieron que la OT exógena inyectada en la sustancia gris periacueductal produce un aumento en la concentración de leu-ENC, met-ENC y endorfinas en la misma región, y que la OT intratecal también

aumenta las concentraciones de leu-ENC, endorfinas y DIN 1-13 (Yang, 1994). La VP inyectada en la sustancia gris periacueductal también regula positivamente la expresión y secreción de leu-ENC, met-ENC y endorfinas en la sustancia gris periacueductal de la rata (Yang et al., 2007).

Por lo tanto, la proyección del NPV a la ME juega un papel importante en la modulación de la información nociceptiva, dicho efecto se da a través de la OT, la DIN y la ENC. La función de la VP en las láminas superficiales de la ME no se ha comprobado, por lo que este péptido podría estar involucrado en la regulación de otro tipo de información somatosensorial.

#### **7.4. Mecanismos descendentes de la modulación de la nocicepción**

Además del NPV hay otros núcleos que intervienen en la modulación de la nocicepción a nivel de las láminas superficiales del asta dorsal de la ME: el rafe magnus, la sustancia gris periacueductal, el locus coeruleus, la amígdala, la corteza somatosensorial, el tálamo y la formación reticular mesencefálica. La analgesia producida por estos núcleos se debe a los péptidos opioides, a la serotonina, la noradrenalina y la OT (Serrano-Atero et al., 2002).

La estimulación del rafe magnus, y del NPV bloquea la entrada de la información aferente inhibiendo a las fibras C y a las A delta, así como la postdescarga de las neuronas nociceptivas, activadas por la estimulación de su campo receptivo. La estimulación de ambos núcleos produce un incremento en la duración e intensidad de los efectos inhibitorios. La estimulación del rafe magnus provoca potenciales de acción evocados en la ME, hecho que no sucede al estimular el NPV, por lo que se sugiere que el mecanismo a través del cual se logra la analgesia es diferente en cada núcleo (Condés-Lara et al., 2012)

El locus coeruleus también inhibe las fibras C, las fibras A delta y la postdescarga de las neuronas de amplio rango dinámico, estimuladas nociceptivamente a través de su campo receptivo. La estimulación del NPV y del locus coeruleus produce un sinergismo de los efectos inhibitorios. Al inyectar yohimbina un *antagonista*  $\alpha$ -2 adrenérgico en el Locus coeruleus se bloquean los efectos inhibitorios producidos por la estimulación del NPV en la postdescarga y en las fibras A delta pero no en las fibras C,

por lo que el NPV puede inhibir las respuestas nociceptivas del asta dorsal directamente o indirectamente a través de la modulación del sistema noradrenérgico descendente del locus coeruleus (Rojas-Piloni et al., 2012).

La proyección del NPV-ME que encontramos se caracteriza por una gran colocalización entre OT-VP, OT-DIN, VP-ENC, DIN-ENC, lo cual resulta muy interesante si contemplamos que la colocalización hasta ahora descrita para OT y VP se ha reportado como escasa en el NPV (Otero-García M. et al. 2016). La existencia de una proyección VP hacia las láminas superficiales de la ME así como la presencia de receptores de vasopresina, nos permite sugerir que la VP juega un papel en la modulación de la nocicepción y que la transmisión de la información nociceptiva a nivel supraespinal podría estar modulada por la coliberación entre 2 o más péptidos, de neuronas provenientes del NPV del hipotálamo.

De la misma forma se podría implicar que la acción del NPV actúa a nivel de la ME no solamente como modulador de la información nociceptiva sino también como modulador de otros tipos de información sensorial. Además hay que contemplar al NPV como un generador virtual que podría estar coordinando a través de varias estructuras los mecanismos endógenos de analgesia.

Okabe et al., 2015 mostraron que estímulos parecidos a caricias, en las ratas, incrementan la actividad de neuronas oxitocinérgicas en el NPV, y a pesar de que se sabe que este tipo de estimulación provoca un aumento de las concentraciones de OT en sangre, estos autores proponen estudios en donde se verifique si el NPV en respuesta a estímulos positivos envía proyecciones oxitocinérgicas al núcleo del tracto solitario, área gris periacueductal, área ventral tegmental o médula espinal. Nuestro trabajo demuestra que la proyección del NPV a la médula espinal lleva por lo menos dos péptidos, por lo que se debe estudiar su efecto en la modulación de la nocicepción a nivel de la ME. Así mismo de existir una modulación de los estímulos positivos directamente en las astas dorsales de la ME es muy probable que sea regulada por más de un péptido, quizá entonces entendamos la función vasopresinérgica y dinorfinérgica de esta vía.

## 8. Conclusiones

Los resultados aquí presentados muestran que el 5.06% del área total del NPV tiene proyección hacia las láminas superficiales del segmento L3 de la ME.

