



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL NÚCLEO  
PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO Y SU ACCIÓN  
SOBRE LA MÉDULA ESPINAL, ÁREA GRIS  
PERIACUEDUCTAL, NÚCLEO RAFÉ MAGNO Y LOCUS  
COERULEUS POR MEDIO DEL C-FOS”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**AMADA ELOÍSA RUBIO BELTRÁN**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. MIGUEL CONDÉS LARA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013.**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL NÚCLEO  
PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO Y SU ACCIÓN  
SOBRE LA MÉDULA ESPINAL, ÁREA GRIS  
PERIACUEDUCTAL, NÚCLEO RAFÉ MAGNO Y LOCUS  
COERULEUS POR MEDIO DEL C-FOS”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**AMADA ELOÍSA RUBIO BELTRÁN**

DIRIGIDA POR

**Dr. MIGUEL CONDÉS LARA**

**SINODALES**

Dr. Miguel Condés Lara  
DIRECTOR

---

Dra. Ma. Guadalupe Martínez Lorenzana  
SINODAL

---

Dra. María Guadalupe García Alcocer  
SINODAL

---

Dr. César Ibarra Alvarado  
SINODAL

---

Este trabajo se realizó en el Laboratorio B – 16 del Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México – Campus Juriquilla, Qro., bajo la dirección del Dr. Miguel Condés Lara, con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por medio del estímulo a Ayudante de Investigador SNI III Exp. 410 8759 (MCL).

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis está dedicada a todos aquellos que estuvieron a mi lado a lo largo de toda mi licenciatura.

Agradezco a los integrantes del Laboratorio B-16, Javier, Yunuén, el Dr. Rojas, Abimael y Betty, mis compañeros de risas, seminarios, reuniones, cafés e infinidad de momentos. A la Dra. Lupita por contestar toda y cada una de mis mil preguntas con total paciencia. Y en especial al Dr. Miguel Condés Lara, por sus enseñanzas, no sólo académicas, sino también de vida; además por darme la oportunidad de conocer a un gran ser humano.

A mis profesores en la licenciatura, porque soy el resultado de sus enseñanzas. A los que siempre confiaron en mi capacidad, mil gracias por ver el potencial en mí. A Arlette, por repetirme mil quinientas veces el procedimiento para titularme con total paciencia.

A mis amigos que siempre me apoyaron y creyeron en mí: Pepos, Clara, Are, Sam, Sari, Rojas, Julio, Lucero, Mery, Rulos, Cutza, Charlie, Tania y muchos más. Muchas gracias por estar ahí, por haber sido mis compañeros de desvelos, corajes, por echarme porras y uno que otro regaño cuando era necesario.

Y en especial, gracias a mi familia. Mis padres, por haberme enseñado cada uno a su manera, a superarme, salir adelante y luchar por mis sueños, los amo con todo mi corazón, les dedico esto en agradecimiento de todo lo que me han dado. Mi tía Lulú, que siempre ha estado pendiente de mi bienestar, te adoro y te admiro profundamente. Mis tíos Hugo y Martha, no hay palabras suficientes para agradecerles todo lo que han hecho por mí. A Charlie, por toda la ayuda que me ha dado, a mis abuelos y el resto de mi familia, por haber estado a mi lado, apoyándome a lo largo de los años.

De corazón, gracias a todos.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Dolor	1
1.2 Nocicepción y médula espinal	3
1.3 Vías ascendentes de la información nociceptiva	5
1.3.1 Tracto espinotalámico	5
1.3.2 Tracto espinoreticular	6
1.3.3 Tracto espinomesencefálico	6
1.3.4 Tracto cervicotalámico	6
1.3.5 Tracto espinohipotalámico	6
1.4 Modulación del dolor	8
1.4.1 Núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV)	8
1.4.2 Área gris periacueductal (PAG)	10
1.4.3 Locus coeruleus (LC)	12
1.4.4 Núcleo rafé magno (RMg)	12
1.5 C-fos como marcador neuronal de dolor	13
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 General	16
3.2 Específicos	16
4. METODOLOGÍA	17
4.1 Material	17
4.1.1 Animales de experimentación	17
4.1.2 Cirugía	17

4.2 Métodos	17
4.2.1 Estimulación del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV)	17
4.2.2 Perfusión	17
4.2.3 Cortes histológicos del tejido	16
4.2.4 Técnica de deshidratación del tejido	16
4.2.5 Técnica de tinción del tejido	
4.2.6 Técnica inmunohistoquímica para c-fos	16
4.2.7 Análisis Histológico	17
4.2.8 Cuantificación de neuronas positivas a c-fos	17
4.2.9 Análisis estadístico	17
5. RESULTADOS	18
5.1 Verificación de los sitios de estimulación	18
5.2 Análisis de las neuronas inmunorreactivas a c-fos	19
5.2.1 Sección lumbar de la médula espinal (ME)	19
5.2.2 Área gris periacueductal (PAG)	21
5.2.3 Locus coeruleus (LC)	23
5.2.4 Núcleo magno del rafé (RMg)	24
6. DISCUSIÓN	27
7. CONCLUSIONES	30
8. REFERENCIAS	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Subdivisión del asta dorsal de la médula espinal	4
2	Esquema de tres de las principales vías ascendentes que transmiten información nociceptiva de la médula espinal a centros superiores	7
3	Sistema descendente hipotálamo – espinal	9
4	Proyecciones del PAG	11
5	Sitio de estimulación	20
6	Cuantificación de células positivas a c-fos en médula espinal	22
7	Análisis del conteo de células positivas a c-fos en los distintos segmentos lumbares, del asta dorsal de la ME	23
8	Cuantificación de células positivas a c-fos en el PAG	24
9	Análisis del conteo de células positivas a c-fos en el PAG	25
10	Cuantificación de células positivas a c-fos en el LC	26
11	Análisis del conteo de células positivas a c-fos en el LC	27
12	Cuantificación del células positivas a c-fos en RMg	28
13	Análisis del conteo de células positivas a c-fos en el RMg	29

## **RESUMEN**

El hipotálamo es una estructura del sistema nervioso central que está encargada de diferentes funciones, entre las que se encuentran el dolor y la analgesia. Diferentes estudios señalan que la estimulación del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) está relacionada con un mecanismo oxitocinérgico que produce analgesia en modelos de inflamación y dolor agudo. Así mismo, existen proyecciones neuronales entre el hipotálamo y diversas estructuras relacionadas con la modulación del dolor, entre las que se encuentran el área gris periacueductal (PAG), el locus coeruleus (LC), el núcleo rafé magno (RMg) y el asta dorsal del segmento lumbar de la médula espinal (ME). Con base en esto, se planteó el presente trabajo de investigación cuyo objetivo es estudiar las proyecciones del NPV a las estructuras que están implicadas en la analgesia. Para cumplir con este objetivo se utilizó el marcador c-fos que permite señalar los sitios activados después de la estimulación eléctrica del NPV. Se utilizaron ratas macho, las cuales se dividieron en tres grupos: 1) control, 2) un falso operado, 3) estimulado en la zona del NPV. Se realizaron cortes coronales de 40  $\mu\text{m}$  de espesor del cerebro a nivel PAG, LC y RMg, así como en ME a nivel lumbar, se llevó a cabo la técnica de inmunohistoquímica para c-fos y se cuantificaron las células inmunopositivas. Se encontró una activación ipsilateral en el asta dorsal de la ME y en el RMg; así mismo, en el LC como en el PAG se encontró una activación bilateral.

## **I. ANTECEDENTES**

### **1.1 Dolor**

El dolor es un mecanismo protector del cuerpo, una percepción que forma parte de una desagradable experiencia emocional y sensorial asociada a un posible daño tisular. Algunos tejidos tienen receptores sensoriales especializados, llamados nociceptores, que son activados cuando un tejido sufre un daño. Sin embargo, la nocicepción, no lleva necesariamente a experimentar dolor, ya que la percepción del dolor es un producto de la abstracción cerebral a partir de un estímulo sensorial (Basbaum y Jessel, 2000).

La naturaleza individual y subjetiva del dolor, es uno de los factores que dificultan su definición y tratamiento clínico. El dolor puede ser agudo o crónico. El primero es un mecanismo normal; mientras que el segundo es una condición debilitante, que la mayoría de las veces presenta resistencia a la farmacoterapia, por lo que también es un problema socio-económico (Paul y col., 2012). El dolor crónico, parece no tener ningún propósito útil y las condiciones patofisiológicas en la mayoría de los casos se encuentran asociadas con alteraciones de la vía fisiológica normal (Fürst, 1999). Este dolor puede ser dividido en dos amplios grupos, nociceptivo y neuropático. El dolor nociceptivo es producido por la activación directa de nociceptores en la piel o en tejido blando en respuesta a daño tisular y usualmente está acompañado de inflamación. El dolor neuropático resulta de un daño directo a nervios en el sistema nervioso central o periférico (Grelík y col., 2005).

El daño ocasionado a la piel o a tejidos subcutáneos, tales como articulaciones o músculos, activa diversas clases de terminales nociceptoras, las cuales son terminales periféricas de neuronas primarias sensoriales, cuyos cuerpos celulares se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal y del trigémino (Hains, 2007). Podemos considerar tres clases de nociceptores: térmicos, mecánicos y polimodales. Los nociceptores térmicos son activados por temperaturas mayores a 45°C y menores a 5°C. Estos nociceptores tienen fibras A $\delta$  de pequeño diámetro, mielínicas y conducen las señales nerviosas aproximadamente a 20 m/s. Los nociceptores mecánicos son activados por presión intensa aplicada a la piel y

también tienen fibras A $\delta$  también. Los receptores polimodales son activados por estímulos mecánicos, químicos o térmicos de alta intensidad. Estos nociceptores tienen fibras C de pequeño diámetro, no mielínicas, que conducen lentamente, generalmente a velocidades de menos de 1 m/s. Estos nociceptores se encuentran ampliamente distribuidos en la piel y en tejidos profundos y a menudo actúan juntos (Purves, 2004).

Las vísceras contienen nociceptores silentes. Normalmente, estos receptores no son activados por estimulación nociva, aunque su umbral de activación disminuye dramáticamente por inflamación y diversos daños químicos. Así, la activación de estos nociceptores puede contribuir al desarrollo de hiperalgesia secundaria y sensibilización central (Basbaum y Jessel, 2000).

Contrario a los receptores somatosensoriales especializados para tacto y presión, la mayoría de los nociceptores son terminaciones nerviosas libres. El mecanismo por el cual estímulos dañinos despolarizan terminaciones nerviosas libres y generan potenciales de acción, es por la presencia de estímulos de alta intensidad, así como por la liberación de sustancias químicas, que están ligadas a los procesos de lesión tisular. Una gran cantidad de factores determinan la localización, intensidad y calidad del dolor, además del nivel de actividad de las fibras A $\delta$  y C (Purves, 2004). Mientras que la percepción del tacto o la presión es consistente cuando los receptores de tacto-presión son estimulados eléctricamente, la activación del mismo nociceptor puede llevar a diferentes sensaciones. En ausencia de conducción por fibras A $\alpha$  y A $\beta$ , la percepción del dolor es anormal, por lo que no nos es posible distinguir entre diversos estímulos, percibiendo solamente la sensación de dolor quemante (Basbaum y Jessel, 2000).

Aunque la percepción del dolor normalmente varía entre individuos y en diferentes contextos, en situaciones patológicas, la activación de nociceptores puede llevar a dos tipos de estados anormales de percepción del dolor: alodinia e hiperalgesia. En la alodinia, el dolor es resultado de un estímulo que normalmente suele ser inocuo. Los pacientes no sufren un dolor constante; en ausencia de estímulo, no hay dolor. Por otra parte, la hiperalgesia es una respuesta excesiva a un estímulo

nocivo y a menudo los pacientes que la sufren pueden percibir el dolor de manera espontánea (Basbaum y Jessel, 2000).

## 1.2 Nocicepción y médula espinal

Las fibras aferentes nociceptivas terminan predominantemente en el asta dorsal de la médula espinal. Dicha asta, puede subdividirse en seis láminas o capas distintas, basándose en las características citológicas de las neuronas presentes. Las neuronas nociceptivas, están localizadas en la parte superficial del asta dorsal, en la lámina marginal, también conocida como lámina I, en la sustancia gelatinosa o lámina II y en la lámina V. La mayoría de éstas neuronas reciben señales sinápticas directas de fibras C A $\delta$  y C. En el caso específico de la lámina V, podemos encontrar neuronas de amplio rango dinámico (WDR), las cuales parecen jugar un papel en la integración de la información periférica al recibir información de diversos tipos de fibras nerviosas, como se observa en la Figura 1 (Price y col., 1994).

