



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Modulación dopaminérgica de la información propioceptiva en la  
médula espinal del ratón”**

**TESIS**

**que presenta**

Lic. en Opt. Jonathan Jair Milla Cruz

**Para obtener el Grado de  
Maestro en Ciencias  
en la especialidad de:  
Neurobiología Celular y Molecular**

**Director de la Tesis:  
Dr. Jorge Noel Quevedo Durán**

México, Distrito Federal

Agosto 2015

## **Agradecimientos**

A mis padres, por todo el apoyo, sabiduría y amor incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida. Gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí.

A mis maestros, por las enseñanzas, la paciencia y dedicación que han puesto a mi formación.

Al CONACYT, por el apoyo económico brindado en el transcurso de la maestría.

# Índice

	Página
I. Resumen	10
II. Introducción	13
1. Inhibición presináptica asociada a la despolarización de aferentes primarias	14
1.1. Inhibición presináptica	14
1.2. Potencial de raíz dorsal y su relación con la inhibición presináptica	19
1.3. Mecanismos implicados en la despolarización de aferentes primarias	21
1.4 Organización funcional de la inhibición presináptica	23
2. Monoaminas: Su papel modulador en la inhibición presináptica asociada a PAD	29
2.1. Efectos de las monoaminas en la médula espinal	29
2.2. El papel neuromodulador de la DA en la médula espinal	31
2.3. Clasificación de los receptores dopaminérgicos	35
2.4. Proyecciones dopaminérgicas hacia la médula espinal y localización de los receptores a DA	37
III. Planteamiento del problema y objetivos	43
IV. Métodos	46
1. Preparación	46
2. Estimulación y registro	47
3. Protocolo para estimar la depresión homosináptica	48
4. Control de corriente y voltaje en la configuración de célula entera (“whole cell clamp”)	49
5. Fármacos	51
V. Resultados	52
1. Registro de los EFPs producidos por la estimulación de aferentes de	52

bajo umbral a distintas profundidades en el asta dorsal	
2. Registro de los EFPs y DRPs producidos por la estimulación del nervio tibial con intensidades de estimulación graduadas	54
3. Efecto de la DA sobre los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral	56
4. Curso temporal de los efectos de la DA sobre los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral	57
5. Eficacia de la DA en la depresión de los DRPs	59
6. Efecto de algunos agonistas de los receptores a DA sobre los EFPs y DRPs	62
7. Efecto de la DA sobre el potencial de DC y la excitabilidad de las fibras aferentes de bajo umbral	64
8. Efecto de la DA sobre la depresión homosináptica de los EFPs y DRPs, producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas	65
9. Eficacia del agonista de los receptores <i>D<sub>2</sub>-like</i> , quinpirol, sobre la depresión de los DRPs	70
10. Efecto de la DA sobre las propiedades de membrana de las interneuronas del asta dorsal registradas en la configuración de célula entera	72
11. Efecto de la DA sobre los potenciales (EPSPs) y corrientes (EPSCs) postsinápticos excitadores	75
VI. Discusión	77
VII. Conclusiones	84
Perspectivas a largo plazo	84
VIII. Referencias	86

## Índice de figuras

	Página
1. Depresión de los EPSPs monosinápticos del grupo Ia producida por la estimulación condicionante de aferentes flexoras a través de un mecanismo de inhibición presináptica	15
2. Inhibición diferencial de los EPSPs producidos por la estimulación de fibras Ia y fibras descendentes	16
3. Micrografía electrónica de un botón sináptico a nivel espinal	17
4. La estimulación condicionante de nervios flexores produce una depresión concomitante de las salvas aferentes y de los EPSPs	18
5. Potenciales de raíz dorsal producidos por la estimulación de aferentes cutáneas y raíces dorsales adyacentes	20
6. Representación esquemática de una sinapsis axoaxónica GABAérgica	22
7. Inhibición presináptica producida por la activación de distintos tipos de fibras aferentes musculares sobre los EPSPs registrados en motoneuronas extensoras	24
8. Fibras aferentes musculares del grupo I que producen y que reciben inhibición presináptica asociada a la PAD	25
9. Organización funcional de la inhibición presináptica relacionada con la PAD	27
10. Efecto de la ablación genética selectiva de las interneuronas responsables de la inhibición presináptica que expresan la enzima GAD2	28
11. Efecto modulador de las monoaminas y de la acetilcolina sobre los EPSPs registrados en interneuronas del asta dorsal en rebanadas de médula espinal de rata neonata	30
12. Acciones moduladoras de las monoaminas sobre los DRPs producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral en el nervio tibial	31
13. Modulación dopaminérgica de las respuestas reflejas producidas por la estimulación del nervio esplácnico	32
14. Efecto de la aplicación iontoforética de dopamina (DA) y sus agonistas sobre los potenciales extracelulares (EFPs) de campo registrados en la zona intermedia de la médula espinal del gato	34
15. Efecto de la DA sobre los potenciales de acción y EPSPs producidos por	35

la estimulación de la raíz dorsal	
16. Distribución de los grupos celulares dopaminérgicos en el cerebro de roedor adulto	39
17. Neuronas del grupo A11 positivas a tirosina hidroxilasa (TH+) que proyectan a la médula espinal en el ratón	40
18. Efecto antinociceptivo de la DA en neuronas de la sustancia gelatinosa de la médula espinal den la rata	41
19. Distribución de los receptores a dopamina (D <sub>1</sub> -D <sub>5</sub> ) en la médula espinal del ratón	42
20. Diagrama y fotografía del arreglo experimental de la médula espinal aislada del ratón neonato	48
21. Protocolo de pulsos pareados para evaluar la depresión homosináptica	49
22. Con una intensidad de estimulación 2 xU se reclutan solamente fibras aferentes mielinizadas	53
23. Potenciales de raíz dorsal (DRPs) y potenciales extracelulares de campo (EFPs) registrados a distintas profundidades en el asta dorsal de la médula espinal del ratón, producidos por la estimulación del nervio tibial (Tib)	54
24. Potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación del nervio tibial (Tib) con distintas intensidades	55
25. La DA deprime los potenciales de raíz dorsal (DRPs) pero no los potenciales extracelulares de campo (EFPs) evocados por la estimulación de fibras de bajo umbral del nervio tibial (Tib)	56
26. Resumen de los efectos de la DA sobre los potenciales de raíz dorsal (DRPs) y los potenciales extracelulares de campo (EFPs) evocados por la estimulación de fibras de bajo umbral del nervio tibial (Tib)	57
27. Curso temporal de los efectos de la DA sobre los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y los potenciales de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación del nervio tibial (Tib)	58
28. La DA deprime los DRPs en una manera dependiente de la concentración	60
29. Efecto del metabisulfito (MBS) de sodio al 0.1 % sobre la eficacia de la DA en la depresión de los DRPs	61

30.	Efecto de los agonistas dopaminérgicos sobre los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs)	63
31.	Resumen de los efectos del agonista <i>D<sub>2</sub>-like</i> , quinpirol, sobre los potenciales de raíz dorsal (DRPs) y los potenciales extracelulares de campo (EFPs) evocados por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral del nervio tibial (Tib)	64
32.	La DA no modifica el potencial DC registrado en las raíces dorsales ni la amplitud del potencial compuesto antidrómico (CAP) producido por la microestimulación intraespinal	65
33.	Depresión homosináptica de los EFPs y DRPs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas	67
34.	Efecto de la DA sobre la depresión homosináptica de los EFPs y DRPs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas	69
35.	Curso temporal de la depresión homosináptica de los EFPs y DRPs evocados por la estimulación de fibras aferentes homónimas del nervio Tib 2 xU	70
36.	El quinpirol deprime los DRPs en una manera dependiente de la concentración, de manera similar a la DA	71
37.	Protocolo de pulsos de corriente para evaluar las propiedades de membrana de las interneuronas registradas en la modalidad de célula entera	73
38.	Gráfica que resume los efectos de la DA sobre las propiedades de membrana de interneuronas registradas en el asta dorsal	74
39.	Efecto de la DA sobre los EPSPs y EPSCs producidos por la estimulación de aferentes mielinizadas del nervio Tib	76
40.	Posible distribución de los receptores de la familia <i>D<sub>2</sub>-like</i> en las interneuronas que median la PAD de las fibras aferentes mielinizadas	83

## Índice de Tablas

	Página
1. Incidencia de neuronas que presentaron depresión y/o facilitación en la amplitud de los EPSPs por la aplicación de 5-HT, NA, DA y ACh	30
2. Constantes de afinidad (pKi) de algunos agonistas y antagonistas de los receptores dopaminérgicos	37
3. Depresión homosináptica promedio de los EFPs y DRPs, registrados en condición control y tras la aplicación de DA (10 $\mu$ M), a los distintos intervalos de tiempo entre estímulos mostrados	68
4. Propiedades de membrana de las interneuronas registradas en el asta dorsal de la médula espinal del ratón, tras la aplicación de DA	74
5. Efecto de la DA sobre los EPSPs, EPSCs y DRPs registrados en las interneuronas del asta dorsal de la médula espinal del ratón	76



## Abreviaturas

cAMP	Adenosín monofosfato- 3', 5' cíclico
CAP	Potencial de acción compuesto
CPG	Centro generador de patrones
DA	Dopamina
DC	Corriente directa
DRG	Ganglio de la raíz dorsal
DRP	Potencial de raíz dorsal
DRR	Reflejo de raíz dorsal
EFP	Potencial extracelular de campo
EPSP	Potencial postsináptico excitador
FDHL	Flexor digitorum longus y flexor hallucis longus
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GS	Gastrocnemio y sóleo
IEE	Intervalo entre estímulos
IPSP	Potencial postsináptico inhibitor
LCR	Líquido cefalorraquídeo
NA	Noradrenalina / norepinefrina
PAD	Despolarización de aferentes primarias
PBSt	Bíceps posterior y semitendinoso
SMAB	Bíceps anterior y semimembranoso
SP	Peroneo superficial
sVRP	Potenciales lentos de raíz ventral
TIB	Tibial
VRP	Potencial de raíz ventral
xU	Veces por umbral
5-HT	5-Hidroxitriptamina / Serotonina

## I. Resumen

La dopamina (DA) es un neuromodulador muy importante en el sistema nervioso central de los mamíferos. En la médula espinal la DA juega un papel fundamental en el control de la información nociceptiva y de la actividad motriz. Sin embargo, se conoce poco acerca de su papel en el control de la información no nociceptiva (cutánea y propioceptiva). El objetivo de la presente tesis fue examinar los efectos de la DA sobre la vías interneuronales que median la despolarización de aferentes primarias (PAD), producida por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral (mielinizadas), e investigar los subtipos de receptores a DA involucrados. Los experimentos se realizaron en la médula espinal lumbar de ratón neonato (P6), hemiseccionada sagitalmente y con nervios periféricos en continuidad, los cuales se estimularon con intensidades basadas en múltiplos del umbral (xU) de las fibras más excitables (usualmente  $\leq 2$  xU), a 200  $\mu$ s y con una frecuencia de 0.1 Hz. La PAD, asociada a la inhibición presináptica, fue inferida a partir de los potenciales de raíz dorsal (DRPs) registrados en las raíces dorsales L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub>, y la transmisión sináptica de las fibras aferentes a partir del componente monosináptico de los potenciales extracelulares de campo (EFPs), o de los potenciales (EPSPs) o corrientes (EPSCs) postsinápticos excitadores registrados en interneuronas del asta dorsal profunda de la médula espinal. La eficacia sináptica de las fibras aferentes fue estimada a partir de la depresión de los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de las fibras aferentes homónimas. La excitabilidad de las fibras aferentes se evaluó mediante la técnica de Wall. La DA (1-10  $\mu$ M) deprimió los DRPs en 44.1% respecto al control, sin afectar el componente monosináptico de los EFPs ni la depresión homosináptica. La depresión de los DRPs fue mimetizada por el agonista de los receptores dopaminérgicos de la familia D<sub>2</sub>-like, quinpirol (1-10  $\mu$ M), al deprimir los DRPs en 32.2% respecto al control, sin efecto sobre los EFPs. En cambio, el agonista de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>-like, SKF-38393 (10  $\mu$ M), no produjo un efecto significativo sobre los DRPs o EFPs. La DA deprimió las EPSCs monosinápticas registradas en interneuronas del asta dorsal sin afectar el componente monosináptico de los EPSPs, ni las propiedades de membrana de las

interneuronas registradas. Ni la DA ni el quinpirol afectaron la excitabilidad de las fibras aferentes. En conclusión, nuestros resultados sugieren que la DA deprime los DRPs mediante la activación de receptores de la familia *D<sub>2</sub>-like*. Puesto que la transmisión monosináptica de las fibras aferentes mielinizadas no fue afectada por la DA o el quinpirol, se propone que la depresión de los DRPs se debe a una reducción de la excitabilidad de las vías neuronales que median la PAD.

## Abstract

Dopamine (DA) is a very important neuromodulator in the mammalian central nervous system. At the spinal cord level DA plays a fundamental role in the control of nociceptive information and motor behavior. The aim of this thesis was to examine the effect of DA on neuronal pathways mediating primary afferent depolarization (PAD), produced by stimulation of low-threshold (myelinated) afferent fibers, and to investigate the DA receptor subtypes involved. Experiments were carried out in the sagittal hemisected spinal cord of 6 days-old mice. Dorsal and ventral roots were maintained in continuity with sciatic nerve branches. Stimulation intensities were based on threshold multiples ( $xT$ ) from the most excitable afferent fibers (usually  $\leq 2 xU$ ), 200  $\mu s$  and 0.1 Hz frequency. PAD, associated to presynaptic inhibition, was inferred from recorded dorsal root potential (DRPs) in dorsal root  $L_3$ - $L_4$ . Monosynaptic transmission of afferent fibers was inferred from the monosynaptic component of extracellular field potentials (EFPs), or from excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) or currents (EPSCs) recorded in deep dorsal horn interneurons in the same segments. Synaptic efficacy was estimated from the homosynaptic depression of EFPs and DRPs produced by the stimulation of homonymous afferents. Excitability of afferent fibers was assessed by means of Wall's technique. DA (1-10  $\mu M$ ) depressed DRPs 44.1% of control, with no effect on the monosynaptic component of EFPs or the homosynaptic depression. The depressant effect of DRPs produced by DA was mimicked by the dopaminergic  $D_2$ -like receptor agonist, quinpirole (1-10  $\mu M$ ) (-32.2% of control), with no effect on EFPs. In contrast, the dopaminergic  $D_1$ -like receptor agonist, SKF-38393 (10  $\mu M$ ), produced no significant changes on DRPs or EFPs. DA depressed EPSCs recorded in deep dorsal horn interneurons with no significant effect on EPSPs amplitude, or interneuron membrane properties. Neither DA nor quinpirole affected the excitability of afferent fibers. In conclusion, our results suggest that DA depresses low threshold-evoked DRPs by activation of the  $D_2$ -like receptor family. Since neither DA nor quinpirole affected the synaptic efficacy of myelinated afferent fibers, it is proposed that depression of DRPs by DA is due to a reduction in the excitability of neuronal pathways mediating PAD.

## II. Introducción

La médula espinal constituye un punto crítico de neuromodulación dado que es el sitio en el que se establece contacto entre las aferencias sensoriales y el sistema nervioso central. A este respecto, los sistemas monoaminérgicos supraespinales juegan un rol fundamental en la modulación de diversas funciones espinales. Se ha observado que las vías monoaminérgicas descendentes, clasificadas de acuerdo al fenotipo de neuromodulador liberado [dopaminérgicas (DA), serotoninérgicas (5-HT) y noradrenérgicas (NA)], están implicadas en la regulación de una amplia variedad de funciones, tales como la locomoción, la antinocicepción y la regulación de la transmisión sináptica de las fibras aferentes somáticas y viscerales, entre otras (Bras et al., 1989; Fleetwood-Walker, 1988; García-Ramírez et al., 2014; Garraway y Hochman, 2001; Millan, 2002; Zimmerman et al., 2012).

Se ha propuesto que la neuromodulación monoaminérgica a nivel espinal es un proceso sumamente diferenciado (Garraway y Hochman, 2001), el cual se encuentra ligado a los distintos subtipos de receptores a monoaminas, a sus mecanismos y sitios de acción (presinápticos y postsinápticos), así como a las afinidades que presentan los receptores para cada una de las monoaminas (Bras et al., 1989; Christie, Whelan, 2005; Curtis, Leah, et al., 1983; Engberg y Ryall, 1966; García-Ramírez et al., 2014; Jankowska y Hammar, 2000; Ridet et al., 1992).

