



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PROYECCIÓN DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR  
HIPOTALÁMICO AL NÚCLEO INTERMEDIO LATERAL Y A LAS  
CAPAS SUPERFICIALES DEL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA  
ESPINAL”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**EDNA HURTADO SANTIAGO**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. MARÍA GUADALUPE MARTÍNEZ LORENZANA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2009.**

**BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

No. Adq. 158972

No. Título \_\_\_\_\_

Clas. JS

573.8694

H967p

\_\_\_\_\_

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**



**“PROYECCIÓN DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR  
HIPOTALÁMICO AL NÚCLEO INTERMEDIO LATERAL Y A LAS  
CAPAS SUPERFICIALES DEL ASTA DORSAL DE LA MÉDULA  
ESPINAL”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**EDNA HURTADO SANTIAGO**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. MARÍA GUADALUPE MARTÍNEZ LORENZANA**

**SINODALES**

**Dra. MARÍA GUADALUPE MARTÍNEZ LORENZANA**  
DIRECTOR \_\_\_\_\_

**Dra. MARÍA ELENA VILLAGRÁN HERRERA**  
SINODAL \_\_\_\_\_

**Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**  
SINODAL \_\_\_\_\_

**Dr. MIGUEL CONDÉS LARA**  
SINODAL \_\_\_\_\_

## **DEDICATORIA**

A mis padres, porque son la fuerza que me impulsa a seguir adelante, por su amor y apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto CONACyT 89423 (GML).

A mi familia, Angeles, Erasto, Edda, Eliut, Gustavo y Habib.

A la Dra. Guadalupe Martínez Lorenzana, Dr. Miguel Condés y Lara, Dr. Gerardo Rojas Piloni, MVZ. Javier Rodríguez Jiménez, personas que integran el laboratorio de Dolor y Epilepsia, Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, campus Juriquilla, UNAM.

A mi Lupita, mi directora de tesis: no existen las suficientes palabras ni elogios para agradecer todo lo que ha hecho por mí.

A todos mis maestros en la vida.

Con este trabajo concluyo lo que hace 6 años comencé, mi licenciatura, e inicio mi formación como futura científica.

Jamás olvidaré la primavera del 2009.

A Habib le dejó una nota especial, que seguramente leerá dentro de 20 años: espero que este libro te inspire para que seas un gran hombre en esta vida.

Sólo son desgraciados el loco incapaz de  
escoger sus ensueños y el enfermo  
a quien el dolor impide soñar.

**Santiago Ramón y Cajal**

# ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II. 1 División del Hipotálamo	3
II. 2 Conexión del Núcleo Paraventricular Hipotalámico (NPV)	7
II. 2. 1 Proyección Neurohipofisial	7
II. 2. 2 Proyección a la Eminencia Media (EME)	7
II. 2. 3 Proyección Extrahipotalámica	8
II. 3 Dolor	10
II. 4 Médula Espinal	13
II. 5 Aferencias Somatosensoriales	15
II. 5. 1 Vías Espinohipotalámicas	16
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	19
IV.1 General	19
IV.2 Específicos	19
V. METODOLOGÍA	20
V. 1 Material	20
V. 1. 1 Animales de Experimentación	20
V. 1. 2. Cirugía	20
V. 2 Métodos	20
V. 2. 1 Inyección de los Trazadores Neuronales Retrógrados	20
V. 2. 2 Perfusión	21
V. 2. 3 Cortes Histológicos del Tejido	21
V. 2. 4 Técnica de Deshidratación y Tinción del Tejido	21

V. 2. 4 .1 Deshidratación del Tejido	21
V. 2. 4. 2 Tinción del Tejido	22
V. 2. 5 Técnica de Inmunofluorescencia para Oxitocina (OT)	22
V. 2. 6 Cuantificación de Neuronas Marcadas con FG, TB, FG/TB y OT	22
V. 2. 7 Análisis Histológico	22
VI. RESULTADOS	24
VI. 1 Verificación de los Sitios de Inyección	24
VI. 2 Núcleo Paraventricular Hipotalámico	24
VI. 3 Análisis de las Neuronas Marcadas con FG, TB, FG/TB e Inmunorreactivas a OT en el NPV en Animales Inyectados en el Segmento Torácico (T5-T10)	26
VI. 4 Análisis de las Neuronas Marcadas con FG, TB, FG/TB e Inmunorreactivas a OT en el NPV en Animales Inyectados en el Segmento Lumbar L1	27
VI. 5 Cuantificación de Neuronas en el NPV	30
VI. 5. 1 Neuronas de Proyección al Segmento T5-T10	30
VI. 5. 2 Neuronas de Proyección al Segmento L1	31
VII. DISCUSIÓN	32
VIII. CONCLUSIONES	37
IX. BIBLIOGRAFÍA	38

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Número de neuronas marcadas con FG/TB, FG y TB en el NPV en la región torácica (T5-T10)	30
2	Muestra el número de neuronas marcadas con FG/TB, FG y TB en el NPV en la región lumbar (L1)	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura del hipotálamo	5
2	Control del sistema endocrino por el hipotálamo	6
3	Núcleo paraventricular hipotalámico	8
4	Diagrama de la médula espinal a nivel de L1	15
5	Vías neuronales de la medula espinal al hipotálamo	17
6	Segmentos de médula espinal donde se llevaron a cabo las inyecciones de los trazadores neuronales retrógrados FG y TB	25
7	Micrografías de la distribución del NPV	26
8	Neuronas observadas en el NPV mediante microscopia de fluorescencia en la región torácica (T5-T10)	28
9	Neuronas observadas en el NPV mediante microscopia de fluorescencia en la región lumbar (L1)	29

## RESUMEN

El hipotálamo juega un papel importante en el control central de mecanismos autónomos y en el sistema somatosensorial. Se ha descrito mediante el trazado de vías neuronales que el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) proyecta hacia el núcleo intermedio lateral (IML) y envía colaterales al menos a las capas superficiales del asta dorsal (CSAD) de los segmentos cervicales y lumbares de la médula espinal (ME). Sin embargo, un correlato entre el IML y las CSAD a nivel torácico no ha sido descrito. El objetivo de este trabajo fue demostrar si neuronas del NPV envían proyecciones hacia el IML y las CSAD; así como colaterales a nivel del segmento torácico de la ME y su posible relación con la oxitocina (OT). Se realizaron laminectomías en ratas macho a nivel de la vértebra T11 para inyectar los trazadores Fluoro Gold (FG) en IML y True Blue (TB) en CSAD. De los cortes coronales de 40  $\mu\text{m}$  de espesor del cerebro a nivel NPV, se cuantificaron las neuronas marcadas con FG y TB. Los resultados obtenidos fueron: 85.17% del total de neuronas marcadas en el NPV corresponden a FG, 8.16% corresponde a TB y 6.67% fueron doblemente marcadas (FG/TB). La inmunofluorescencia para OT mostró una distribución localizada a lo largo del NPV. De este trabajo podemos concluir que el NPV es considerado un integrador central entre los sistemas nervioso autónomo central y periférico que está formado de neuronas que envían proyecciones descendentes independientes al IML y las CSAD en la región torácica y lumbar de la ME y colaterales en un porcentaje bajo hacia ambas estructuras.

## I. INTRODUCCIÓN

El hipotálamo juega un papel importante en la regulación de la glándula pituitaria, en el control central de mecanismos autónomos y en el sistema somatosensorial, integra la respuesta autónoma y la función endocrina con el comportamiento, en particular con la homeostasis corporal.

Además, se ha descrito mediante el trazado de vías neuronales que el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) proyecta hacia el núcleo intermedio lateral (IML) y envía colaterales al menos a las capas superficiales del asta dorsal (CSAD) de los segmentos cervicales y lumbares de la médula espinal. Sin embargo, un correlato entre el IML y las CSAD a nivel torácico no ha sido descrito.

Uno de los puntos a dilucidar en este trabajo es demostrar si neuronas del NPV envían proyecciones hacia el IML y las CSAD; así como colaterales a nivel del segmento torácico de la médula espinal. Por otro lado, se sabe que la oxitocina (OT) está presente en la vía descendente desde el NPV hacia diferentes sitios en la médula espinal; en particular, en la sustancia gelatinosa de las capas dorsales en la médula espinal, las cuales están involucradas en el procesamiento de la información nociceptiva.

El NPV ha sido descrito como parte del sistema inhibitorio del dolor en el SNC. La estimulación del NPV produce un efecto analgésico el cual no está mediado por opioides o por vasopresina. Sin embargo, la OT administrada por diferentes vías y la estimulación eléctrica del NPV, han demostrado tener un efecto anti-nociceptivo que es mediado por la activación de la vía descendente a la médula espinal, que sugiere que la OT puede ser un potente agente analgésico. Además, varios estudios indican que el NPV y el núcleo supraquiasmático son las fuentes primarias de OT en el SNC y que el NPV tiene una proyección directa importante hacia la médula espinal la cual ha sido demostrada mediante el trazado retrógrado y anterógrado. También, se ha visto que la distribución de los receptores de OT en el asta dorsal de la médula espinal de rata coincide con las inervaciones de OT, lo

cual sugiere una acción reguladora de este péptido en funciones sensoriales y autónomas.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es describir la vía neuronal que el NPV proyecta hacia el IML y a las CSAD a nivel del segmento torácico de la médula espinal. Esto nos ayudará a continuar dilucidando sobre el mecanismo por el cual se transmite la información nociceptiva desde el lugar de origen hacia las zonas involucradas en el NPV para su procesamiento, regulación y emisión de respuestas.

## II. ANTECEDENTES

El hipotálamo ejerce una importante influencia regulatoria sobre el sistema nervioso autónomo (Bard, 1928), controla procesos vitales básicos mediante tres mecanismos principales. Primero, tiene acceso a información sensitiva de casi todo el cuerpo. Recibe aferencias directas del sistema sensitivo visceral y del sistema olfatorio. Las aferencias somatosensitivas viscerales que transportan información sobre el dolor se transmiten al hipotálamo desde el asta dorsal medular y dorsal del trigémino. Las hormonas circulantes, como la angiotensina II y la leptina, penetran en el hipotálamo por zonas especializadas a lo largo de los bordes del tercer ventrículo denominados órganos circunventriculares, donde interaccionan directamente con las neuronas hipotalámicas.

Segundo, el hipotálamo compara la información sensitiva con valores de referencia biológicos. Existen valores de referencia para una extensa variedad de procesos fisiológicos, como la glucemia, el sodio, la osmolalidad y los niveles de hormonas en suero. Y tercero, cuando el hipotálamo detecta una desviación respecto a un valor de referencia, ajusta un conjunto de respuestas autónomas, endocrinas y conductuales para restablecer la homeostasis.

Todos estos procesos deben ser coordinados con precisión y para ello, el hipotálamo contiene una serie de grupos celulares especializados con funciones diferentes.

### II. 1 División del Hipotálamo

El hipotálamo se puede dividir en tres regiones: anterior, medio y posterior. La parte más anterior del hipotálamo, superpuesta al quiasma óptico, es el área preóptica. Esta área controla la presión arterial y la composición de la sangre; los ciclos de sueño y vigilia, la temperatura corporal y muchas hormonas; así como la actividad reproductora.

El tercio medio del hipotálamo contiene los núcleos ventromedial, paraventricular, supraóptico e infundibular. En particular en este trabajo estamos interesados en el

núcleo paraventricular (NPV) que comprende los componentes magnocelular y parvocelular neuroendocrinos que controlan la adenohipófisis y la neurohipófisis. Además, contiene neuronas que inervan las neuronas preganglionares parasimpáticas y simpáticas del bulbo raquídeo y la médula espinal, con lo que desempeña un papel importante en la regulación de las respuestas autónomas. El tercio posterior del hipotálamo comprende el cuerpo mamilar y el área hipotalámica posterior situada sobre él.

Los principales núcleos del hipotálamo en su mayor parte están situados en la parte medial, entre dos sistemas de fibras importantes. Un sistema masivo de fibras longitudinales, el fascículo prosencefálico medial, que discurre por la parte lateral del hipotálamo. Este fascículo conecta el hipotálamo con el tronco encefálico y con el prosencéfalo basal, el núcleo amigdalino y la corteza cerebral.

Un segundo sistema de fibras, más pequeño, está localizado en posición medial a los principales núcleos hipotalámicos, en la pared del tercer ventrículo. Este sistema de fibras periventriculares contiene fibras longitudinales que conectan el hipotálamo con la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo. El sistema periventricular es también portador de los axones que se dirigen desde las neuronas neuroendocrinas parvocelulares localizadas en la región periventricular, que comprende los núcleos paraventricular e infundibular, hasta la eminencia media, para el control de la adenohipófisis. Éstos se reúnen en la eminencia media con los axones de las neuronas magnocelulares, que descienden por el tallo hipofisario, a la neurohipófisis, ver Figura 1 (Iversen y col., 2000).

Además, el hipotálamo controla el sistema endocrino de forma directa, mediante la secreción de productos neuroendocrinos a la circulación general desde la neurohipófisis, e indirectamente, vierte hormonas reguladoras al sistema portal local, que drena en los vasos sanguíneos de la adenohipófisis, ver Figura 2 (Guyton y Hall, 1997; Iversen y col., 2000).

Las grandes neuronas de los núcleos paraventricular y supraóptico, que constituyen la región magnocelular del hipotálamo se proyectan hacia la hipófisis posterior (neurohipófisis) (Iversen y col., 2000).