Gran parte de las neuronas en la lámina I responden exclusivamente a estímulos nocivos, por lo tanto son llamadas neuronas específicas nociceptivas y se proyectan a centros cerebrales superiores. Algunas neuronas de esta lámina, llamadas neuronas de amplio rango dinámico, responden gradualmente a estímulos mecánicos nocivos y no nocivos. La sustancia gelatinosa está conformada casi exclusivamente por interneuronas, tanto inhibitoras como excitadoras, algunas de las cuales responden solamente a señales nociceptivas, mientras que otras responden también a estímulos no nocivos (Basbaum y Jessel, 2000; Purves, 2004).

Las láminas III y IV están localizadas en la zona ventral de la sustancia gelatinosa y contienen neuronas que reciben señales monosinápticas de fibras A $\beta$ . Estas neuronas responden predominantemente a estímulos no nocivos y tienen campos receptivos restringidos que están organizados topográficamente. La lámina V contiene principalmente neuronas de amplio rango dinámico que se proyectan al tronco encefálico y a regiones del tálamo. Estas neuronas reciben señales monosinápticas de fibras A $\beta$  y A $\delta$  y también reciben señales de fibras C, ya sea directamente en sus dendritas que se extienden dorsalmente en la superficie del

asta dorsal o indirectamente por medio de interneuronas excitatorias que reciben señales de fibras C. Gran cantidad de neuronas en la lámina V también reciben señales nociceptivas de estructuras viscerales. La unión de señales nociceptivas somáticas y viscerales en neuronas de la lámina V pueden explicar el “dolor referido”, condición en la cual el dolor por el daño a una estructura visceral es desplazado a otras áreas de la superficie del cuerpo (Basbaum y Jessel, 2000; Purves, 2004).

Las neuronas de la lámina VI reciben señales de vías aferentes de diámetro mayor, procedentes de músculos y articulaciones y responden a manipulaciones no nocivas de las articulaciones. Se piensa que estas neuronas no contribuyen a la transmisión de mensajes nociceptivos.

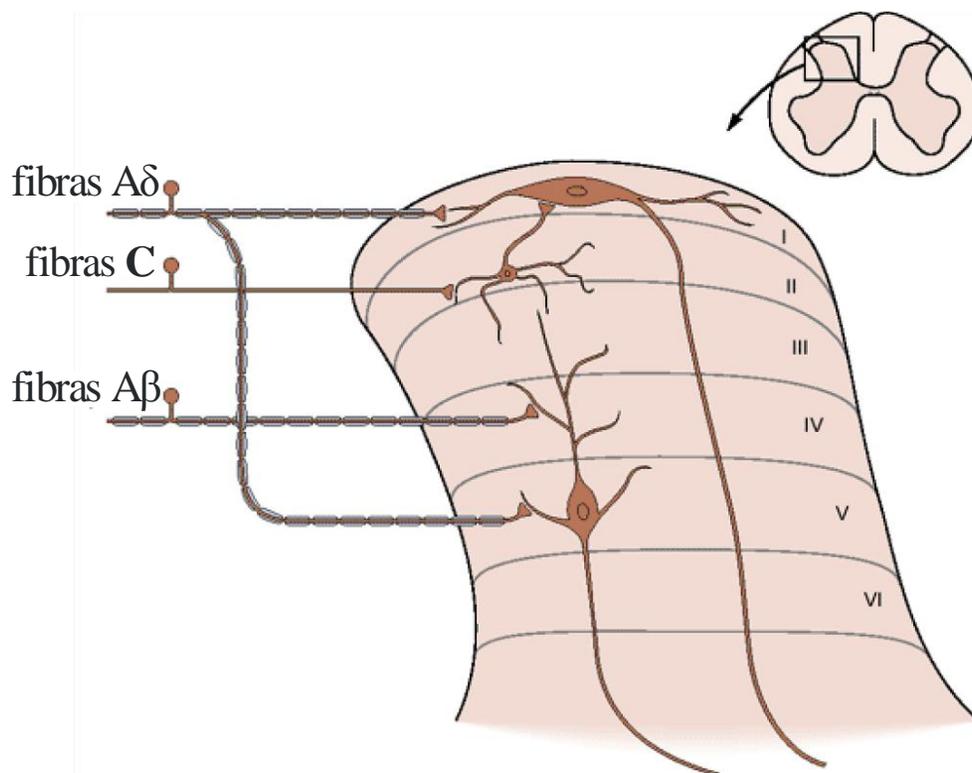


Figura 1. Subdivisión del asta dorsal de la médula espinal. Las fibras aferentes nociceptivas terminan en neuronas de proyección en el asta dorsal de la médula espinal. Las neuronas de proyección en la lámina I reciben información directa de fibras aferentes nociceptivas A $\delta$  e indirecta de fibras aferentes nociceptivas C, procedentes de interneuronas en la lámina II. Las neuronas de la lámina V, predominantemente de amplio rango dinámico, reciben señales de bajo umbral, procedentes de fibras A $\beta$  de mecanorreceptores, así como de fibras A $\delta$  y C (tomado y modificado de Kandel y col., 2000).

Finalmente, las neuronas del asta ventral, láminas VII y VIII, muchas de las cuales responden a estímulos nocivos, tienen propiedades de respuesta más complejas, ya que las señales nociceptivas a neuronas de la lámina VII son polisinápticas. Además, aunque la mayoría de las neuronas del asta dorsal reciben señales de sólo un lado del cuerpo, numerosas células de la lámina VII responden contralateralmente, lo que puede contribuir a la naturaleza difusa de diversas condiciones del dolor, ver Figura 1 (Basbaum y Jessel, 2000).

Como se mencionó anteriormente, las neuronas de proyección en la lámina I reciben información directa de fibras aferentes nociceptivas A $\delta$  e indirecta de fibras aferentes nociceptivas C, procedentes de interneuronas en la lámina II. Por otra parte, las neuronas de la lámina V, predominantemente de amplio rango dinámico, reciben señales de bajo umbral, procedentes de fibras A $\beta$  de mecanorreceptores, así como de fibras A $\delta$  y C, por lo que en esta tesis se trabajó con las láminas I–V.

### 1.3 Vías ascendentes de la información nociceptiva

La información sobre el daño tisular es llevada de la médula espinal al cerebro a través de diversas vías ascendentes. Las cinco principales vías están constituidas por los tractos: espinotalámico, espinoreticular, espinomesencefálico, cervicotalámico y espinohipotálamico.

#### 1.3.1 Tracto espinotalámico

El tracto espinotalámico es la vía ascendente nociceptiva más prominente en la médula espinal. Este tracto comprende los axones de las neuronas nociceptivas específicas, así como de aquellas de amplio rango dinámico en las láminas I y V-VII del asta dorsal. Estos axones se extienden al lado contralateral de la médula espinal y ascienden en la sustancia blanca anterolateral, terminando en el tálamo, posteriormente la señal viaja a la corteza cingulada, la corteza primaria somatosensorial y la corteza insular, ver Figura 2 (Kandel y col., 2000). La estimulación eléctrica del tracto espinotalámico produce dolor, mientras que lesiones del tracto resultan en reducciones marcadas en la sensación del dolor en el lado opuesto a la lesión de la médula espinal (Basbaum y Jessel, 2000).

### 1.3.2 Tracto espinoreticular

El tracto espinoreticular comprende los axones de las neuronas de las láminas VII y VIII. Éste asciende en el cuadrante anterolateral de la médula espinal y termina en la formación reticular y el tálamo, ver Figura 2 (Kandel y col., 2000). La importancia de esta vía implica respuestas a impulsos nociceptivos, componentes vegetativos, activación de mecanismos endógenos descendentes moduladores de la entrada de información nociceptiva (Basbaum y Jessel, 2000).

### 1.3.3 Tracto espinomesencefálico

El tracto espinomesencefálico comprende los axones de las neuronas en las láminas I y V y se proyecta del cuadrante anterolateral de la médula espinal a la formación reticular mesencefálica y al área gris periacueductal (PAG) y de la vía tracto espinoparabraquial se proyecta al núcleo parabraquial, ver Figura 2 (Kandel y col., 2000). Además, neuronas del núcleo parabraquial se proyectan a la amígdala, el sistema neuronal involucrado en la emoción. Es por esto que se cree que el tracto mesencefálico contribuye al componente afectivo del dolor (Basbaum y Jessel, 2000; Purves, 2004).

### 1.3.4 Tracto cervicotálámico

El tracto cervicotálámico se origina principalmente en las láminas III-IV y en menor medida en las láminas I, II y V. Las neuronas de estas láminas reciben información de fibras A $\delta$  y A $\beta$  que transmiten impulsos dolorosos y de amplio rango dinámico y ascienden por el lemnisco medio del tronco encefálico a los núcleos del mesencéfalo y a los núcleos externos ventroposteriores y posteromediales del tálamo. Este tracto realiza un primer relevo sináptico en el núcleo cervical lateral donde pasa por la comisura anterior blanca y asciende por el lemnisco medio. Posteriormente se proyecta principalmente al núcleo ventroposterolateral del tálamo y al núcleo del tracto solitario (Almeida, 2004).

### 1.3.5 Tracto espinohipotálámico

El tracto espinohipotálámico puede recibir señales somatosensoriales directas de la médula espinal (Burstein y col., 1990). Los axones somatosensoriales primarios

penetran en las astas dorsales y sus señales son retransmitidas por las células marginales a las neuronas de segundo orden, localizadas en las láminas IV y V de la médula espinal, las cuales cruzan eventualmente la línea media a nivel de la médula espinal y ascienden junto con el tracto espinotalámico al hipotálamo lateral (Palkovits, 1999).

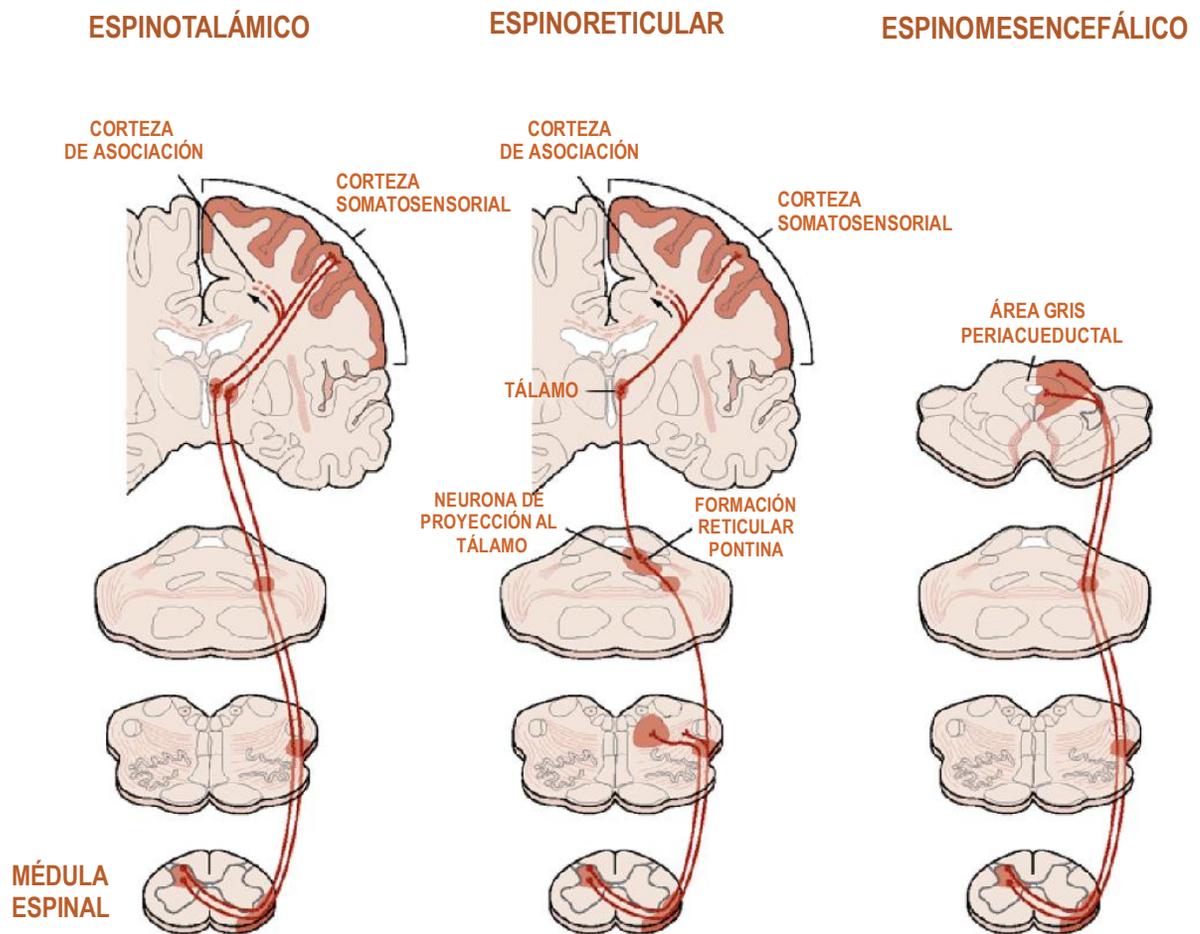


Figura 2. Esquema de tres de las principales vías ascendentes que transmiten información nociceptiva de la médula espinal a centros superiores (Tomado y modificado de Kandel y col., 2000).