Uno de los mecanismos de carácter inhibitorio más importantes sobre la información sensorial es el control de la transmisión sináptica de las fibras aferentes primarias a través de un mecanismo de inhibición presináptica asociada a la despolarización de aferentes primarias (*primary afferent depolarization*, o PAD; por sus siglas en inglés) (Eccles, et al., 1962b; Eccles, et al., 1962c; Zimmerman et al., 2012). Sin embargo, en la actualidad, poco se sabe sobre la

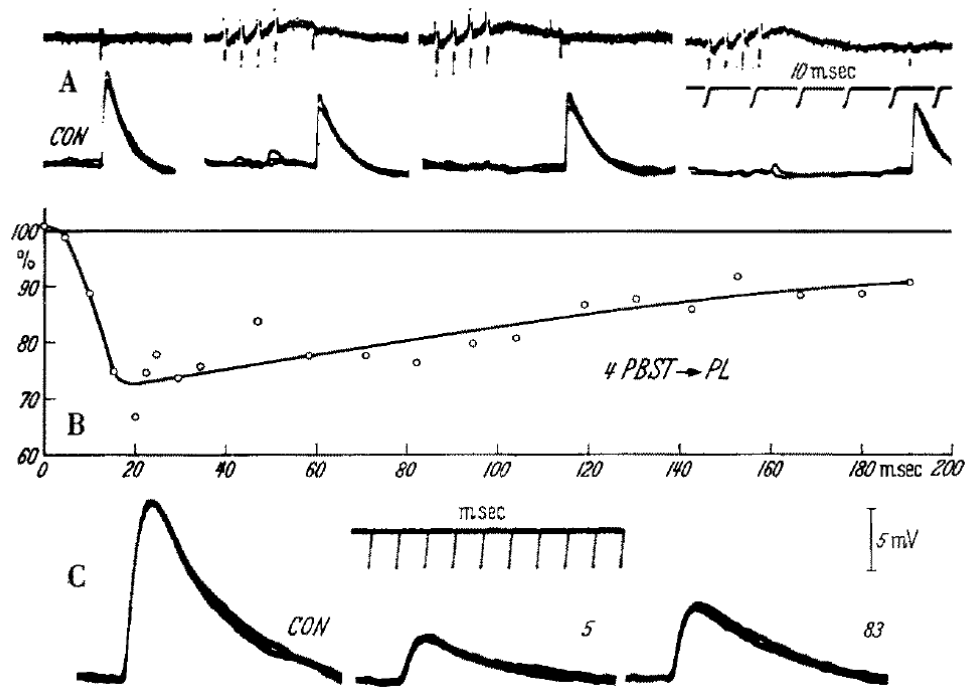
modulación monoaminérgica de las vías neuronales que median la inhibición presináptica asociada a la PAD.

### *1. Inhibición presináptica asociada a la despolarización de aferentes primarias*

#### *1.1 Inhibición presináptica*

La información sensorial proveniente de las fibras aferentes somáticas (cutáneas y propioceptivas) y viscerales es regulada a nivel de la médula espinal mediante mecanismos tanto presinápticos como postinápticos (Garraway y Hochman, 2001; Jankowska y Hammar, 2000; Millan, 2002; Rudomin y Schmidt, 1999; Zimmerman et al, 2012). Uno de estos mecanismos involucra interneuronas GABAérgicas localizadas en las láminas intermedias y en el asta dorsal de la médula espinal, las cuales establecen sinapsis GABAérgicas axoaxónicas sobre las terminales de las fibras aferentes, y cuya activación conduce a una reducción de la efectividad sináptica de estas terminales (Eccles, et al., 1962a; Eccles, et al., 1962c; Jankowska, McCrea, et al., 1981). A este mecanismo inhibitorio de control de la información sensorial se le conoce como inhibición presináptica. Los trabajos pioneros realizados por Frank y Fuortes (1957) constituyen la evidencia clásica de la inhibición presináptica, ya que en ellos se describe la depresión de los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) monosinápticos producidos por la estimulación de fibras aferentes musculares del grupo Ia en motoneuronas espinales (Figura 1), al aplicar una estimulación condicionante a fibras aferentes de músculos flexores. Esta depresión ocurre en ausencia de cambios en el potencial de membrana en reposo o en la excitabilidad de las motoneuronas (Eccles, et al., 1961a; Frank y Fuortes, 1957). Las observaciones de Eccles, Lundberg y colaboradores mostraron, además, que la depresión de los EPSPs ocurre sin cambios en la invasión del potencial antidrómico en la motoneurona, ni en la amplitud ni en el curso temporal de los EPSPs monosinápticos producidos por la estimulación de fibras descendentes (Eccles, et al., 1961a; Eide, Lundberg, 1968), lo que fue validado posteriormente por Rudomin y colaboradores (1991)

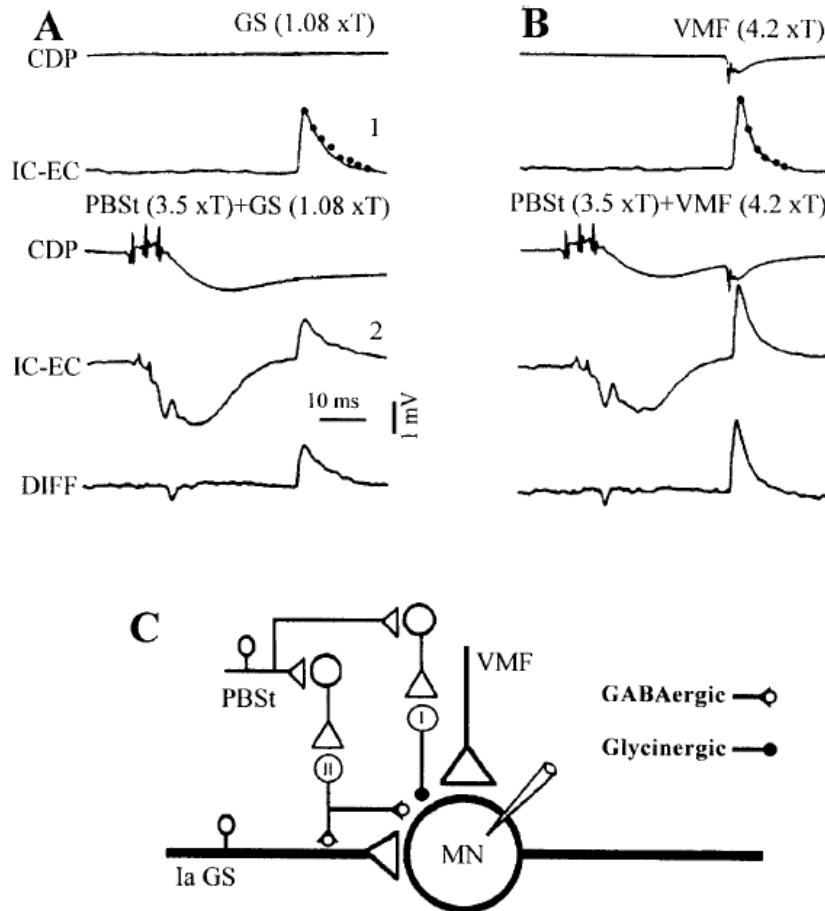
(Figura 2). No obstante, se llegó a proponer la posibilidad de mecanismos inhibitorios postsinápticos en un sitio alejado del soma, como es el caso de las dendritas distales de las motoneuronas, los cuales no serían fácilmente detectados por un microelectrodo intracelular a nivel del soma. Por esta razón, Frank (1959) denominó a este fenómeno “inhibición remota”.



**Figura 1. Depresión de los EPSPs monosinápticos del grupo Ia producida por la estimulación condicionante de aferentes flexoras a través de un mecanismo de inhibición presináptica. A)** EPSPs control (CON) registrados en una motoneurona del nervio plantaris (PL) (estímulo de prueba) y depresión asociada a la estimulación previa del nervio flexor, bíceps posterior y semitendinoso, con cuatro pulsos (4PBSt; estimulación condicionante), precediendo al estímulo de prueba con diferentes intervalos. Los trazos superiores corresponden al registro de la salva aferente en el dorso de la médula (la positividad se muestra hacia arriba en ambos trazos). **B)** Curso temporal de la depresión de los EPSPs (expresada como porcentaje de la amplitud control) para los registros mostrados en A. **C)** EPSPs control (CON) y depresión de los mismos cuando fueron precedidos con estimulación condicionante de aferentes flexoras del grupo I con un intervalo de 5 y 83 ms (datos de otro experimento) (Eccles, et al., 1961a).

La depresión de los EPSPs producida por la estimulación condicionante de aferentes flexoras ocurre sin cambios en la fase de decaimiento, lo que implica que no se producen cambios en la resistencia de membrana a nivel postsináptico (Eccles, et al., 1961a). Sin embargo, estudios posteriores mostraron que se

pueden detectar cambios en la pendiente de decaimiento de los EPSPs cuando ocurre una interacción EPSPs/IPSPs en las dendritas distales de la motoneurona, es decir, cuando existe una inhibición postsináptica remota (Cook y Cangiano, 1972; Eide, Lundberg, 1968; Rudomin, Núñez et al, 1974). A este respecto, se ha propuesto que una misma interneurona puede producir inhibición presináptica y postsináptica en las motoneuronas espinales (Figura 2C) (Rudomin, 1992).

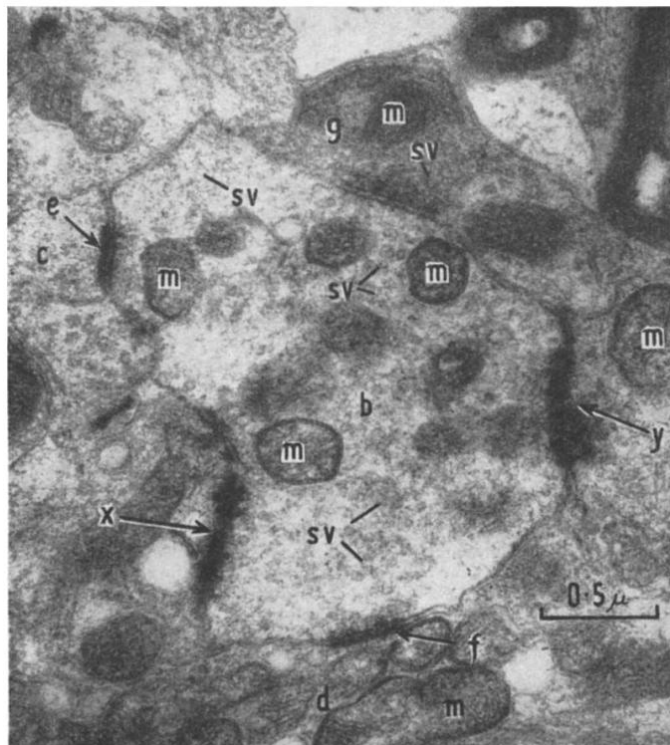


**Figura 2. Inhibición diferencial de los EPSPs producidos por la estimulación de fibras Ia y fibras descendentes.** **A)** Efecto de la estimulación condicionante del nervio bíceps posterior y semitendinoso (PBSt) sobre los EPSPs producidos por la estimulación de fibras Ia del nervio gastrocnemio (GS). *CDP*, potencial del dorso de la médula. *IC-EC*, potencial intracelular registrado en una motoneurona menos el potencial de campo extracelular. *Diff*, EPSPs producidos por la estimulación de fibras Ia y precedidos por la estimulación condicionante, obtenidos tras la sustracción del trazo 2. **B)** Efecto de la misma estimulación condicionante del nervio PBSt sobre los EPSPs producidos por la estimulación del fascículo ventro-medial (*VMF*). **C)** Diseño experimental y vías neuronales que median la inhibición pre y postsináptica. La inhibición presináptica es mediada por interneuronas GABAérgicas de último orden (II) que hacen contacto sináptico con las terminales Ia del nervio GS, y probablemente con las motoneuronas. En cambio, la inhibición postsináptica es mediada por interneuronas glicinérgicas (I) (Rudomin, Jiménez, et al., 1991; Rudomin 1992).



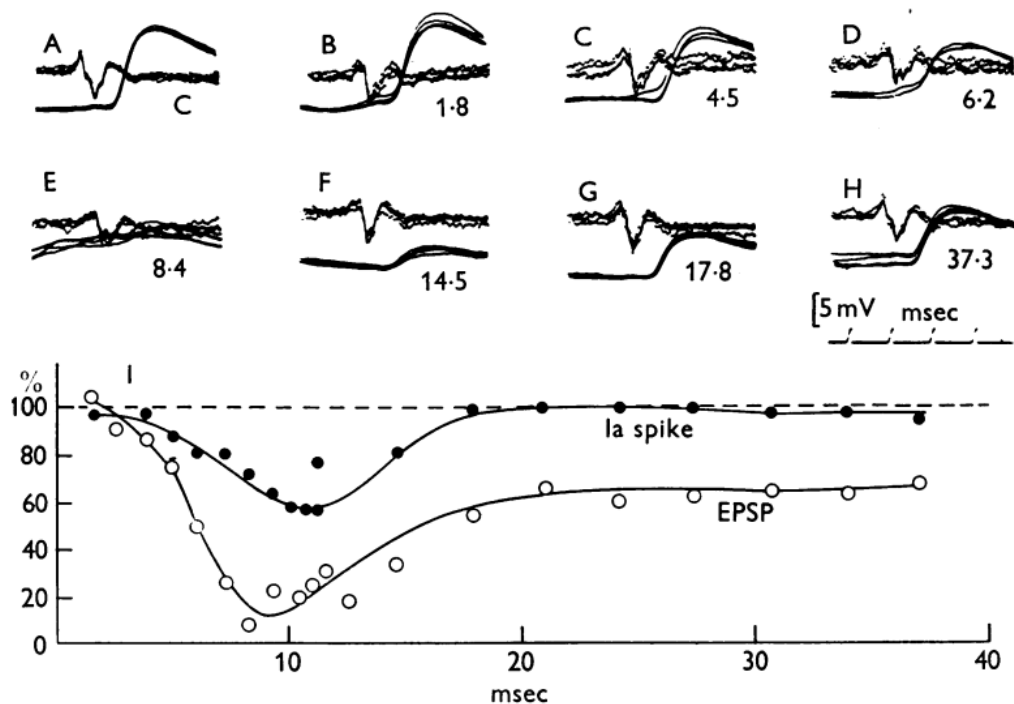
En 1990 el grupo de McCrea (McCrea, Schefchyk, et al., 1990) señaló que la reducción en la amplitud de los EPSPs monosinápticos, producida por la estimulación condicionante de aferentes flexores con intensidades de estimulación para activar fibras del grupo I, no podría explicarse por un incremento de conductancias postsinápticas en las motoneuronas. Por consiguiente, la ausencia de depresión de los EPSPs de origen supraespinal por la acción de un estímulo condicionante que deprime los EPSPs de las fibras Ia, sin cambios en su curso temporal, apoya el origen presináptico de la depresión de los EPSP Ia.

El concepto de inhibición presináptica se sustentó, adicionalmente, por la evidencia de sinapsis axoaxónicas en el núcleo motor de la médula espinal (Gray, 1962; Lamotte, Destombes et al 1997; Lamotte d'Incamps et al, 1998) (Figura 3), así como por el descubrimiento de la inhibición presináptica en la unión neuromuscular del cangrejo de río, producida por una despolarización de las terminales sinápticas (Dudel y Kuffler, 1960).



**Figura 3. Micrografía electrónica de un botón sináptico a nivel espinal.** Botón sináptico en la médula espinal del gato (b) recibiendo contactos axoaxónicos por otro botón sináptico (g). Se puede apreciar la hendidura sináptica entre el botón presináptico y la terminal axónica (Gray, 1962).

Eccles y colaboradores fueron los pioneros en establecer una asociación entre la inhibición presináptica de los EPSPs producidos por la estimulación de fibras Ia y la despolarización de las terminales presinápticas (Figura 4) (Eccles, et al., 1961a; 1962b). Estos investigadores postularon que la despolarización presináptica (despolarización de aferentes primarias, PAD) es la responsable de la depresión de los EPSPs, a través de un efecto inhibitor sobre los potenciales de acción presinápticos que arriban a las terminales aferentes (salvas aferentes), ocasionando una disminución en la cantidad de neurotransmisor liberado por las mismas.