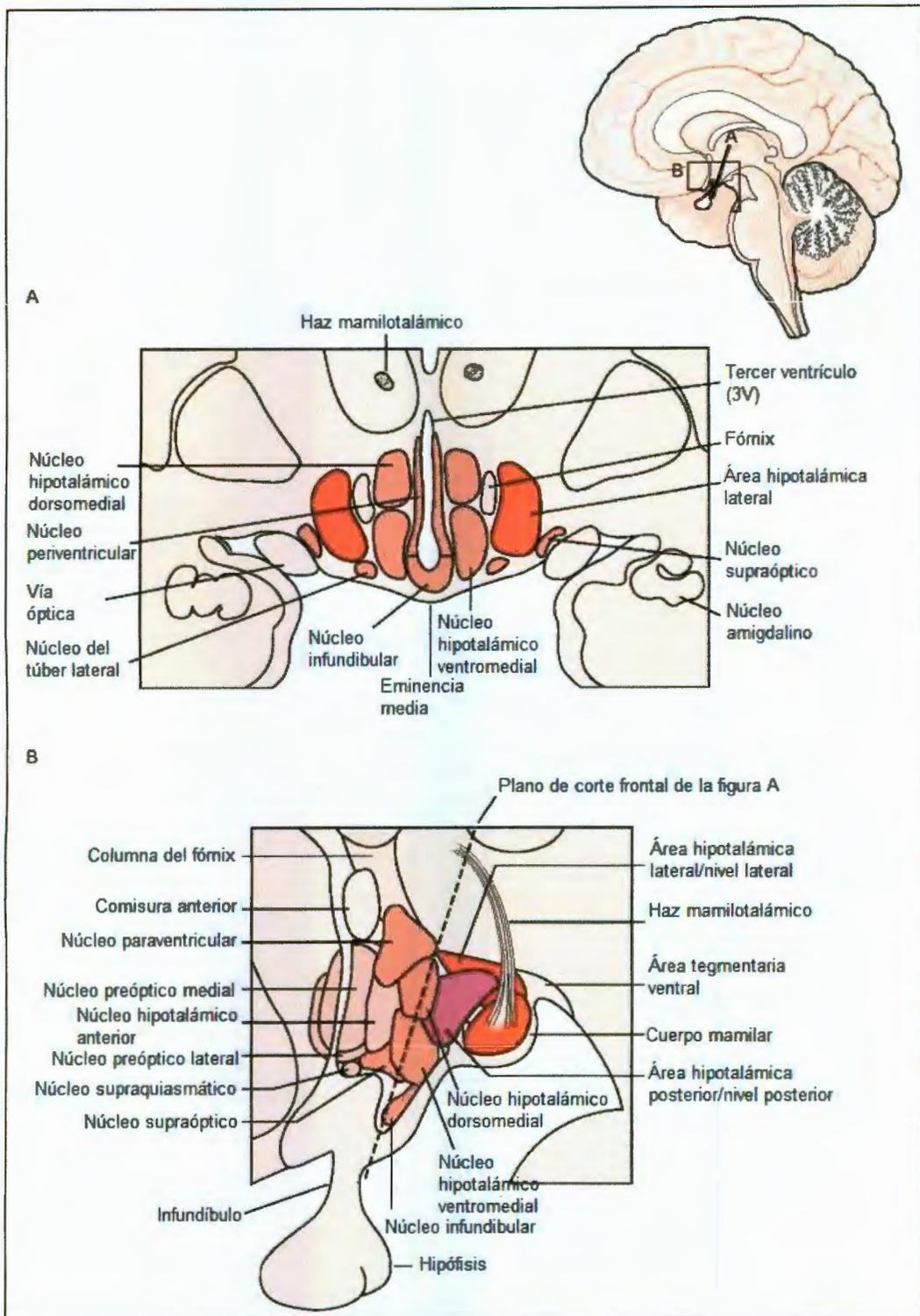


Figura 1. Estructura del hipotálamo. A. Visión frontal del hipotálamo (corte a lo largo del plano que se muestra en la parte B). B. Visión medial que muestra la mayoría de los núcleos principales. El hipotálamo a menudo se divide con fines analíticos en tres zonas en dirección rostrocaudal: el área preóptica, el nivel tuberal y el nivel posterior. (Tomado y modificado de Kandel y col., 2000).

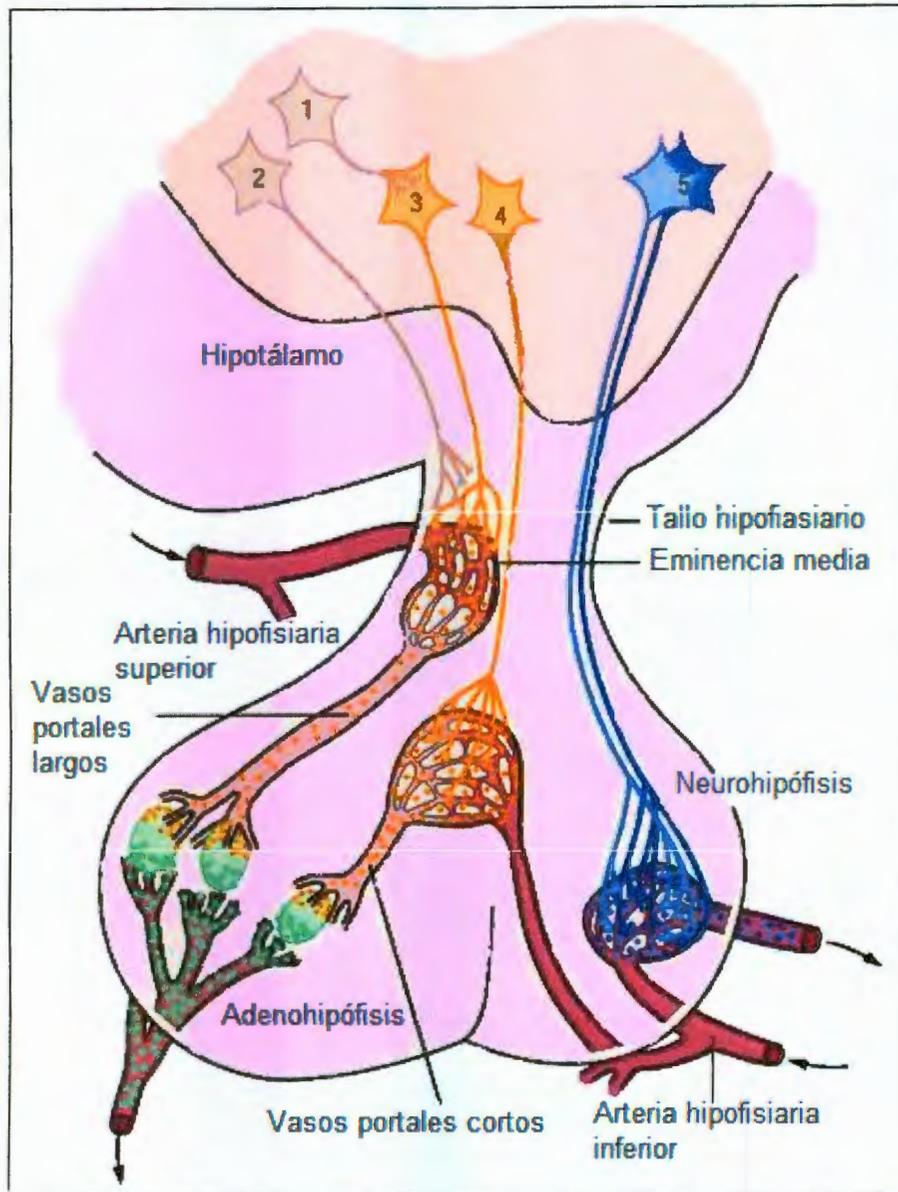


Figura 2. El hipotálamo controla la hipófisis tanto directa como indirectamente a través de las neuronas liberadoras de hormonas. Las neuronas peptidérgicas (5) liberan OT o VP a la circulación general a través de la neurohipófisis (lóbulo posterior). Dos tipos generales de neuronas participan en la regulación de la adenohipófisis (lóbulo anterior). Las neuronas peptidérgicas (3, 4) sintetizan y liberan hormonas a la circulación portal-hipofisiaria. El segundo tipo de neurona es el enlace entre las neuronas peptidérgicas y el resto del encéfalo. Se cree que estas neuronas, establecen sinapsis con las neuronas peptidérgicas sobre el cuerpo celular (1) o sobre la terminal del axón (2). (Tomado y modificado de Kandel y col., 2000).

## II. 2 Conexión del Núcleo Paraventricular Hipotalámico (NPV)

Entre las proyecciones más importantes del NPV se encuentran las siguientes:

### II. 2. 1 Proyección Neurohipofisial

La mayor parte de las neuronas del NPV envían axones al lóbulo posterior de la glándula pituitaria (neurohipófisis), extendiéndose en dos grupos celulares distintos:

1) la porción medial magnocelular (PaMM) la cual contiene la mayoría de neuronas que producen oxitocina (OT) y se extiende anteroventromedialmente en el núcleo, y 2) la división lateral magnocelular (PaLM) la cual está formada de neuronas vasopresinérgicas y forma una agrupación distinta situada posterodorsolateralmente al PaMM, ver Figura 3 (Armstrong y col., 1980; Van den Pol, 1982).

### II. 2. 2 Proyección a la Eminencia Media (EME)

El NPV provee una entrada sustancial a la capa externa de la eminencia media. Estas células son pequeñas y se localizan en las porciones parvocelular anterior (PaAP) y medial (PaMP) del NPV (Swanson y Kuypers, 1980). También, algunas células grandes del PaMM y el PaLM proyectan hacia la EME (Wiegand y Price, 1980; Lechan y col., 1982). El PaAP y PaMP contienen una gran variedad de tipos celulares, incluidas neuronas inmunorreactivas para neurotensina, factor de liberación de corticotropina (CRF), somatostatina, encefalinas, dopamina (Silverman y Zimmerman, 1983; Swanson y Sawchenko, 1983), y hormona de liberación de tirotrópina (Lechan y Jackson, 1982).

Una gran inervación de neuronas vasopresinérgicas de la capa externa de la EME deriva del NPV y está involucrada funcionalmente con la regulación glucocorticoide (Vandesande y col., 1977; Silverman y Zimmerman, 1982). Algunas de estas neuronas son magnocelulares que envían colaterales a la neurohipófisis. Por otro lado, la gran mayoría de esta inervación proviene de un grupo parvocelular (Sawchenko y col., 1984).

La citoarquitectura de las neuronas en el PaAP y PaMP no es bien conocida. Sin embargo, algunas neuronas del PaMP envían colaterales dentro del mismo núcleo

o en regiones que proyectan a la glándula pituitaria posterior, ver figura 3 (Van den Pol, 1982).

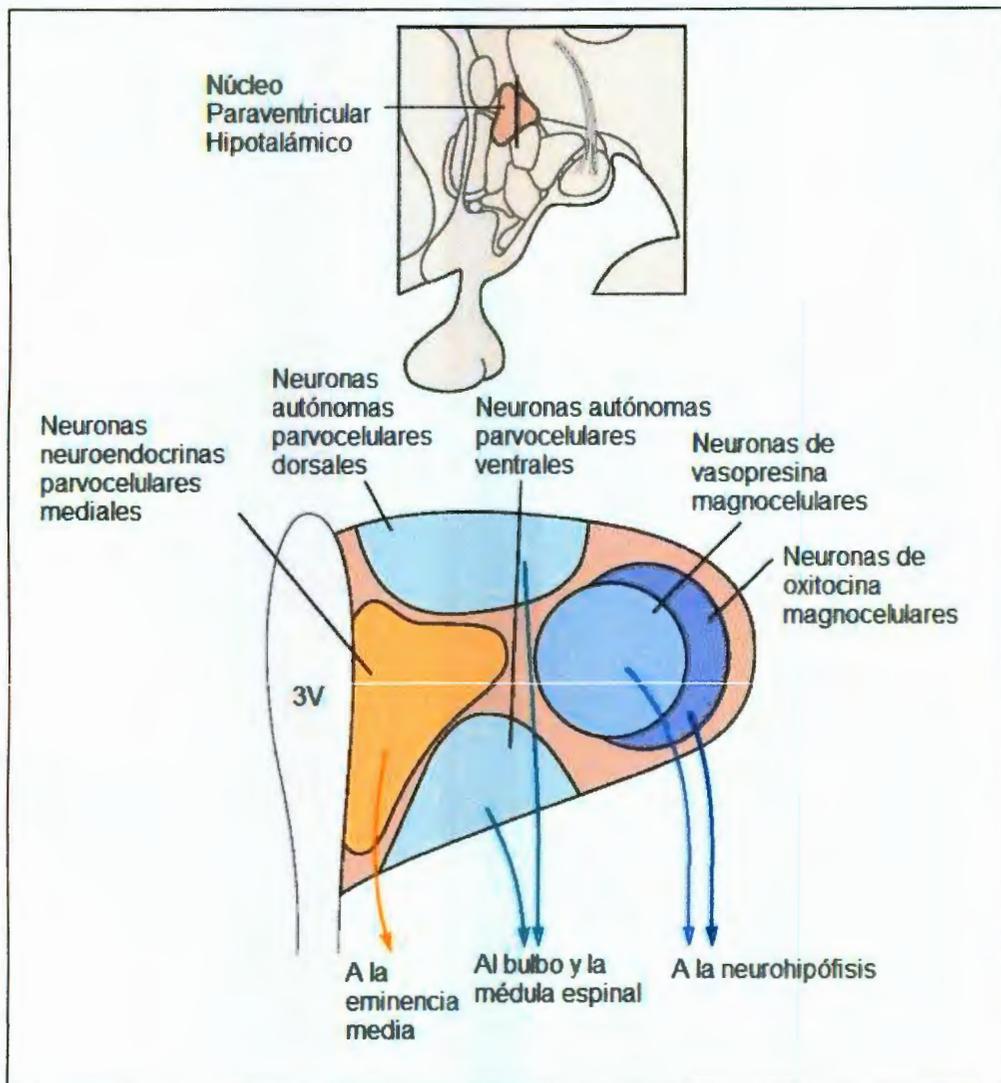


Figura 3. Núcleo paraventricular hipotalámico. Se muestra la ubicación del NPV y los grupos de neuronas que lo conforman. 3V: tercer ventrículo. (Tomado y modificado de Kandel y col., 2000).