## 1.4 Modulación del dolor

Uno de los más grandes descubrimientos en la investigación del dolor, es que el cerebro tiene circuitos moduladores, cuya función principal es regular la percepción del dolor. En las últimas décadas, una gran cantidad de estructuras se han relacionado con diversos sistemas moduladores dentro del sistema nervioso central que afectan la respuesta a estímulos nocivos (Oliveras y Besson, 1988). El sitio inicial de modulación es la médula espinal, donde las interconexiones entre las vías aferentes nociceptivas y no nociceptivas pueden controlar la transmisión de la información nociceptiva a centros superiores en el cerebro. Además, la médula espinal es a donde llega la información sensorial con contenido de dolor y es ahí mismo en donde convergen los sistemas descendentes que pueden alterar la percepción del dolor (Basbaum y Jessel, 2000).

### 1.4.1 Núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV)

Estudios previos demostraron la existencia de una vía descendente hipotalámica que llega a la médula espinal, que está involucrada con funciones autonómicas, como se muestra en la Figura 3 (Kabat y col., 1935; Magoun, 1938, Carpenter, 1994). La estimulación de las áreas lateral (Cox y Valenstein, 1965), medial (Berkowitz y Sherman, 1982) y posterior (Rhodes y Liebeskind, 1978) hipotalámica, producen analgesia. De manera más específica, trabajos recientes muestran que la estimulación eléctrica del NPV está involucrada en la modulación del dolor, sugiriendo una nueva vía para un sistema descendente de modulación del dolor (Condés-Lara y col., 2003). Por medio de trazadores anterógrados (Luiten y col., 1985) y retrógrados (Saper y col., 1976), se ha demostrado una proyección directa del NPV a la médula espinal, así como al lóbulo posterior de la glándula pituitaria (Sherlock y col., 1975), la eminencia media (Vandesande y Dierickx, 1977), el locus coeruleus (LC) (Swanson, 1977; Swanson y Hartman, 1980; Kobayashi y col., 1974), el núcleo parabraquial (Conrad y Pfaff, 1976) y la médula espinal (Hosoya y Matsushita, 1979). Así mismo se ha observado una proyección oxitocinérgica del NPV al área gris periacueductal (PAG) y el Núcleo Rafé Magno (RMg), estructuras reconocidas por estar involucradas en la percepción del dolor (Millan y col., 1984;

Millan, 1986; 2002). También, se ha postulado que la vía paraventricular-espinal, envuelve neuronas preganglionares simpáticas y parasimpáticas específicas y la zona marginal, las cuales participan en el paso de información nociceptiva ascendente a través del tracto espinotalámico (Swanson y McKellar, 1979). Condés-Lara y col. (2007) demostraron que los segmentos lumbares y cervicales del asta dorsal de la médula espinal reciben proyecciones del NPV, lo que convierte esta vía descendente NPV-médula espinal en parte del sistema no específico o difuso de modulación del dolor, tal como fue descrito para las proyecciones del núcleo rafé-médula espinal (Villanueva y Fields, 2004).

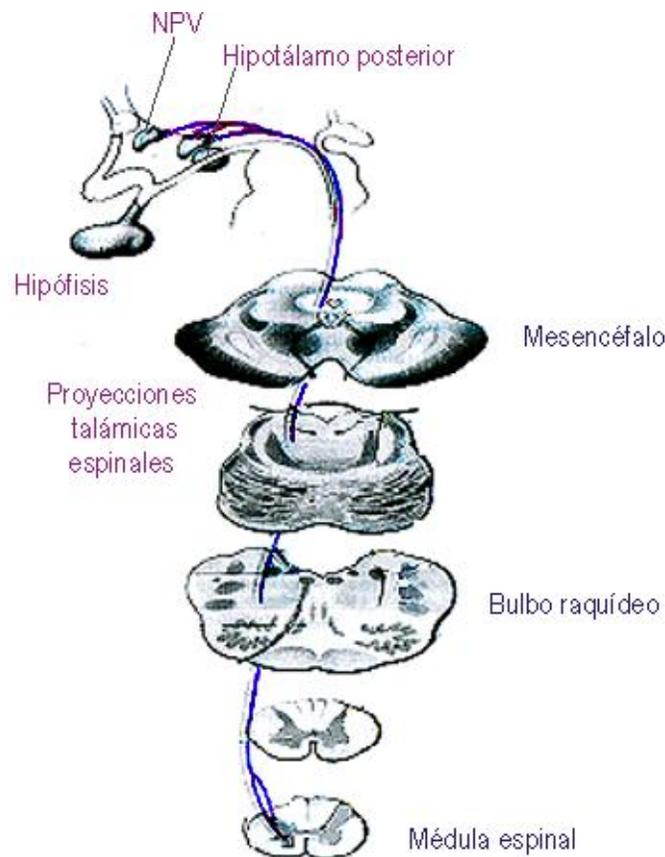


Figura 3. Sistema descendente hipotálamo – espinal. Proyección de los núcleos hipotalámicos: núcleo paraventricular y el núcleo posterior, que transmiten la información en una vía directa hacia las astas dorsales y mediales de la médula espinal (tomada y modificada de Carpenter, 1994)

#### 1.4.2 Área gris periacueductal (PAG)

El PAG participa como conexión entre los sistemas de procesamiento emocional y las vías motoras usadas en las reacciones de defensa. Esta estructura se subdivide en función de sus conexiones anatómicas y funcionales (Carrive, 1993), teniendo una organización columnar longitudinal (Bandler y Shipley, 1994,) dividiéndose en cuatro núcleos situados dorsomedial, dorsolateral, lateral y ventrolateral al acueducto de Silvio (Paxinos, 1985).

Se ha observado que la estimulación eléctrica del PAG produce una analgesia profunda y selectiva (Reynolds, 1969). La analgesia producida de esta manera, es sumamente específica, lo cual quiere decir que cuando las sensaciones tales como el tacto, la presión y la temperatura están aún presentes, simplemente se siente menos dolor. La estimulación del PAG también bloquea reflejos espinales que son normalmente evocados por estímulos nocivos. Este bloqueo ocurre ya que la estimulación recluta vías descendentes que inhiben neuronas nociceptivas en la médula espinal (Heinricher y col., 2009).

Pocas neuronas en el PAG se proyectan directamente al asta dorsal de la médula espinal; en cambio, realizan conexiones excitatorias con neuronas de la médula rostroventral, en particular con neuronas serotoninérgicas en la línea media del RMg. Las neuronas de este núcleo se proyectan a la médula espinal por la vía dorsal del funículo lateral y hace conexiones inhibitorias con neuronas de las láminas I, II y V del asta dorsal.

Otros sistemas inhibitorios descendentes que suprimen la actividad de neuronas nociceptivas en el asta dorsal, se originan en el LC noradrenérgico y otros núcleos de la médula. Esta proyección descendente bloquea la salida de neuronas en las láminas I y V por acciones inhibitorias directas e indirectas (Heinricher y col., 2009). Así mismo, se reportan proyecciones del PAG al NPV, el núcleo lateral hipotalámico, el LC, la región celular noradrenérgica A5, la médula rostral ventromedial y la médula rostral ventrolateral, ver Figura 4 (Farkas y col., 1998).

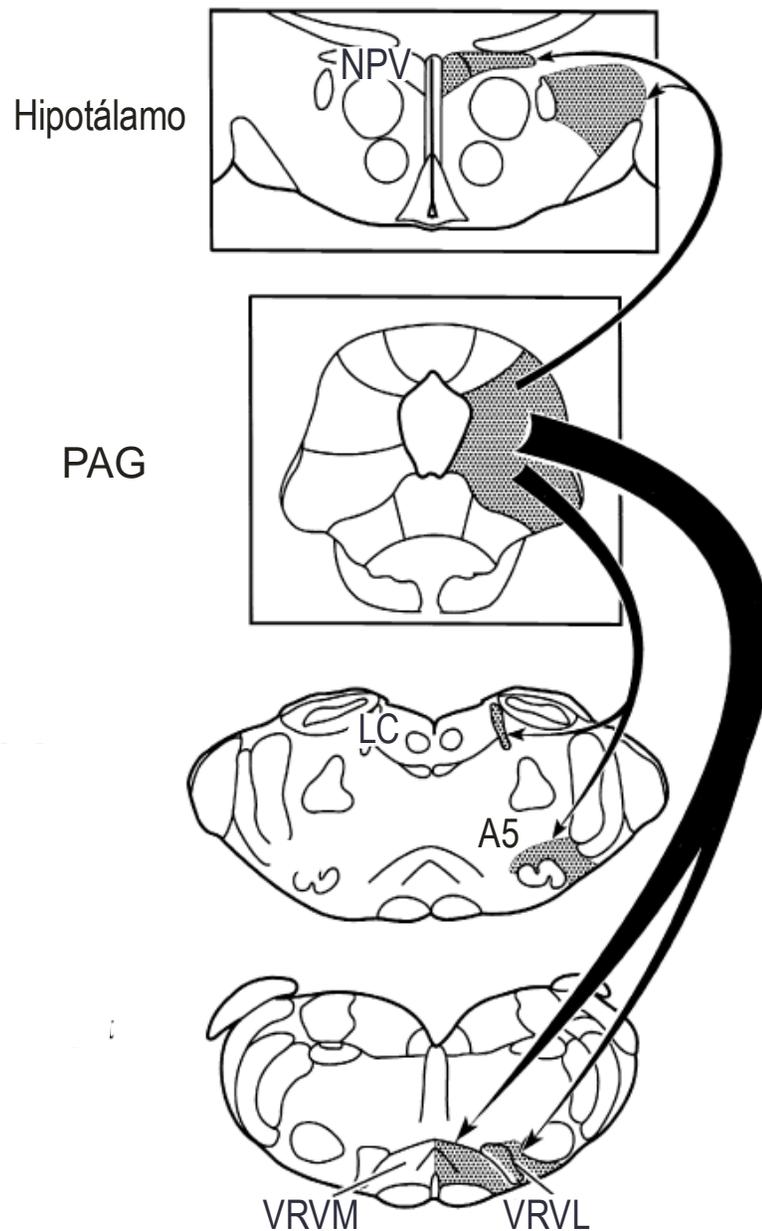


Figura 4. Proyecciones del PAG. El PAG se proyecta a neuronas del hipotálamo (NPV y el núcleo lateral), el LC, el grupo celular noradrenérgico A5, la médula rostral ventromedial y la médula rostral ventrolateral.

#### 1.4.3 Locus coeruleus (LC)

La principal entrada noradrenérgica en el asta dorsal tiene su origen en el LC. La activación de esta región, eléctrica o químicamente, puede producir profunda antinocicepción (West y col., 1993) y puede inhibir la actividad nociceptiva en neuronas del asta dorsal (Hodge y col., 1981).

El LC inerva diversos sitios cerebrales que tienen relación con la transmisión del dolor. Estos sitios son la corteza cerebral, el hipocampo, el hipotálamo, el núcleo parabraquial, el núcleo tracto solitario y el núcleo dorsal del rafé. Numerosas investigaciones se han enfocado en el sistema descendente del LC como uno de los sistemas endógenos de control del dolor. Se ha demostrado que el LC manda proyecciones bilaterales al asta dorsal de la médula espinal. Axones de las neuronas que proyectan contralateralmente del LC cruzan la línea media dentro del cerebro y viajan a través del funículo dorsolateral para terminar en el asta dorsal contralateralmente (Clark y Proudfit, 1991). La estimulación del LC es efectiva tanto ipsilateral como contralateralmente, indicando una entrada bilateral al asta dorsal. Estos descubrimientos anatómicos y electrofisiológicos sugieren que el sistema modulador descendente del LC podría ser activado bilateralmente durante un proceso de inflamación, aun cuando el sitio de activación del LC sea ipsilateral o contralateral al sitio de inflamación (Jones y Gebhart, 1988).