No se conoce con precisión la totalidad de las proyecciones OT, VP, DIN y ENC del NPV a la ME, sin embargo, se estima que el porcentaje de proyección para cada uno de ellos es aproximadamente de: OT:11.06%, VP:15.01%, DIN:11.46%, ENC:13.04% respectivamente. Además se conoce que es muy alta la colocalización entre dos de estos cuatro péptidos, pues se encontró que del área marcada con TB, que es el área con proyección hacia la ME, aproximadamente el 9.1% colocaliza OT-VP, el 9.52% colocaliza OT-DIN, el 7.64% colocaliza VP-ENC y el 8.10% DIN-ENC.

El 11.06% de la proyección NPV-ME es oxitocinérgica, lo que representa el 0.56% del área total del NPV, dicha proyección es escasa sin embargo, es capaz de aumentar el umbral al dolor modulando las sinapsis entre las aferentes primarias que conducen la información nociceptiva, y las neuronas de las láminas superficiales del asta dorsal de la ME.

La proyección de OT, VP, DIN y ENC desde el NPV hacia las láminas superficiales de la ME lleva a pensar que la eficiencia de la modulación de la nocicepción además de darse por proyecciones provenientes de diversos núcleos del encéfalo, también se da por proyecciones con diferentes neurotransmisores o neuropéptidos secretados en el mismo núcleo, tal es el caso del NPV. Dicha proyección parecería hacer redundante el sistema, sin embargo, quizás no es más que una manera de asegurar la expresión del mecanismo homeostático de la analgesia endógena.

## 9. Referencias

- Afifi A y Bergman R, 2006. Neuroanatomía funcional. McGraw Hill. (pp. 24-42).
- Ammann B, Gottschall J y Zenker W. 1983. Afferent projections from the rat longus capitis muscle studied by transganglionic transport of HRP. *Anat. Embryol.* 166, 275-289.
- Armstrong W y Hatton G. 1980. The localization of projection neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus following vascular and neurohypophysial injections of HRP. *Brain Res. Bull.* 5, 473-477.
- Armstrong W. 2004. Hypothalamic Supraoptic and Paraventricular Nuclei. En: Paxinos G. *The Rat Nervous System.* (pp. 369-388), Australia: Academic Press.
- Basbaum AI, Cruz L y Weber E. 1986. Immunoreactive dynorphin B in sacral primary afferent fibers of the cat. *J. Neurosci.* 6, 127-133.
- Bleier R y Byne W. 1982. Septum and hypothalamus. En: Paxinos G. *The Rat Nervous System.* Vol. 2 (pp.87-118), Australia: Academic Press.
- Botticelli LJ, Cox BM y Goldstein A. 1981. Immunoreactive dynorphin in mammalian spinal cord and dorsal root ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 78, 7783-7786.
- Brichta A y Grant G. 1985. Cytoarchitectural organization of the spinal cord. En: Paxinos G. *The Rat Nervous System.* (pp. 293-301), Australia: Academic Press.
- Brío L y Riera RP. 1995. Manual de bases teórico-prácticas de inmunocitoquímica <http://books.google.com.mx/books?id=3g4HD0oDMhkC&dq=problemas+y+soluciones+en+inmunocitoquímica&sitesec=reviews> Universidad de Oviedo, pp. 44.
- Brown CH y Bourque CW. 2004. Autocrine feedback inhibition of plateau potentials terminates phasic bursts in magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *J. Physiol.* 557, 949-960.
- Brown CH, Leng G, Ludwig M y Bourque CW. 2006. Endogenous activation of supraoptic nucleus kappa-opioid receptors terminates spontaneous phasic bursts in rat magnocellular neurosecretory cells. *J. Neurophysiol.* 95, 3235-3244.

- Brushart TM y Mesulam MM. 1980. Transganglionic demonstration of central sensory projections from skin and muscle with HRP-lectin conjugates. *Neurosci. Lett.* 17, 1-6.
- Budai D y Fields HL. 1998. Endogenous opioid peptides acting at mu-opioid receptors in the dorsal horn contribute to midbrain modulation of spinal nociceptive neurons. *J. Neurophysiol.* 79, 677- 687.
- Buijs R. 1978. Intra-and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Cell. Tissue Res.* 192, 423-435.
- Carpenter M. 1994. *Neuroanatomía. Fundamentos.* 4ta ed. Panamericana. Buenos Aires, pp. 93, 94, 110, 111.
- Cechetto DF y Saper CB. 1998. Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.* 272, 579-604.
- Chen SR y Pan HL. 2006. Blocking mu opioid receptors in the spinal cord prevents the analgesic action by subsequent systemic opioids. *Brain. Res.* 1081, 119 -125.
- Clark R. 1984. Anatomy of the mammalian cord. En: Davidoff R. A. *Handbook of the spinal cord.* New York, (pp. 1-45).
- Code RA y Fallon JH. 1986. Some projections of dynorphin-immunoreactive neurons in the rat central nervous system. *Neuropeptides.* 8, 165-172.
- Condés-Lara M, Martínez-Lorenzana G, Rojas-Piloni G y Rodríguez-Jiménez J. 2007. Branched oxytocinergic innervations from the paraventricular hypothalamic nuclei to superficial layers in the spinal cord. *Brain Res. Report.* 1160, 20-29.
- Condés-Lara M, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, López-Hidalgo M y Rodríguez-Jiménez J. 2009. Hypothalamospinal oxytocinergic antinociception is mediated by GABAergic and opiate neurons that reduce A-delta and C fiber primary afferent excitation of spinal cord cells. *Brain Res.* 1247, 38-49.
- Condés-Lara M, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Díez-Martínez DC y Rodríguez-Jiménez J. 2012. Functional interactions between the paraventricular

hypothalamic nucleus and raphe magnus. A comparative study of an integrated homeostatic analgesic mechanism. *Neuroscience*. 209, 196-207.