### II. 2. 3 Proyección Extrahipotalámica

Un tercer grupo de neuronas de tamaño variable del NPV proyecta caudalmente y es diferente a los otros dos grupos (Saper y col., 1976; Hosoya y Matsushita, 1979; Armstrong y col., 1980; Swanson y Kuypers, 1980). La proyección a la médula

espinal inerva la columna celular del núcleo intermediolateral (IML) y se origina ampliamente en los núcleos parvocelulares dorsomedial (PaDC), ventral (PaV) y el subnúcleo posterior (PaPO) (Koh y Ricardo, 1980). Estos dos últimos núcleos también proyectan a varias áreas en la médula oblongada, notablemente el núcleo del tracto solitario y el complejo vagal dorsal. El PaDC, PaV y PaPO están formados por células de tamaño variable y contienen un grupo pequeño de células inmunorreactivas a vasopresina (VP) principalmente en el núcleo PaV, e inmunorreactivas a OT en los núcleos PaDC, PaV y PaPO. Algunas de estas células peptidérgicas proyectan directamente a sitios caudales, pero la gran mayoría de estas proyecciones extrahipotalámicas del NPV no han sido identificadas neuroquímicamente (Sawchenko y Swanson, 1982; Sofroniew y Schrell, 1982).

La parte parvocelular del NPV proyecta a las áreas de procesamiento del dolor en el tallo cerebral y la médula espinal, mientras que la parte magnocelular proyecta principalmente a la pituitaria, ver Figura 3 (Swanson y Kuypers, 1980; Sawchenko y Swanson, 1982; Cechetto y Saper, 1988).

También, se ha descrito mediante el trazado de vías neuronales que el NPV proyecta hacia el IML (Hosoya y col., 1991) y envía colaterales al menos a las capas superficiales del asta dorsal (CSAD) de los segmentos cervicales y lumbares de la médula espinal (Condés-Lara y col., 2007). Sin embargo, un correlato entre el IML y las CSAD a nivel torácico de la médula espinal no ha sido descrito.

El NPV ha sido descrito como parte del sistema inhibitorio del dolor en el sistema nervioso central (SNC) (Shiraishi y col., 1995; Condés-Lara y col., 2003, 2006, 2007; Miranda-Cardenas y col., 2006; Rojas-Piloni y col., 2007). Su estimulación produce un efecto analgésico, el cual no es mediado o en él tienen una mínima participación los opioides o la vasopresina (Yirmiya y col., 1990; Shiraishi y col., 1995; Condés-Lara y col., 2006, 2007; Miranda-Cardenas y col., 2006). Además, se ha observado que la administración de OT por diferentes vías ha mostrado tener un efecto anti-nociceptivo, el cual es mediado por la activación de vías descendentes anti-nociceptivas a la médula espinal, lo cual sugiere que la OT

podría ser un potente agente analgésico (Arletti 1993; Lundeberg y col., 1993, 1994; Condés-Lara y col., 2006; Miranda-Cardenas y col., 2006). También, varios estudios indican que el NPV y el núcleo supraquiasmático son la fuente primaria de OT en el SNC y que el NPV tiene una proyección directa muy importante hacia la médula espinal, la cual ha sido demostrada mediante trazadores neuronales retrógrados y anterógrados (Saper y col., 1976; Swanson 1977; Swanson y McKellar 1979; Sawchenko y Swanson 1982; Condés-Lara y col., 2007). La distribución de los sitios de ligando de OT en el asta dorsal de la médula espinal en rata coincide con la inervación de OT, lo cual sugiere fuertemente un papel modulador de este péptido en las funciones sensoriales y autonómicas (Reiter y col., 1994).

### II. 3 Dolor

El dolor es principalmente un mecanismo que sirve para proteger al organismo (Guyton y Hall, 1997). Las sensaciones de dolor son las modalidades sensitivas más características de todas. El dolor se ubica dentro de las sensaciones somáticas como las del tacto, presión y posición (Basbaum y Jessell, 2000). Tiene una importante función protectora, ya que nos avisa del peligro que corre alguno de nuestros tejidos o de una lesión que debe ser tratada.

El dolor tiene una cualidad urgente y evolutiva, que es la responsable del aspecto afectivo y emocional de su percepción.

La intensidad con la que se percibe el dolor, depende de condiciones circunstanciales, y el mismo estímulo puede producir respuestas diferentes en distintos individuos en condiciones similares (Basbaum y Jessell, 2000).

El dolor es una percepción que consiste en una experiencia sensitiva y emocional desagradable asociada con una lesión tisular presente o posible.

Aunque está mediado por el sistema nervioso, es importante establecer una distinción entre aquél y los mecanismos nerviosos de la nocicepción, es decir, de la respuesta a una lesión tisular percibida o real.

Algunos tejidos tienen receptores sensitivos especializados, llamados nociceptores, activados por estímulos nocivos en los tejidos periféricos (Purves y col., 2004). No siempre la nocicepción conduce necesariamente a una experiencia dolorosa. Por ello, la relación entre la nocicepción y la percepción del dolor nos proporciona otro ejemplo del principio de que la percepción es un producto de la abstracción y la elaboración por parte del cerebro de una información sensitiva.

No existen estímulos dolorosos que sean invariablemente una percepción dolorosa en todas las personas, es decir, no todos sentimos lo mismo a un mismo estímulo. El dolor puede ser persistente o crónico. El primero es característico de muchas enfermedades y es la razón principal por la que un paciente acude al médico, mientras que el dolor crónico parece no tener ningún propósito útil y tan sólo sirve para hacer un deterioro en la vida del paciente.

Los dolores persistentes pueden dividirse en dos amplias clases, los nociceptivos y los neuropáticos. Los dolores nociceptivos son el resultado de la activación directa de nociceptores en la piel o los tejidos blandos en respuesta a una lesión tisular, y por lo general aparecen como acompañantes de una inflamación.

Los dolores neuropáticos son debidos a la lesión directa de los nervios del sistema nervioso periférico o central, y a menudo producen una sensación de quemadura o descarga eléctrica. La anestesia dolorosa, literalmente dolor en ausencia de sensación, sigue a veces a la sección transversal terapéutica de un nervio sensitivo realizada para intentar bloquear un dolor crónico (Basbaum y Jessell, 2000).

Los estímulos dolorosos en la piel o tejido subcutáneo, como articulaciones o músculos, activan varias clases de terminales de nociceptores, que son las terminaciones periféricas de neuronas sensitivas primarias cuyos cuerpos celulares se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal y del trigémino (Purves y col, 2004). Se distinguen tres clases principales de nociceptores: 1) térmicos, 2) mecánicos y 3) polimodales; así como una clase denominada nociceptores silentes (Guyton y Hall, 1997; Basbaum y Jessell, 2000, Purves y col., 2004).

Los nociceptores térmicos son activados por temperaturas  $< 5^{\circ}\text{C}$  y  $> 45^{\circ}\text{C}$  que para un individuo humano podrían considerarse extremas, cuando los tejidos no se encuentran protegidos o aislados (Basbaum y Jessell, 2000).

Los receptores sensoriales somáticos responsables de la percepción de estímulos mecánicos están asociados con axones mielinizados, que tienen velocidades de conducción relativamente rápidas. Los axones asociados a los nociceptores, en contraste, conducen la información relativamente lento (Purves y col., 2004).

Estos contienen fibras A $\delta$  finamente mielínicas y de pequeño diámetro que conducen las señales a unos 20m/s. Los nociceptores mecánicos son activados por una presión intensa aplicada a la piel. También tienen fibras A $\delta$ . Los nociceptores polimodales son activados por estímulos mecánicos, químicos o térmicos (tanto fríos como calientes) de gran intensidad. Estos nociceptores tienen fibras C no mielínicas y de pequeño diámetro que conducen las señales lentamente, por lo general a velocidades inferiores a 1.0 m/s (Guyton y Hall, 1997; Basbaum y Jessell, 2000; Purves y col., 2004).

Estas tres clases de receptores están ampliamente distribuidas por la piel y tejidos profundos, y a menudo actúan juntos. Por ejemplo, cuando uno se da un martillazo en el pulgar, se siente inmediatamente un primer dolor agudo, que va seguido de un segundo dolor más prolongado, a veces del tipo de una quemadura. El dolor agudo y rápido es transmitido por fibras A $\delta$  que llevan la información de los nociceptores térmicos y mecánicos; el dolor lento es transmitido por fibras C que son activadas por nociceptores polimodales (Guyton y Hall, 1997; Basbaum y Jessell, 2000).

Las vísceras contienen nociceptores silentes. Normalmente, estos no son activados por una estimulación nociva, si bien su umbral de activación disminuye con la inflamación y diversas agresiones químicas. La activación de los nociceptores silentes puede contribuir al desarrollo de hiperalgesia secundaria y sensibilización central (Basbaum y Jessell, 2000).

Al contrario de los receptores somatosensitivos especializados para el tacto y la presión, la mayoría de los nociceptores son terminaciones nerviosas libres (Purves,

2004). El mecanismo por el cual los estímulos nocivos despolarizan terminaciones sensitivas libres y generan potenciales de acción, es desconocido.

Muchos factores, además del nivel de actividad de las fibras A $\delta$  y C, determinan la localización, la intensidad y la calidad del dolor. Mientras que la percepción del tacto o la presión es constante cuando se estimulan eléctricamente los receptores de tacto-presión, la activación de un mismo nociceptor puede inducir diferentes sensaciones (Basbaum y Jessell, 2000).

En ausencia de conducción por las fibras A $\alpha$  y A $\beta$ , la percepción del dolor no es normal. No es posible distinguir estímulos, normalmente diferentes, pues todos producen un dolor quemante (Guyton y Hall, 1997; Basbaum y Jessell, 2000).

La actividad en los sistemas de fibras de mayor diámetro no sólo modifica la percepción del dolor, sino que también la atenúa. Por ello, el movimiento reflejo de sacudida de la mano cuando uno se quema estimula realmente las fibras aferentes de mayor diámetro que pueden atenuar el dolor (Basbaum y Jessell, 2000).

En situaciones patológicas, la activación de los nociceptores puede llevar a dos tipos de estados dolorosos anormales: la alodinia y la hiperalgesia. En la alodinia el dolor resulta de estímulos que normalmente son inocuos. Los pacientes con alodinia no sienten un dolor constante; en ausencia de estímulo no hay dolor. En cambio, los pacientes con hiperalgesia, que es una respuesta excesiva a estímulos nocivos, a menudo perciben dolores de forma espontánea (Guyton y Hall, 1997; Basbaum y Jessell, 2000).

## II. 4 Médula Espinal

Las fibras aferentes nociceptivas terminan de forma predominante en el asta dorsal de la médula espinal. Esta asta puede subdividirse en seis capas o láminas distintas, según sus características citológicas. Las clases de neuronas aferentes primarias que transportan distintas modalidades terminan en láminas diferentes del asta dorsal.

Las neuronas nociceptivas están localizadas en la parte superficial del asta dorsal en la capa marginal, también llamada lámina I y en la sustancia gelatinosa o lámina

II. La mayoría de ellas recibe señales sinápticas directas de fibras A $\delta$  y C. Muchas de las neuronas de la capa marginal (lámina I) responden exclusivamente a la estimulación nociva, por ello reciben el nombre de neuronas específicas de la nocicepción y se proyectan a los centros cerebrales superiores. Algunas neuronas de esta capa, denominadas neuronas de amplio rango dinámico, responden de manera gradual a estímulos mecánicos nocivos y no nocivos. La sustancia gelatinosa (lámina II) está formada casi exclusivamente por interneuronas, tanto excitadoras como inhibitoras, algunas de las cuales responden sólo a las señales nociceptivas, mientras que otras lo hacen también a estímulos no nocivos.

Las láminas III y IV están localizadas en la parte posterior de la sustancia gelatinosa y contiene neuronas que reciben señales monosinápticas de las fibras A $\beta$ . Estas neuronas responden de forma predominante a estímulos no nocivos. La lámina V contiene sobre todo neuronas de amplio rango dinámico que proyectan en el tronco encefálico y en algunas regiones del tálamo. Estas neuronas reciben señales de las fibras A $\beta$  y A $\delta$ . También reciben señales de las fibras C, ya sea directamente sobre sus dendritas, o indirectamente a través de interneuronas excitadoras que reciben a su vez las señales directamente de las fibras C. Muchas neuronas de la lámina V también reciben señales nociceptivas de estructuras viscerales.

Las neuronas de la lámina VI reciben señales de fibras aferentes procedentes de músculos y articulaciones que responden a la manipulación no nociva de las articulaciones. Estas neuronas no parecen contribuir a la transmisión de mensajes nociceptivos. Por último, neuronas de las láminas ventrales del asta dorsal, la VII y la VIII, muchas de las cuales responden a estímulos nocivos, tienen propiedades de respuesta más compleja debido a que las señales nociceptivas dirigidas a las neuronas de la lámina VII son polisinápticas. Aunque la mayoría de las neuronas del asta dorsal reciben señales sólo de un lado del cuerpo, muchas de la lámina VII responden a estímulos procedentes del lado contralateral, ver Figura 4 (Basbaum y Jessell, 2000).