#### 1.4.5 Núcleo rafé magno (RMg)

El RMg es una de las estructuras relacionadas con el fenómeno de la analgesia inducida por estimulación que más se ha estudiado (Villanueva y Fields, 2004). El RMg se define funcionalmente como la línea media del área pontomedular, en el cual la estimulación eléctrica o la microinyección de opioides producen antinocicepción (Fields y Heinricher, 1985).

El PAG proyecta al RMg, el cual manda su señal al asta dorsal de la médula espinal, la cual es de gran importancia en la función antinociceptiva. Ambos reciben señales aferentes substanciales de centros superiores, particularmente del hipotálamo, la amígdala y la corteza prefrontal. Este sistema es reconocido como el

sitio central de acción de diversos agentes analgésicos, incluyendo opioides, inhibidores de COX-II y cannabinoides (Hohmann y col., 2005; Leith y col., 2007). La estimulación eléctrica puede producir la facilitación o inhibición de la antinocicepción con diferentes umbrales, o sobre el desarrollo de una respuesta inflamatoria (Ren y Dubner, 2002). Los efectos de la inactivación del RMg son complejos, ya que la lesión o inactivación general de las neuronas de éste, puede producir una ligera hiperalgesia o no tener efecto bajo condiciones basales, pero puede aumentar el umbral nociceptivo en estados hiperalgésicos agudos y crónicos (Heinricher y Kaplan, 1991). Por otra parte, estudios más recientes utilizando técnicas electrofisiológicas de registros unitarios (Condés-Lara y col., 2012), sugieren una interacción entre el NPV y el RMg, la cual se lleva a cabo a través de las conexiones previamente reportadas entre el NPV, el RMg y el PAG (Geerling y col., 2010; Larsen, 1996).

#### 1.5 C-fos como marcador neuronal de dolor

La estimulación de neuronas puede activar dos mecanismos diferentes por los cuales procesan y transmiten la información: la actividad electrofisiológica que procesa inmediatamente y converge información relacionada al estímulo; y las cascadas de larga activación que evocan la producción de factores de transcripción que inician la transcripción o represión de otros genes, alterando así la respuesta neuronal a estímulos subsecuentes. La importancia de los factores de transcripción ha sido deducida principalmente en experimentos *in vitro*, sin embargo, se determinado que los factores de transcripción juegan un papel crucial y específico en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso, así como en las respuestas adaptativas del sistema a diferentes tipos de estímulos y a situaciones patológicas (Herdegen y Leah, 1998).

C-fos fue descrito originalmente como una clase de gen de rápida expresión celular después de diversas formas de estimulación por lo que recibe el nombre de “gen de expresión rápida” o IEG por sus siglas en inglés (Cochran y col., 1983). Desde los estudios de Hunt y col., las publicaciones en las que c-fos ha sido usado para estudiar la nocicepción, ha ido en aumento. En dichos estudios, se demuestran los

diferentes tipos de estímulos nocivos, incluyendo termales, mecánicos y químicos, que inducen la expresión de c-fos en el cerebro y la médula espinal, confirmando la relación entre la nocicepción y la expresión de c-fos (Harris, 1998).

Los eventos que llevan a la expresión del IEG en el núcleo, después de estimular la superficie celular son complejos e involucran múltiples vías que producen segundos mensajeros. A grandes rasgos implica a neurotransmisores asociados con el procesamiento de información nociceptiva, como los sistemas glutamatérgico y de sustancia P, que incrementan la concentración de  $Ca^{2+}$  en neuronas postsinápticas, llevando a la activación de c-fos (Doucet y col., 1990).

Existen diversas ventajas al utilizar la expresión de c-fos como herramienta para estudiar las bases de la nocicepción. En primera, nos da una localización más precisa de las poblaciones neuronales que responden al estímulo nocivo, a diferencia de otras técnicas. También, se puede cuantificar el número de células inmunorreactivas a c-fos, logrando así comparar los efectos con diversos protocolos e incluso realizar marcajes múltiples para poder identificar el tipo celular que ha expresado c-fos (Harris, 1998). Ahora bien, en el presente protocolo se utilizará c-fos como marcador de una activación. Es sin lugar a dudas un marcador que no se activa únicamente con los estímulos dolorosos o nociceptivos, pero permite determinar las poblaciones de neuronas que interactúan en las diferentes estructuras implicadas en la analgesia.

## **2. HIPÓTESIS**

La estimulación eléctrica del NPV produce la activación de células del segmento lumbar del asta dorsal de la ME, de la PAG, del RMg y del LC.

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1 General

Determinar si la estimulación eléctrica del NPV produce la activación de las células del segmento lumbar del asta dorsal de la ME, de la PAG, del RMg y del LC.

#### 3.2 Específicos

- ❖ Estimular eléctricamente el NPV.
- ❖ Verificar los sitios de estimulación en el NPV, mediante la técnica histológica de violeta de Cresilo.
- ❖ Cuantificar las neuronas inmunorreactivas a c-fos en el asta dorsal a nivel lumbar, en el LC, en el RMg y en la PAG.

## **4. METODOLOGÍA**

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Animales de experimentación

Se utilizaron 12 ratas macho de la cepa Wistar de un peso de 280 a 300 gramos, las 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). Los animales se dividieron en tres grupos: 1) Control (n=3), al cual no se le realizó la cirugía; 2) falso operado (n=3), en el que se llevó a cabo la cirugía, más no la estimulación y 3) estimulado (n=3), en el que se estimuló el NPV.

#### 4.1.2. Cirugía

Los animales después de ser anestesiados, fueron montados en un aparato estereotáxico para realizar una cirugía en el encéfalo, descubriendo de esta manera la zona correspondiente al NPV.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Estimulación del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV)

Se colocó un electrodo en la región correspondiente al NPV, de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas de Paxinos y Watson (1998). Posteriormente, se realizó una estimulación simple de 4V por 6s, con pulsos de 1 mseg de duración a 60 Hz.

#### 4.2.2 Perfusión

Treinta minutos después de la estimulación, 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 0.1 M, pH 7.4 (PB). Una vez terminada la perfusión se extrajo el cerebro y la médula espinal de cada animal. El tejido se mantuvo en un período de posfijación en paraformaldehído al 4% en PB durante 4 horas y después se colocó el tejido en una

solución de sacarosa al 30% en PB y se mantuvo en refrigeración hasta ser cortado.

#### 4.2.3 Cortes histológicos del tejido

Los cortes de cerebro y médula espinal de cada animal fueron colocados y congelados durante 5 minutos a  $-40^{\circ}\text{C}$  en un microtomo de congelación (LEICA SM 2000R). Se realizaron cortes coronales de  $40\ \mu\text{m}$  de espesor del segmento lumbar de la médula espinal y del cerebro a partir de 8.20 mm hasta -2.60 mm línea interaural. Se obtuvieron 5 series cada  $200\ \mu\text{m}$ , las cuales se almacenaron en pozos de incubación en buffer de fosfatos–Salino (PBS) 0.01 M.

#### 4.2.4 Técnica de deshidratación del tejido

Los cortes pertenecientes a la zona entre 4.20mm y -2.60mm línea interaural y de médula espinal 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 la resina Entellan y un cubreobjetos para su análisis.

#### 4.2.5 Técnica de tinción del tejido

Los cortes pertenecientes a la zona del NPV 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 se montaron con Entellan.

#### 4.2.6 Técnica inmunohistoquímica para c-fos

Los cortes del encéfalo entre 4.20mm y -2.60mm línea interaural y de médula espinal se incubaron en una solución de PBS 0.01 M con 0.5% de tritón X-100 (PBS-T) y se bloquearon con suero de cabra al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de quitar todo el exceso de líquido, se incubó de nuevo en una solución de suero de cabra al 5% y el anticuerpo primario dirigido contra la proteína Fos (Conejo anti-fos 1:1000, Santa Cruz) durante 48 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se lavó en PBS 0.01 M y se volvieron a incubar durante toda una noche a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (Biotinilado cabra anti-

conejo IgG 1:200, vector). Al día siguiente, los cortes se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa ABC (1:200, vector), durante 4 h a 37°C y se reveló con el Kit NiDAB. Los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, se secaron, deshidrataron, aclararon y se cubrieron con Entellan.

#### 4.2.7 Análisis histológico

Los cortes fueron observados en un microscopio óptico LEICA para identificar los sitios de estimulación en el NPV y se observaron mediante microscopia las neuronas inmunoreactivas a c-fos.

#### 4.2.8 Cuantificación de neuronas positivas a c-fos

Los cortes fueron observados en un microscopio óptico LEICA DFC320. Con ayuda del digitalizador MD3Plot Versión 4.0 Accu Stage, se trazaron los cortes en forma digital y se marcaron los sitios exactos en donde se encontraron las neuronas positivas al c-fos, logrando una representación.

#### 4.2.9 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con una ANOVA de una vía y un estudio post hoc de Neuman-Keuls.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Verificación de los sitios de estimulación

El sitio de estimulación fue el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV). Se estimularon un total de 3 animales. Para corroborar en qué estructura exacta y a qué nivel se llevó a cabo la estimulación, se realizó la tinción de violeta de Cresilo al 0.5% de los cortes adyacentes, como se muestra en la Figura 5. La observación de los cortes teñidos permitió identificar la estructura en donde se llevó a cabo la estimulación, que fue efectivamente el NPV, señalado con una línea punteada en la Figura 5C.

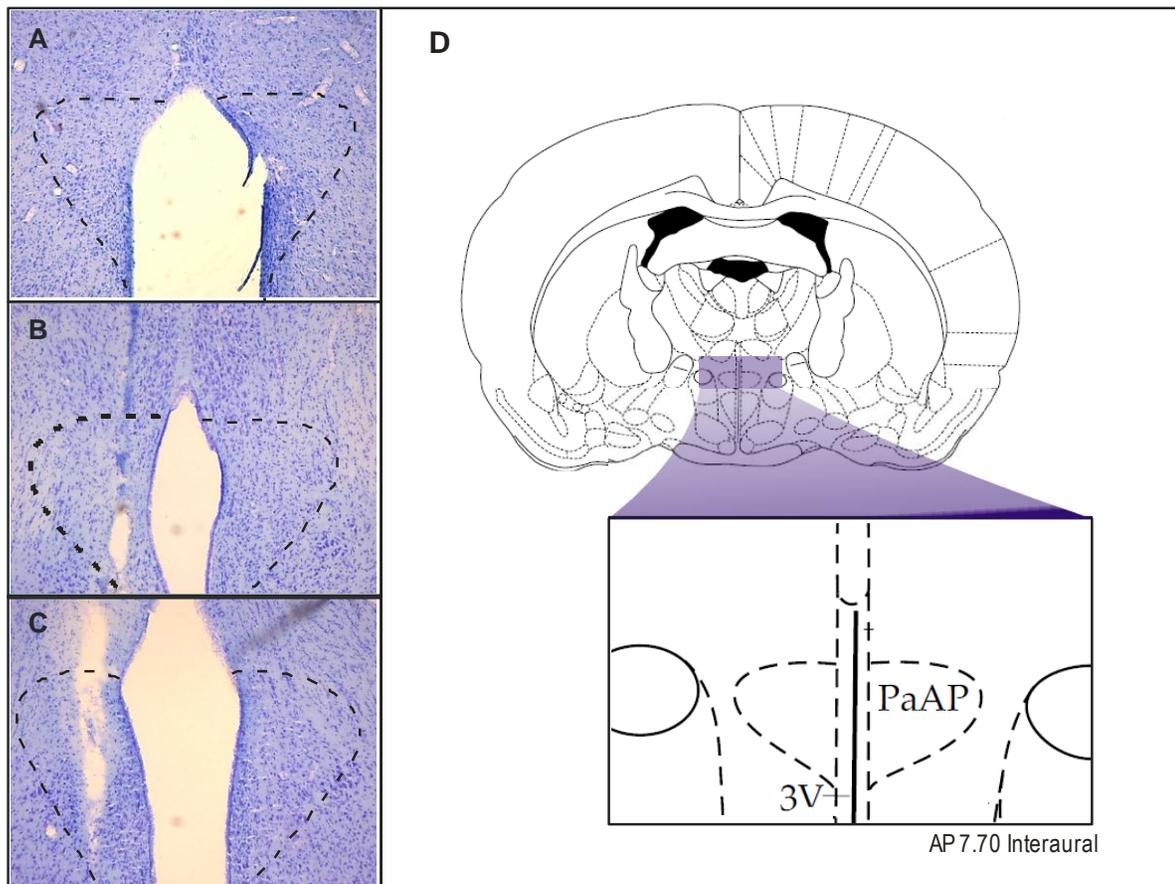


Figura 5. Sitio de estimulación. En A, se observa el corte correspondiente al NPV del grupo control (no hay marca del electrodo). En B y C por otra parte, se muestra el trayecto de los electrodos en el grupo falso operado y el grupo estimulado, respectivamente. Finalmente en D se presenta el diagrama en el que se señala el sitio de estimulación del NPV (tomado de Paxinos y Watson, 1998).