D'Mello R y Dickenson AH. 2008. Spinal cord mechanisms of pain. *Br. J. Anaesth.* 101, 8-16.

Eliava M, Melchior M, Knobloch-Bollmann S, Wahis J, Silva M, Tang Y, Ciobanu A, Triana del Rio R, Roth L, Althammer F, Chavant V, Goumon Y, Gruber T, Petit-Demouliére N, Busnelli M, Chini B, Tan L, Mitre M, Froemke R, Chao M, Giese G, Sprengel R, Kuner R, Poisbeau P, Seeburg P, Stoop R, Charlet A y Grinevich V. 2016. A New Population of Parvocellular Oxytocin Neurons Controlling Magnocellular Neuron Activity and Inflammatory Pain Processing. *Neuron* 89, 1291–1304.

Fink R, Byers M y Middaugh M. 1973. Dynamics of colchicine effects on rapid axonal transport and axonal morphology. *Brain Research*. 56, 299-311.

Geerling JC, Shin JW, Chimenti PC y Loewy AD. 2010. Paraventricular Hypothalamic Nucleus: Axonal Projections to the Brainstem *J. Comp. Neurol.* 518, 1460-1499.

Gómez S, Rueda Ardila NS y Gutiérrez MF. 1994. La inmunología en el diagnóstico clínico. Santa Fé de Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. (pp. 73-89).

Gutstein HB, Bronstein DM y Akil H. 1992. Beta-endorphin processing and cellular origins in rat spinal cord. *Pain*. 51, 241-247.

Hallbeck M, Larhammar D y Blomqvist A. 2001. Neuropeptide expression in rat paraventricular hypothalamic neurons that project to the spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 433, 222-238.

Han JS y Xie CW. 1982. Dynorphin: potent analgesic effect in spinal cord of the rat. *Life Sci.* 31, 169-177.

Hatton GI, Hutton UE, Hoblitzell ER y Armstrong WE. 1976. Morphological evidence for two populations of magnocellular elements in the rat paraventricular nucleus. *Brain Res.* 108, 187-193.

- Heinricher MM, Tavares I, Leith JL y Lumb BM. 2009. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res. Rev.* 60, 214-225.
- Hernández-Linares YG. 2010. Interacción del núcleo paraventricular, con el núcleo ventrolateral del área gris periacueductal y el asta dorsal lumbar de la médula espinal mediante neuronas oxitocinérgicas o vasopresinérgicas: aportaciones anatómicas de una vía de analgesia endógena en rata. Tesis de Licenciatura.
- Hökfelt T, Fahrenkrug J, Tatemoto K, Mutt V, Werner S, Hulting AL, Terenius L y Chang KJ. 1983. The PHI (PHI-27)/corticotropin-releasing factor/enkephalin immunoreactive hypothalamic neuron: possible morphological basis for integrated control of prolactin, corticotropin, and growth hormone secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 80, 895-898.
- Höllt V, Haarmann I, Bovermann K, Jerlicz M y Herz A. 1980. Dynorphin-related immunoreactive peptides in rat brain and pituitary. *Neurosci. Lett.* 18, 149-153.
- Hosoya Y. 1980. The Distribution of Spinal Projection Neurons in the Hypothalamus of the Rat, Studied with the HRP Method. *Exp Brain Res* 40, 79-87.
- Hurtado-Santiago E. 2009. Proyección del núcleo paraventricular hipotalámico al núcleo intermedio lateral y a las capas superficiales del asta dorsal de la médula espinal. Tesis Licenciatura.
- Jensen TS y Yaksh TL. 1984. Spinal monoamine and opiate systems partly mediate the antinociceptive effects produced by glutamate at brainstem sites. *Brain Res.* 321, 287-297.
- Kiss JZ, Martos J y Palkovits M. 1991. Hypothalamic Paraventricular Nucleus: A quantitative analysis of cytoarchitectonic subdivisions in the rat. *J. Comp. Neurol.* 313, 563-573.
- Köbber C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J y Thanos S. 2000. Current concepts of neuroanatomical tracing. *Progr. Neurobiol.* 62, 327-351.
- LaMotte CC y de Lanerolle NC. 1983. Ultrastructure of chemically defined neuron systems in the dorsal horn of the monkey. II. Methionine-enkephalin immunoreactivity. *Brain Res.* 274, 51- 63.