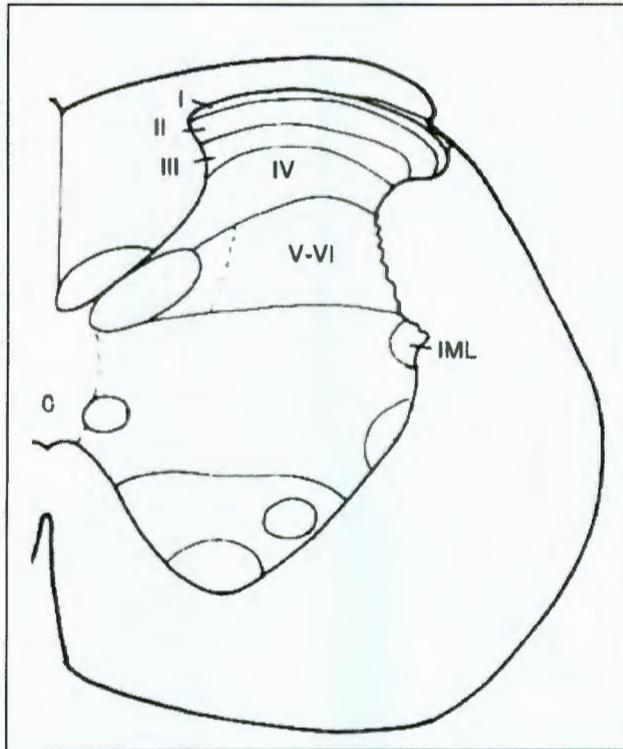


Figura 4. Diagrama de la médula espinal a nivel de L1 donde se muestran las láminas y el IML de la médula espinal. Las láminas I y II corresponden a las CSAD. (Tomado y modificado de Ramos y col., 2008).

## II. 5 Aferencias Somatosensoriales

Las señales somatosensoriales, incluida la nocicepción, pueden alcanzar directamente el sistema hipotálamohipofisario a través del tracto espinohipotálamico o por la activación del sistema catecolaminérgico del tallo cerebral. Las neuronas de primer orden terminan sobre varios tipos celulares en las astas dorsales de la médula espinal y el núcleo trigeminal sensorial. Las fibras nociceptivas de segundo orden (tractos espinoreticular y espinosolitario) emergen de las láminas IV y V de las astas dorsales o de las láminas superficiales del núcleo trigeminal sensorial y terminan en la médula ventrolateral y dorsomedial, ambas inervan neuronas catecolaminérgicas y peptidérgicas (Menétrey y Basbaum, 1987; Menétrey y col., 1983; Lima y Coimbra, 1991; Tavares y col., 1993). Estas fibras ascendentes o sus axones colaterales tal vez cruzan a nivel de la médula espinal o de la parte baja de la médula oblongada (Palkovits, 1999).

## II. 5. 1 Vías Espinohipotalámicas

Las señales somatosensoriales de la médula espinal pueden ser conducidas directamente al hipotálamo por el tracto espinohipotalámico (Burstein y col., 1987; Burstein y col., 1990; Cliffer y col., 1991) o por axones colaterales de fibras del tracto espinoreticulotalámico y/o espinotalámico. Los axones somatosensoriales primarios penetran en las astas dorsales y son retransmitidos por las células marginales a las neuronas de segundo orden localizadas principalmente en las láminas IV y V de la médula espinal. De ahí, las fibras cruzan la línea media a nivel de la médula espinal y ascienden juntas con el tracto espinotalámico al hipotálamo lateral, donde terminan, ver Figura 5 (Palkovits, 1999).

Estudios iniciales de Kabat (1935) y Magoum (1940) indican que existen vías descendentes hipotalámicas que se extienden caudalmente a través del cerebro medio dentro del funículo lateral de la médula espinal hasta alcanzar el IML, demostrándose una posible vía involucrada de los efectos del hipotálamo sobre el sistema nervioso autónomo (Condés-Lara, 2003). También estudios electrofisiológicos, farmacológicos, conductuales y de inmunoanálisis enzimático muestran que la vía descendente oxitocinérgica del NPV participa en la producción de analgesia y en los procesos anti-nociceptivos (Condés-Lara y col., 2006; Miranda-Cardenas y col., 2006; Martínez-Lorenzana y col., 2008). Sin embargo, la relación entre los mecanismos intrínsecos a nivel de las CSAD por el cual las fibras oxitocinérgicas hipotálamo-espinales ejercen este efecto anti-nociceptivo no ha sido explorada. Por tal motivo es de gran importancia dilucidar la relación entre las proyecciones de las neuronas del NPV hacia las CSAD y al IML.

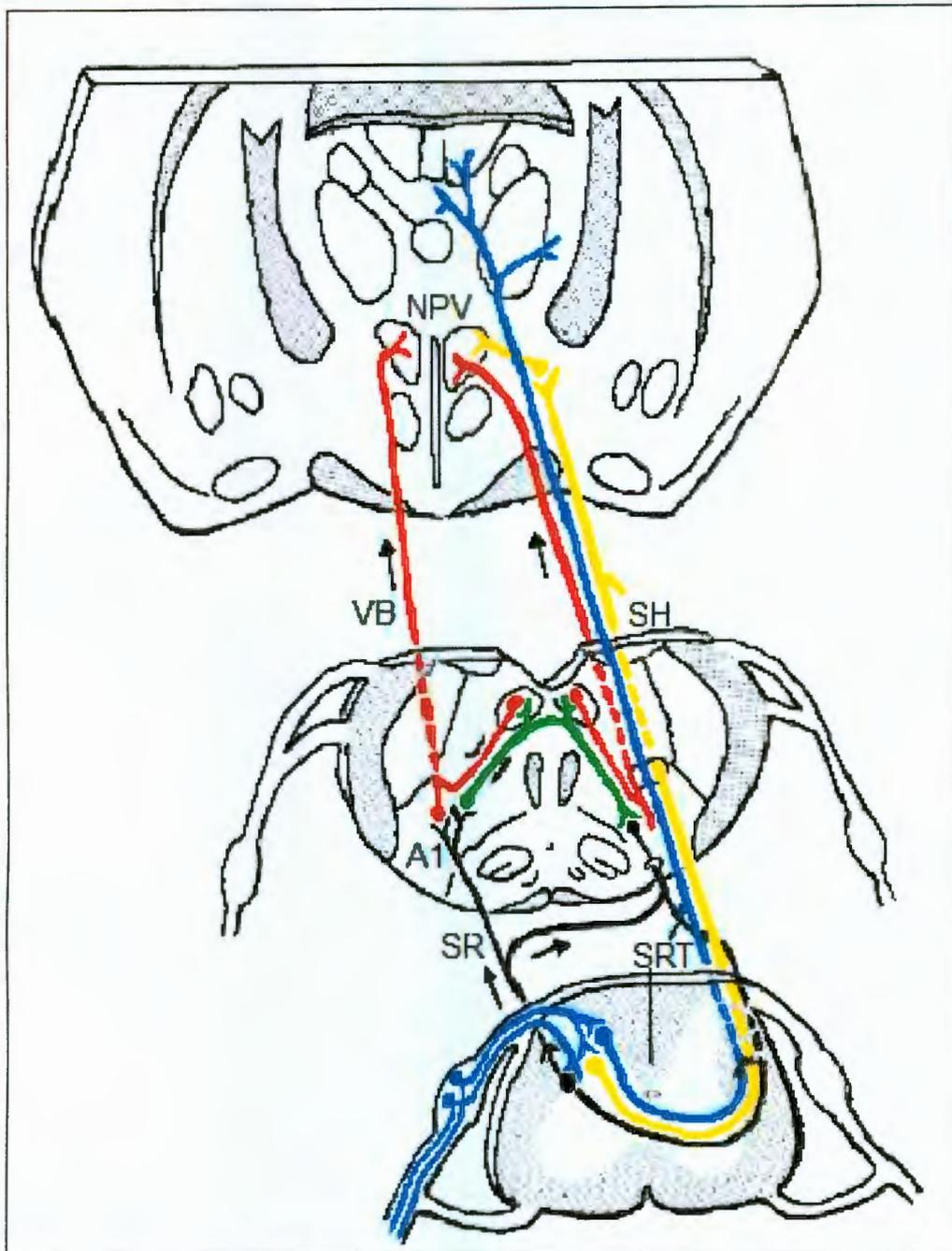


Figura 5. Vías neuronales de la médula espinal al hipotálamo. Las vías nociceptivas (azul) tienen neuronas sensoriales primarias en la raíz dorsal, vías catecolaminérgicas (rojo) desde A1, grupos celulares noradrenérgicos. El tracto espinorreticular (negro) de neuronas espinales nociceptivas hacia A1, células noradrenérgicas. Tracto directo espinohipotalámico (amarillo). Abreviaciones usadas: A1, grupo celular noradrenérgico, NPV, núcleo paraventricular hipotalámico; SH, tracto espinohipotalámico; SR, tracto espinorreticular; SRT, tracto espinorreticulotalámico; VB, haz ventral noradrenérgico. (Tomado y modificado de Palkovitz, 1999).

### **III. HIPÓTESIS**

El NPV envía proyecciones descendentes y colaterales hacia el IML y a las CSAD a nivel torácico de la médula espinal, las cuales pueden ser oxitocinérgicas.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 General

Demostrar que el NPV envía proyecciones hacia el IML y a las CSAD a nivel torácico de la médula espinal mediante el uso de trazadores neuronales retrógrados y su posible colocación con OT.

### IV.2 Específicos

- Describir la vía directa y/o colaterales del NPV hacia el IML y las CSAD a nivel torácico mediante la inyección de los trazadores neuronales retrógrados Fluoro Gold (FG) y True Blue (TB).
- Demostrar que las proyecciones descendentes desde el NPV hacia el IML y a las CSAD a nivel torácico de la médula espinal son oxitocinérgicas, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.
- Verificar los sitios de inyección y la región del NPV mediante la técnica histológica de violeta de Cresilo.
- Cuantificar las neuronas marcadas con FG y/o TB, así como las inmunopositivas a OT en el NPV.

## V. METODOLOGÍA

### V. 1 Material

#### V. 1. 1 Animales de Experimentación

Se utilizaron un total de 18 ratas macho de la cepa Wistar de un peso de 280 a 300 gramos, los cuales se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con comida y agua a libre demanda. Todos los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con una mezcla de Ketamina/Xilacina (70/6 mg/Kg).

#### V. 1. 2. Cirugía

Los animales después de ser anestesiados, fueron montados en un aparato estereotáxico para realizar una laminectomía a nivel de la vértebra torácica T11. Para descubrir la parte final del segmento torácico e inicial del segmento lumbar de la médula espinal. Una vez descubierta la médula espinal, se prosiguió a inyectar los trazadores neuronales retrógrados Fluoro Gold (FG) al 2.5% en agua destilada y True Blue (TB) en cristales.

### V. 2 Métodos

#### V. 2. 1 Inyección de los Trazadores Neuronales Retrógrados

La inyección del trazador FG se realizó con un electrodo de vidrio con 15  $\mu\text{m}$  de diámetro en la punta, acoplado a una pipeta Hamilton y a su vez acoplada a un Vernier; fueron inyectados mediante presión 5-10 nl de FG en el núcleo intermedio lateral de la médula espinal (IML); este núcleo se ubicó a partir de las coordenadas estereotáxicas de Paxinos 1998, se tomó como referencia la parte final del segmento torácico y la línea media de la médula espinal, a una lateralidad de 0.6 mm a la izquierda y una profundidad de 0.9 mm.

Para la inyección del trazador TB se ubicaron primero las capas superficiales del asta dorsal de la médula espinal (CSAD) en la parte inicial del segmento lumbar y se tomó como referencia la línea media de la médula espinal, a una lateralidad de

0.5 mm y una profundidad de 0.3 mm, y posteriormente un cristal de TB fue insertado en las CSAD con un electrodo con punta roma.

Una vez inyectados los trazadores, se prosiguió a suturar los músculos perivertebrales y la piel, a continuación se llevó a cabo el monitoreo de cada animal para comprobar que despertará sin mostrar signos de parálisis en alguno de los miembros posteriores.

#### V. 2. 2 Perfusión

Transcurrido un tiempo de sobrevivencia de 13 días, los animales se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (45 mg/Kg) vía intraperitoneal y se realizó una perfusión vía intracardiaca mediante una solución de lavado con NaCl al 0.9% y con una solución fijadora con paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1M, pH 7.4 (PB). Una vez terminada la perfusión se extrajeron el cerebro y la médula espinal a cada animal. El tejido se mantuvo en un período de posfijación en paraformaldehído al 4% en PB durante 2 horas, transcurrido ese tiempo se colocó el tejido en una solución de sacarosa al 30% en PB y se mantuvo en refrigeración hasta que fueron cortados.

#### V. 2. 3 Cortes Histológicos del Tejido

El cerebro y la médula espinal de cada animal fueron colocados y congelados durante 5 minutos a  $-40^{\circ}\text{C}$  en un micrótopo de congelación (LEICA SM 2000R). Se realizaron cortes coronales de 40  $\mu\text{m}$  de espesor del segmento torácico-lumbar de la médula espinal y del cerebro a partir de 8.20 mm hasta 5.20 mm línea interaural. Se obtuvieron 5 series cada 200  $\mu\text{m}$ , de las cuales las 3 primeras fueron montadas en portaobjetos doblemente gelatinizados y las siguientes 2 series se almacenaron en pozos de incubación.