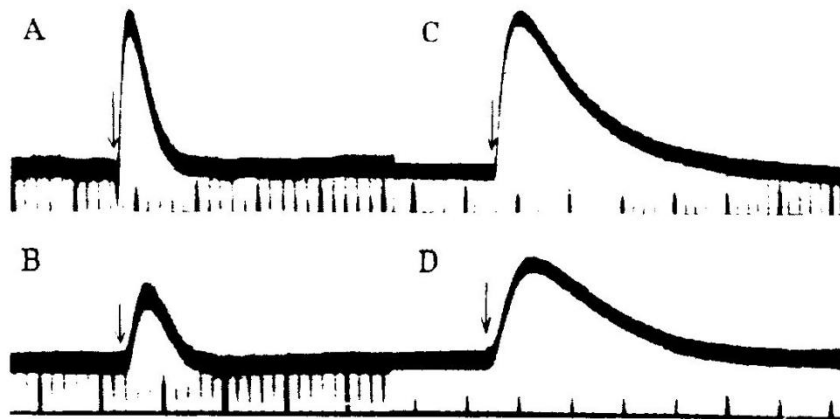


**Figura 4. La estimulación condicionante de nervios flexores produce una depresión concomitante de las salvas aferentes y de los EPSPs. A-H).** Registros intracelulares (trazo inferior) de los EPSPs monosinápticos en motoneuronas del gastrocnemio. Las salvas aferentes (trazo superior), producidas por la estimulación del nervio gastrocnemio fueron registradas en la entrada de la raíz dorsal L7. La negatividad se muestra como una deflexión hacia abajo. **A)** EPSPs control, **B-H)** EPSPs precedidos por la estimulación condicionante de fibras del grupo Ia del nervio PBSt, a los intervalos mostrados. En I se grafica la amplitud de los EPSPs como porcentajes del valor control (círculos blancos) y la amplitud de la salva aferente (Ia spike) producida por la estimulación del nervio gastrocnemio (círculos negros). La amplitud de la salva aferente se midió del pico positivo al pico negativo y se muestran como porcentaje del valor control. La depresión de las salvas aferentes se atribuye a la inhibición del potencial de acción que llega a las terminales debido a la despolarización de las mismas (Eccles, et al., 1961a).

## 1.2 Potencial de raíz dorsal y su relación con la inhibición presináptica

Antes de establecer la asociación entre la despolarización presináptica y la depresión de los EPSPs registrados en motoneuronas, por Eccles y colaboradores, el interés por conocer el mecanismo involucrado en la generación de la PAD y su posible relación con la inhibición presináptica, condujo al planteamiento de diversas hipótesis. Barron y Matthews (1935 y 1938b) observaron que al estimular fibras aferentes cutáneas o una raíz dorsal, en el gato y en la rana, se registraba un potencial negativo de larga duración (200 ms) (Figura 5A,B), al cual denominaron potencial de raíz dorsal, o DRP (*dorsal root potencial*, por sus siglas en inglés) Este potencial era la imagen en espejo del potencial positivo, denominado onda P (*P-wave*), registrado en la superficie del dorso de la médula espinal por Gasser y Graham (1933). Ambos potenciales son el reflejo de una despolarización prolongada de las terminales intraespinales de las fibras aferentes, la cual se propaga antidrómicamente hacia de la raíz dorsal. Al respecto, diversos grupos de investigadores (Barron y Mathews, 1938b; Brooks y Fuortes, 1952; Dun, 1941), propusieron que los DRPs se producen en las terminales aferentes debido a cambios iónicos en el medio extracelular de las mismas (e.g. incrementos en la concentración extracelular de potasio con la estimulación condicionante de las fibras aferentes) (Trachtenberg y Pollen, 1970).

Por otra parte, diversos estudios (Eccles, 1939; Grundfest y Magnes, 1951; Lloyd y McIntyre, 1949) propusieron que las interneuronas jugaban un papel importante en la generación del DRP, al suponer que las fibras aferentes primarias no interactúan directamente entre sí. Es decir, la estimulación de una fibra aferente en particular no ejerce una acción despolarizante específica sobre si misma, o sobre otras fibras, a través de interacciones directas (Koketsu, 1956). Además, el DRP producido por la estimulación de una raíz dorsal y registrado en la misma raíz, es aproximadamente de la misma amplitud que el DRP producido en una raíz dorsal contigua (Figura 5C, D) (Barron y Mathews, 1938b; Lloyd y McIntyre, 1949).



**Figura 5. Potenciales de raíz dorsal producidos por la estimulación de aferentes cutáneas y raíces dorsales adyacentes.** En cada caso, se colocó un electrodo proximal (2 mm) y uno distal (10 mm) al sitio de entrada de la raíz dorsal a la médula espinal. La deflexión hacia arriba indica una negatividad en el electrodo proximal. **A)** Potencial registrado por un estímulo táctil ligero en los dedos de las patas de una rana. **B)** Idem, en el gato. **C)** Potencial registrado por la estimulación eléctrica de una raíz dorsal adyacente en la rana. **D)** Idem, en el gato. La flecha indica el estímulo a las raíces dorsales adyacentes (Barron y Matthews, 1938a).

Desde 1933 Gasser y Graham propusieron una posible relación entre la despolarización de las fibras aferentes y los procesos inhibidores centrales, mediante la comparación de los potenciales positivos lentos (*P-waves*) registrados en el dorso de la médula espinal y la inhibición del reflejo flexor producida por la estimulación condicionante de nervios periféricos ipsilaterales (Eccles, Sherrington, 1931; Forbes et al, 1928). Fue así como Barron y Matthews (1938b), en acuerdo con Gasser y colaboradores, propusieron a la despolarización de las terminales aferentes como el mecanismo subyacente al DRP y a la onda-P, es decir, como la causa de la inhibición de los reflejos espinales, producida por la interacción con corrientes eléctricas, las cuales producían un bloqueo en la conducción de potenciales de acción en las terminales de las fibras aferentes.

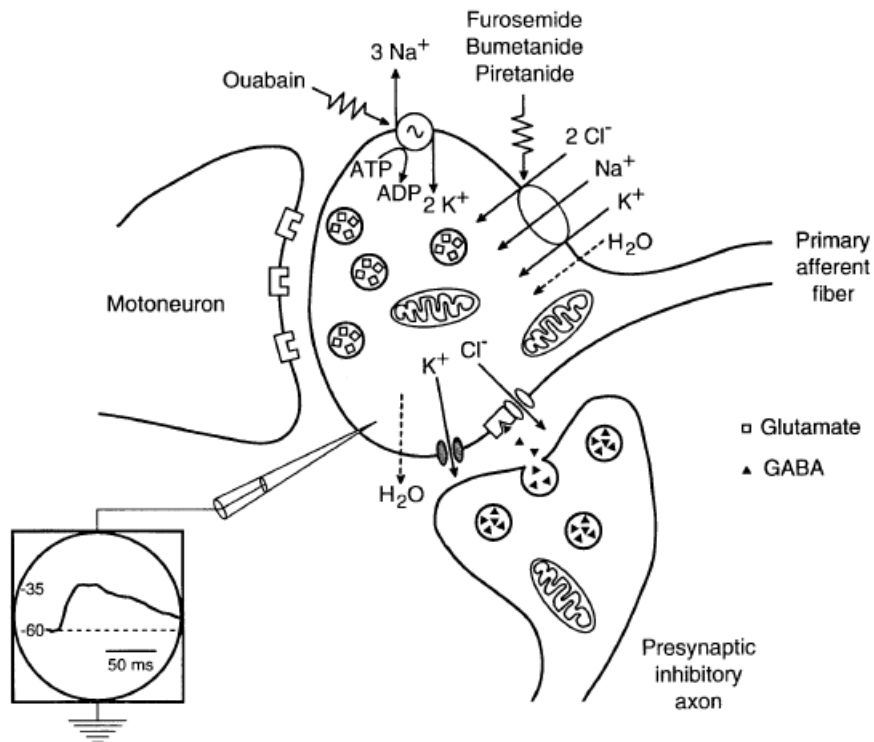
### *1.3 Mecanismos implicados en la despolarización de aferentes primarias*

Con la introducción de los microelectrodos sensibles a potasio ( $K^+$ ) (Walker, 1971), fue posible investigar la propuesta de Barron y Matthews (1938b) en relación a la acumulación de iones  $K^+$  en el medio extracelular a consecuencia de un incremento en la actividad interneuronal (Kríz, Syková, et al., 1974, 1975), y su papel en la generación de la PAD. Sin embargo, ya se ha demostrado que la estimulación de fibras aferentes cutáneas puede producir PAD sin incrementos en la concentración extracelular de  $K^+$ , y más aún, que la inhibición de la PAD producida en fibras aferentes Ia, también ocurre sin un incremento en la concentración del mismo catión (Forbes et al., 1928; Jiménez, Rudomín, et al., 1984). En efecto, estudios fisiológicos y farmacológicos posteriores confirmaron que la acumulación extracelular de iones  $K^+$  no podía ser considerada la única fuente de PAD en la médula espinal.

Con base en las evidencias histológicas que demuestran la presencia de contactos axoaxónicos en la médula espinal (Gray, 1962) en fibras aferentes primarias del grupo Ia (Pierce y Mendell, 1993), del grupo Ib (Lamotte et al, 1997; Lamotte d'Incamps et al., 1998), fibras aferentes musculares del grupo II (Maxwell, Riddell, 1999), y fibras aferentes cutáneas (Maxwell, Ottersen, et al., 1995), se ha llegado a determinar, a través de estudios inmunohistoquímicos a con anticuerpos específicos, la presencia del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en los contactos axoaxónicos anteriormente señalados. Estos hallazgos fueron similares a los reportados por Maxwell y Riddell en los contactos axoaxónicos de los botones sinápticos de fibras musculares del grupo II y aferentes cutáneas (Maxwell et al., 1995; Maxwell y Riddell, 1999).

Por otra parte, en la médula espinal de la rana toro, de la tortuga y de la rata neonata se demostró que la inhibición presináptica de las fibras aferentes, y la inhibición postsináptica de las motoneuronas, son mediadas por la activación de receptores  $GABA_A$  (Bautista et al., 2010; Deshpande SB y Warnick JE, 1988;

Peng y Frank, 1989). Los receptores GABA<sub>A</sub> están acoplados a canales de cloro, y su activación conlleva a la salida de iones cloruro (Cl<sup>-</sup>), dado que el potencial de equilibrio del Cl<sup>-</sup> (E<sub>Cl<sup>-</sup></sub>) en la terminal aferente se encuentra en un nivel más despolarizado con respecto al potencial de membrana en reposo. Ello se debe a la presencia del cotransportador Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>, el cual se encarga de introducir Cl<sup>-</sup> al interior de la terminal aferente (Figura 6). Es así como la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> produce una despolarización de las terminales de las fibras aferentes (Alvarez-Leefmans, 1998).



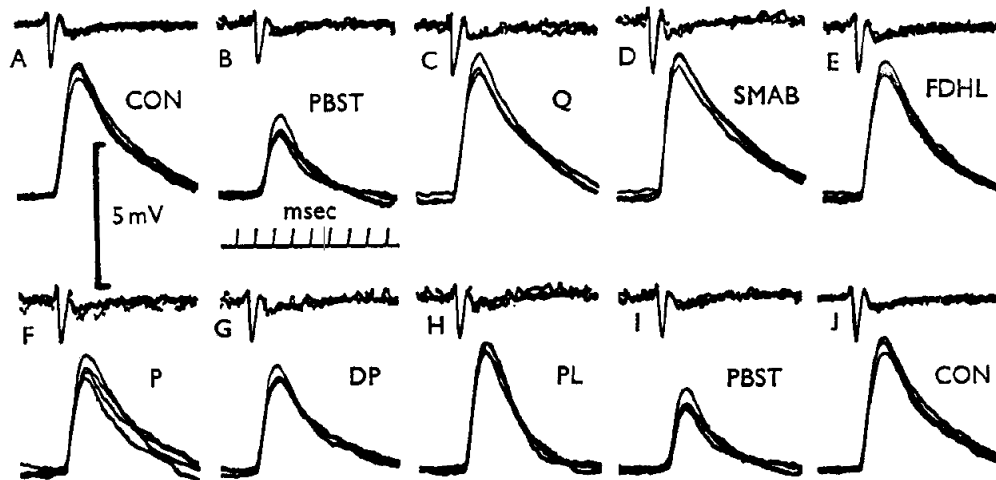
**Figura 6. Representación esquemática de una sinapsis axoaxónica GABAérgica.** Se muestra un microelectrodo insertado en la terminal de la fibra aferente primaria, el cual registra la despolarización producida por el GABA. Esta despolarización se debe al eflujo de iones Cl<sup>-</sup>, que a su vez produce una inactivación parcial de los canales de Na<sup>+</sup>, reduciendo la fuerza impulsora del potencial de acción y una menor activación de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes del voltaje. El cotransportador Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> se encarga de restablecer el gradiente electroquímico del Cl<sup>-</sup> (Alvarez-Leefmans, 1998).

En 1963, Eccles y colaboradores observaron que el antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub>, picrotoxina, deprimía la PAD y los DRPs, e incrementaba de manera simultánea la excitabilidad de las fibras aferentes primarias, aún en presencia de un aumento en la concentración de K<sup>+</sup> (Eccles, et al., 1963). Una despolarización lo suficientemente grande de las fibras aferentes produce un incremento en la excitabilidad de las mismas, de forma tal que se alcanza el umbral para generar un potencial de acción, el cual se propaga de manera antidrómica por las raíces dorsales hacia la periferia; a estos potenciales antidrómicos se les denominó reflejos de raíz dorsal (*dorsal root reflexes*, DRRs; por sus siglas en inglés) (Barron y Matthews, 1938a; Toennies, 1938). No obstante, en 1966 Curtis y Ryall, bajo condiciones experimentales más definidas, observaron que la administración electroforética del GABA disminuía la excitabilidad eléctrica de las terminales, un dato que posteriormente fue confirmado en las terminales de fibras aferentes del cuneatus (Galindo, 1969). Estos resultados apoyaron la hipótesis original de Eccles (Eccles, et al., 1963) acerca del origen de la depresión del DRP producida por aplicación tópica de GABA, es decir, la despolarización de las terminales presinápticas por GABA producía un fenómeno de oclusión con los DRPs.

#### *1.4 Organización funcional de la inhibición presináptica*

En su primer trabajo, Frank y Fuortes (1957) estudiaron la depresión de los EPSPs registrados en motoneuronas del GS por la estimulación condicionante del nervio isquiotibial ipsilateral. Años más tarde, Eccles y colaboradores mostraron que la depresión de los EPSPs, registrados tanto en motoneuronas flexoras como extensoras, producida por la estimulación condicionante de los nervios flexores PBSt, resultaba particularmente más robusta (Eccles, et al., 1961a). Además, descubrieron que la estimulación condicionante de otros nervios flexores (e.g. peroneo común, peroneo profundo) era capaz de producir una depresión muy similar de los EPSPs, mientras que la estimulación condicionante de algunos nervios extensores resultaba ser menos eficaz (Figura 7) (Eccles, et al., 1961a).

Cabe mencionar que la depresión observada sobre los EPSPs fue producida por la estimulación tanto de fibras aferentes Ia (aferentes primarias provenientes de los husos musculares), fibras Ib (aferentes primarias provenientes de órganos tendinosos de Golgi) y en menor grado, por la estimulación de aferentes musculares del grupo II (aferentes secundarias de los husos musculares) y del grupo III.