- Laughlin TM, Vanderah TW, Lashbrook J, Nichols ML, Ossipov M, Porreca F y Wilcox GL. 1997. Spinally administered dynorphin a produces long-lasting allodynia: involvement of NMDA but not opioid receptors. *Pain*. 72, 253-260.
- Levi M, Koeppen M y Stanton B. 2006. Capítulo 4 Transmisión sináptica. *Fisiología*: (pp. 42-55), España. Elsevier Mosby.
- Light AR y Perl ER. 1979. Spinal Termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J. Comp. Neurol*. 186, 133-150.
- Litwack G. y Schmidt J. 2006. Capítulo 21, Bioquímica de las hormonas I, hormonas polipeptídicas. En: Devlin T. *Bioquímica libro de texto con aplicaciones clínicas* (pp. 916-919), Barcelona: Reverté.
- Ma W, Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y, Radhakrishnan V, Cuello AC y Henry JL, 1997. Substance P and enkephalin immunoreactivities in axonal boutons presynaptic to physiologically identified dorsal horn neurons. An ultrastructural multiple-labelling study in the cat. *Neuroscience* 77(3), 793-811.
- Marvizón G, Chen W y Murphy N. 2009. Enkephalins, Dynorphins, and Endorphin in the Rat Dorsal Horn: An Immunofluorescence Colocalization Study. *J. Comp. Neurol*. 517, 51-68.
- Matsuura T, Kawasaki M, Hashimoto H, Ishikura T, Yoshimura M, Ohkubo J, Maruyama T, Motojima Y, Sabanai K, Mori T, Ohnishi H, Sakai A, y Ueta Y. 2015. Fluorescent Visualisation of Oxytocin in the Hypothalamoneurohypophysial/spinal Pathways After Chronic Inflammation in Oxytocin-Monomeric Red Fluorescent Protein 1 Transgenic Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 27, 636–646.
- Meister B, Villar MJ, Ceccatelli S y Hokfelt T. 1990. Localization of chemical messengers in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei: an immunohistochemical study using experimental manipulations. *Neurosci*. 37, 603-633.
- Melzack R y Wall PD. 1965. Pain Mechanisms: A New Theory. *Science*. 150, 71-79.

- Merchenthaler I, Maderdrut JL, Cianchetta P, Shughrue P y Bronstein D. 1997. In situ hybridization histochemical localization of prodynorphin messenger RNA in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 28, 211-232.
- Miranda-Cardenas Y, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J, López-Hidalgo M, Freund-Mercier MJ y Condés-Lara M. 2006. Oxytocin and electrical stimulation of the paraventricular hypothalamic nucleus produce antinociceptive effects that are reversed by an oxytocin antagonist. *Pain* 122, 182-189.
- Molander C, Xu Q y Grant G. 1984. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.* 280, 133-141.
- Morgan MM, Gold MS, Liebeskind JC y Stein C. 1991. Periaqueductal gray stimulation produces a spinally mediated, opioid antinociception for the inflamed hindpaw of the rat. *Brain Res.* 545, 17-23.
- Nadelhaft I y Booth AM. 1984. The location and morphology of preganglionic neurons and the distribution of visceral afferents from the rat pelvic nerve: A horseradish peroxidase study. *J. Comp. Neurol.* 226, 238-245.
- Nagy J y Hunt S. 1983. The termination of primary afferents within the rat dorsal horn: Evidence of the rearrangement following capsaicin treatment. *J. Comp. Neurol.* 218, 145-158.
- Nahin RL y Giesler GJ. 1982. Anatomical studies of lamina X in the rat. *Soc. Neurosci. Abst.* 8, 93.
- Ochs S. 1972. Fast transport of materials in mammalian nerve fibers. *Science* 176, 252-260.
- Okabe S, Yoshida M, Takayanagi Y y Onaka T. 2015. Activation of hypothalamic oxytocin neurons following tactile stimuli in rats. *Neuroscience Letters.* 600, 22-27.
- Otero-García M, Agustín-Pavo C, Lanuza E y Martínez-García F. 2016 Distribution of oxytocin and co-localization with arginine vasopressin in the brain of mice. *Brain. Struct. Funct.* 221, 3445–3473.