## 5.2 Análisis de las neuronas inmunorreactivas a c-fos

### 5.2.1 Sección lumbar de la médula espinal (ME)

Se procesaron alrededor de 200 cortes, que resultaron en poco más de 43 000 células.

En la Figura 6 podemos observar algunos de los cortes obtenidos, es claro cómo hay un incremento en el marcaje de c-fos en el grupo estimulado, primordialmente de manera ipsilateral (del mismo lado de la estimulación) (Figura 6C). También se observa un ejemplo de los diagramas obtenidos con el programa MDPlot, utilizado para la cuantificación (Figura 6D).

Al cuantificar, se dividieron los cortes en los diversos segmentos (L1–L6) de la región lumbar. Debido a que los cortes de L1 y L6 eran muy pocos, se realizó el análisis de L2 a L5. Así mismo, se analizaron separadamente las láminas I-II y III-V, como se observa en la Figura 7B y 7C.

En el análisis inicial, donde se observó el efecto en toda el asta dorsal, se obtuvo una clara activación ipsilateral de L2–L5, presentando un mayor conteo en L2. Mientras tanto, contralateralmente (opuesto al sitio de estimulación) sólo mostró una activación significativa en L3 y una tendencia en L4.

Posteriormente, en el análisis realizado en las láminas I–II, es evidente la activación ipsilateral de L2 a L5, siendo de nuevo L2, el que presentó un mayor conteo celular positivo a c-fos. Contralateralmente sin embargo, no se encontró ninguna diferencia significativa.

Por otra parte, en las láminas III–V, sólo se encontró una activación significativa en los segmentos L3 y L5 de manera ipsilateral, con una notoria tendencia en el segmento L2. Del lado contralateral al sitio de estimulación, no se encontró ninguna diferencia significativa, sólo una ligera tendencia en L2 y L3. Además, cabe mencionar que el rango en estas láminas fue menor, representaba aproximadamente la quinta parte del conteo obtenido en las láminas más superficiales.

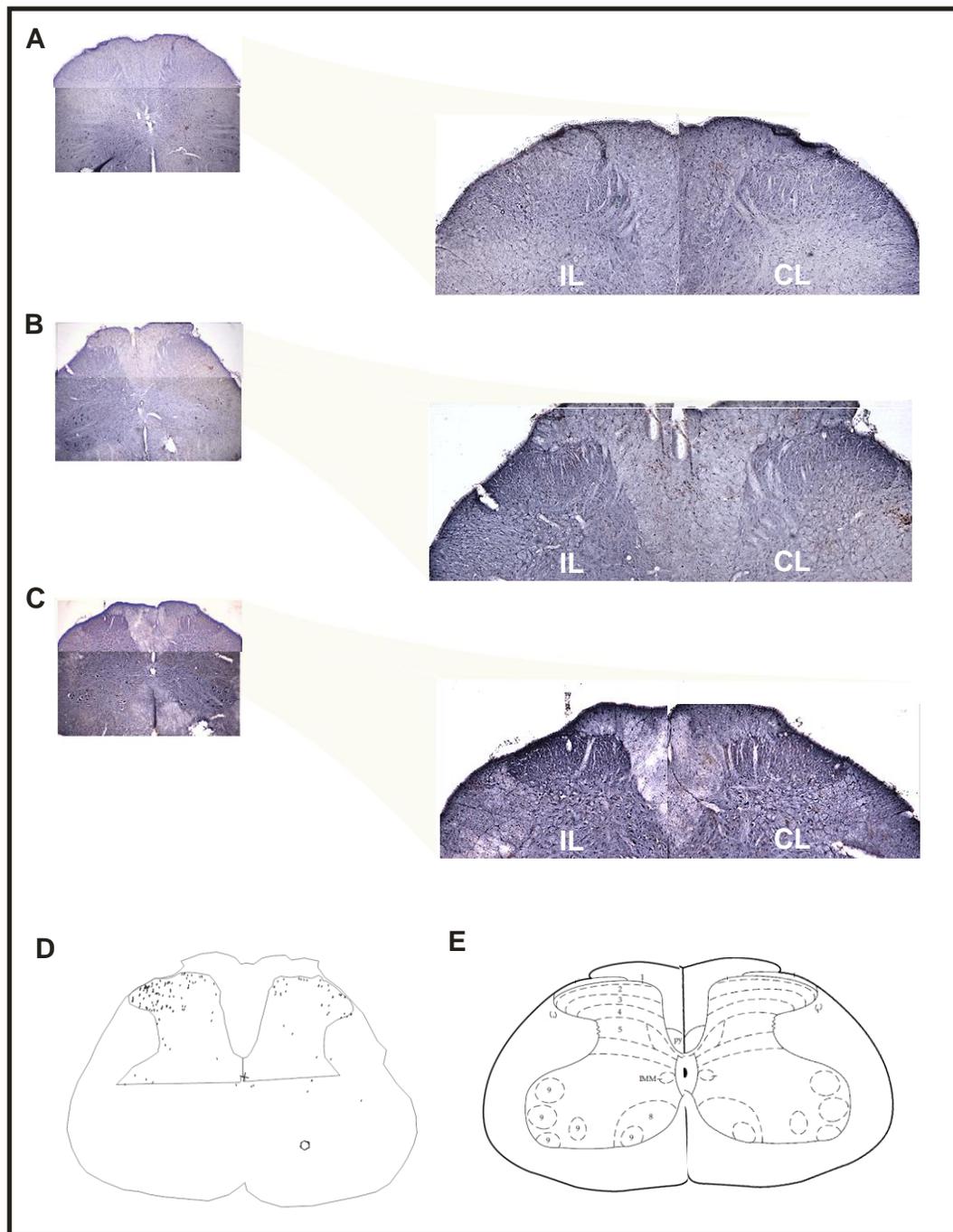


Figura 6. Cuantificación de células positivas a c-fos en la ME, en los diversos grupos de experimentación. En la imagen se observa un corte del grupo control (A), del falso operado (B) y del estimulado (C). Se presenta el efecto ipsilateral (IL) y contralateral (CL). Además, en D se muestra un ejemplo del esquema de las regiones a analizar con el programa MDPlot para la cuantificación. Finalmente, en E se presenta un diagrama (tomado de Paxinos y Watson, 1998) en el que se muestran las láminas I–V.

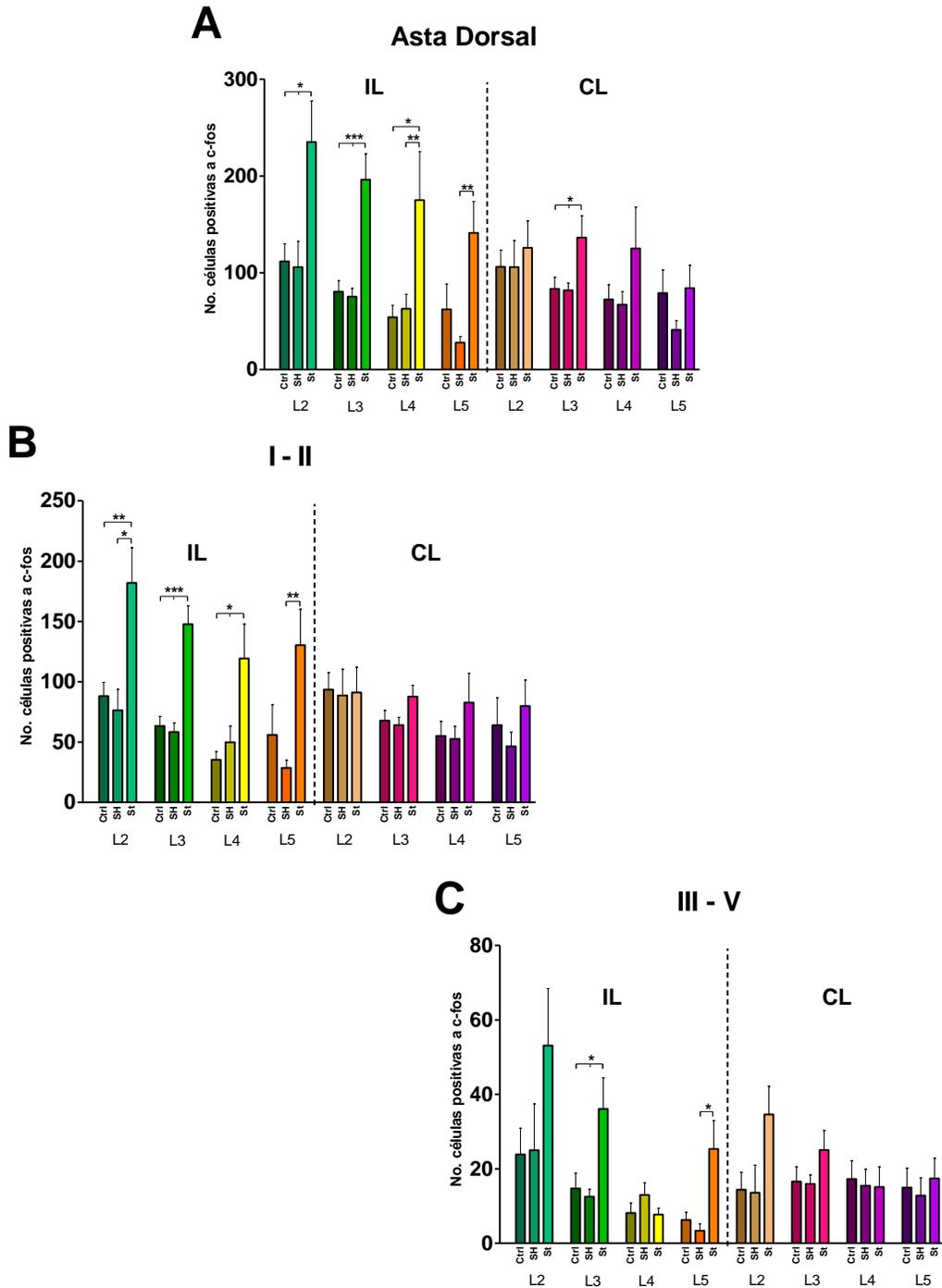


Figura 7. Análisis del conteo de células positivas a c-fos en los distintos segmentos lumbares, del asta dorsal de la ME. Se muestran los diversos segmentos del engrosamiento lumbar (L2–L5) que fueron cuantificados en cada uno de los grupos experimentales: Ctrl, control; SH, falso operado; St, estimulado. Se estudió su efecto ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en la ME. En el eje y, el número de células positivas a c-fos (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### 5.2.2 Área gris periacueductal (PAG)

Se procesaron alrededor de 200 cortes del PAG, que representaron  $\pm 4$  200 células. En la Figura 8 se muestran algunos de estos cortes. Es posible observar claramente cómo hay un incremento en el marcaje de células positivas a c-fos en el grupo estimulado (Figura 8C). Como el PAG se encuentra conformado en distintos núcleos (Figura 8D), para demostrar específicamente la acción en estas diversas regiones, se dividió su análisis.