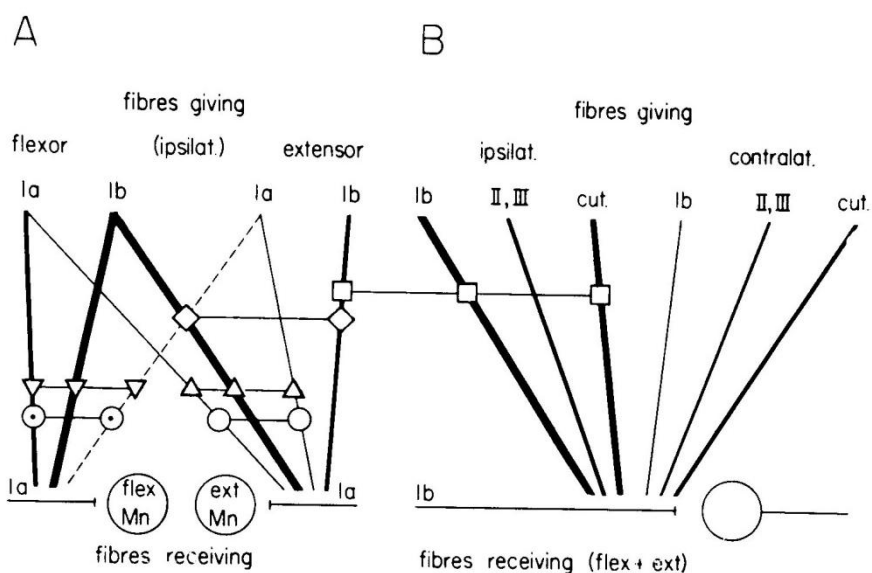


**Figura 7. Inhibición presináptica producida por la activación de distintos tipos de fibras aferentes musculares sobre los EPSPs registrados en motoneuronas extensoras.** A) Los EPSPs control (CON) fueron registrados en motoneuronas del gastrocnemio con una intensidad máxima de estimulación de las aferentes musculares del grupo I. B-I) Se muestran los efectos de la estimulación condicionante de distintos nervios musculares con una intensidad supramáxima sobre los EPSPs control (Eccles, et al., 1961b).

Diversos estudios han mostrado que la estimulación de fibras aferentes Ia y Ib de músculos flexores (ipsilaterales) produce una inhibición presináptica asociada a la PAD en las fibras aferentes Ia, tanto flexoras como extensoras (Eccles, et al., 1961b; Eccles, et al., 1962b, Eccles, et al., 1963). Además, se ha demostrado que la estimulación de las fibras Ib, producida por la contracción de los músculos ipsilaterales, es más eficaz para producir PAD en las fibras Ia (Devanandan, Eccles, et al., 1965; 1966; 1964). Por otra parte, la estimulación de fibras musculares extensoras del grupo I es poco efectiva para producir inhibición presináptica de las fibras Ia de músculos flexores, a pesar de que la contracción



de músculos extensores induce una inhibición presináptica en los músculos extensores agonistas (Devanandan, Eccles, et al., 1966). Ello llevó a considerar a la inhibición presináptica como un mecanismo de control selectivo, capaz de modular en forma independiente la información transmitida por los distintos tipos de fibras aferentes. Es decir, existe una organización de las vías que producen y las fibras que reciben inhibición presináptica asociada a la PAD, en relación a los receptores musculares y a las acciones de los músculos involucrados (flexores o extensores). Como se puede observar en la Figura 8, existen distintas interacciones sinápticas entre las fibras aferentes Ia y Ib que producen inhibición presináptica, con las fibras Ia y Ib que reciben inhibición presináptica. Estas interacciones ocurren a través de distintas vías neuronales, las cuales pueden ser moduladas independientemente de su origen muscular (Brink et al., 1984).



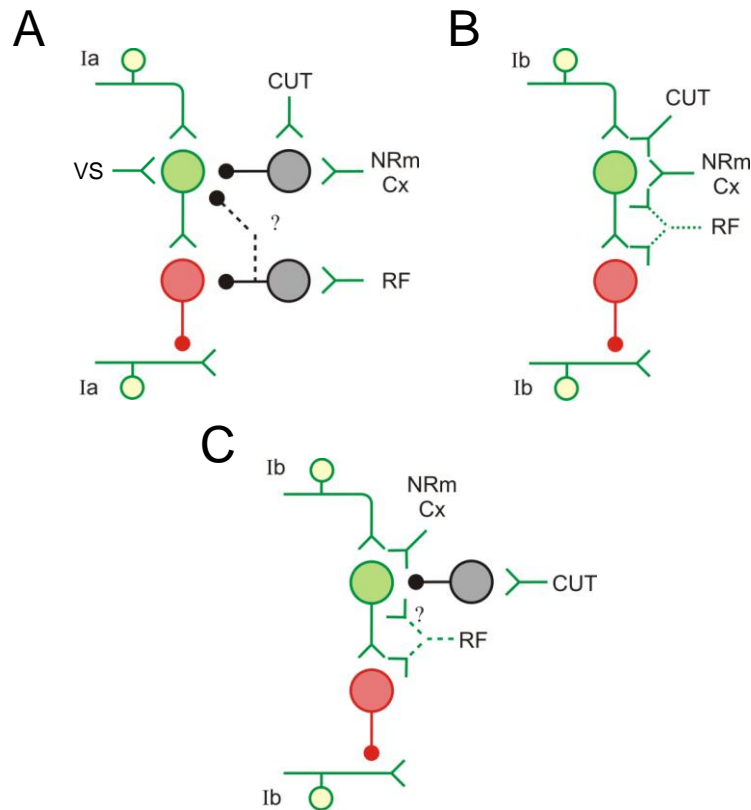
**Figura 8. Fibras aferentes musculares del grupo I que producen y que reciben inhibición presináptica asociada a la PAD. A)** Fibras aferentes flexoras y extensoras del grupo Ia y Ib que producen PAD sobre las fibras aferentes Ia flexoras y extensoras que reciben PAD. **B)** Fibras aferentes musculares del I, II y III y fibras aferentes cutáneas que producen PAD sobre las fibras aferentes Ib de músculos flexores y extensores. En ambos casos, el grosor de las líneas indica la magnitud de la PAD. Los símbolos indican vías neuronales específicas. Las vías compartidas para las fibras Ia están indicadas por círculos y para las fibras Ib por diamantes y cuadros. Los triángulos indican las vías compartidas para las fibras Ib de flexores y para las fibras Ia de flexores y extensores (Brink et al., 1984).

Adicionalmente, Carpenter, Engberg y Lundberg (1962, 1966), mostraron que la PAD puede ser producida por la estimulación de vías supraespinales, como la región dorso-medial del tallo cerebral, ya que la PAD producida por la estimulación del fascículo longitudinal medial, desaparecía al seccionar los cuadrantes ventrales de la médula espinal (Carpenter, Lundberg, et al., 1963). Asimismo, Cook (1969) demostró que la activación del núcleo vestibular induce PAD, hallazgo que concuerda con la desaparición de los DRPs producidos por la estimulación del nervio craneal VIII después de una lesión completa del núcleo vestibular (Cook, Cangiano, et al., 1969). Estos hallazgos sugieren que las vías descendentes también pueden modular presinápticamente la información sensorial muscular y cutánea.

En 1986, Rudomin y su grupo de trabajo definieron tres patrones de PAD para las fibras aferentes del grupo I, tal como se muestran en la Figura 9. La estimulación de fibras aferentes del grupo I y las vías vestíbulo espinales producen PAD en las fibras aferentes musculares del grupo Ia. En cambio, la estimulación de vías cutáneas, articulares, retículo-espinales, rubro-espinales y córtico-espinales no producen PAD por si mismas; no obstante, son capaces de inhibir la PAD producida por aferentes del grupo I (patrón de PAD tipo A). La estimulación de vías aferentes del grupo Ib, cutáneas, articulares, y de las vías retículo-espinales, rubro-espinales y córtico-espinales producen PAD en una subpoblación de fibras del grupo Ib (patrón de PAD tipo B). Una subpoblación de fibras Ib, en las que la estimulación de vías descendentes produce PAD, pero la estimulación de fibras cutáneas y articulares no tiene efecto, inhiben la PAD producida por estimulación de aferentes del grupo Ib (patrón de PAD tipo C). Esta organización implica que las interneuronas que median la PAD de las fibras aferentes son diferentes y altamente específicas.

Mediante estudios realizados en el gato, se ha estimado que la latencia mínima para producir PAD es de 0.6 a 0.8 ms (Jankowska et al., 1981), un dato compatible con un retardo monosináptico, mientras que la latencia de la PAD

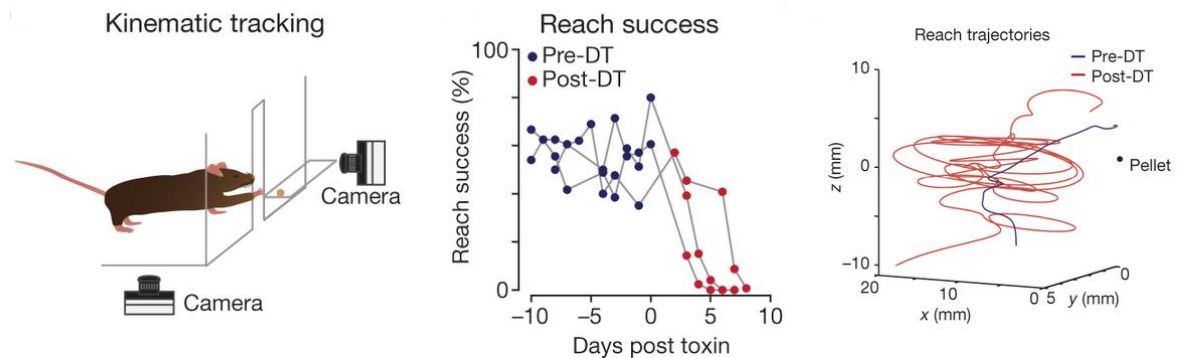
producida por la estimulación de fibras aferentes del grupo I varía entre 1.7 y 2.0 ms (Rudomin et al., 1983). Tales observaciones llevaron a concluir que la vía más corta para producir PAD requiere al menos dos interneuronas interpuestas, es decir, una latencia trisináptica (Figura 9).



**Figura 9. Organización funcional de la inhibición presináptica relacionada con la PAD. A), B) y C)** Diagramas que muestran los posibles sitios de acción de diferentes vías aferentes y supraespinales sobre las vías neuronales que median la PAD de las fibras aferentes con patrones de PAD tipo A, B y C, respectivamente. Las interneuronas GABAérgicas, glutamatérgicas y glicinérgicas se muestran en rojo, verde y gris, respectivamente. Los signos de interrogación en B y C muestran conexiones que si están presentes no pueden ser documentadas ni excluidas con las técnicas empleadas (modificado de Rudomin et al., 1986).

En la actualidad, con el desarrollo de nuevas herramientas genéticas, ha sido posible estudiar a las interneuronas GABAérgicas espinales responsables de la inhibición presináptica, caracterizadas por ser las únicas neuronas GABAérgicas que expresan la enzima descarboxilasa del ácido glutámico tipo 2 (GAD2, también conocida como GAD65) (Hughes et al., 2005; Soghomonian y Martin, 1998), y

algunos factores de transcripción específicos, como el factor tumoral pancreático 1a (Ptf1a), con el propósito de evaluar su papel en la conducta motriz. Se ha mostrado que la ablación genética selectiva de las interneuronas que expresan la enzima GAD2, en ratones transgénicos  $GAD2^{cre}$ , modifica severamente los movimientos dirigidos a alcanzar objetos (Fink et al., 2014). En estos animales se produce una oscilación estereotipada de las extremidades durante el movimiento de alcance (Figura 10). Estos resultados revelaron el papel central que ejerce la inhibición presináptica en el control sensoriomotor, produciendo una estabilización y un amortiguamiento de los movimientos dirigidos.

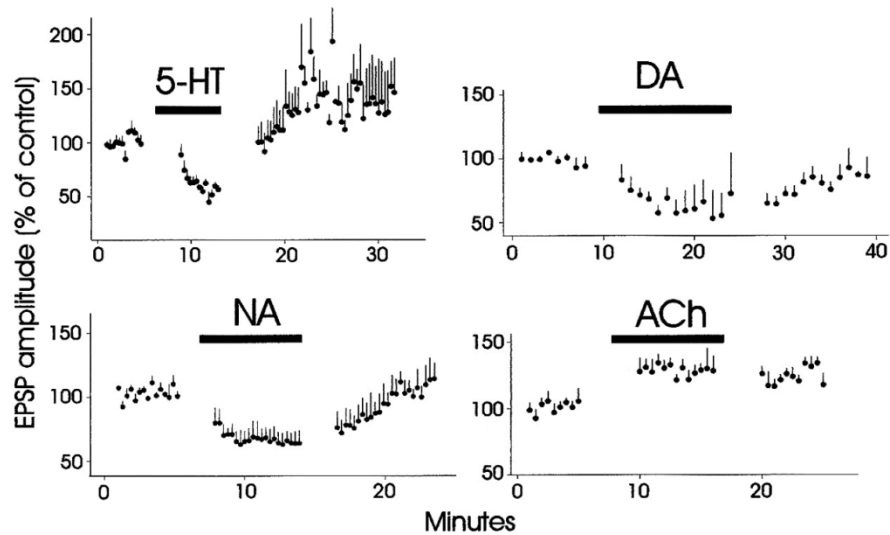


**Figura 10. Efecto de la ablación genética selectiva de las interneuronas responsables de la inhibición presináptica que expresan la enzima GAD2.** *Panel izquierdo.* Protocolo de análisis de la cinemática enfocada a evaluar el movimiento de alcance. Un ratón  $GAD2^{cre}$  es videograbado por dos cámaras monocromáticas de alta velocidad y resolución, mientras realiza un movimiento de alcance en una pata delantera, dirigido a obtener alimento. *Panel intermedio.* Gráfica que ilustra el efecto previo (círculos azules) y posterior (círculos rojos) a la ablación selectiva de las interneuronas GAD2 mediante la aplicación de toxina diftérica (DT), en el movimiento de alcance. *Panel derecho.* Gráfica con las trayectorias videograbadas de la pata delantera del ratón, mientras ejecuta el movimiento orientado a obtener el alimento. El trazo azul corresponde a la condición control cuando las interneuronas GAD2 aún están presentes. El trazo rojo corresponde al movimiento después de la ablación de las interneuronas GAD2, tras la aplicación de la DT (Fink et al., 2014).

## *2. Monoaminas: Su papel modulador en la inhibición presináptica asociada a PAD*

### *2.1 Efectos de las monoaminas en la médula espinal*

En general, los sistemas monoaminérgicos producen un efecto bimodal sobre la información sensorial (Figura 11). Por ejemplo, la 5-HT puede inhibir o facilitar la transmisión sensorial nociceptiva y térmica (Tabla 2) (Hochman y Garraway, et al., 2001), pero poco se sabe acerca de sus efectos sobre las aferentes que codifican la información sensorial no nociceptiva y propioceptiva (García-Ramírez et al., 2014). A este respecto, se ha observado que las monoaminas 5-HT, DA y NA deprimen considerablemente los DRPs producidos por la estimulación de aferentes mielinizadas cutáneas y propioceptivas (Figura 11), así como aquellos producidos por la estimulación de fibras aferentes viscerales; es decir, reducen, en principio, la inhibición presináptica producida por la estimulación de aferentes propioceptivas, cutáneas, musculares y viscerales (Bras et al., 1989; Curtis et al., 1983; García-Ramírez et al., 2014; Jankowska y Hammar, 2000; Rudomin y Schmidt, 1999; Zimmerman et al., 2012). No obstante, no ha sido posible precisar si los efectos de las monoaminas sobre las vías neuronales que median la PAD ocurren a nivel presináptico o postsináptico (Schmidt y Sherrington, 1971; García-Ramírez et al., 2014). Por otra parte, se ha demostrado que la activación del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>3</sub>, produce una despolarización directa de las fibras aferentes nociceptivas conduciendo a una reducción en la liberación del neurotransmisor y a un efecto antinociceptivo (Alhaider, Lei, et al., 1991; Bardin, Lavarenne, et al., 2000; Millan, 2002). Se ha observado, además, que la 5-HT, DA y NA deprimen los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) producidos por la estimulación de la raíz dorsal (Figura 11 y Tabla 1) (Garraway y Hochman, 2001). Sin embargo, en dicho estudio se utilizaron intensidades de estimulación adecuadas para activar fibras de muy alto umbral (nociceptivas), y no se determinó si la depresión de los EPSPs ocurría a través de mecanismos presinápticos o postsinápticos.