#### V. 2. 4 Técnicas de Deshidratación y Tinción del Tejido

##### V. 2. 4. 1 Deshidratación del Tejido

Los cortes de la serie 1 y 2 fueron deshidratados en un tren que contenía alcohol al 70%, al 80%, al 96% y al 100% y, xilol absoluto. Posteriormente los cortes fueron montados con una resina DPX y un cubreobjetos, para su posterior análisis.

#### V. 2. 4. 2 Tinción del tejido

Los cortes de los cerebros de la serie 3 fueron teñidos con violeta de Cresilo al 0.5% para su estudio histológico, primero mediante un tren de hidratación que contenía xilol absoluto, alcohol al 100%, al 96%, al 80%, al 70% y una solución de violeta de Cresilo al 0.5%, posteriormente se llevó a cabo una deshidratación, como se mencionó en el apartado anterior, y fueron montados con la resina Entellan para su análisis.

#### V. 2. 5 Técnica de Inmunofluorescencia para Oxitocina (OT)

Se llevó a cabo mediante la preincubación de los cortes en un medio que contenía un Buffer tritón x-100 al 5% y suero de cabra al 5%, durante 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se incubaron con un anticuerpo primario OT-neurofisisina (PS60 anti-ratón) disuelto 1:250 durante toda una noche, generosamente provisto por el Dr. H. Gainer del "National Institute of Neurological Disorders and Stroke". Después los cortes fueron lavados con buffer fosfatos salino 0.1 M, pH 7.4 (PBS) y fueron incubados con el anticuerpo secundario Alexa 488 disuelto 1:300. Se dejaron incubar toda la noche y luego de un lavado con PBS, los cortes fueron montados en portaobjetos doblemente gelatinizados con Vectashield y un cubreobjetos.

#### V. 2. 6 Cuantificación de Neuronas Marcadas con FG, TB, FG/TB y OT

Se obtuvieron imágenes digitales de los cortes a nivel del NPV y se realizó la localización de las neuronas marcadas en dicha región. Esto se hizo en el programa Data Image Tracer versión 1.2.

#### V. 2. 7 Análisis Histológico

Los cortes fueron observados en un microscopio con sistema de fluorescencia con un filtro UV ( $\lambda = 350-460$  nm) y un filtro para fluoresceína ( $\lambda = 450-490$  nm) (LEICA); para identificar en los sitios de inyección el FG (418 nm) en el IML y el TB (404 nm) en las CSAD de la médula espinal, y en el NPV las neuronas marcadas con FG y TB, así como las inmunopositivas para OT (488 nm), respectivamente.

Las preparaciones teñidas con violeta de Cresilo al 0.5% se observaron en un microscopio óptico para situar y establecer la ubicación del NPV.

## VI. RESULTADOS

### VI. 1 Verificación de los Sitios de Inyección

Los sitios de inyección se llevaron a cabo en dos segmentos diferentes de la médula espinal (ME), en el torácico y el lumbar. Se inyectaron un total de 18 animales, al analizar mediante microscopia de fluorescencia, 6 correspondieron al sitio de inyección en el segmento lumbar (L1) y 1 en el torácico (T5-T10). Los resultados obtenidos de estos animales se muestran a continuación en la Figura 6C.

Para corroborar a qué nivel y estructura exacta se encontraron los sitios de inyección de los trazadores neuronales retrógrados en la ME, Fluoro Gold (FG) y True Blue (TB), se realizó la tinción de violeta de Cresilo al 0.5% de los cortes adyacentes, como se muestra en la Figura 6B. Una vez que observamos los cortes de ME teñidos, fue posible la identificación de las estructuras en donde se llevaron a cabo las inyecciones, estas fueron en el núcleo intermedio lateral de la médula espinal (IML), señalado con una línea punteada y las capas superficiales del asta dorsal de la médula espinal (CSAD) señaladas con un corchete, ambas estructuras fueron encontradas en los dos segmentos, T5-T10 y L1 (Figura 6A).

El trazador FG fue inyectado en el núcleo IML, mientras que el TB en las CSAD, para ambos segmentos. En la figura 6C se muestran ejemplos de los sitios de inyección, para FG en el IML a nivel torácico (T5-T10) y para TB en las CSAD a nivel lumbar (L1).

### VI. 2 Núcleo Paraventricular Hipotalámico (NPV)

Para determinar la distribución de las neuronas marcadas con los diferentes trazadores neuronales retrógrados FG y TB ó inmunorreactivas para oxitocina (OT) en el NPV se realizó la técnica de violeta de Cresilo al 0.5%, en una serie contigua a la observada mediante fluorescencia, el NPV fue delineado con líneas punteadas, ver Figura 7.

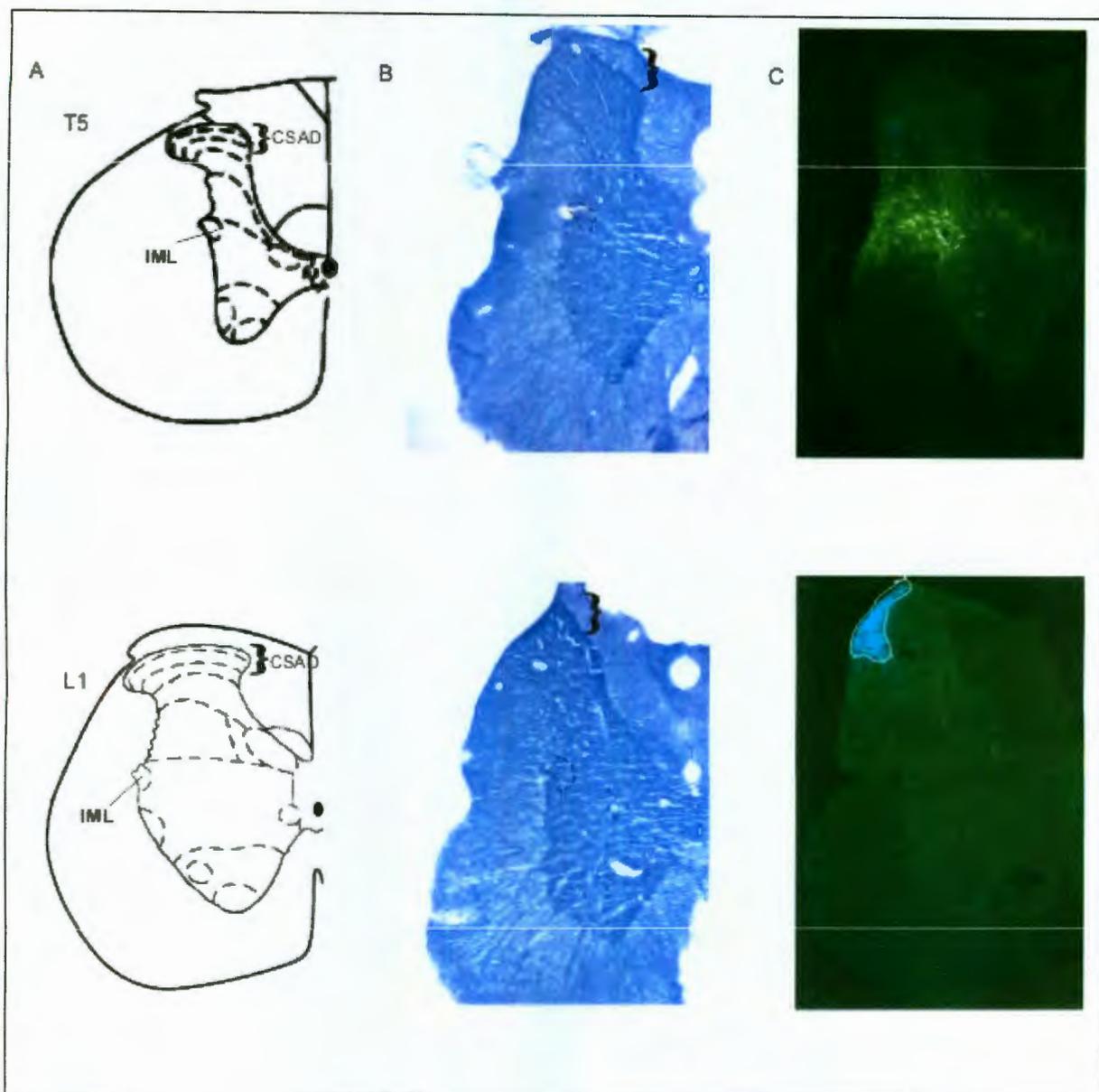


Figura 6. Muestra los segmentos en los que fueron inyectados los trazadores neuronales retrógrados FG y TB. La fila superior corresponde al nivel torácico (T5-T10) y la fila inferior al nivel lumbar (L1). La columna A muestra los diagramas de T5-T10 y L1 (tomados de Paxinos y Watson, 1998), donde se señalan las estructuras del IML y las CSAD. En la columna B se muestran los cortes de la ME a nivel de T5-T10 y L1 teñidos con violeta de Cresilo al 0.5%. La columna C, muestra las imágenes de los sitios de inyección con FG en el IML a nivel de T5-T10 y con TB en las CSAD a nivel de L1. Abreviaciones: FG (Fluoro Gold); TB (True Blue); IML (Núcleo Intermedio Lateral de la Médula Espinal); CSAD (Capas Superficiales del Asta Dorsal de la Médula Espinal); ME (Médula Espinal).

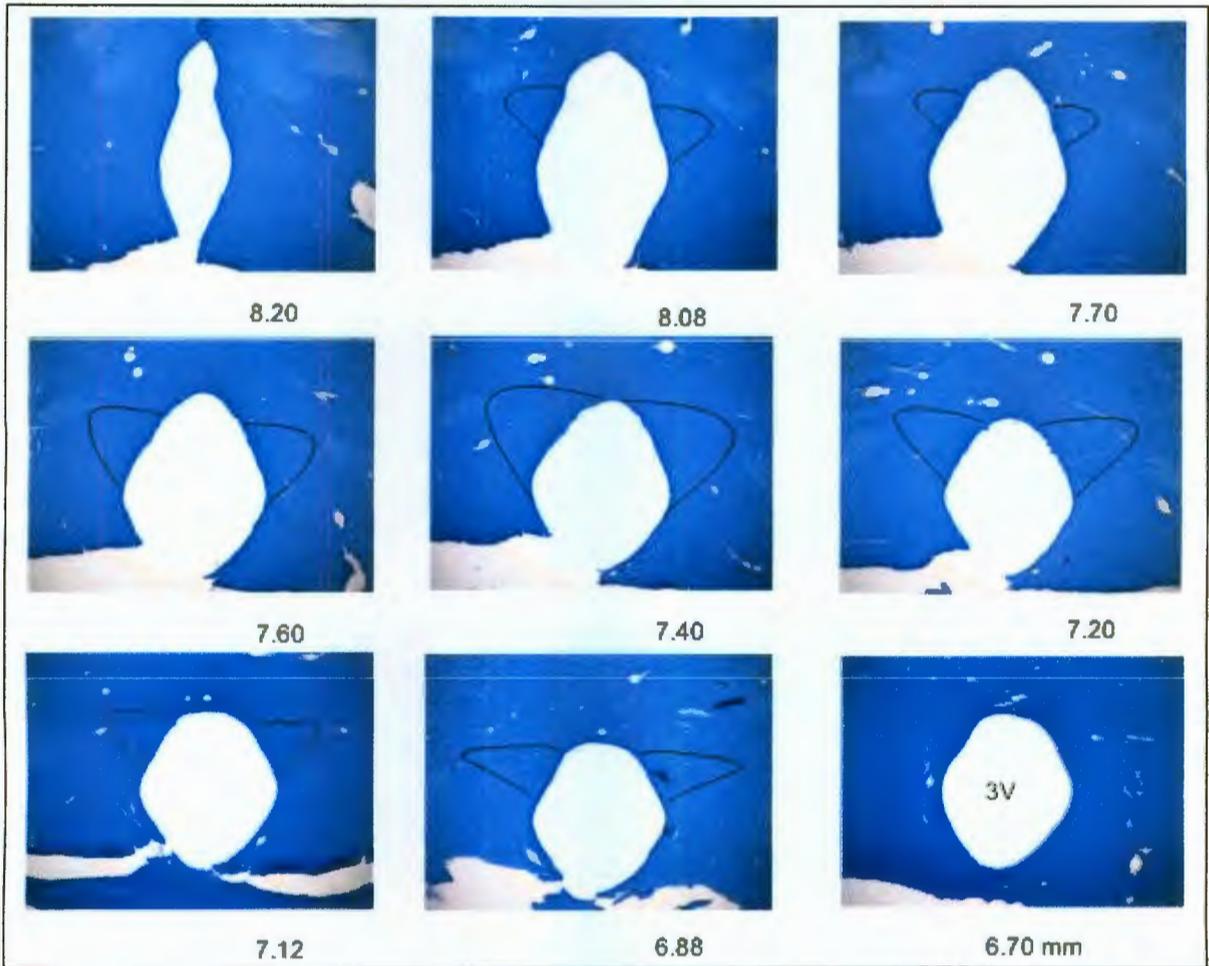


Figura 7. Se muestran las fotomicrografías de la distribución del NPV (líneas punteadas) desde su región más anterior 8.08 mm, hasta su porción más posterior 6.88 mm línea interaural. Cortes coronales de 40  $\mu$ m teñidos con violeta de Cresilo al 0.5%. Aumento a 25x.