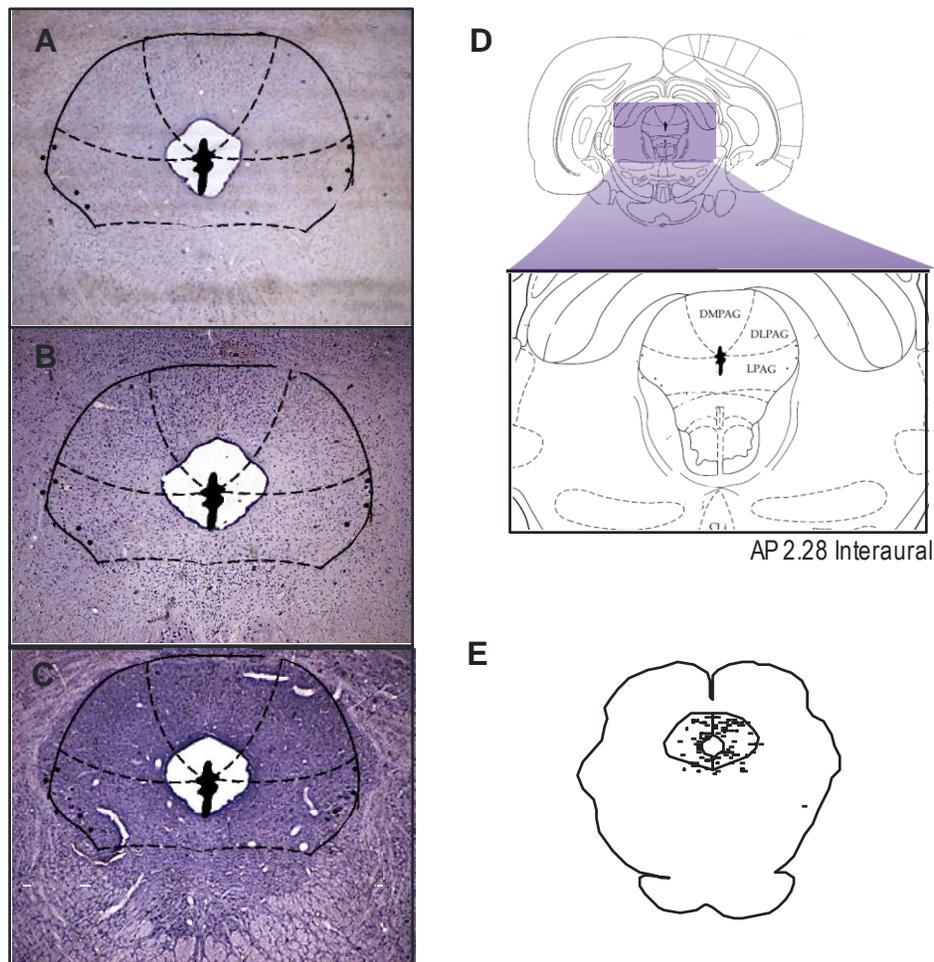


Figura 8. Cuantificación de células positivas a c-fos en el PAG. En esta imagen se presentan fotomicrografías de tres cortes analizados. En A, un corte perteneciente a una rata del grupo control, en B del grupo falso operado y en C del grupo estimulado. En D, se muestra un diagrama (tomado de Paxinos y Watson, 1998) en donde se representa el PAG. Finalmente, en E, se presenta un esquema generado por la cuantificación de dicha estructura por medio del programa MDPlot (DMPAG, dorsomedial; DLPAG, dorsolateral; LPAG, lateral).

Al analizar el PAG, se obtuvo una clara activación tanto ipsilateral como contralateral en casi todos sus núcleos, sólo en la parte más anterior del PAG, no se tuvo una diferencia significativa contralateralmente, sin embargo, sí una clara tendencia. Comparando entre los diversos núcleos, la activación celular fue muy similar entre las porciones dorsolateral (DLPAG), lateral (LPAG), dorsomedial (DMPAG) y ventrolateral (VLPAG), mientras que en el PAG, el conteo celular fue mucho mayor (Figura 9).

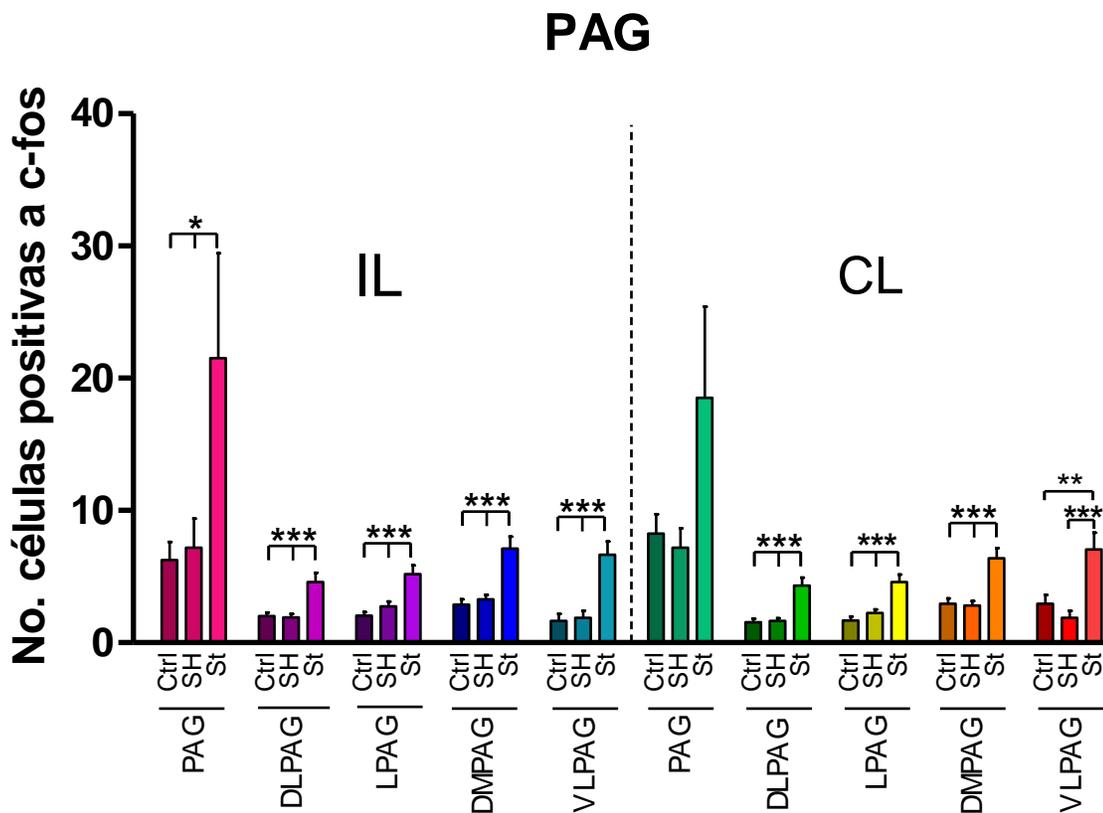


Figura 9. Análisis del conteo de células positivas a c-fos en el PAG. Se observan los diferentes grupos con los que se trabajaron (Ctrl, control; SH, falso operado; St, estimulado), además de estudiarse su efecto ipsilateral (IL) y contralateral (CL). En las ordenadas, el número de células positivas a c-fos (\* $p < 0.050$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### 5.2.3 Locus coeruleus (LC)

Se analizaron 70 cortes, que representaron alrededor de 100 células. Como se muestra en la Figura 10, hay un aumento de células inmunorreactivas a c-fos en el grupo estimulado.

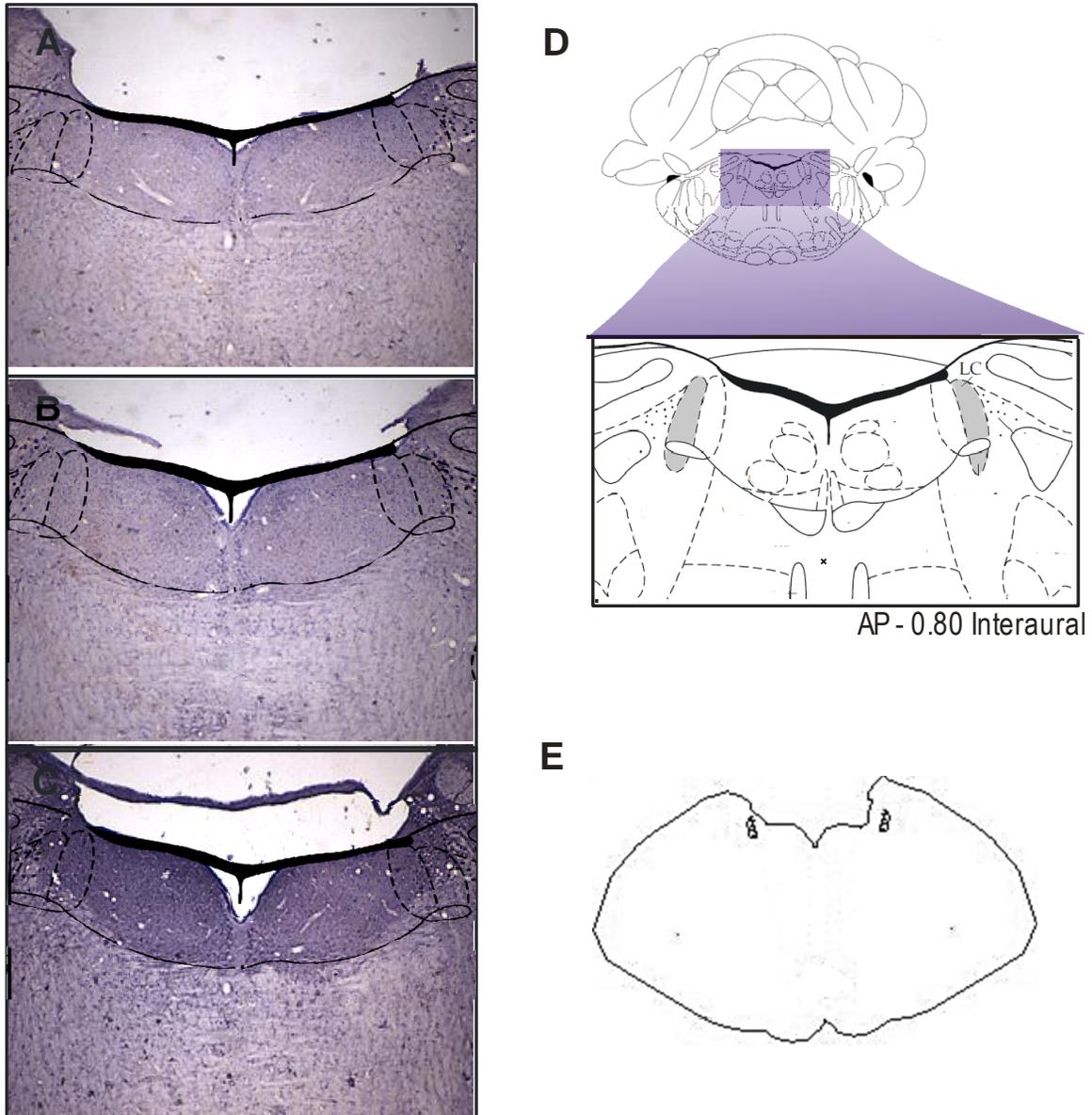


Figura 9. Cuantificación de células positivas a c-fos en el LC. Se muestran cortes correspondientes a una rata de grupo control (A), falso operado (B) y estimulado (C). En D, un diagrama (tomado de Paxinos y Watson, 1998) que muestra la zona correspondiente al LC y el esquema obtenido con el programa MDPlot en E.

En el análisis estadístico, logramos observar una activación bilateral del LC, sin embargo ipsilateralmente se presentó una mayor activación, lo cual puede observarse en la Figura 10.

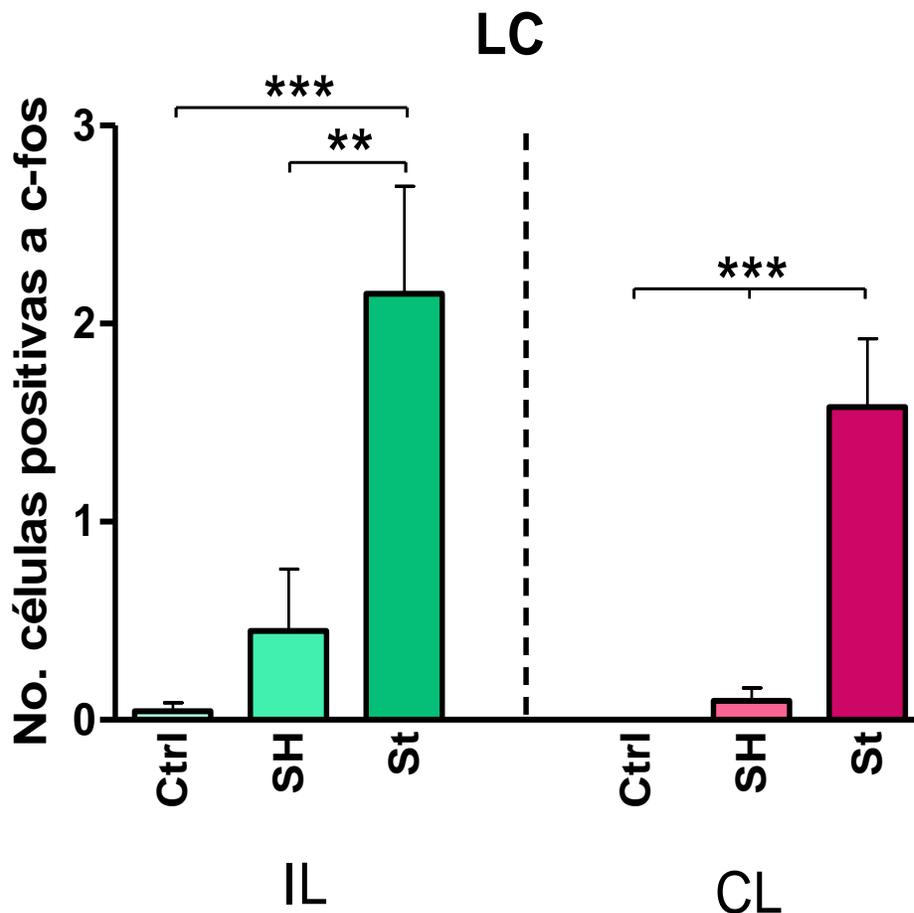


Figura 10. Análisis del conteo de células positivas a c-fos en el LC. Se observa en las abscisas el efecto ipsilateral (IL) y contralateral (CL), así como los diferentes grupos con los que se trabajó (Ctrl, contro; SH, falso operado; St, estimulado). En las ordenadas, el número de células positivas a c-fos (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

#### 5.2.4 Núcleo magno del rafé (RMg)

Se analizaron poco más de 150 cortes, que representaron 35 células. En la Figura 11 podemos observar algunos de los cortes en los que, a diferencia de otras estructuras, no se nota claramente una activación del RMg

Al realizar el análisis estadístico, se obtuvo una diferencia significativa ipsilateralmente, sin embargo, el rango de los datos era menor a uno, como se puede observar en la Figura 12.