**Figura 11. Efecto modulador de las monoaminas y de la acetilcolina sobre los EPSPs registrados en interneuronas del asta dorsal en rebanadas de médula espinal de rata neonata.** Las gráficas muestran el curso temporal de la depresión de los EPSPs producida por la aplicación (barra horizontal) de serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y dopamina (DA). Puede observarse que la acetilcolina (ACh) produce una facilitación. Los EPSPs fueron producidos por la estimulación de la raíz dorsal con intensidades para activar las fibras no mielinizadas tipo C (Garraway y Hochman, 2001).

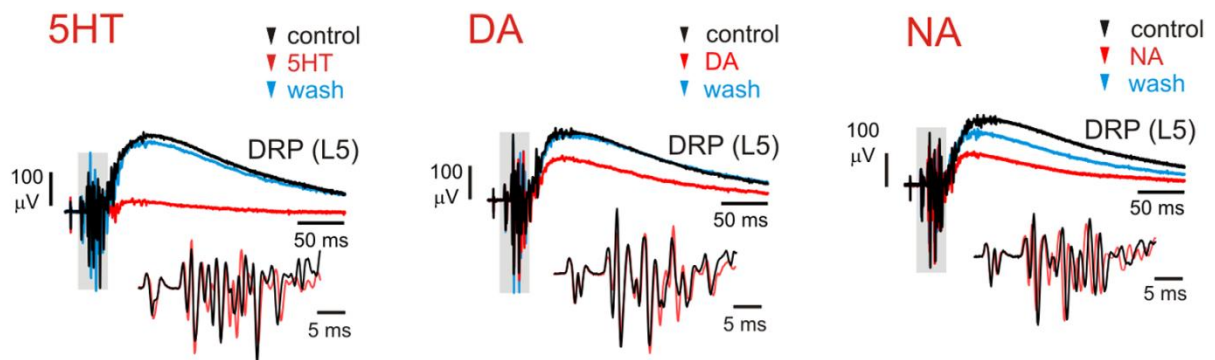
**Tabla 1. Incidencia de neuronas que presentaron depresión y/o facilitación en la amplitud de los EPSPs por la aplicación de 5-HT, NA, DA y ACh.**

Agonist	EPSP Amplitude, ↑	EPSP Amplitude, ↓	No Change
5-HT (28)	14	79	7
NA (26)	15	62	23
DA (20)	15	55	30
ACh (20)	70	15	15

Los valores representan el porcentaje del tamaño de la muestra mostrada en paréntesis (Garraway y Hochman, 2001).

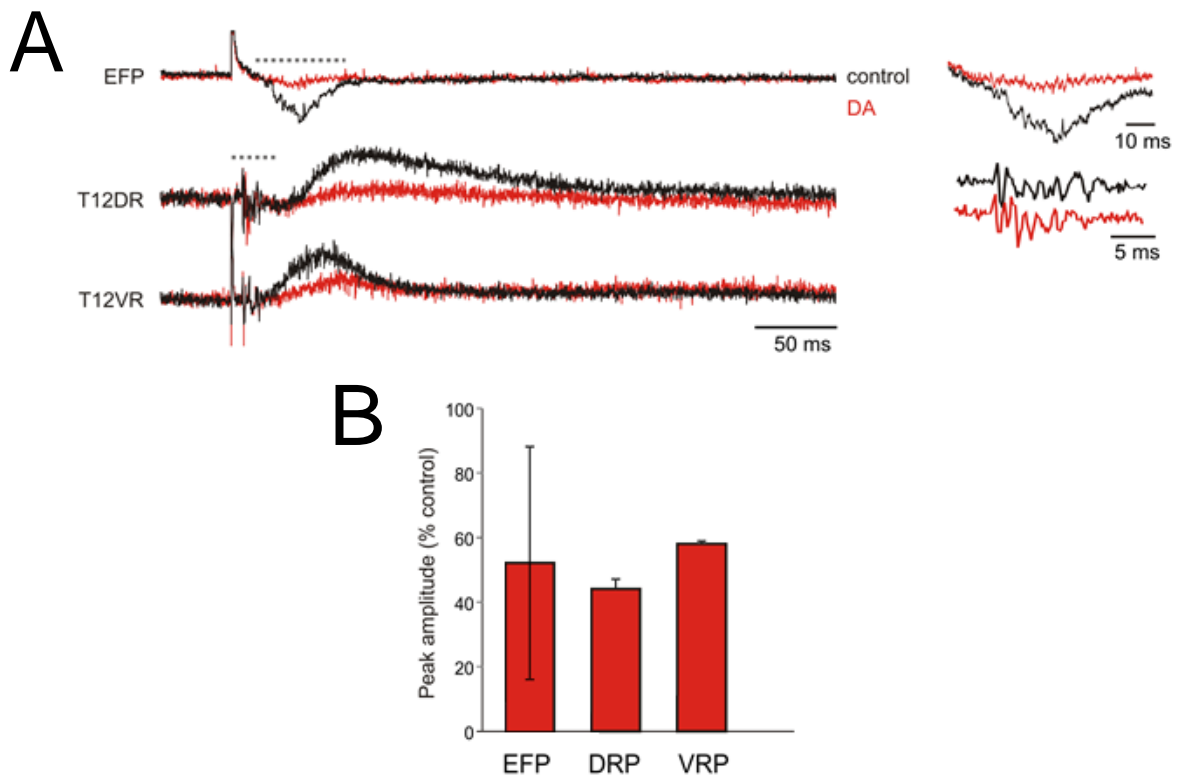
## 2.2 El papel neuromodulador de la DA en la médula espinal

Dentro del grupo de monoaminas, se ha considerado a la DA como un neuromodulador muy importante en el sistema nervioso central de los mamíferos. En particular, en estudios pioneros se ha demostrado que la DA deprime el reflejo monosináptico en la médula espinal del gato (Carp y Anderson, 1982), lo que resalta la importancia de los receptores dopaminérgicos en la actividad motriz. Asimismo, se ha observado que la DA deprime los DRPs producidos por la estimulación de nervios cutáneos y musculares, sin afectar el componente monosináptico de los potenciales extracelulares de campo (EFPs) (Figura 12) (García-Ramírez et al., 2014). Similarmente, la DA también deprime los DRPs y los potenciales de raíz ventral (VRPs) producidos por la estimulación del nervio esplácnico (Zimmerman et al., 2012); es decir, ejerce acciones inhibitorias sobre el sistema nervioso autónomo (Figura 13).



**Figura 12. Acciones moduladoras de las monoaminas sobre los DRPs producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral en el nervio tibial.** DRPs registrados en la raíz dorsal L5 antes, durante y después de la aplicación de 10  $\mu$ M de 5-HT, DA y NA, respectivamente. El nervio tibial se estimuló a una intensidad 4 xU (veces el valor umbral de las fibras más excitables). Se puede apreciar que las tres monoaminas producen una depresión de los DRPs, siendo la 5-HT más efectiva. Puede observarse que la amplitud de la salva aferente, estimada a partir del registro de los DRPs a un mayor barrido (insertos) no fue afectada por las monoaminas (García-Ramírez et al., 2014).

En el asta dorsal de la médula espinal se ha observado que la DA inhibe a las interneuronas de primer orden activadas por fibras aferentes del grupo II, provenientes de husos musculares, a través de la activación de receptores de la familia *D<sub>2</sub>-like*. Sin embargo, las interneuronas de la zona intermedia son inhibidas por la DA, posiblemente a través de la activación de receptores adrenérgicos, o mediante la liberación de NA desde las terminales de fibras adrenérgicas (Figura 14) (Skoog y Noga, 1995).



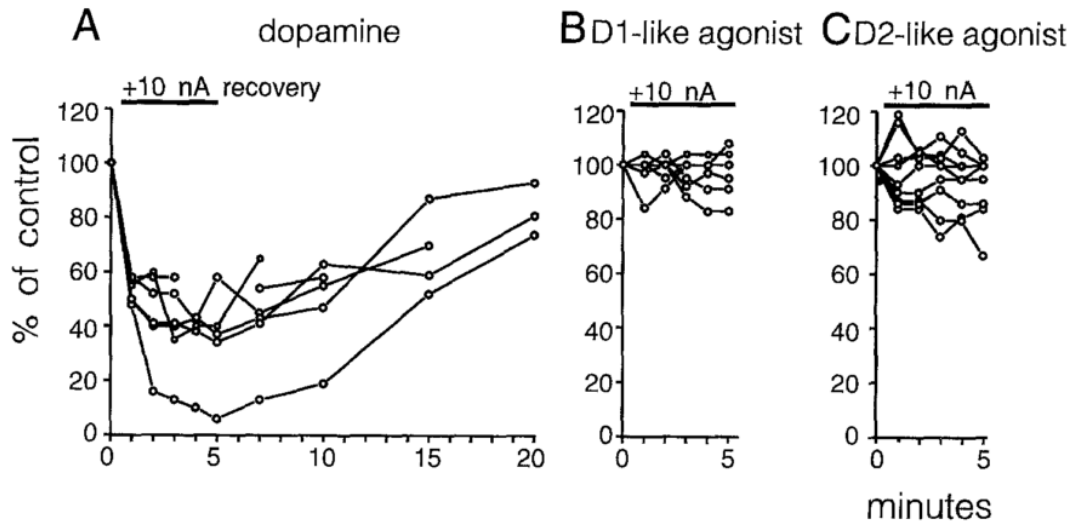
**Figura 13. Modulación dopaminérgica de las respuestas reflejas producidas por la estimulación del nervio esplácnico. A)** De arriba abajo, EFP, DRP (T12DR) y VRP (T12VR) producidos por la estimulación de aferentes viscerales en el nervio esplácnico y registrados a nivel T12. El control se muestra en negro, y los efectos de la aplicación de DA (10  $\mu$ M) se muestran en rojo. **B)** Gráfica de la depresión de los EFPs, DRPs y VRPs producida por la aplicación de DA. Los valores promedio de amplitud y la D.E.M. se muestran normalizados con respecto a la amplitud control. El inserto muestra un acercamiento de los EFPs y de la salva aferente registrada en la raíz T12DR (Zimmerman et al., 2012).



Es importante señalar que los niveles extracelulares que alcanza la DA son un factor clave en la activación de diferentes tipos de receptores dopaminérgicos. Por ejemplo, a partir de estudios realizados en la corteza prefrontal de la rata, se sabe que la DA, a bajas concentraciones (10 nM), activa a los receptores *D<sub>1</sub>-like*, mientras que a concentraciones altas (>20  $\mu$ M) activa a los receptores *D<sub>2</sub>-like* (Kawamoto, Otsuguro et al., 2012). En la médula espinal de la rata neonata la DA, a concentraciones <1  $\mu$ M, deprime los potenciales de raíz ventral lentos (sVRP), atribuidos a las respuestas polisinápticas provocadas por la estimulación de las fibras C que transmiten la información nociceptiva (Kawamoto, Otsuguro, et al., 2012). No obstante, a concentraciones >1  $\mu$ M, además de la depresión de los potenciales de raíz ventral lentos (sVRP), la DA produce una despolarización de las motoneuronas y deprime el reflejo monosináptico (Clemens y Hochman, 2004; Kawamoto et al., 2012; Kitazawa, Saito, et al., 1985). La depresión del reflejo monosináptico en la médula espinal del ratón por la DA, a una concentración 1  $\mu$ M, se produce *via* la activación de receptores *D<sub>2</sub>-like* (Clemens y Hochman, 2004).

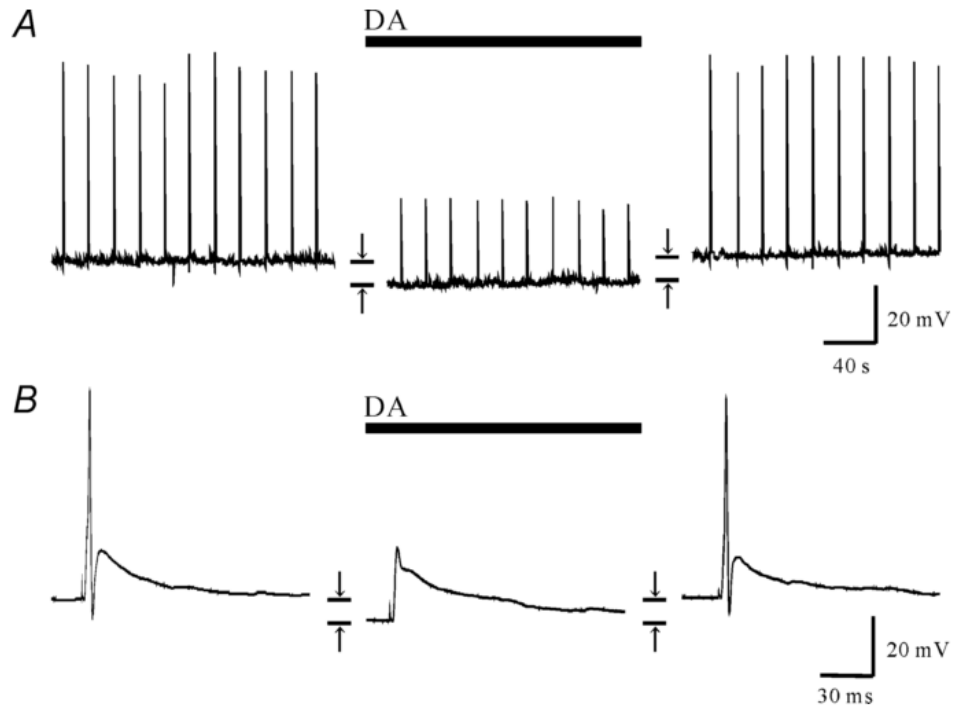
En la médula espinal de rata neonata se ha reportado que la DA deprime los componentes de latencia corta y prolongada de los EPSPs producidos por la estimulación de la raíz dorsal (Garraway y Hochman, 2001). Asimismo, en neuronas espinales de la sustancia gelatinosa de la rata neonata, la DA, a concentraciones >10  $\mu$ M, activa canales de  $K^+$ , produciendo una hiperpolarización *via* la activación de receptores *D<sub>2</sub>-like* (Figura 15) (Tamae et al., 2005).

group II intermediate zone field potentials



**Figura 14. Efecto de la aplicación iontoporética de dopamina (DA) y sus agonistas sobre los potenciales extracelulares (EFPs) de campo registrados en la zona intermedia de la médula espinal del gato.** A) Curso temporal del efecto de la DA sobre la amplitud de los EFPs, producidos por la estimulación de aferentes musculares del grupo II en la zona intermedia en la médula espinal del gato. Los efectos se muestran como el porcentaje de la amplitud en el registro control. B) y C) Gráficas iguales a las de A, mostrando los efectos de agonistas a los receptores de la familia *D<sub>1</sub>-like* y *D<sub>2</sub>-like*. Las barras superiores indican el periodo de la iontophoresis. Se puede inferir que los efectos de la DA ocurren posiblemente a través de la activación de receptores a NA (Skoog y Noga, 1995).

Resulta de importancia destacar que la DA ejerce un efecto modulador sobre los circuitos neuronales que generan el patrón motriz en los mamíferos. En particular, en la médula espinal *in vitro* de roedores, la aplicación de DA, o sus agonistas, induce una actividad rítmica y alternante entre flexión y extensión, estabilizando el patrón motriz (Barrière, Mellen, et al., 2004).



**Figura 15. Efecto de la DA sobre los potenciales de acción y EPSPs producidos por la estimulación de la raíz dorsal.** A) Potenciales de acción generados por la estimulación eléctrica de la raíz dorsal, a una frecuencia de 0.2 Hz, mediante un electrodo de succión. El registro corresponde una neurona de la sustancia gelatinosa (potencial en reposo -63 mV). La raíz dorsal se estimuló con una intensidad apropiada para activar a las fibras aferentes de alto umbral (fibras C). La barra horizontal indica el tiempo de perfusión de la DA (100 μM), la cual produjo una clara hiperpolarización (8 mV) del potencial de membrana, y una inhibición de los potenciales de acción. B) Registro de los potenciales de acción y de los EPSPs en una escala de tiempo expandida. Se puede apreciar que tras la aplicación de DA, el potencial de acción desaparece sin una modificación aparente de los EPSPs (Tamae et al., 2005).