### VI. 3 Análisis de las Neuronas Marcadas con FG, TB, FG/TB e Inmunorreactivas a OT en el NPV en Animales Inyectados en el Segmento Torácico (T5-T10)

Las neuronas marcadas en el NPV, muestran una distribución preferentemente ipsilateral al sitio de inyección, es decir del lado izquierdo; pocas neuronas fueron observadas contralateralmente, las cuales no fueron consideradas en este trabajo.

La Figura 8 muestra en dos columnas cortes coronales del NPV, a un aumento de 100x y a 200x de los mismos cortes, respectivamente.

En los animales inyectados a nivel torácico se encontraron: 1) neuronas marcadas con TB correspondientes a aquellas que proyectan hacia las CSAD (Figura 8B), 2) neuronas marcadas con FG que son correspondientes a las neuronas que proyectan hacia el IML (Figura 8A) y 3) neuronas doblemente marcadas con FG y TB, estas neuronas envían al mismo tiempo proyecciones colaterales hacia el IML y las CSAD (Figura 8B). También se encontró una población sustancial de neuronas inmunorreactivas a OT a lo largo del NPV (Figura 8C), solamente una neurona marcada con FG fue inmunorreactiva a OT (Figura 8D). En esta rata inyectada a este nivel, no se encontraron neuronas en el NPV con triple marcaje (FG, TB e inmunorreactivas a OT).

#### VI. 4 Análisis de las Neuronas Marcadas con FG, TB, FG/TB e Inmunorreactivas a OT en el NPV en Animales Inyectados en el Segmento Lumbar (L1)

En la Figura 9 se muestra en dos columnas cortes coronales del NPV, a un aumento de 100x y a 200x de los mismos cortes, respectivamente. Y se observan las neuronas en el NPV que fueron marcadas con FG, TB, FG/TB e inmunorreactivas para OT en los animales que fueron inyectados a nivel L1. Se encontró un grupo de neuronas marcadas con FG correspondientes a aquellas que proyectan hacia el IML (Figura 9A), otro grupo de neuronas marcadas con TB correspondientes a las neuronas que proyectan hacia las CSAD y neuronas doblemente marcadas, con FG y TB, estas son las neuronas que envían proyecciones colaterales hacia el IML y las CSAD (Figura 9B).

De la misma manera que en los animales inyectados a nivel torácico, en este grupo también se encontró una población sustancial de neuronas inmunorreactivas a OT a lo largo del NPV (Figura 9C) y, solamente una neurona marcada con FG fue inmunorreactiva a OT para este grupo de animales (Figura 9D). Ninguna neurona en el NPV fue observada con triple marcaje (FG, TB e inmunorreactiva a OT).

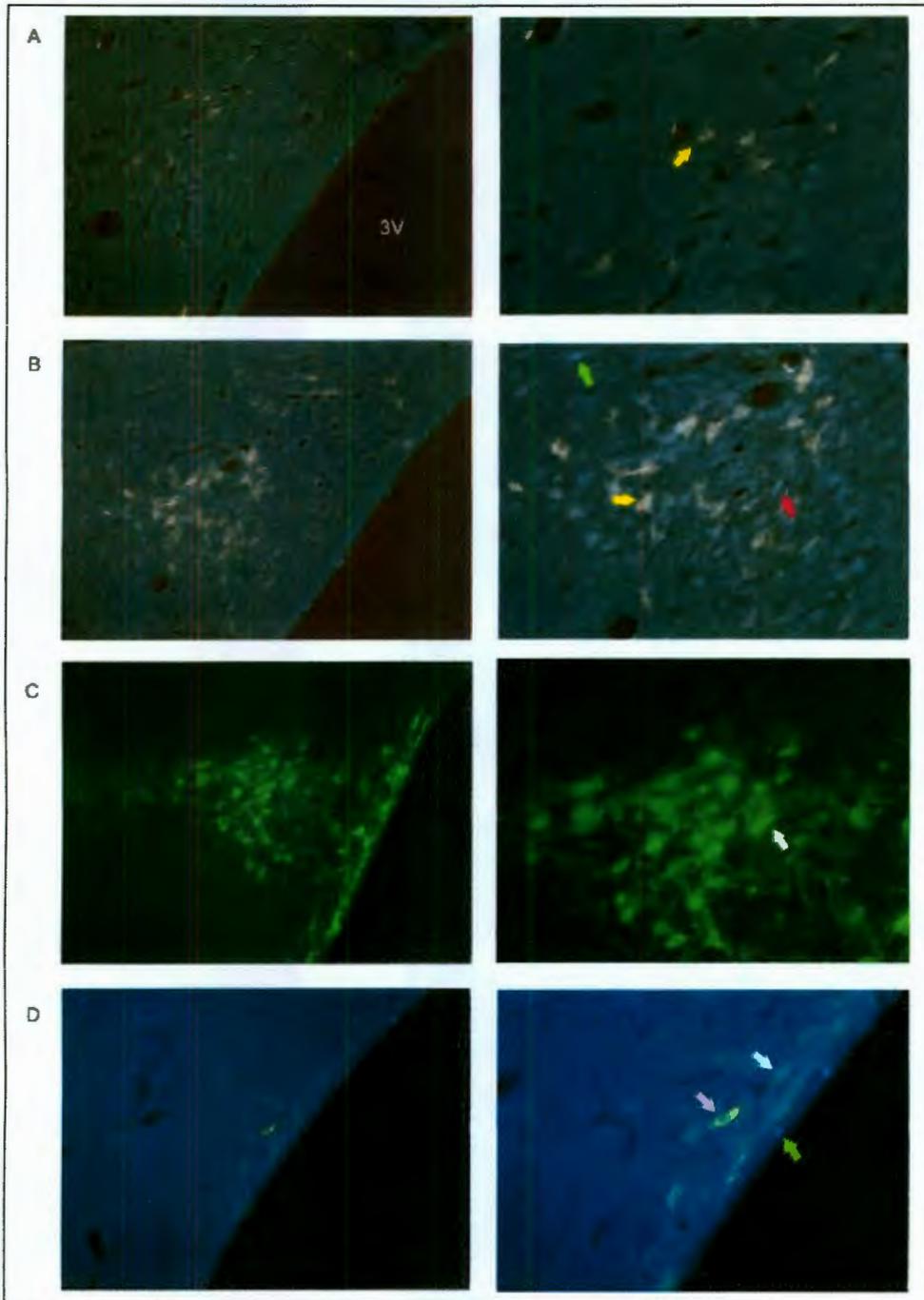


Figura 8. Neuronas observadas en el NPV mediante microscopía de fluorescencia, en un animal con sitios de inyección en el segmento T5-T10. Las imágenes de la fila A muestran ejemplos de neuronas marcadas únicamente con FG (flecha amarilla); en la fila B se observan neuronas marcadas con TB (flecha verde), con FG (flecha amarilla) y doblemente marcadas con FG/TB (flecha roja); en la fila C se muestran neuronas inmunorreactivas a OT, un ejemplo es señalado por la flecha blanca; en la fila D se señala una neurona marcada con TB (flecha verde), una neurona inmunorreactiva a OT (flecha blanca) y una neurona marcada con FG que además, es inmunorreactiva a OT (flecha rosa). Fotomicrografías a 100x lado izquierdo y a 200x lado derecho.

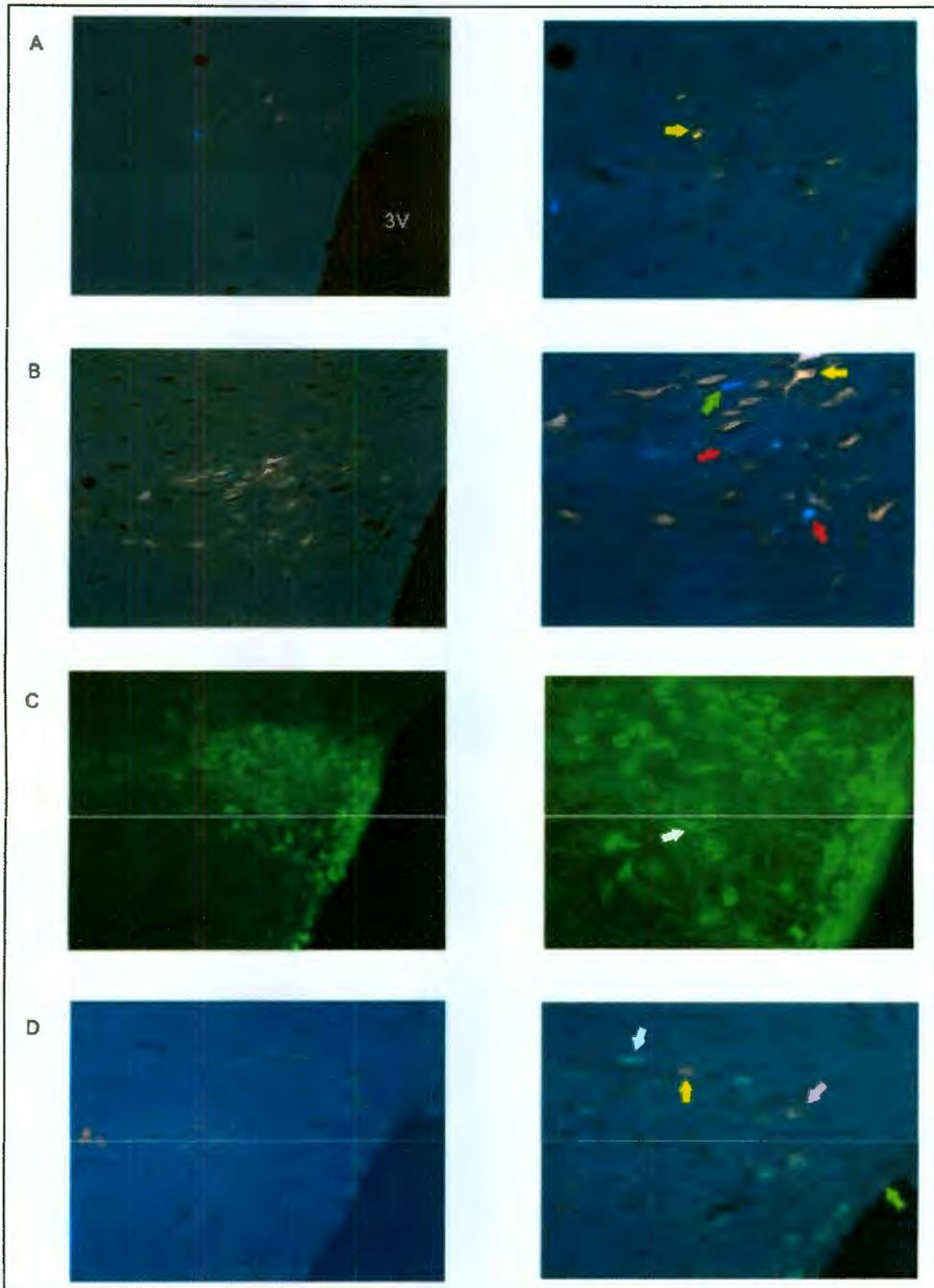


Figura 9. Neuronas observadas en el NPV mediante microscopía de fluorescencia, en un animal con sitios de inyección en el segmento L1. Las imágenes de la fila A muestran ejemplos de neuronas marcadas únicamente con FG en el NPV (flecha amarilla); en la fila B se observan neuronas marcadas con TB (flecha verde), con FG (flecha amarilla) y doblemente marcadas con FG/TB (flecha roja); la fila C muestra neuronas inmunorreactivas a OT, un ejemplo de una de ellas se señala por la flecha blanca; en la fila D se observa un ejemplo de una neurona marcada con TB (flecha verde), una neurona inmunorreactiva a OT (flecha blanca), una neurona marcada con FG (flecha amarilla) y una neuronas maracada con FG que además es inmunorreactiva a OT (flecha rosa).

## VI. 5 Cuantificación de Neuronas en el NPV

### VI. 5. 1 Neuronas de Proyección al Segmento T5-T10

Se realizó la cuantificación de las neuronas marcadas en el NPV en el animal inyectado en la región torácica, el FG en T5, mientras que el TB en T10, el Cuadro 1 muestra estos resultados.

Cuadro 1. Muestra el número de neuronas marcadas con FG/TB, FG y TB en el NPV en animales (n = 1) con sitios de inyección en el IML y las CSAD a nivel T5-T10.

FG/TB	FG	TB
12	156	8

La población de neuronas en el NPV marcada con FG es mayor que aquella marcada con TB, de 156 a 8 neuronas, respectivamente. El número de neuronas doblemente marcadas, FG/TB, fue menor que las marcadas únicamente con TB, siendo la diferencia entre ambas de únicamente 4 neuronas. Expresado en porcentajes, significa que un 88.64% del total de neuronas marcadas en el NPV corresponden a las neuronas que proyectan hacia el IML, mientras que sólo el 4.54% corresponde a las neuronas que envían sus proyecciones a las CSAD y el 6.82% corresponde a neuronas doblemente marcadas (FG/TB), es decir aquellas que envían colaterales tanto al IML como a las CSAD.

Nuestro análisis del número de neuronas en el NPV en el animal que fue inyectado a nivel T5-T10, muestra una distribución específica de neuronas marcadas con TB, FG ó FG/TB, con una máxima concentración de estas entre 7.20 y 6.88 mm línea interaural (Paxinos y Watson, 1998). Es decir, esta distribución se encuentra en la porción más posterior del NPV.