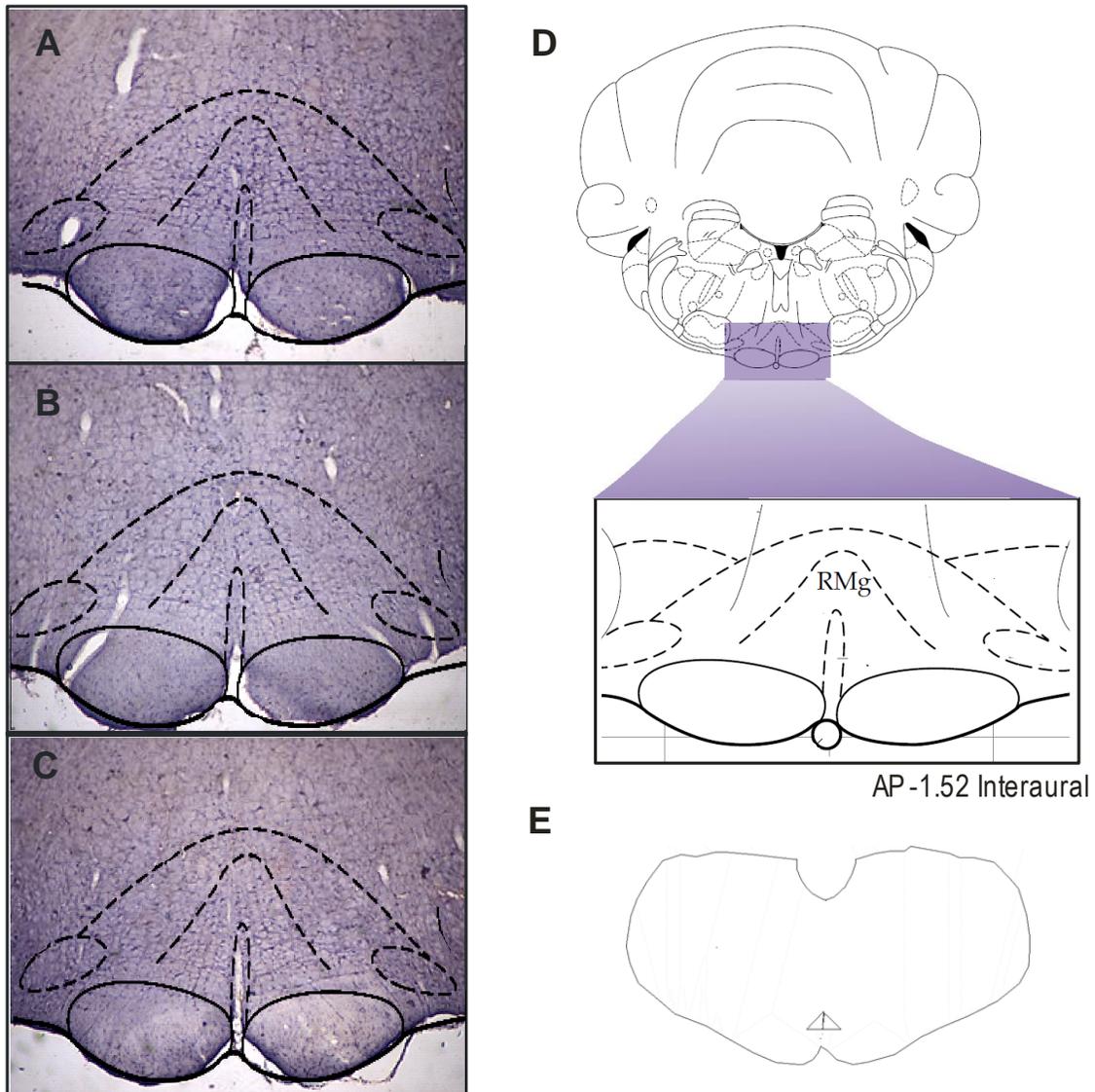


Figura 11. Cuantificación de células positivas a c-fos en el RMg. En A, B y C, se muestran cortes correspondientes a una rata perteneciente al grupo control, falso operado y estimulado respectivamente. En D se muestra el diagrama (Paxinos y Watson, 1998) que representa al RMg y en E, el esquema obtenido con el programa MDPlot.

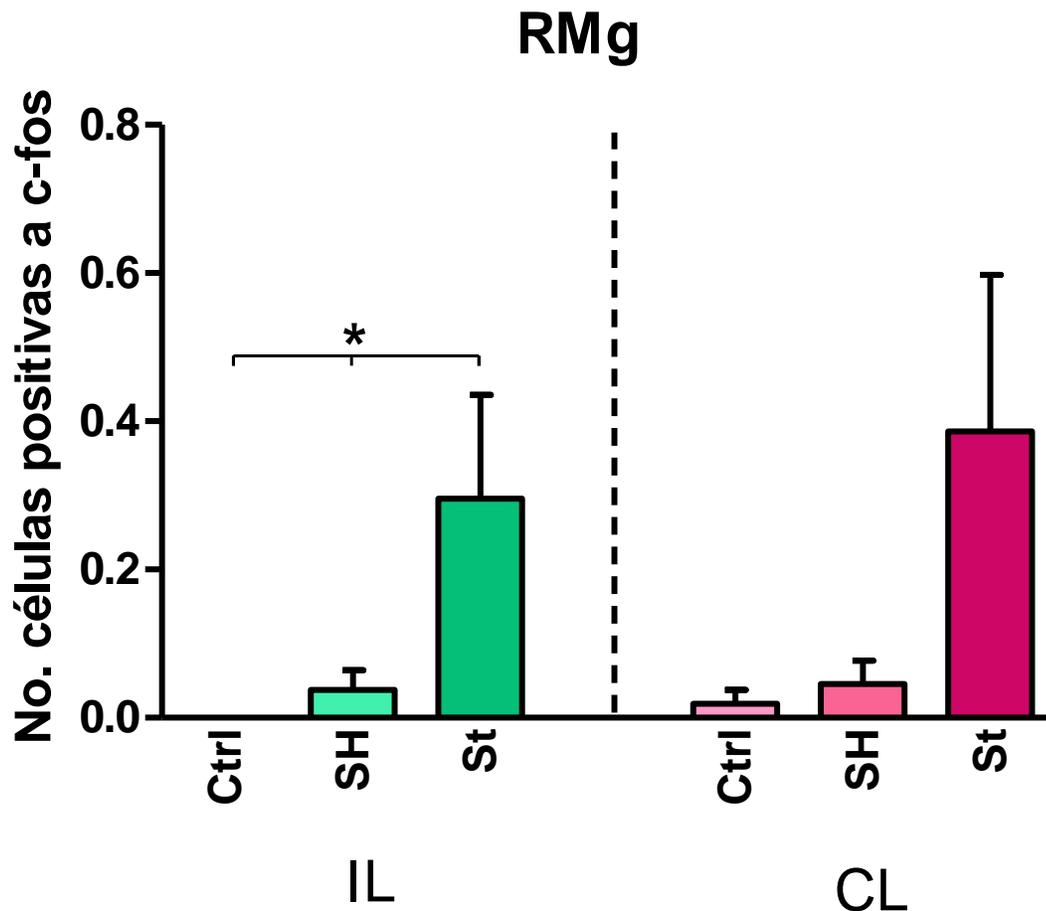


Figura 12. Análisis estadístico del conteo del RMg. Se observa en el eje x, el efecto ipsilateral (IL) y contralateral (CL), así como los diferentes grupos con los que se trabajó (Ctrl, contro; SH, falso operado; St, estimulado). En y, el número de células positivas a c-fos (\*  $p < 0.05$ ).

## 6. DISCUSIÓN

Al analizar las células positivas en el asta dorsal de la sección lumbar de la médula espinal (ME), se decidió dividir dicho análisis en láminas I–II y III–V para tener un estudio más detallado. Al hacer esto, se observó cómo en las láminas más superficiales, hay una activación claramente ipsilateral desde L2 hasta L5, que fueron los segmentos lumbares que se estudiaron. Por otra parte, en las láminas más ventrales, III – V, no se observó el mismo grado de activación, ya que sólo L3 y L5 mostraron una diferencia significativa. En el estudio del asta dorsal por completo, se vuelve a observar una clara activación ipsilateral. Esto concuerda con lo demostrado por Kabat (1935) y Magoum (1940), los cuales afirman la existencia de una vía descendente hipotalámica que llega a la médula espinal. Así mismo, Saper y col. (1976), Hosoya y Matsushita (1979) y Luiten y col. (1985) demostraron una proyección directa del NPV a la médula espinal. En 1979, Swanson y McKellar, postularon una vía paraventricular-espinal, cuyas neuronas participan en el paso de información nociceptiva ascendente a través del tracto espinotalámico, tal como fue descrito en el trabajo de Condés-Lara y col. (2007) donde demuestran que los segmentos lumbares y cervicales del asta dorsal de la médula espinal reciben proyecciones del NPV, lo que convierte esta vía descendente NPV-médula espinal en parte del sistema no específico o difuso de modulación del dolor.

La literatura describe que la estimulación eléctrica del área gris periacueductal (PAG) produce una analgesia profunda y selectiva (Reynolds, 1969). De manera adicional, otros estudios sugieren una proyección oxitocinérgica del NPV al PAG (Millan y col., 1984; Millan, 1986; 2002). En este trabajo, se optó por dividir esta área en sus diferentes regiones, para un estudio más detallado. Se observó una activación bilateral por parte de sus secciones lateral (LPAG), dorsomedial (DMPAG), dorsolateral (DLPAG) y ventrolateral (VLPAG). En la parte más anterior del PAG, la activación fue ipsilateral. Investigaciones anteriores (Beitz, 1982; Roeling y col., 1993; Yang y col., 2007) proponen una proyección del NPV al PAG y que ésta desencadena procesos de antinocicepción.

Diversos estudios han descrito una proyección directa del NPV al locus coeruleus (LC) (Swanson, 1977; Swanson y Hartman, 1980; Kobayashi y col., 1974), así como su capacidad para producir profunda antinocicepción (West y col., 1993) e inhibir actividad nociceptiva en neuronas del asta dorsal (Hodge y col., 1981). En este trabajo, la activación mostrada fue bilateral, lo que concuerda con los estudios de Jones y Gebhart (1988) en los que afirman que la estimulación del LC es efectiva tanto ipsilateral como contralateralmente, revelando una entrada bilateral al asta dorsal.