### 2.3 Clasificación de los receptores dopaminérgicos

La DA, precursor metabólico inmediato de la NA y adrenalina, modula múltiples funciones fisiológicas interactuando con receptores localizados a nivel central y periférico (Jose, et al., 2003; Missale, et al., 1998; Willems, et al, 1985). Inicialmente se demostró que los receptores a DA se podían agrupar en dos poblaciones distintas, de las cuales, sólo una se encontraba acoplada a la enzima adenilil ciclasa, siendo capaz de modular su actividad (Spano, Govoni, et al., 1978). Este hallazgo condujo a la separación de los subtipos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, basándose principalmente en su habilidad para modular la producción de adenosín

monofosfato cíclico (cAMP), y en sus diferencias farmacológicas (Kebabian y Calne, 1979). La caracterización posterior de las familias de receptores a DA empleando enfoques de clonación genética, reveló que la DA podía activar múltiples subtipos de receptores (Bunzow et al., 1988; Dearry et al., 1990; Monsma, Mahan, et al., 1990; Van Tol et al., 1991). Con base en sus propiedades estructurales, farmacológicas y bioquímicas, estos receptores fueron clasificados en dos familias: la familia *D<sub>1</sub>-like* (que incluye a los subtipos D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub> acoplados a proteínas G $\alpha_{s/olf}$ ), y la familia *D<sub>2</sub>-like* (que incluye los subtipos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> acoplados a proteínas G $\alpha_{i/o}$ ) (Alexander, Mathie, et al., 2011; Andersen et al., 1990; Missale et al., 1998; Neve, Seamans, et al., 2004; Sibley y Monsma, 1992). Además, se demostró que los receptores de la familia *D<sub>1</sub>-like* se encuentran casi exclusivamente de forma postsináptica, en neuronas como las espinosas medianas GABAérgicas del estriado. En tanto que, los receptores de la familia *D<sub>2</sub>-like* se encuentran expresados en forma pre y postsináptica, en neuronas dopaminérgicas (Rondou, Haegeman, et al., 2010; Sokoloff et al., 2006).

La DA es capaz de activar a los cinco subtipos de receptores, con distintos grados de afinidad, que va desde el orden de nanomolar hasta el micromolar. En general, se ha observado que los diferentes subtipos de receptores a DA varían significativamente en su sensibilidad a los agonistas y antagonistas a DA (Missale et al., 1998; Rondou et al., 2010; Sokoloff et al., 2006). En lo que respecta a ligandos selectivos, los receptores de las familias *D<sub>1</sub>-like* y *D<sub>2</sub>-like* pueden ser identificados mediante el uso de agonistas y antagonistas específicos, como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Constantes de afinidad (pKi) de algunos agonistas y antagonistas de los receptores dopaminérgicos.**

Ligando	D <sub>1</sub> -like		D <sub>2</sub> -like		
	D <sub>1</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
<b>Agonista</b>					
Dopamina	9	9	8.2	8.4	7.5
SKF38393	9	~9.3	~6.8	~5.3	~6.0
Quinpirol	5.7	ND	8.3	7.6	7.5
<b>Antagonista</b>					
SCH 23390	~9.7	9.5	~6.0	~6.1	~5.5
Racloprida	4.7	ND	8.7	8.4	5.6
L-741,626	ND	ND	7.9	6.9	6.1
SB-277011-A	ND	ND	5.5	8	ND
L-745,870	ND	ND	5.7	5.2	8.8

Datos tomados de (Altamirano-Espinoza et al., 2013; Manrique-Maldonado et al., 2011).

El efecto más estudiado de la activación de los receptores de la familia D<sub>1</sub>-like que se expresan de forma postsináptica, es la activación que ejercen sobre los circuitos neuronales que generan la actividad locomotriz (Gomez et al., 1999; Jung & Shim, 2011; Medvedev et al., 2013; Tran et al., 2005). En tanto que los receptores de la familia D<sub>2</sub>-like involucran mecanismos de acción más complejos, ya que se les encuentra de forma pre y postsináptica. Se ha observado que los autoreceptores localizados presinápticamente, proveen un mecanismo importante de retroalimentación que regula la síntesis y liberación de neuromoduladores en respuesta a cambios en la concentración extracelular de DA (Missale et al., 1998; Sibley, 1999; Wolf y Roth, 1990).

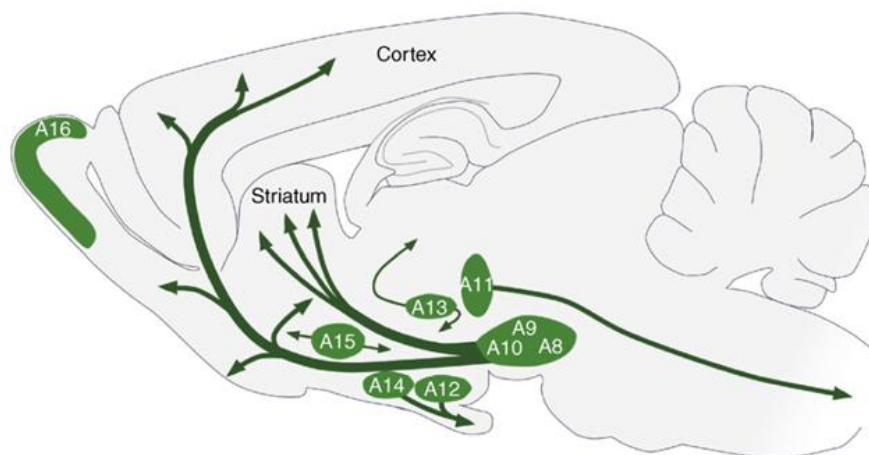
#### *2.4 Proyecciones dopaminérgicas hacia la médula espinal y localización de los receptores a DA*

Previamente se había considerado que la DA se encontraba únicamente en las terminales de las fibras noradrenérgicas como un simple precursor de la síntesis de NA (Andén, Fuxe, 1971; Andén, Jukes, et al., 1966). Sin embargo, en

la actualidad sabemos que existen terminales dopaminérgicas en la médula espinal, y que la DA juega un papel relevante como neuromodulador en diversas funciones sensoriales y motrices (Commissiong y Neff, 1979; Ridet et al., 1992; Weil-Fugazz y Godefroy, 1993).

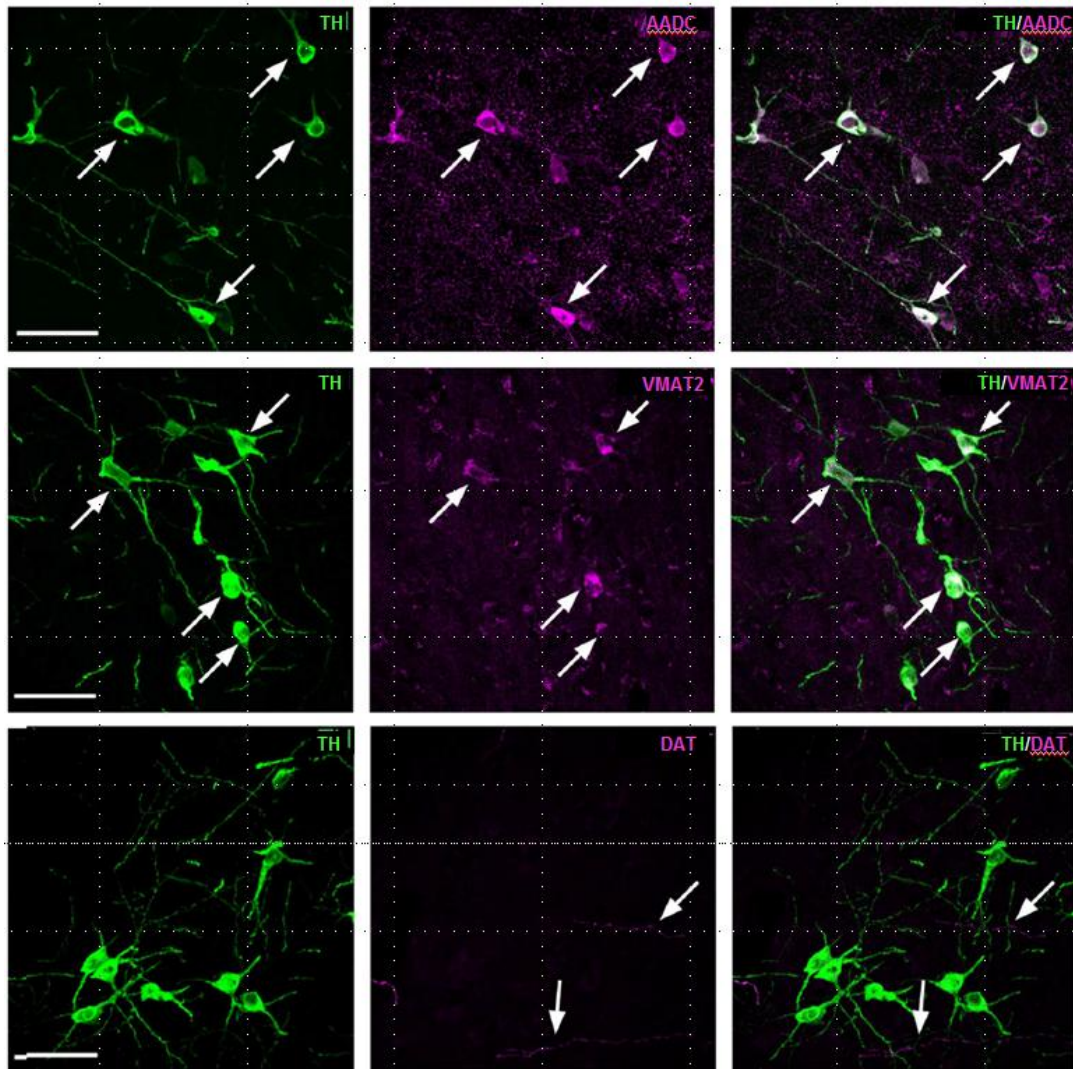
Mediante técnicas de inmunohistoquímica, basadas en el empleo de anticuerpos anti-DA, y el uso de microscopía de campo claro y microscopía electrónica (Ridet et al., 1992), así como técnicas de marcaje retrógrado y análisis de la presencia de metabolitos de la DA (Commissiong y Neff, 1979; Weil-Fugazza y Godefroy, 1993), ha sido posible determinar la existencia de proyecciones dopaminérgicas con origen en el grupo neuronal diencefálico A11. Es decir, neuronas localizadas en las áreas posterior y dorsal del hipotálamo y en la sustancia gris periventricular del tálamo caudal (Figura 16), las cuales proyectan hacia distintos niveles en la médula espinal de la rata, de manera importante en las láminas de Rexed superficiales (I-II) y profundas (III-V) del asta dorsal, así como en la lámina X del asta ventral (Björklund y Skagerberg, 1979; Skagerberg y Björklund, 1982; Skagerberg et al., 1988; Weil-Fugazza y Godefroy, 1993). Aunque en menor proporción, se ha visto que las neuronas dopaminérgicas presentes en la sustancia negra mesencefálica también envían proyecciones hacia la médula espinal (Commissiong, Gentleman, et al., 1979).

Por otra parte, a través de ensayos de inmunohistoquímica en rebanadas de la médula espinal del ratón, se ha determinado que las neuronas que conforman el grupo neuronal A11, expresan la enzima tirosina hidroxilasa necesaria para la síntesis de DA. No obstante, estas neuronas carecen del transportador de DA (DAT) (Koblinger et al., 2014), lo cual sugiere la posible participación del transportador de NA (NET) en el proceso de recaptura de la DA (Figura 17), tal como sucede en la corteza frontal y en el hipocampo (Borgkvist, Malmlöf, et al., 2012; Morón, Brockington, et al., 2002).



**Figura 16. Distribución de los grupos celulares dopaminérgicos en el cerebro de roedor adulto.** Las neuronas dopaminérgicas en el cerebro de los mamíferos se encuentran localizadas en nueve grupos celulares bien definidos, distribuidos desde el mesencéfalo hasta el bulbo olfatorio, tal como se muestra en el corte sagital del esquema. Las principales proyecciones de estos grupos celulares dopaminérgicos se ilustran con flechas. Nótese que únicamente el grupo A11 presenta una proyección hacia la médula espinal (Anders Björklund, et al., 2007).

La estimulación del grupo neuronal A11, así como la aplicación exógena de DA, pueden producir antinocicepción (Fleetwood-Walker, 1988; Gallagher, Inokuchi, et al., 1980), a través de la activación de receptores *D<sub>2</sub>-like* en las neuronas de la sustancia gelatinosa de la rata, tal como se muestra en los registros de la Figura 17 (Tamae et al., 2005). No obstante, el papel de la DA en la modulación de la antinocicepción permanece incierto y se ha propuesto que puede ejercer un papel diferente al de la NA y 5-HT en la modulación de la transmisión sináptica de las fibras aferentes primarias (Garraway y Hochman, 2001, Taniguchi, et al 2011).

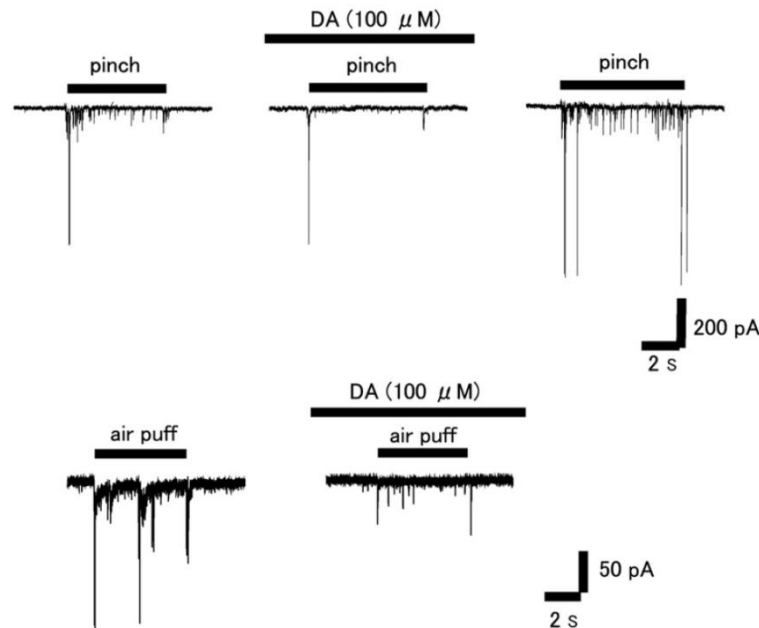


**Figura 17. Neuronas del grupo A11 positivas a tirosina hidroxilasa (TH<sup>+</sup>) que proyectan a la médula espinal en el ratón.** *Panel superior, de izquierda a derecha.* Neuronas dopaminérgicas, TH<sup>+</sup> marcadas (verde), neuronas que expresan la enzima descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (AADC, en magenta) y la superposición de ambas imágenes. Las flechas señalan a las neuronas TH<sup>+</sup> que también expresan la enzima AADC. *Panel intermedio.* Neuronas TH<sup>+</sup> y neuronas que expresan el transportar vesicular de monoaminas 2 (VMAT2, en magenta). Nótese en la superposición aquellas neuronas TH<sup>+</sup> que coexpresan el VMAT2 (indicadas con flechas). *Panel inferior.* Al igual que en los anteriores, se muestran neuronas TH<sup>+</sup>, no obstante, puede apreciarse que éstas no coexpresan el transportador de dopamina (DAT, en magenta) (Koblinger et al., 2014).