- Oztas E. 2003. Neuronal tracing Neuroanatomy. Neuroanatomy. 2, 2-5.
- Pasinelli P y Brown RH. 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. Nat. Rev. Neuroscience. 7, 710-723.
- Paxinos G. y Watson C. 1997. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press, (pp. 183-192).
- Peinado MA, Pedrosa JA y Rodrigo J. 1996. Avances en inmunocitoquímica y técnicas relacionadas. España: Publicaciones de la Universidad de Jaén.
- Pittman QJ, Blume HW y Renaud LP. 1981. Connections of the hypothalamic paraventricular nucleus with the neurohypophysis, median eminence, amygdala, lateral septum and midbrain periaqueductal gray: an electrophysiological study in the rat. Brain Res. 215, 15-28.
- Puelles L, Martínez P y Martínez T. 2008. Neuroanatomía, Medica. Madrid: Panamericana. (pp. 1-8).
- Puder BA y Papka RE. 2001. Hypothalamic Paraventricular Axons Projecting to the Female Rat Lumbosacral Spinal Cord Contain Oxytocin Immunoreactivity. Department. J. Neurosci. Res. 64, 53-60.
- Rojas-Piloni G, López-Hidalgo M, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J y Condés-Lara M. 2007. GABA-mediated oxytocinergic inhibition in dorsal horn neurons by hypothalamic paraventricular nucleus stimulation. Brain Res. 1137, 69-77.
- Rojas-Piloni G, Mejía-Rodríguez R, Martínez-Lorenzana G y Condés-Lara M. 2010. Oxytocin, but not vasopressin, modulates nociceptive responses in dorsal horn neurons. Neurosci Lett. 476, 32-35.
- Rojas-Piloni G, Rodríguez-Jiménez J, Martínez-Lorenzana G y Condés-Lara M. 2012. Dorsal horn antinociception mediated by the paraventricular hypothalamic nucleus and locus coeruleus: a comparative study. Brain Res. 21, 41-50.
- Saper CB, Loewy AD, Swanson LW y Cowan WM. 1976. Direct hypothalamo-autonomic connections. Brain Res. 117, 305-312.

- Sawchenko PE y Swanson LW. 1982. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.* 205, 260-272.
- Sawchenko PE. 1987. Adrenalectomy-induced enhancement of CRF and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons: anatomic, peptide, and steroid specificity. *J. Neurosci.* 7, 1093-1106.
- Serrano-Atero M, Peramo F, Cañas A, García-Saura P, Serrano-Álvarez C y Caballero J. 2002. Modulación descendente de la información nociceptiva (I). *R e v. Soc. Esp. Dolor.* 9, 382-390.
- Schorscher-Petcu A, Sotocinal S, Ciura S, Dupre A, Ritchie J, Sorge R, Crawley J, Shuang-Bao H, Nishimori K, Young L, Tribollet E, Quirion R y Mogil J S. 2010. Oxytocin-Induced Analgesia and Scratching Are Mediated by the Vasopressin-1A Receptor in the Mouse. *Journal Neurosci.* 30, 8274-8284.
- Sofroniew MV, Weindl A, Schrell U y Wetzstein R. 1981. Immunohistochemistry of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the human and primate brain. *Acta Histochem. Suppl.* 24, 79-95.
- Susalka SJ, Hancock WO y Pfister KK. 2000. Distinct cytoplasmic dynein complexes are transported by different mechanisms in axons. *Biochim. Biophys. Acta.* 1496, 76-88.
- Swanson LW. 1977. Immunohistochemical evidence for a neurophysin-containing autonomic pathway arising in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.* 128, 346-353.
- Swanson LW y Kuypers HG. 1980. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J. Comp. Neurol.* 194, 555-570.
- Swanson LW y McKellar S. 1979. The distribution of oxytocin and neurophysin stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. *J. Comp. Neurol.* 188, 87-106.

- Swanson LW, Sawchenko PE y Lind RW. 1986. Regulation of multiple peptides in CRF parvocellular neurosecretory neurons: Implications for the stress response. *Prog. Brain Res.* 68, 169-190.
- Swanson LW, Sawchenko PE. 1983. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci.* 6, 269–324.
- Swanson LW, Swanson PE, Sawchenko SJ, Wiegand W y Price JL. 1980. Separate neurons in the paraventricular nucleus project to the medial eminence and to the medulla or spinal cord. *Brain Res.* 198, 190-195.
- Tan-No K, Taira A, Sakurada T, Inoue M, Sakurada S, Tadano T, Sato T, Sakurada C, Nylander I, Silberring J, Terenius L y Kisara K. 1996. Inhibition of dynorphin-converting enzymes prolongs the antinociceptive effect of intrathecally administered dynorphin in the mouse formalin test. *Eur. J. Pharmacol.* 314, 61-67.
- Tan-No K, Taira A, Sakurada T, Inoue M, Sakurada S, Tadano T, Sato T, Sakurada C y Tracey DJ. 1985. Ascending and descending pathways in the spinal cord. *Paxinos G; The Rat Nervous System.* (pp. 311-324), Australia: Academic Press.
- Thurston C, Campbell I, Culhane E, Carstens E y Watkins L. 1992. Characterization of intrathecal vasopressin induced antinociception, scratching behavior, and motor suppression. *Peptides.* 13, 17–25.
- Tsou K, Khachaturian H, Akil H y Watson SJ. 1986. Immunocytochemical localization of pro-opiomelanocortin-derived peptides in the adult rat spinal cord. *Brain Res.* 378, 28-35.
- Tuchscherer MM y Seybold VS. 1989. A quantitative study of the coexistence of peptides in varicosities within the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 9, 195-205.
- Vanderah TW, Bernstein RN, Yamamura HI, Hruby VJ, y Porreca F. 1996. Enhancement of morphine antinociception by a CCKB antagonist in mice is mediated via opioid delta receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 212-219.