Finalmente, al analizar el núcleo magno del rafé, se observó una diferencia significativa de manera ipsilateral, sin embargo, el promedio de células encontradas es menor a uno. El RMg es una de las estructuras en las que más se ha estudiado el fenómeno de la analgesia inducida por estimulación (Villanueva y Fields, 2004), por lo que esperábamos observar una mayor densidad celular positiva a c-fos. Revisando diversos estudios relacionados con RMg y c-fos, observamos que el tiempo que dejan pasar entre la estimulación y la perfusión es mayor al nuestro; nosotros trabajamos con un período de 30 minutos, mientras que otros grupos de investigación trabajan con tiempos mayores a 1 hora, incluso mayores a 5 horas (Lkhagvasuren, 2011; Madden, 2012). Lo anterior nos hace asumir que en el RMg, el tiempo de expresión de c-fos es un poco más lento, lo cual sería bueno tomar en cuenta para futuros experimentos, ya que es de gran importancia esta estructura, pues como se mencionó anteriormente, es de las más estudiadas con respecto a su efecto analgésico inducido por estimulación, además de que se ha observado una proyección oxitocinérgica del NPV al RMg (Millan y col., 1984; Millan, 1986; 2002). Asimismo, estudios más recientes, utilizando técnicas electrofisiológicas de registros unitarios (Condés-Lara y col., 2012), sugieren una interacción entre el NPV y el RMg, la cual se lleva a cabo a través de las conexiones previamente reportadas entre el NPV, el RMg y el PAG (Geerling y col., 2010; Larsen, 1996).

Con los datos obtenidos en este trabajo, podemos concluir que el sistema de analgesia endógeno es un sistema que se activa como parte de una respuesta fisiológica de los organismos, al recibir un estímulo que tiende a dañar la integridad

del mismo (Condés-Lara y col., 2009). Lo novedoso, es el haber podido establecer una serie de activaciones, a partir del NPV con otras estructuras que son susceptibles de generar analgesia. Además de poder haber cuantificado que la vía descendente del NPV activa neuronas en la médula espinal, valorado por la presencia del c-fos. De tal suerte, que los resultados obtenidos fortalecen una hipótesis que señala que los sistemas endógenos de analgesia pueden interactuar para favorecer el efecto de supresión de la información con características de dolor. Por el contrario, se ha especulado que esta serie de interacciones, entre las estructuras implicadas en la analgesia, podría ser una redundancia funcional y a partir del presente trabajo y los reportados en la literatura (Condés-Lara y col., 2012; Rojas-Piloni y col., 2012) señalan este tipo de interacciones como importantes para asegurar una función que es la obtener un estado homeostático en el organismo.

## **7. CONCLUSIONES**

La estimulación eléctrica del NPV genera una activación ipsilateral de neuronas del asta dorsal de la ME en su segmento lumbar.

Así mismo, la estimulación eléctrica del NPV activa bilateralmente neuronas del DMPAG, LPAG, DLPAG y VLPAG. Además de activar ipsilateralmente el PAG.

El LC también presenta una activación neuronal al estimular eléctricamente el NPV, en este caso de manera bilateral.

Por último, la estimulación eléctrica del NPV, muestra una activación neuronal mínima en el RMg, predominantemente ipsilateral.

## 8. REFERENCIAS

**Almeida T**, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res.* **2004**;1000:40–56.

**Basbaum A**, Jessell T. *Principios de Neurociencia*. 4ª Ed. McGrawHill, Madrid. **2000**;472–490.

**Bandler R**, Shipley MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression?. *Trends in Neurosci.* **1994**;17:379–389.

**Beitz AJ**. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience.* **1982**;7:133–159.

**Berkowitz BA**, Sherman S. Characterization of vasopressin analgesia. *J Pharmacol Exp Ther.* **1982**;220:329–334.

**Burstein R**, Cliffer KD, Geisler GJ. Cells of origin of the spinothalamic tract in the rat. *J Comp Neurol.* **1990**;291:329–344.

**Carrive P**. The periaqueductal gray and defensive behaviour: functional representation and neuronal organization. *Brain Res.* **1993**;58:27–47.

**Clark FM**, Proudfit HK. The projection of locus coeruleus neurons to the spinal cord in the rat determined by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *Brain Res.* **1991**;538:231–45.

**Cochran BH**, Reffel AC, Stiles CD. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell.* **1983**;33:939–947.

**Condés-Lara M**, Marina-González N, Martínez-Lorenzana G, Luis Delgado O, Freund-Mercier MJ. Actions of oxitocina and interactions with glutamate on spontaneous and evoked dorsal spinal cord neuronal activities. *Brain Res.* **2003**;976:75–81.

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

**Condés-Lara M**, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J. Paraventricular hypothalamic oxytocinergic cells responding to noxious stimulation

and projecting to the spinal dorsal horn represent a homeostatic analgesic mechanism. *Eur J Neurosci.* **2009**;30:1056–1063.

**Condés-Lara M**, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Condés Diez-Martínez D, Rodríguez-Jiménez J. Functional interactions between the paraventricular hypothalamic nucleus and raphe magnus. A comparative study of an integrated homeostatic analgesic mechanism. *J Neurosci.* **2012**;209:196–207.

**Conrad LC**, Pfaff DW. Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. II. An autoradiographic study of the anterior hypothalamus. *J Comp Neurol.* **1976**;169:221–261.

**Cox VC**, Valenstein ES. Attenuation of aversive properties of peripheral shock by hypothalamic stimulation. *Science.* **1965**;149:323–325.

**Doucet JP**, Squinto SP, Bazan NG. Fos-Jun and the primary genomic response in the nervous system. *Molecular Neurobiology.* **1990**;27–55.

**Farkas E**, Jansen A, Loewy A. Periaqueductal gray matter input to cardiac-related sympathetic premotor neurons. *Brain Res.* **1998**;792:179–192.

**Fields HL**, Heinricher MM. Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Science.* **1985**;308:361–374.

**Fürst S**. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res.* **1999**;48,2:129–141.

**Geerling JC**, Shin JW, Chimenti PC, Loewy AD. Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *J Comp Neurol.* **2010**;518:1460–1499.

**Grelik C**, Allard S, Ribeiro-da-Silva A. Changes in nociceptive sensory innervation in the epidermis of the rat lower lip skin in a model of neuropathic pain. *Neurosci Lett.* **2005**;389:140–5.

**Hains BC**. *Pain*. 1° edición. Nueva York: Chelsea House, **2007**;8–18.

**Harris JA**. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res.* **1998**;45:1–8.

**Heinricher MM**, Kaplan HJ. GABA-mediated inhibition in rostral ventromedial medulla: role in nociceptive modulation in the lightly anesthetized rat. *Pain.* **1991**;47:105–113.

**Heinricher** MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev.* **2009**;60:214–225.

**Herdegen** T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res.* **1998**;28:370–490.

**Hodge** Jr CJ, Apkarian AV, Stevens R, Vogelsang G, Wisnicki HJ. Locus coeruleus modulation of dorsal horn unit responses to cutaneous stimulation. *Brain Res.* **1981**;204:415–20.

**Hohmann** AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, Krey JF, Walker JM, Holmes PV, Crystal JD, Duranti A, Tontini A. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature.* **2005**;435:1108–1112.

**Hosoya** Y, Matsushita M. Identification and distribution of the spinal and hypophyseal projection neurons in the paraventricular nucleus of the rat. A light and electron microscopic study with the horseradish peroxidase method. *Exp Brain Res.* **1979**;35:315–331.

**Hunt** SP, Pini, A.; Evan, G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature.* **1987**;328:632–634.

**Jones** SL, Gebhart GF. Inhibition of spinal nociceptive transmission from the midbrain, pons and medulla in the rat: activation of descending inhibition by morphine, glutamate and electrical stimulation. *Brain Res.* **1988**;460:281–96.

**Kabat** H, Magoum HW, Ranson SW. Electrical stimulation of points in the forebrain and midbrain. The resultant alteration in blood pressure. *Arch Neurol Psychiatry.* **1935**;34:931–940.

**Kandel** ER, Schwarts JH, Jessell TM. *Principios de Neurociencia.* 4<sup>a</sup> Ed. McGrawHill, Madrid. **2000.** 460.

**Kobayashi** RM, Palkovits M, Kopin IS, Jacobowitz DM. Biochemical mapping of noradrenergic nerves arising from the rat locus coeruleus. *Brain Res.* **1974**;77:269–279.

**Larsen** PJ, Hay-Schmidt A, Vrang N, Mikkelsen JD. Origin of projections from the midbrain raphe nuclei to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat: a combined retrograde and anterograde tracing study. *J Neurosci.* **1996**;70:963–988.

**Leith** JL, Wilson AW, Donaldson LF, Lumb BM. Cyclooxygenase-1-derived prostaglandins in the periaqueductal gray differentially control C- versus A-fiber-evoked spinal nociception. *J Neurosci.* **2007**;27:11296–11305.

**Lkhagvasuren** B, Nakamura Y, Oka T, Sudo N, Nakamura K. social defeat stress induces hyperthermia through activation of thermoregulatory sympathetic premotor neurons in the medullary raphe region. *Eur J Neurosci.* **2011**;34:1442–1452.

**Luiten** PG, ter Horst GJ, Karst H, Steffens AB. The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord. *Brain Res.* **1985**;329:374–8.

**Madden** CJ. Glucoprivation in the ventrolateral medulla decreases brown adipose tissue sympathetic nerve activity by decreasing the activity of neurons in raphe pallidus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **2012**;302:224–232.

**Magoun** HW. Descending connections from the hypothalamus. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* **1938**;2:270–285.

**Millan** MJ, Schmauss C, Millan MH, Herz, A. Vasopressin and oxytocin in the rat spinal cord: analysis of their role in the control of nociception. *Brain Res.* **1984**;309:384–388.

**Millan**, MJ. Multiple opioid systems and pain. *Pain.* **1986**;27:303–347.

**Millan**, MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiology.* **2002**;66:355–474.

**Oliveras** JL, Besson JM. Stimulation-produced analgesia in animals: behavioral investigations. *Progress in Brain Res.* **1988**;77:141–157.

**Palkovits**, M. Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. *Front Neuroendocrinol.* **1999**;20:270–295.

**Paul** J, Zeilhofer HU, Fritschy JM. Selective distribution of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes in mouse spinal dorsal horn neurons and primary afferents. *J Comp Neurol.* **2012**;520:3895–3911.

- Paxinos G.** The rat nervous system. London: Academic Press. **1985**.
- Paxinos G, Watson C.** The rat brain in stereotaxic coordinates. London: Academic Press. **1998**.
- Price DD, Mao J, Mayer DJ.** Central neural mechanisms of normal and abnormal pain states. Pharmacological Approaches to the treatment of chronic pain, new concepts and critical issues. **1994**;61–84.
- Purves D.** Neuroscience. 3<sup>o</sup> edición. Sunderland: Sinauer Associates, **2004**;209–228.
- Ren K, Dubner R.** Descending modulation in persistent pain: an update. Pain. **2002**;100:1–6.
- Reynolds DV.** Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. Science. **1969**;164:444–445.
- Rhodes DL, Liebeskind JC.** Analgesia from rostral brain stem stimulation in the rat. Brain Res. **1978**;143:521–532.
- Roeling TA, Veening JG, Peters JP, Vermelis ME, Nieuwenhuys R.** Efferent connections of the hypothalamic “grooming area” in the rat. Neuroscience. **1993**;56:199–225.
- Rojas-Piloni G, Rodríguez-Jiménez J, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M.** Dorsal horn antinociception mediated by the paraventricular hypothalamic nucleus and locus coeruleus: A comparative study. Brain Research. **2012**;1461:41–50.
- Saper CB, Loewy AD, Swanson LW, Cowan WM.** Direct hypothalamo-autonomic connections. Brain Res. **1976**;117:305–12.
- Sherlock DA, Field PM, Raisman G.** Retrograde transport of horseradish peroxidase in the magnocellular neurosecretory system of the rat. Brain Res. **1975**;88:403–414.
- Swanson LW.** Immunohistochemical evidence for a neurophysin-containing autonomic pathway arising in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Brain Res. **1977**;128:346–353.

**Swanson** LW, McKellar S. The distribution of oxytocin and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. *J Comp Neurol.* **1979**;188:87–106.

**Swanson** LW, Hartman BK. Biochemical specificity in central pathways related to peripheral and intracerebral homeostatic functions. *Neurosci Lett.* **1980**;16:55–60.

**Vandesande** F, Dierickx K. Immunocytochemical localization of the vasopressinergic and the oxytocinergic neurons in the human hypothalamus. *Cell Tissue.* **1977**;184:15–27.

**Villanueva** L, Fields H. *The Pain System in Normal and Pathological States: A Primer for Clinicians.* 1a edición. Seattle: IASP Press. **2004**;223–243.

**West** WL, Yeomans DC, Proudfit HK. The function of noradrenergic neurons in mediating antinociception induced by electrical stimulation of the locus coeruleus in two different sources of Sprague–Dawley rats. *Brain Res.* **1993**;626:127–135.

**Yang** J, Yang Y, Chen M, Xu HT, Liu WY, Lin BC. Arginine vasopressin in periaqueductal gray, which relates to antinociception, comes from hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Neurosci Lett.* **2007**;412:154–158.