Estudios de hibridación *in situ* con cRNA digoxigenina-etiquetado y PCR en tiempo real han revelado la expresión de los cinco subtipos de receptores a DA (D<sub>1-5</sub>) en la médula espinal del ratón, con expresión predominante del subtipo D<sub>2</sub> (Figura 18). Además, los cinco subtipos de receptores muestran una distribución

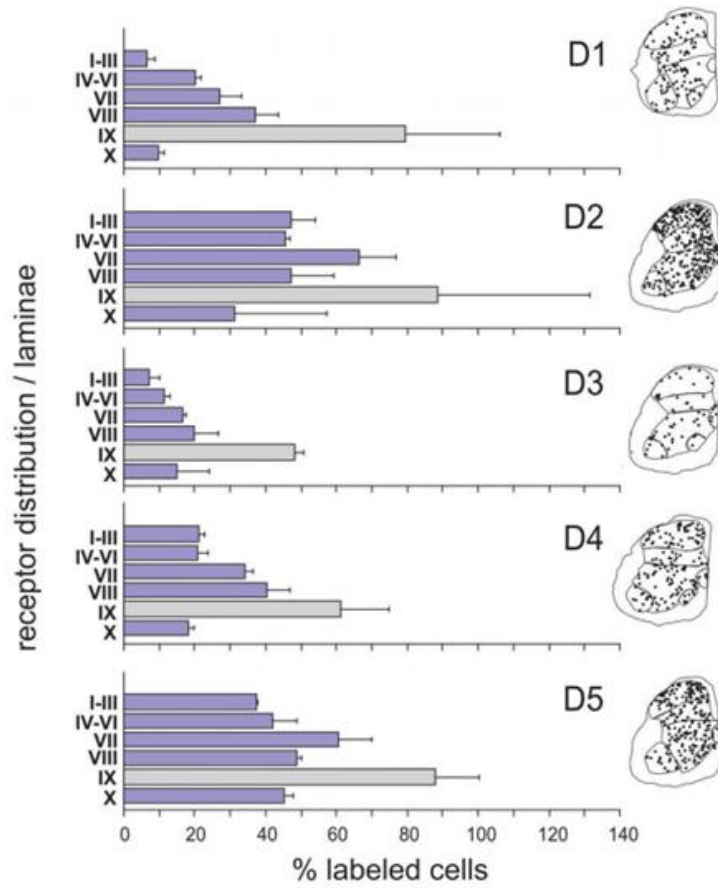


difusa en todas las láminas de la sustancia gris de la médula espinal, incluyendo las motoneuronas (Zhu, Clemens, et al., 2008; ver también Allen Data Base [www.brain-map.org](http://www.brain-map.org)).



**Figura 18. Efecto antinociceptivo de la DA en neuronas de la sustancia gelatinosa de la médula espinal de la rat.** *Panel superior.* EPSPs registrados en la modalidad de control de voltaje ( $V_H = -70$  mV), tras estimular con un pinchazo la cola de la rata (estímulo nociceptivo). A la izquierda se muestra el control, en el centro se el efecto de la DA ( $100 \mu\text{M}$ ) y a la derecha la recuperación tras el lavado. Se observa claramente la depresión de los EPSPs producidos por el estímulo nociceptivo, tras la aplicación de DA. *Panel inferior.* EPSPs registrados en las mismas condiciones que en el caso anterior, producidos por un disparo de aire (estímulo no nociceptivo). Se puede observar el efecto depresor de la DA ( $100 \mu\text{M}$ ) sobre los EPSPs (Taniguchi, et al 2011).

Por otra parte, los estudios autorradiográficos con agonistas dopaminérgicos radioactivos sugieren que los receptores  $D_1$  se encuentran ampliamente localizados en las regiones cervical y lumbosacra de la médula espinal de la rat; mientras que los receptores  $D_2$  se encuentran más localizados en la sustancia gelatinosa del asta dorsal, lo cual les atribuye un papel regulador en el procesamiento de información sensorial nociceptiva (Dubois, Savasta, et al., 1986; Levant y McCarson, 2001; Scatton, Dubois, et al., 1984).



**Figura 19. Distribución de los receptores a dopamina (D<sub>1</sub>-D<sub>5</sub>) en la médula espinal del ratón.** Los histogramas muestran la incidencia y distribución de células marcadas con sondas antisentido para los receptores a dopamina D<sub>1</sub>-D<sub>5</sub>, cuantificadas mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Zhu, Clemens, et al., 2008).

### III. Planteamiento del problema y objetivos

La médula espinal no sólo constituye un relevo de la información sensorial y supraespinal, sino que conforma un sitio de integración de funciones sensoriales y motrices, tanto somáticas como viscerales. A nivel espinal, la información sensorial proveniente de fibras aferentes cutáneas y musculares está sujeta a diversos mecanismos de modulación, en su mayoría poco definidos, los cuales están implicados en la regulación y el refinamiento de funciones tan variadas como la actividad locomotriz, el funcionamiento del sistema nervioso autónomo, y el control de la información sensorial nociceptiva y no nociceptiva.

Los sistemas monoaminérgicos supraespinales se han destacado como neuromoduladores clave de diversas funciones espinales, en particular, la transmisión sináptica de las fibras aferentes primarias. De los sistemas monoaminérgicos, uno de los que ha recibido poca atención al respecto es el sistema dopaminérgico. Ciertamente, ya se han realizado trabajos que han permitido conocer la distribución y localización de las fibras dopaminérgicas y de los receptores a DA en la médula espinal, así como los efectos de la DA sobre la transmisión sináptica de las fibras aferentes de alto umbral (fibras A $\delta$  y C) y su papel antinociceptivo. No obstante, todavía existe poca información acerca del papel neuromodulador de la DA sobre las fibras aferentes mielinizadas de bajo umbral (cutáneas A $\beta$  y musculares del grupo I y II, principalmente).

Por consiguiente, en la presente tesis de maestría nos hemos planteado determinar el papel funcional de la DA en la modulación de la transmisión sináptica de las fibras aferentes sensoriales de bajo umbral mediante un abordaje *in vitro* de la médula espinal y nervios periféricos del ratón neonato, investigando los efectos de la DA sobre la transmisión sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral y sobre las vías neuronales que median la inhibición presináptica asociada a la despolarización de aferentes primarias (PAD). Además, mediante una disección farmacológica nos hemos propuesto dilucidar los tipos de receptores a

DA implicados en la modulación de la transmisión sináptica y de las vías neuronales que median la PAD.

### *Relevancia del proyecto*

Se sabe que tras sufrir una sección espinal, se suprime el control inhibitorio supraespinal, lo que conlleva a la aparición de hiperreflexia y espasticidad, a través de diversos mecanismos (Adams and Hicks, 2005). Aunado a ello, en pacientes con lesiones de médula espinal, se ha observado una disminución de la inhibición presináptica, teniendo como resultado un aumento de la hiperreflexia y la espasticidad (Faist et al., 1994). De modo que, un incremento en la inhibición presináptica podría llevar a la reducción de la hiperreflexia y la espasticidad. Por esta razón, resulta de interés investigar los efectos que ejerce la DA sobre las vías neuronales que median la inhibición presináptica asociada a la despolarización de aferentes primarias, lo cual permitiría un mayor entendimiento del papel que juega la DA en la modulación de la información sensorial y su posible papel en el control de la hiperreflexia y la espasticidad. Además, la identificación de los subtipos de receptores a DA implicados en dicha modulación, representaría un avance para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas al control de tales patologías.

### *Hipótesis*

En la médula espinal aislada del ratón, la DA podría inhibir las vías neuronales que median la despolarización de aferentes primarias (PAD), producida por la estimulación de fibras aferentes mielinizadas, a través de la activación de receptores *D<sub>2</sub>-like* presentes en las vías interneuronales que median la PAD. A diferencia de la transmisión sináptica nociceptiva, es probable que la DA no afecte directamente la transmisión sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral (cutáneas y propioceptivas).

### *Objetivo General*

Investigar el papel funcional de la DA y los tipos de receptores involucrados en la modulación de las vías neuronales que median la despolarización de aferentes primarias (PAD) y en la transmisión sináptica de las fibras aferentes mielinizadas en la médula espinal del ratón.

### *Objetivos Particulares*

1. Determinar el efecto de la DA sobre los potenciales de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación de nervios periféricos con intensidades adecuadas para la activación de fibras aferentes de bajo umbral (mielinizadas).
2. Examinar el efecto de la DA sobre el componente monosináptico de los potenciales extracelulares de campo (EFPs) registrados en el asta dorsal, producidos por la estimulación de fibras aferentes mielinizadas.
3. Investigar el efecto de la DA sobre la excitabilidad de las fibras aferentes mielinizadas mediante la técnica de Wall (Wall, 1985) y sobre el potencial DC registrado en las raíces dorsales.
4. Examinar el efecto de la DA sobre la depresión homosináptica e inhibición presináptica producidas por la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas.
5. Determinar la relación concentración-respuesta del efecto de la DA, en ausencia y en presencia de bloqueadores: i) del transportador a DA (DAT), ii) del transportador a NA (NET) y iii) de la monoaminoxidasa B (MAO<sub>B</sub>).
6. Investigar el efecto de los agonistas selectivos de los receptores dopaminérgicos de la familia D<sub>1-like</sub> y D<sub>2-like</sub> sobre los DRPs y EFPs.

## IV. Métodos

### 1. Preparación

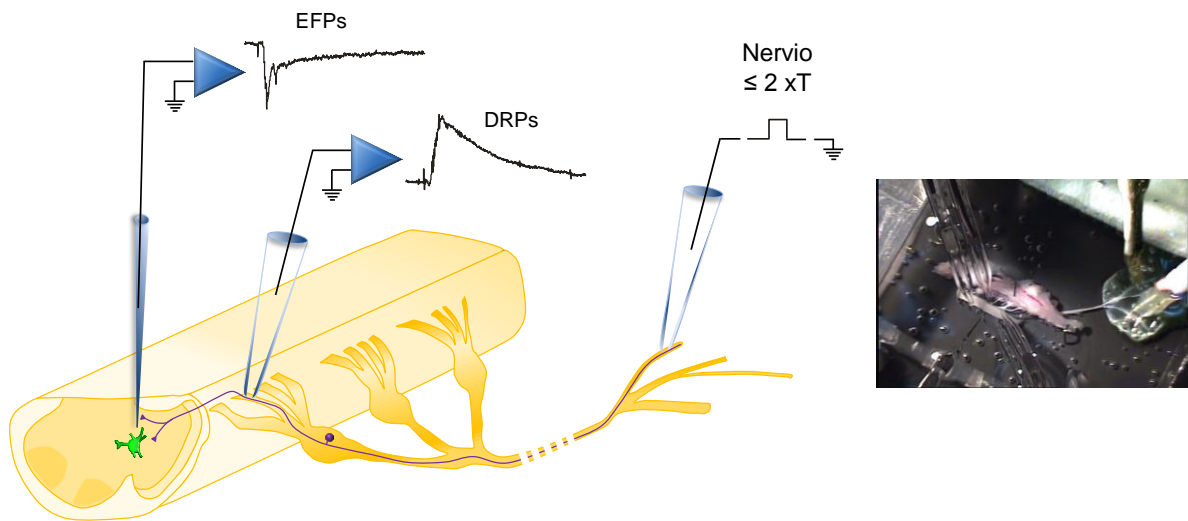
Los experimentos se realizan en ratones (BALB/c) de 6 días postnatales y sexo indistinto, los cuales se anestesian con la inmersión (excepto la cabeza) en agua helada durante algunos minutos. Posteriormente se decapitan y evisceran rápidamente manteniendo el tronco vertebral con parte de las costillas y de los músculos paravertebrales. La preparación se transfiere a una cámara de 150 ml conteniendo líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial para disección a 5°C, conteniendo (en mM): sacarosa 230, KCl 3, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1.2, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.5, MgSO<sub>4</sub> 10, NaHCO<sub>3</sub> 25, D-Glucosa 11. El LCR artificial se burbujea a nivel de saturación con una mezcla de carbógeno (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) a fin de ajustar el pH a 7.4. Mediante una vertebrectomía se expone la médula espinal de la región lumbosacra manteniendo la integridad de las raíces dorsales en continuidad con el nervio ciático y sus ramificaciones (Figura 20). Se cortan las raíces ventrales y posteriormente se realiza una hemisección sagital de la misma. Se disecan las ramas de nervio ciático (Sci): tibial (Tib), Sural (Su), Peroneo superficial (SP) y Peroneo profundo (DP), las cuales se seccionan lo más distalmente posible. Posteriormente, la preparación se transfiere a una cámara de registro de 130 ml, la cual se perfunde a flujo constante (15-20 ml/min) con LCR artificial para registro a 23 °C, que contiene (en mM): NaCl 125, KCl 2.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1.25, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2, MgSO<sub>4</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 26, D-Glucosa 25. La solución de registro se burbujea con una mezcla de carbógeno (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) a fin de ajustar el pH a 7.4. Por último, la médula espinal se estabiliza con agujas entomológicas manteniendo la superficie de la hemisección con un ángulo de 45°.

## *2. Estimulación y registro*

Los DRPs se registran mediante el empleo de un electrodo de succión (120  $\mu\text{m}$  de diámetro), colocado sobre la raíz lumbar L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub> lo más cercano posible a la médula espinal. El registro de los EFPs se lleva a cabo entre los segmentos espinales L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub> mediante micropipetas (2-4 M $\Omega$ ) llenas con una mezcla de NaCl 2M y azul de pontamina, las cuales se insertan con un ángulo de 90° en la superficie hemiseccionada (Figura 20), tomando como referencia el borde de las columnas dorsales y el canal central. Los EFPs reflejan las corrientes de membrana postsinápticas en la población de neuronas cercanas a la punta de la micropipeta.

Los nervios periféricos se estimulan monopolarmente mediante electrodos de succión, con el electrodo de referencia (plata cubierta con teflón, excepto en la punta) enrollado alrededor del mismo. Se emplean pulsos cuadrados de 200  $\mu\text{s}$  de duración, a una frecuencia de 0.1 Hz y con intensidades de estimulación  $\leq 2$  veces el valor umbral (2 xU) de las fibras más excitables, con lo cual se reclutan fibras aferentes mielinizadas (musculares del grupo I y II y cutáneas A $\beta$ ).

Los EFPs se registran con un amplificador Axoclamp-2B acoplado a un acondicionador de señales Cyber-Amp 320 (Molecular Devices, U.S.A.), mientras que los DRPs se registran con amplificadores acoplados a DC (A-M systems, U.S.A; filtro pasa bandas DC – 3 KHz). Las señales se capturan por medio del programa pClamp (v 10.2, Molecular Devices, U.S.A.) y se almacenan en una computadora PC para su análisis posterior fuera de línea.



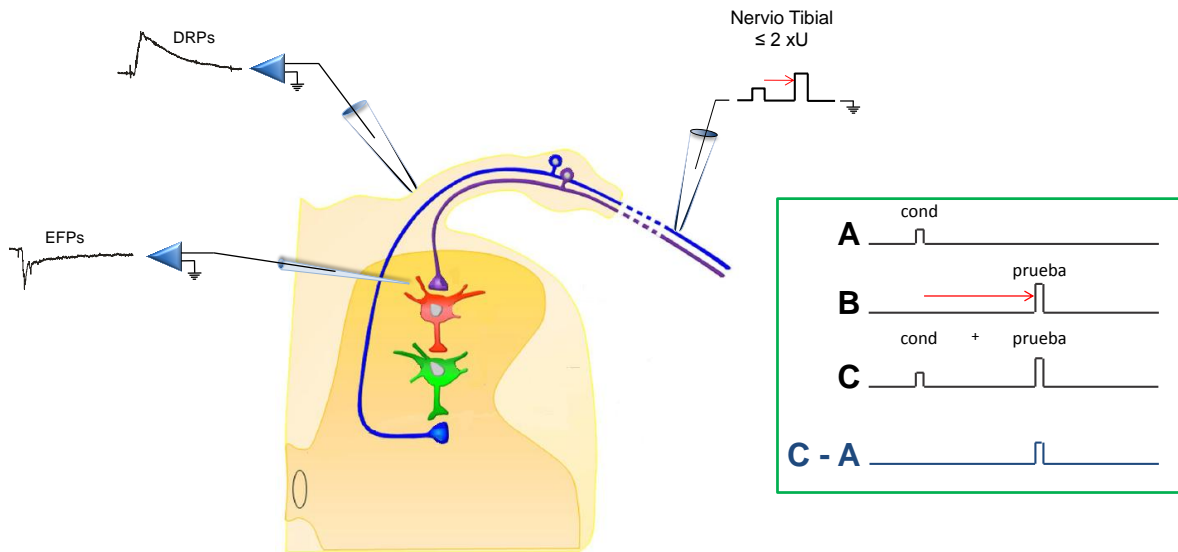
**Figura 20. Diagrama y fotografía del arreglo experimental de la médula espinal aislada del ratón neonato.** Se puede observar el electrodo de estimulación colocado sobre el nervio tibial (Tib), el electrodo de registro de los DRPs colocado en la porción proximal de una raíz dorsal y el electrodo de registro de los EFPs colocado a través de la superficie de la médula espinal hemiseccionada en el asta dorsal profunda.