- Watson SJ, Akil H, Vartan E, Ghazarossant VE y Goldsteintt E. 1981. Dynorphin immunocytochemical localization in brain and peripheral nervous system: Preliminary studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 1260-1263.
- Yaksh TL. 1997. Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. *Acta. Anaesthesiol. Scand.* 41, 94 -111.
- Yang J. 1994. Intrathecal administration of oxytocin induces analgesia in low back pain involving the endogenous opiate peptide system. *Spine*, 19, 867-871.
- Yang J, Liang JY, Li P, Pan YJ, Qiu PY, Zhang J, Hao F y Wang DX. 2011. Oxytocin in the periaqueductal gray participates in pain modulation in the rat by influencing endogenous opiate peptides. *Peptides* 32, 1255-1261.
- Yang J, Yang Y, Chu J, Wang G, Hongtao X, Wen-Yan L, Wang C y Lin B. 2009. Endogenous opiate peptides in the spinal cord are involved in the analgesia of hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Peptides* 30, 740-744.
- Yang J, Yang Y, Xu HT, Chen JM, Liu WY y Lin BC. 2007. Arginine vasopressin induces periaqueductal gray release of enkephalin and endorphin relating to pain modulation in the rat. *Regulatory Peptides* 142, 29-36.
- Yen S. 2001. Neuroendocrinología de la reproducción. En: Yen S., Jaffe, Barbieri, *Endocrinología de la Reproducción, fisiología, fisiopatología y manejo clínico.* (pp. 31-75), Argentina: Editorial Panamericana.
- Zheng JQ, Seki M, Hayakawa T, Ito H y Zyo K. 1995. Descending projections from the paraventricular hypothalamic nucleus to the spinal cord: anterograde tracing study in the rat. *Okajimas Folia. Anat. Jpn.* 72, 119-135.
- Zimmermann M. 1983. Ethical Guidelines for investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. *Pain.* 16, 109-110.
- Zorman G, Belcher G, Adams JE y Fields HL. 1982. Lumbar intrathecal naloxone blocks analgesia produced by microstimulation of the ventromedial medulla in the rat. *Brain Res.* 236, 77- 84.

## 10. Índice de tablas y figuras

<b>Tabla 1.</b> Divisiones del hipotálamo.....	6
<b>Figura 1.</b> Divisiones del NPV.....	8
<b>Figura 2.</b> Proyección del NPV a la ME.....	11
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografía del NPV, proyección cervical y lumbar a la ME.....	12
<b>Figura 4.</b> Fotomicrografía del sitio de inyección del trazador neuronal TB en la ME.....	23
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografías de la inmunorreactividad a OT, VP, DIN Y ENC a toda la extensión rostro-caudal NPV.....	24
<b>Figura 6.</b> Gráficas de la inmunorreactividad a OT, VP, DIN y ENC a diferente nivel rostro-caudal del NPV .....	25
<b>Figura 7.</b> Gráfica de la inmunorreactividad a OT, VP, DIN y ENC en el NPV.....	26
<b>Figura 8.</b> Inmunorreactividad de las neuronas del NPV a OT/VP.....	27
<b>Figura 9.</b> Inmunorreactividad de las neuronas del NPV a OT/DIN.....	28
<b>Figura 10.</b> Inmunorreactividad de las neuronas del NPV a VP/ENC.....	29
<b>Figura 11.</b> Inmunorreactividad de las neuronas del NPV a DIN/ENC.....	30
<b>Figura 12.</b> Gráficas de la colocación de dos péptidos en el NPV para cada nivel rostro-caudal.....	31
<b>Figura 13.</b> Gráfica de la colocación de dos péptidos en el NPV.....	32
<b>Figura 14.</b> Proyección del NPV a la ME.....	33
<b>Figura 15.</b> Gráficas de colocación dobles.....	34
<b>Figura 16.</b> Gráfica de la colocación de TB con OT, VP, DIN o ENC en el NPV.....	35
<b>Figura 17.</b> Inmunorreactividad a VP/OT de las neuronas de proyección del NPV a la ME...	36
<b>Figura 18.</b> Proyección oxitocinérgica (OT) y dinorfinérgica (DIN) de las neuronas del NPV a la ME.....	37
<b>Figura 19.</b> Proyección vasopresinérgica (VP) y encefalinérgica (ENC) de las neuronas del NPV a la ME.....	38

<b>Figura 20.</b> Inmunorreactividad a DIN y ENC de las neuronas del NPV que proyectan a la ME.....	39
<b>Figura 21.</b> Gráfica de colocación triples para diferentes niveles rostro-caudal del NPV.....	40
<b>Figura 22.</b> Gráfica del área de colocación de TB y dos péptidos en el NPV.....	41
<b>Figura 23.</b> Gráfica de la inmunorreactividad a OT, VP, DIN y ENC, en las neuronas de proyección del NPV-ME.....	41
<b>Figura 24.</b> Gráfica de la colocación entre dos péptidos, en las neuronas de proyección del NPV-ME.....	42
<b>Figura 25.</b> Diagrama de la colocación entre VP/OT y OT/DIN en la proyección del NPV-ME .....	43
<b>Figura 26.</b> Diagrama de la colocación entre DIN/ENC y VP/ENC en la proyección del NPV-ME .....	44
<b>Figura 27.</b> Dibujo del transporte axonal retrógrado y anterógrado.....	66
<b>Figura 28.</b> Esquema de la técnica de Inmunofluorescencia.....	67

## 11. Apéndices

### 11.1. Trazadores Neuronales

Los trazadores neuronales son sustancias que al ser inyectadas cerca o dentro de neuronas estas lo incorporan a su sistema de transporte de manera anterógrada y/o retrógrada por medio del transporte axonal (Köbbert et al., 2000).