## VI. 5. 2 Neuronas de Proyección al Segmento L1

Se realizó un promedio de las neuronas marcadas únicamente con FG, TB y doblemente marcadas con FG/TB, en los animales que fueron inyectados a nivel de L1; estos resultados están descritos en el Cuadro 2. Nótese que la población de neuronas del NPV que proyectan al IML es más densa ( $143.0 \pm 48.9$ ) que la que proyecta hacia las CSAD ( $13.7 \pm 8.7$ ), también algunas proyecciones, en promedio  $11.2 \pm 7.7$ , fueron doblemente marcadas. Expresado en porcentajes, significa que un 85.17% del total de neuronas marcadas en el NPV corresponden a las neuronas marcadas con FG que son las que proyectan hacia el IML, mientras que sólo el 8.16% corresponde a las neuronas marcadas con TB, las cuales envían sus proyecciones a las CSAD y el 6.67% fueron las neuronas doblemente marcadas (FG/TB), es decir envían colaterales tanto al IML como a las CSAD.

Cuadro 2. Muestra el número de neuronas marcadas con FG/TB, FG y TB en el NPV en animales ( $n = 6$ ) con sitios de inyección en el IML y las CSAD a nivel L1.

FG/TB	FG	TB
$11.2 \pm 7.7$	$143.0 \pm 48.9$	$13.7 \pm 8.7$
media $\pm$ e. e.		

Nuestro análisis del número de neuronas en el NPV en animales que fueron inyectados a nivel L1, muestran una distribución específica de neuronas marcadas con TB, FG ó FG/TB, con una máxima concentración de estas entre 7.20 y 6.88 mm línea interaural (Paxinos y Watson, 1998). Es decir, esta distribución se encuentra en la porción más posterior del NPV.

## VII. DISCUSIÓN

Al observar los sitios de inyección en la médula espinal (ME) se corroboró con el atlas de coordenadas estereotáxicas (Paxinos y Watson, 1998) que los sitios de inyección se ubicaron en dos regiones distintas de la ME, la torácica, en donde el núcleo intermedio lateral (IML) fue ubicado en T5 y las capas superficiales del asta dorsal (CSAD) en T10, y la región lumbar donde el IML y las CSAD fueron ubicadas a nivel de L1.

Hosoya (1980) estudió las proyecciones del hipotálamo hacia la ME mediante inyecciones de peroxidasa de rábano en varios niveles, encontró que estas proyecciones varían significativamente en el número de neuronas marcadas y dependen del nivel en la ME donde se llevó a cabo la inyección. Una distribución rostro-caudal fue observada; esto es, el número de proyecciones del hipotálamo hacia la ME disminuyó conforme los sitios de inyección fueron ubicados más caudalmente en cada segmento (Hosoya, 1980).

Cuando se cuantificó el número de neuronas marcadas en el núcleo paraventricular hipotalámico (NPV), no se observó una diferencia significativa entre el número de neuronas que proyectan hacia la región torácica y las que proyectan hacia la región lumbar. No se encontró que la proyección del NPV hacia el IML y las CSAD disminuyera de manera significativa, pues si bien es cierto que las inyecciones se llevaron a cabo en dos regiones diferentes, estas son contiguas, y los niveles donde se ubicaron los sitios de inyección fueron muy cercanos (T5-T10 y L1).

Existe una distribución específica de las neuronas del NPV que envían colaterales al IML y a las CSAD, y que además se distribuyen de acuerdo a la anteroposterioridad en la ME; sin embargo, en este trabajo no se encontró diferencia entre la distribución de neuronas que proyectan hacia el IML, las CSAD o ambos a nivel de T5-T10 que a nivel de L1.

El IML y las CSAD en la región torácica (T5-T10) reciben proyecciones del NPV. Como en la región torácica, también las proyecciones del NPV hacia las CSAD aumentan de forma caudal, hacia la región lumbar (L1); sin embargo, son vías

independientes y bien regionalizadas y con mayor número de proyección de estas neuronas al IML y en un menor porcentaje hacia las CSAD a nivel de estos segmentos, cuando se compararon estos resultados con los antes obtenidos por nuestro grupo de trabajo, en el cual se observa que aproximadamente el 58.8% de la proyección del NPV es hacia las CSAD de las regiones lumbares entre L4 y L5 (Condés-Lara y col., 2007).

Estos resultados muestran evidencias de la proyección del NPV a estructuras relacionadas al sistema nervioso autónomo, como el IML y por otro lado, demuestra la gran regionalización que tiene esta proyección descendente del NPV a las CSAD, específicamente a los segmentos L4-L5 (Condés-Lara y col., 2007) y no al segmento T5-L1, como se muestra en este trabajo, que también aporta mayor solidez a los estudios electrofisiológicos y neuroanatómicos en nuestra línea de estudio sobre el dolor.

Neuronas sencillas y dobles marcadas han sido encontradas a todo lo largo del NPV cuando se inyecta entre L4 y L5 (Condés-Lara y col., 2007). En este trabajo, para ambas regiones (T5-T10 y L1) la mayor distribución de neuronas marcadas en el NPV con FG, TB y FG/TB se ubica aproximadamente entre 7.20 a 6.88 mm línea interaural.

La inmunofluorescencia para OT mostró una distribución localizada a lo largo del NPV, sin embargo, sólo fue encontrada una neurona, tanto en la región torácica como en la lumbar, que envía proyección al IML y que además es inmunorreactiva a OT.

El NPV contiene neuronas que envían colaterales hacia las regiones cervical y lumbar de la ME que además son inmunorreactivas a OT (Condés-Lara y col., 2007), sin embargo, no se observó ninguna neurona en el NPV que envíe colaterales hacia el IML y las CSAD, a nivel torácico y lumbar, que sea inmunorreactiva a OT.

Aunque muchas neuronas del NPV que proyectan a las CSAD a nivel de L4 y L5 son inmunorreactivas para OT (Condés-Lara y col., 2007), en este trabajo no se encontraron neuronas que proyecten hacia las CSAD a nivel de L1

inmunorreactivas para OT. También puede no haber neuronas inmunorreactivas para OT en el NPV que proyectan hacia las CSAD a nivel torácico, pues tampoco se encontró alguna neurona marcada con TB e inmunorreactiva para OT.

El papel de la OT en la médula espinal aún no es del todo conocido, por ejemplo, a nivel torácico incrementa el ritmo cardíaco (Yashpal y col., 1987; Braga y col., 2000) y/o la presión sanguínea (Sansone y col., 1997). También, OT altera la tasa de señales de las neuronas preganglionares simpáticas (Gilbey y col., 1982; Backman y Henry, 1984); en la región torácico-lumbar, OT es liberada después de estimulación cérvico-vaginal y esto induce la dilatación pupilar (Sansone y Komisaruk, 2001); También OT ha sido implicada en funciones reproductivas, en ratas macho en la erección del pene (Veronneau-Longueville y col., 1999; Argiolas y Melis, 2005) y, en ratas hembra en el parto (Benoussaidh y col., 2005); así como efectos analgésicos, inducidos por estimulación mecánica cérvico-vaginal (Komisaruk y Sansone, 2003). De igual manera se ha provisto evidencia de la activación de neuronas preganglionares simpáticas durante la lactancia (Marina y col., 2002).

Con respecto al papel de la OT en la transmisión de la información somatosensorial (Condés-Lara y col., 2003), mediante estudios electrofisiológicos de neuronas en las astas dorsales de la médula espinal se encontró que la OT puede tener efectos excitatorios e inhibitorios. Sin embargo, probado con la activación glutamatérgica, la OT mostró tener un efecto inhibitorio (Jo y col., 1998; Condés-Lara y col., 2003). Estos reportes sugieren una acción inhibitoria de la OT en respuestas somáticas y nociceptivas (Ramos y col., 2008). Por medio de estos mecanismos descendentes, el NPV puede tener influencia en la transmisión de información nociceptiva, mecánica y térmica a través del tracto espinotalámico (Saper, 1995).

En recientes artículos, ha sido demostrado que el nivel del péptido OT está relacionado con estados de analgesia y dolor en humanos (Yang, 1994) y ratas (Martínez-Lorenzana y col., 2008). Ha sido reportada una transitoria pero efectiva supresión del dolor en pacientes con cáncer después de una inyección cerebro-ventricular de 300 mg de OT (Madrazo y col., 1987). Estos hallazgos señalan la

importancia de la OT como un marcador para evaluar y resolver las condiciones de dolor (Martínez-Lorenzana y col., 2008).

Las inervaciones oxitocinérgicas de la zona marginal de las astas dorsales de la médula espinal sugieren que el NPV influye en la transmisión de información nociceptiva y térmica a través de la proyección de las células a los tractos espinotalámico y anterolateral, que surgen en parte de las células en la zona marginal (Narotzky y Kerr, 1978; Condés-Lara y col., 2007).

Sin embargo, una concentración de OT central tiene una función diferente comparada con la OT circulante. La OT circulante tiene funciones endócrinas sobre la eyección de leche en la lactancia o la contracción uterina durante el parto, mientras que la concentración de OT central comprende una amplia gama de acciones en función de la estructura implicada (Martínez-Lorenzana y col., 2008).

El hipotálamo, como un centro de regulación neuroendocrina, está recíprocamente interconectado con otros mecanismos reguladores centrales como el sistema autónomo. Los impulsos somatosensoriales tienen fuerte influencia en su actividad endócrina y viceversa. El hipotálamo regula las actividades autónomas por una vía neurohumoral a través de la glándula pituitaria y por la actividad de neuronas autónomas preganglionares (Palkovits, 1999).

El NPV sirve como un integrador de funciones endocrinas, autónomas y de comportamiento mediante interconexiones neuronales bidireccionales con la mayoría de las áreas cerebrales autónomas y límbicas (Swanson, 1987).

También es considerado una fuente de integración central entre los sistemas nervioso autónomo central y periférico. Está caracterizado por una arquitectura muy compleja y se involucra en numerosas funciones, desde el estrés al control de la alimentación, el balance de la energía corporal, la presión sanguínea, el ritmo cardíaco y la actividad sexual (Swanson y Sawchenko, 1983).

Además el NPV ha sido descrito como parte del sistema inhibitorio del dolor en el sistema nervioso central (SNC) (Shiraishi y col., 1995; Condés-Lara y col., 2006; Miranda-Cardenas y col., 2006; Condés-Lara y col., 2007; Rojas-Piloni y col., 2007). La estimulación del NPV produce un efecto analgésico cuando no está mediado por

opioides o vasopresina (VP) (Yirmiya y col., 1990; Shiraishi y col. 1995; Condés-Lara y col., 2006; Miranda-Cardenas y col., 2006; Condés-Lara y col., 2007). Varios estudios indican que el NPV y el núcleo supraquiasmático son fuentes primarias de OT en el SNC y que el NPV tiene una importante proyección directa hacia la médula espinal, la cual ha sido demostrada por medio de trazadores neuronales retrógrados y anterógrados (Saper y col., 1976; Swanson, 1977; Swanson y McKellar, 1979; Sawchenko y Swanson, 1982; Condés-Lara y col., 2007). También, la distribución de los sitios de unión de OT en las astas dorsales de la médula espinal en rata coincide con las inervaciones de OT, lo cual sugiere un papel modulador para este péptido en funciones sensoriales y autónomas (Reiter y col., 1994). Recientemente se ha presentado evidencia de que OT forma parte de un mecanismo de control endógeno, descendente e inhibitorio que tiene una acción anti-nociceptiva contra el dolor neuropático (Condés-Lara y col., 2005; Miranda-Cardenas y col., 2006).

Continuar con la tarea de descubrir y entender los mecanismos por los cuales nuestro cuerpo interpreta los estímulos dolorosos nos permitirá encontrar nuevas alternativas para el tratamiento del dolor, ya sea el neuropático o aquel proveniente de una enfermedad, crónica o aguda, e incluso implementar acciones preventivas y terapéuticas.

## VIII. CONCLUSIONES

- El NPV es considerado un integrador central entre los sistemas nervioso autónomo central y periférico.
- Posee neuronas que envían proyecciones descendentes independientes hacia el IML y las CSAD en la región torácica y lumbar de la ME; y un mínimo número de colaterales hacia ambas estructuras.
- El NPV efectivamente tiene una estrecha relación con OT, sin embargo no está distribuida en las neuronas que reciben proyecciones del NPV, en la región torácica a nivel de T5-T10 y en la lumbar a nivel de L1.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Argiolas, A., Melis, M. R. 2005.** Central control of penile erection: role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Prog. Neurobiology*: Vol. 76: 1-21.
- Arletti, R., Benelli, A., Bertolini, A. 1993.** Influence of oxytocin on nociception and morphine antinociception. *Neuropeptides*: Vol. 24: 125-129.
- Armstrong, W. E., Warach, S., Hatton, G. I., McNeill, T. H. 1980.** Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: A cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. *Neuroscience*: Vol. 5: 1931-1958.
- Backman, S. B., Henry, J. L. 1984.** Effects of oxytocin and vasopressin on the thoracic sympathetic preganglionic neurons in the cat. *Brain Research*: Vol. 13: 679-684.
- Bard, P. 1928.** A diencephalic mechanism for the expression of rage with special reference to the sympathetic nervous system. *American Journal of Physiology*: Vol. 84: 490-515.
- Basbaum, A. I., Jessell, T. M. 2000.** *Principios de Neurociencia*. 4a. ed. McGraw-Hill, Madrid: 472-490.
- Benoussaidh, A., Maurin, Y., Rampin, O. 2005.** Possible neural mediation of the central effects of oxytocin on uterine motility. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*: Vol. 289: 798-804.
- Braga, D. C., Mori, E., Higa, K. T., Morris, M., Michelini, L. C. 2000.** Central oxytocin modulates exercise-induced tachycardia. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*: Vol. 278: 1474-1482.
- Burstein, R., Cliffer, K. D., Giesler, G. J. J. 1987.** Direct somatosensory projections from the spinal cord to the hypothalamus and telencephalon. *Journal of Neuroscience*: Vol. 7: 4159-4164.
- Burstein, R., Cliffer, K. D., Giesler, G. J. J. 1990.** Cells of the origin of the spinohypothalamic tract in the rat. *Journal Comparative Neurology*: Vol. 291: 329-344.