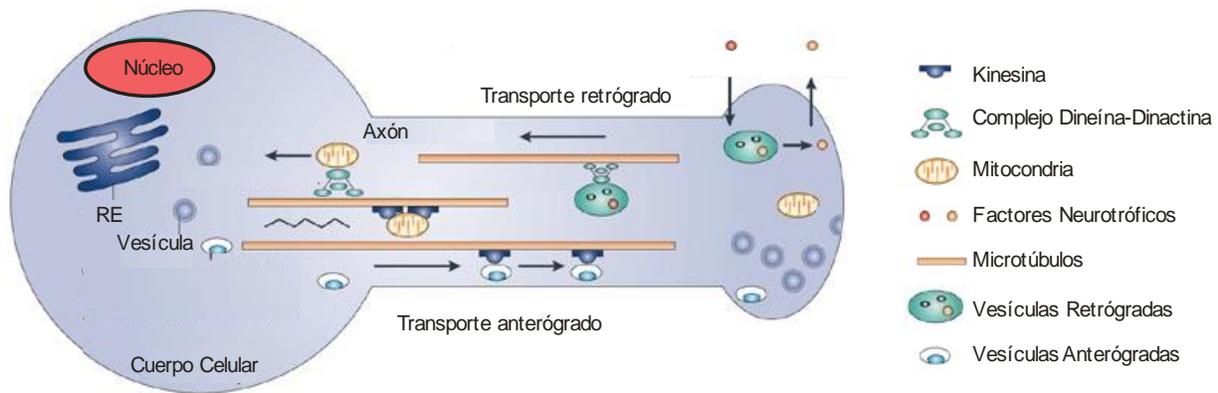
El transporte axonal anterógrado utiliza dentro de la célula la translocación de organelos y vesículas, así como el transporte de algunas macromoléculas como la actina, miosina y clatrina, además de enzimas necesarias para la síntesis de neurotransmisores en las terminales axónicas. Este transporte anterógrado se refiere al acarreo de sustancias en el interior de la neurona, desde los cuerpos celulares hacia las terminales axónicas. Mientras que el transporte axonal retrógrado permite el traslado de moléculas pequeñas, proteínas destinadas a degradarse, material endocitado y otras enzimas solubles, desde el axón hasta el soma de una neurona (Köbbert et al., 2000; Oztas E. 2003).

Dependiendo de las características de cada trazador tales como su solubilidad o su pH, estas sustancias ingresan a las neuronas por diferentes mecanismos; algunos entran por difusión pasiva gracias a su gradiente de concentración, otros ingresan por transporte activo, tal es el caso de las dextran aminas, las lectinas, la HRP y el Fast Blue, además pueden ingresar a la célula por medio de iontoforésis mediante el paso de corriente eléctrica.

De manera general se ha dividido al transporte axonal anterógrado, en un transporte axonal rápido 400 (mm/día) y un transporte axonal lento. El componente lento se divide a su vez en un componente lento A y un componente lento B cuya velocidad es de aproximadamente 0.1 y 6 mm/día respectivamente. El transporte axonal retrógrado es rápido, su velocidad es de 100 a 200 mm/día (Ochs 1972; Susalka et al., 2000).

La interacción de los microtúbulos con las kinesinas permite el transporte axonal anterógrado, mientras que el transporte axonal retrógrado se da gracias a la interacción

de los microtúbulos con las dineinas (Köbbert et al., 2000; Susalka et al., 2000) Ver Figura 27.



**Figura 27.** Dibujo del transporte axonal retrógrado y anterógrado. La kinesina es la proteína que se encarga del transporte axonal anterógrado, mientras que un complejo de dineína-dinactina es el responsable del transporte axonal retrógrado (Modificada de Pasinelli y Brown 2006)

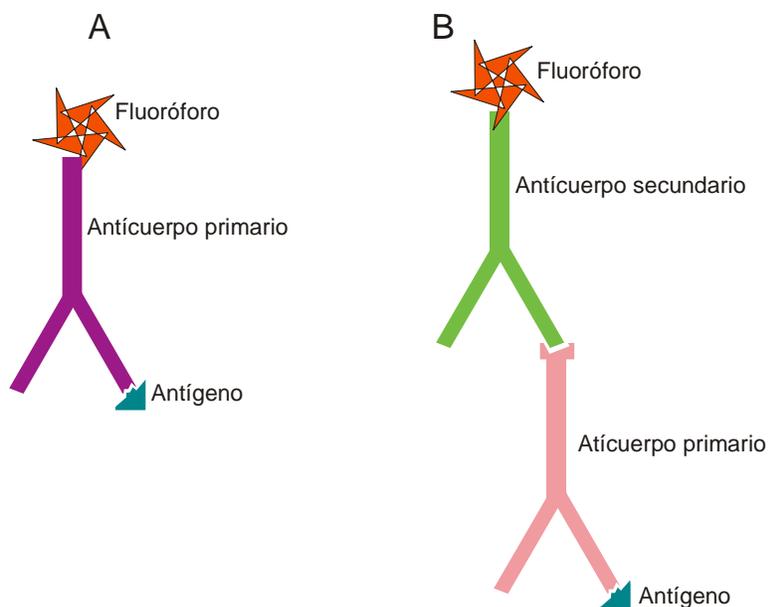
Hay varias formas de aplicar el trazador, inyección a presión, inyecciones iontoforéticas y en cristales, y varias formas de detectarlo como son fluorescencia, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (Oztas, 2003).

En ésta tesis se utilizó el trazador neuronal retrógrado: True Blue.

## 11.2. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia o técnica de anticuerpos fluorescentes es un procedimiento especializado que consiste en una reacción antígeno anticuerpo hecha visible por la incorporación de un fluoróforo, una vez hecha la reacción se excita al fluoróforo para observarlo en el microscopio de fluorescencia o confocal (Gómez et al., 1994 ).

La inmunofluorescencia puede ser directa, si el anticuerpo a utilizar está acoplado con un fluoróforo e indirecta si el anticuerpo que reconoce al antígeno no está marcado, y en este caso se utiliza un segundo anticuerpo conjugado con el fluorocromo, dirigido contra el primero ver figura 28 (Brío y Riera, 1995).



**Figura 28.** Esquema de la técnica de Inmunofluorescencia. En **A** se observa la **inmunofluorescencia directa** y se ve la interacción del antígeno con el anticuerpo primario que tiene un fluoróforo acoplado. **B** muestra la **inmunofluorescencia indirecta** en donde el antígeno reconoce a un anticuerpo que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que tienen un fluoróforo acoplado.

Al realizar una inmunofluorescencia directa lo primero que se necesita es, establecer la sustancia que se quiere detectar. Una vez conocido lo anterior es necesario establecer las características del anticuerpo que se necesita, es decir establecer su especificidad. Generalmente al tejido se le aplica Tritón para permeabilizar las membranas de las células y permitir que el anticuerpo ingrese. En el caso de la reacción de la inmunofluorescencia indirecta se debe bloquear la posible tinción de fondo con suero del animal donante del anticuerpo secundario.

Posteriormente, se incuba con el anticuerpo primario y 24 hrs después con el anticuerpo secundario el cual estará unido a un fluoróforo (Peinado et al., 1996).

En esta tesis se utilizó la inmunofluorescencia de tipo indirecta para detectar células oxitocinérgicas, vasopresinérgicas, dinorfinérgicas y encefalinérgicas.

### 11.3. Síntesis y transporte de neuropéptidos

Una característica de los neuropéptidos es que actúan sobre su blanco en concentraciones menores a las de los neurotransmisores; sus efectos son más persistentes pero aparecen con mayor lentitud. Los péptidos se localizan en vesículas grandes distribuidas a lo largo de la terminación sináptica, son liberados con estimulación a alta frecuencia, éstos se sintetizan en el soma de las neuronas, en donde las vesículas que contienen el neuropéptido son liberadas por la cara madura del complejo de Golgi, y de ahí se trasladan hacia la terminación axónica por transporte axónico rápido. Algunos neuropéptidos se sintetizan como preprohormonas y mientras son transportadas hacia el axón se convierten en hormona, gracias a la acción de enzimas (Levi et al., 2006).

La molécula propresofisina es degradada por las endopeptidasas para producir la VP y la neurofisina II, mientras que la OT y la neurofisina I se obtienen de la prooxifisina. Ambos son péptidos cíclicos que contienen nueve residuos aminoácidos, el peso molecular de la VP es de 1.007 y el de la OT es de 1.084; las dos tienen un puente cys-cys idéntico en las posiciones 1 y 6, únicamente difieren en dos aminoácidos en las posiciones 3 y 8. Las neurofisinas son las proteínas transportadoras para la OT y la VP, proteína transportadora y péptido se secretan conjuntamente (Yen, 2001).

Las encefalinas son pentapéptidos, la met-ENC es Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, y la leu-ENC es Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, de la molécula de pro-ENC se obtiene una molécula de metionina-ENC, una de leucina-ENC y un residuo llamado octapéptido. En las células cromafines de la médula adrenal de un gen se sintetizan seis Met-encefalinas y una molécula de Leu-ENC (Litwack y Schmidt, 2006).

La prodinorfina contiene una molécula de leu-ENC y DIN la cual a su vez puede ser degradada a DIN A, DIN B y neo-endorfinas.