**Cechetto, D. F., Saper, C. B. 1988.** Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *Journal Comparative Neurology*: Vol. 272: 579-604.

**Cliffer, K. D., Burstein, R., Giesler, G. J. J. 1991.** Distributions of spinothalamic, spinohypothalamic, and spinotelencephalic fibers revealed by anterograde transport of PHA-L in rats. *Journal of Neuroscience*: Vol. 11: 852-868.

**Condés-Lara, M., Marina, G. N., Martínez, L. G., Luis, D. O., Freund-Mercier, M. J. 2003.** Actions of oxytocin and interactions with glutamate on spontaneous and evoked dorsal spinal cord neuronal activities. *Brain Research*: Vol. 976: 75-81.

**Condés-Lara, M., Maie, I., Dickenson, A. H. 2005.** Oxytocin actions of afferent spinal cord activities in neuropathic but no in normal rats. *Brain Research*: Vol. 1045: 124-133.

**Condés-Lara, M., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., López-Hidalgo, M., Freund-Mercier, M. J. 2006.** Paraventricular hypothalamic influences on spinal nociceptive processing. *Brain Research*: Vol. 1081: 126-137.

**Condés-Lara, M., Martínez-Lorenzana, G., Rojas-Piloni, G., Rodríguez-Jiménez, J. 2007.** Branched oxytocinergic innervations from the paraventricular hypothalamic nuclei to superficial layers in the spinal cord. *Brain Research*: Vol. 1160: 20-29.

**Gilbey, M. P., Coote, J. H., Fleetwood-Walker, S., Peterson, D. F. 1982.** The influence of the paraventriculo-spinal pathway, and oxytocin and vasopressin on sympathetic preganglionic neurons. *Brain Research*: Vol. 251: 283-290.

**Guyton, A. C., Hall, J. E. 1997.** *Tratado de Fisiología Médica*. 9a. Ed. McGraw-Hill/Interamericana, México: 661-674, 818.

**Hosoya, Y., Matsushita, M. 1979.** Identification and distribution of the spinal cord and hypophysial projection neurons in the paraventricular nucleus of the rat: A Light and electron microscopic study with the horseradish peroxidase method. *Experimental Brain Research*: Vol. 35: 315-332.

**Hosoya, Y. 1980.** The distribution of spinal projection neurons in the hypothalamus of the rat, studied with the HRP method. *Experimental Brain Research*: Vol. 40: 79-87.

**Hosoya, Y., Sugiura, Y., Okado, N., Loewy, A. D, Kohno, K. 1991.** Descending input from the hypothalamic paraventricular nucleus to the sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Brain Research*: Vol. 85: 10-20.

**Iversen, S., Iversen, L., Saper, C. B. 2000.** *Principios de Neurociencia*. 4a. ed. McGraw-Hill, Madrid: 960-980.

**Jo, Y. H., Stoeckel, M. E., Freund-Mercier, M. J., Schlichter, R. 1998.** Oxytocin modulates glutamatergic synaptic transmission between cultured neonatal spinal cord dorsal horn neurons. *Journal of Neuroscience*: Vol. 18: 2377-2386.

**Kabat, H., Magoum, H. W., Ranson, S. W. 1935.** Electrical stimulation of points in the forebrain and midbrain. The resultant alteration in blood pressure. *Archive Neurology Psychiatric*: Vol. 34: 931-940.

**Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M. 2000.** *Principios de Neurociencia*. 4ta. Ed. McGraw-Hill, España: 976-978.

**Koh, E. T., Ricardo, J. A. 1980.** Paraventricular nucleus of the hypothalamus: Anatomical evidence of ten functionally discrete subdivisions. *Neuroscience*: Vol. 6: 521.

**Komisaruk, B. R., Sansone, G. 2003.** Neural pathways mediating vaginal function: the vagus nerves and spinal cord oxytocin. *Scandinavian Journal of Psychology*: Vol. 44: 241-250.

**Lechan, M. R., Jackson, I. M. D. 1982.** Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*: Vol. 111: 55-65.

**Lechan, M. R., Nestler, J. L., Jacobson, S. 1982.** The tuberoinfundibular system of the rat as demonstrated by immunohistochemical localization of retrogradely transported wheat germ agglutinin (WGA) from the median eminence. *Brain Research*: Vol. 245: 1-15.

**Lima, D., Coimbra, A. 1991.** Neurons in the substantia gelatinosa rolandi (lamina II.) project to the caudal ventrolateral reticular formation of the medulla oblongata in the rat. *Neuroscience Letter*: Vol.132: 16-18.

**Lundeberg, T., Meister, B., Bjorkstrand, E., Uvnas, M. K. 1993.** Oxytocin modulates the effects of galanin in carrageenan-induced hyperalgesia in rats. *Brain Research*: Vol. 608: 181-185.

**Lundeberg, T., Uvnas, M. K, Agren, G., Bruzelius, G. 1994.** Anti-nociceptive effects of oxytocin in rats and mice. *Neuroscience Letter*: Vol. 170: 153-157.

**Madrazo, I., Franco-Bourland, R. E., León-Meza, V. M., Mena, I. 1987.** Intraventricular somatostatin 14, arginine vasopressin and oxytocin: analgesic effect in a patient with intractable cancer pain. *Applications of Neurophysiology*: Vol. 50: 427-431.

**Magoum, H. W. 1940.** Descending connections from the hypothalamus. *Research Publications Association for Research in Nervous and Mental Disease*: Vol. 20: 270-285.

**Marina, N., Morales, T., Díaz, N., Mena, F. 2002.** Suckling-induced activation of neural c-fos expression at lower thoracic rat spinal cord segments. *Brain Research*: Vol. 954: 100-114.

**Martínez-Lorenzana, G., Espinoza-López, L., Carranza, M., Aramburo, C., Paz-Tres, C., Rojas-Piloni, G., Condés-Lara, M. J. 2008.** PVN electrical stimulation prolongs withdrawal latencies and releases oxytocin in cerebrospinal fluid, plasma, and spinal cord tissue in intact and neuropathic rats. *Pain*: Vol. 140: 265-273.

**Menétrey, D. Roudier, F., Besson, J. M. 1983.** Spinal neurons reaching the lateral reticular nucleus as studied in the rat by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience Letter*: Vol. 220: 439-452.

**Menétrey, D., Basbaum, A. I. 1987.** Spinal and trigeminal projections to the nucleus of the solitary tract: A possible substrate for somatovisceral and viscerovisceral reflex activation. *Journal Comparative Neurology*: Vol. 255: 439-450.

**Miranda-Cardenas, Y., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., López-Hidalgo, M., Freund-Mercier, M., Condés-Lara, M. 2006.** Oxytocin and electrical stimulation of the paraventricular hypothalamic nucleus produce antinociceptive affects that are reversed by an oxytocin antagonist. *Pain*: Vol. 122: 182-189.

**Narotzky, R. A., Kerr, F. W. R. 1978.** Marginal neurons of the spinal cord: Types, afferent synaptology, and functional considerations. *Brain Research*: Vol. 139: 1-20.

**Palkovits, M. 1999.** Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris memorial lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998. *Frontiers in Neuroendocrinology*: Vol. 20: 270-295.

**Paxinos, G., Watson, C. 1998.** *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4a. ed. Academic Press, London.

**Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A. S., McNamara, J. O., Williams, S. M. 2004.** *Neuroscience*. 3a. Ed. Sinauer Associates, Inc., U. S. A.: 209-228.

**Ramos, E., Castilla, A., Navarro, N., Monasterio, N., Mena, F., Morales, T. 2008.** Suckling-induced oxytocin increase in the spinal cord in the rat. *Brain Research*: Vol. 1236: 85-92.

**Reiter, M.K., Kremarik, P., Freund M.M., Stoeckel, M.E., Desaulles, E., Feltz, P. 1994.** Localization of oxytocin binding sites in the thoracic and upper lumbar spinal cord of the adult and postnatal rat: a histoautoradiographic study. *European Journal of Neuroscience*: Vol. 6: 98-104.

**Rojas-Piloni, G., López-Hidalgo, M., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J. Condés-Lara, M. 2007.** GABA-mediated oxytocinergic inhibition in dorsal horn neurons by hypothalamic paraventricular nucleus stimulation. *Brain Research*: Vol. 1137: 69-77.

**Sansone, G. R., Bianca, R., Cueva-Rolon, R., Gomez, L. E., Komisaruk, B. R. 1997.** Cardiovascular responses to vaginocervical stimulation in the spinal cord-transected rat. *American Journal of Physiology*: Vol. 273: 1361-1366.

**Sansone, G. R., Komisaruk, B. R. 2001.** Evidence that oxytocin is an endogenous stimulator of autonomic sympathetic preganglionics: the papillary dilatation response to vaginocervical stimulation in the rat. *Brain Research*: Vol. 898: 265-271.

**Saper, C. 1995.** Central autonomic system. In: Paxinos, G. (Ed.), *The rat nervous system*. Academic Press, New York, pp. 107-135.

**Saper, C. B., Loewy, A. L., Swanson, L. W., Cowan, W. M. 1976.** Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Research*: Vol. 177: 305-312.

**Sawchenko, P.E., Swanson, L.W. 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. *Journal Comparative Neurology*: Vol. 205: 260-272.

**Sawchenko, P. E., Swanson, L. W. Vale, W. W. 1984.** Co-expression of CRF- and vasopressin-immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons of adrenalectomized rat. *Proceeding National Academic Science USA*: Vol. 81: 1883-1887.

**Shiraishi, T., Onoe, M., Kojima, T., Sameshima, Y., Kageyama, T. 1995.** Effects of hypothalamic paraventricular nucleus: electrical stimulation produce marked analgesia in rats. *Neurobiology*: Vol. 3: 393-403.

**Silverman, A. J., Zimmerman, E. A. 1982.** Adrenalectomy increases sprouting in a peptidergic neurosecretory system. *Neuroscience*: Vol. 7: 2705-2714.

**Silverman, A. J., Zimmerman, E. A. 1983.** Magnocellular neurosecretory system. *Annual Review Neuroscience*: Vol. 6: 357-380.

**Sofroniew, M. V., Schrell, U. 1982.** Evidence for a direct projection from oxytocin and vasopressin neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus to the medulla oblongata: Immunohistochemical visualization of both the horseradish peroxidase transported and the peptide produced by the same neurons. *Neuroscience Letter*: Vol. 22: 211-217.

**Swanson, L. W. 1977.** Immunohistochemical evidence for a neurophysin-containing autonomic pathway arising in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Research*: Vol. 128: 346-353.

**Swanson, L.W., McKellar, S. 1979.** The distribution of oxytocin and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. *Journal Comparative Neurology*: Vol. 188: 87-106.

**Swanson, L. W., Kuypers, H. G., 1980.** The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitectonic subdivisions and the organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescent double-labeling method. *Journal Comparative Neurology*: Vol. 194: 555-570.

- Swanson, L. W., Sawchenko, P. E. 1983.** Hypothalamic integration: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annual Review Neuroscience*: Vol. 6: 269-324.
- Swanson, L. W. 1987.** The hypothalamus, *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Part 1, Integrated Systems of the CNS. Vol. 5. Elsevier, Amsterdam: 1-124.
- Tavares, I., Lima, D., Coimbra, A. 1993.** Neurons in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord projecting to the medullary ventrolateral reticular formation express c-fos after noxious stimulation of the skin. *Brain Research*: Vol. 623: 278-286.
- Van den Pol, A. N. 1982.** The magnocellular and parvocellular paraventricular nucleus of the rat: Intrinsic organization. *Journal Comparative Neurology*: Vol. 206: 317-345.
- Vandesande, F., Dierickx, K., DeMey, J. 1977.** The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic fibers to the external region of the median eminence of the rat hypophysis. *Cell Tissue Research*: Vol. 180: 443-452.
- Veronneau-Longueville, F., Rampin, O., Freund-Mercier, M. J., Tang, Y., Calas, A., Marson, L., McKenna, K. E., Stoeckel, M. E., Benoit, G., Giuliano, F. 1999.** Oxytocinergic innervations of autonomic nuclei controlling penile erection in the rat. *Neuroscience*: Vol. 93: 1437-1447.
- Wiegand, S. J., Price, J. L. 1980.** Cells of origin of the afferent fibers to the median eminence in the rat. *Journal Comparative Neurology*: Vol. 192: 1-19.
- Yang, J. 1994.** Intrathecal administration of oxytocin induces analgesia in low back pain involving the endogenous opiate peptide system. *Spine*: Vol. 19: 867-871.
- Yashpal, K., Gauthier, S., Henry, J. L. 1987.** Oxytocin administered intrathecally preferentially increases heart rate rather than arterial pressure in the rat. *Journal Autonomic Nervous System*: Vol. 20: 167-178.
- Yirmiya, R., Ben, E. S., Shavit, Y., Marek, P., Liebeskind, J.C. 1990.** Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus produces analgesia not mediated by vasopressin or endogenous opioids. *Brain Research*: Vol. 537: 169-174.