### 3. Protocolo para estimar la depresión homosináptica

Para evaluar la depresión homosináptica y los efectos de la DA sobre la misma, se empleó el protocolo de pulsos pareados, utilizando el arreglo experimental mostrado en la Figura 21 (panel izquierdo). De manera alternada y secuencial: A) se aplica el estímulo condicionante al nervio tibial, B) se aplica el estímulo de prueba al mismo nervio, C) se aplican simultáneamente los estímulos condicionante y de prueba con intervalos de tiempo variables entre ambos estímulos (25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 y 10000 ms respectivamente) y 4) se subtrae la condición A de la condición C para obtener el efecto de la estimulación condicionante sobre el estímulo de prueba, sin la interferencia de algún posible efecto del estímulo condicionante solo.



Con los resultados obtenidos se construye una gráfica que muestra el curso temporal de la depresión homosináptica de los EFPs y DRPs para cada intervalo de tiempo entre el estímulo condicionante y de prueba.



**Figura 21. Protocolo de pulsos pareados para evaluar la depresión homosináptica.** *Panel izquierdo.* Se muestra el arreglo experimental empleado. *Panel derecho.* **A)** Estímulo condicionante. **B)** Estímulo de prueba. **C)** Aplicación de un pulso condicionante precediendo al pulso de prueba con un intervalo variable (25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 y 10000 ms). **C-A)** Sustracción del registro control A) del registro en la condición C) para obtener el estímulo de prueba afectado por la estimulación condicionante, sin la interferencia de éste último.

#### 4. Control de corriente y voltaje en la configuración de célula entera (“whole cell clamp”).

Para la elaboración de las micropipetas de registro se emplean capilares de borosilicato de pared delgada, con un diámetro externo de 1.5 mm (World Precision Instruments), estirados mediante un proceso de dos pasos (Narishige PC-10). Las micropipetas se llenan con una solución para registro intracelular, que contiene (en mM): Gluconato de potasio 120, KCl 10, NaCl 10, EGTA 0.20, HEPES 10, ATP 4, GTP 1, QX-314 5 (adicionado en algunos casos para inhibir las conductancias rápidas de  $\text{Na}^+$ ), ajustando el pH a 7.3 con NaOH.

La técnica de registro de control de voltaje y corriente, “a ciegas” (“blind patch”), en la modalidad de célula entera (“whole cell clamp”) (Blanton et al. 1989), se lleva a cabo a temperatura ambiente (23 °C), empleando un amplificador Axoclamp 700B (Molecular Devices, U.S.A.). Para la aplicación de protocolos de estimulación y captura de datos se emplea una tarjeta analógico-digital Digidata 1440A y el software pClamp 10 (Axon Instruments, Molecular Devices, U.S.A.). La resistencia de las micropipetas varía entre 5-7 M $\Omega$  y se mide empleando el “membrane test” del programa Clampex en la modalidad de control de voltaje. La micropipeta se inserta sobre la superficie hemiseccionada de la médula espinal en dirección al asta dorsal profundo (láminas IV-VI de Rexed) a nivel L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub>, con un ángulo de 90° respecto a la superficie de la hemisección, y aplicando una presión positiva mínima. Las interneuronas se localizan entre 50-150  $\mu$ m de profundidad, en el área correspondiente al registro de los EFPs de máxima amplitud. Una vez establecido un sello de alta impedancia (gigasello; > 1 G $\Omega$ ), se permite un tiempo de estabilización (1-3 min.) con un voltaje de mantenimiento de -80 mV. Se procede a la ruptura del parche de membrana mediante la aplicación de presión negativa. Inmediatamente se determina el potencial de membrana en reposo en la configuración de control de corriente. A partir del potencial de membrana registrado se aplican diversos protocolos de pulsos para estimar la resistencia y la constante de tiempo de la membrana, la corriente reobase, la amplitud y duración del potencial de acción, el patrón de disparo de los potenciales de acción, la presencia de rebote postinhibitorio y la presencia de una caída en la deflexión del voltaje con pulsos hiperpolarizantes, característica de la corriente de catiónica I<sub>h</sub> activada por hiperpolarización. Posteriormente, se registran las respuestas provocadas (EPSPs y EPSCs) por la estimulación de nervios periféricos (principalmente el nervio tibial). Los resultados se analizan con el programa Clampfit 10 y la estadística se lleva a cabo con el programa GraphPad Prism.

## 5. Fármacos

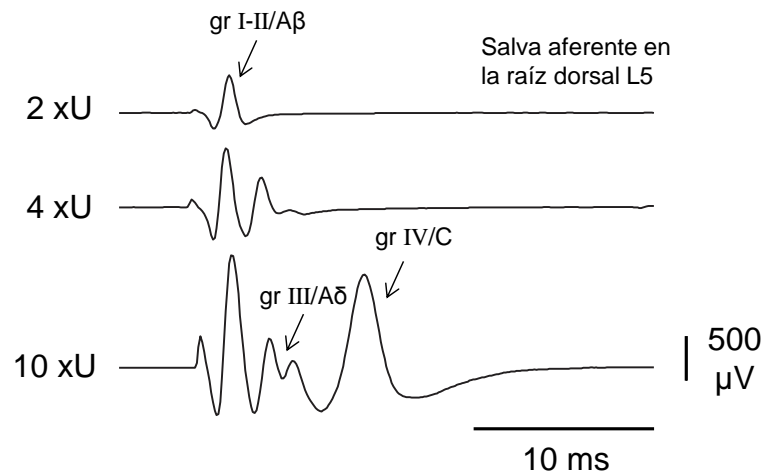
Los fármacos se preparan en alícuotas a concentraciones altas (1-10 mM) y se almacenan a -20°C hasta que son requeridos. Para su uso, se disuelven en el LCR artificial de registro para alcanzar las concentraciones deseadas. La determinación de los efectos de los fármacos se realiza mediante un cálculo porcentual del registro obtenido tras la acción del fármaco (8-12 min después de su aplicación) con respecto al registro control, asegurando la recuperación después de su lavado (10-20 min), cuando ello sea posible. Los siguientes fármacos fueron utilizados: dopamina (clorhidrato de 3-hidroxitiramina), SKF38393 (clorhidrato de SKF-38393), quinpirol (clorhidrato de quinpirol), GBR12909, desipramina (desmetilimipramina), pargilina (clorhidrato de pargilina)

## V. Resultados

### *1. Registro de los EFPs producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral a distintas profundidades en el asta dorsal.*

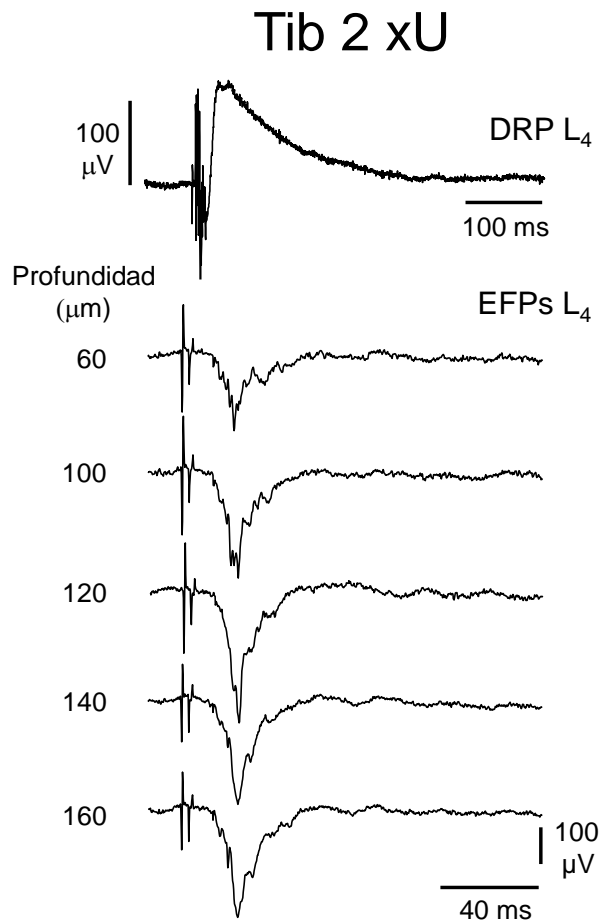
Primeramente, para asegurar una estimulación selectiva de fibras aferentes mielinizadas, registramos la salva aferente en el extremo caudal de una raíz dorsal, producida por la estimulación del extremo proximal (Figura 22). Pudimos observar que con intensidades  $\leq 2$  xU, se registra solamente el componente de mayor velocidad de conducción, el cual corresponde a la activación de fibras aferentes A $\beta$  y del grupo I y II. Observamos también que con intensidades de estimulación  $>4$  xU, se reclutan componentes de mayor latencia, atribuidos a la activación de las fibras A $\delta$  y C. Estos componentes de la salva aferente se registran de manera similar en el nervio ciático al estimular el nervio tibial (no ilustrado).

Posteriormente, con la finalidad de poder establecer la localización de las proyecciones de las fibras aferentes de bajo umbral en el asta dorsal de la médula espinal, se llevaron a cabo registros de los EFPs a distintas profundidades. En la Figura 23 se muestra el DRP registrado en la raíz dorsal L<sub>4</sub> y los EFPs, registrados simultáneamente en el mismo nivel y a distintas profundidades, ambos producidos por la estimulación del nervio tibial con una intensidad 2 xU. Como se muestra en la Figura 22, dicha intensidad asegura la activación selectiva de fibras aferentes mielinizadas de bajo umbral (Vejsada, Paleček, et al., 1985; García-Ramírez et al., 2014).



**Figura 22. Con una intensidad de estimulación 2 xU se reclutan solamente fibras aferentes mielinizadas.** Se puede observar que al estimular la porción proximal de la raíz dorsal L5 con intensidades menores a 2 xU, en la porción distal de la misma raíz se registra únicamente el componente de mayor velocidad de conducción, asociado a la activación de fibras aferentes A $\beta$  (cutáneas) y de los grupos I y II (musculares). Mientras que con intensidades mayores se reclutan componentes de menor velocidad de conducción atribuidos a la activación de fibras de los grupos III/ A $\delta$  y IV/ C.

Los DRPs registrados tienen una duración de ~250 ms y un tiempo al pico de ~42 ms. Los EFPs exhiben distintos componentes, de los cuales el de menor latencia (3 ms a partir de la salva aferente registrada en el DRP) es considerado como monosináptico, producto de la activación de fibras aferentes de bajo umbral y con mayor velocidad de conducción. Los EFPs de mayor amplitud se registraron entre los 100-140  $\mu$ m de profundidad. Los componentes de mayor latencia se deben a la activación de fibras de menor velocidad de conducción y probablemente también a la activación de vías oligosinápticas.

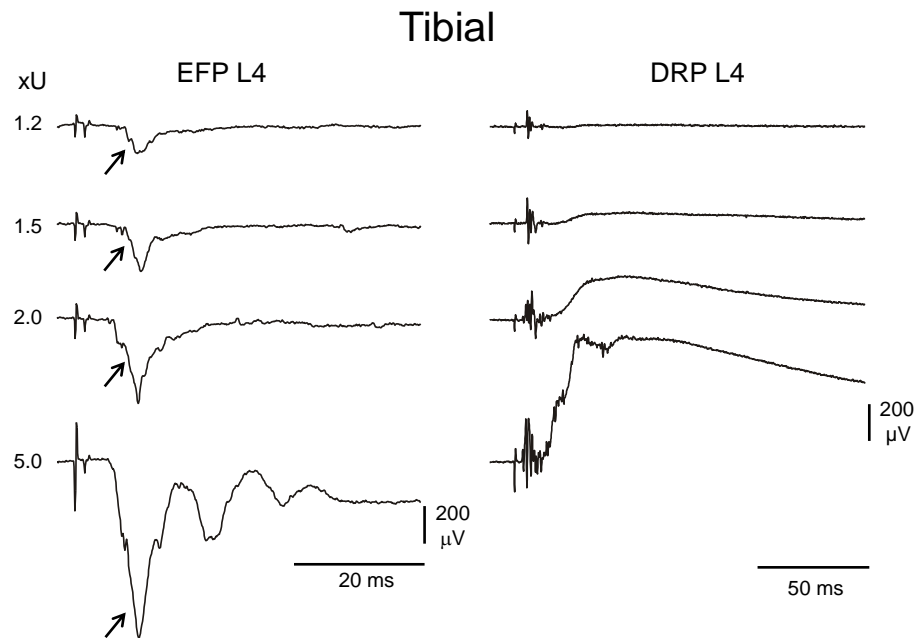


**Figura 23. Potenciales de raíz dorsal (DRPs) y potenciales extracelulares de campo (EFPs) registrados a distintas profundidades en el asta dorsal de la médula espinal del ratón, producidos por la estimulación del nervio tibial (Tib).** *Panel superior.* DRPs evocados por la estimulación del nervio tibial con una intensidad de estimulación 2 xU. *Panel inferior.* EFPs registrados a las profundidades indicadas. Cada trazo representan el promedio de 12 muestras.

## *2. Registro de los EFPs y DRPs producidos por la estimulación del nervio tibial con intensidades de estimulación graduadas*

En la Figura 24 se puede observar que la estimulación del nervio tibial con intensidades graduadas produce EFPs (registrados a una profundidad de 100  $\mu\text{m}$ ) con características diferentes. Con intensidades de estimulación bajas (1.2 xU) los EFPs exhiben un componente de latencia corta, que corresponde a la activación monosináptica de las interneuronas del asta dorsal. A medida que se incrementa

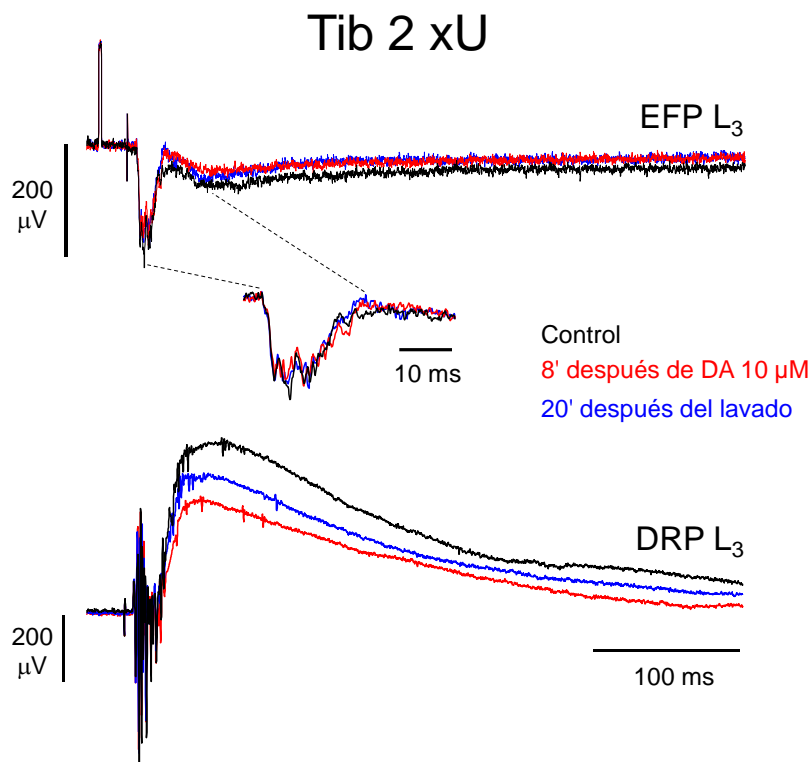
la intensidad de estimulación aparecen componentes de mayor latencia. Ambos componentes exhiben una mayor amplitud al incrementar la intensidad de estimulación. De manera similar, la amplitud de los DRPs se incrementa con intensidades de estimulación más alta, alcanzando un valor máximo con una intensidad 5 xU. Se puede observar que los DRPs son susceptibles a una facilitación espacial al incrementar la intensidad de estimulación, debido al gran número de terminales aferentes que proyectan hacia distintos niveles de la médula espinal.



**Figura 24. Potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación del nervio tibial (Tib) con distintas intensidades.** *Panel izquierdo.* EFPs registrados a nivel L<sub>4</sub> y a una profundidad de 100 μm. A medida que se incrementa la intensidad de estimulación, se observa un incremento en la amplitud del componente monosináptico (indicado con una flecha). *Panel derecho.* DRPs registrados a nivel L<sub>4</sub> a la misma profundidad que los EFPs. Puede apreciarse un incremento en la amplitud del DRP, siendo máxima para una intensidad 5 xU.

### 3. Efecto de la DA sobre los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral

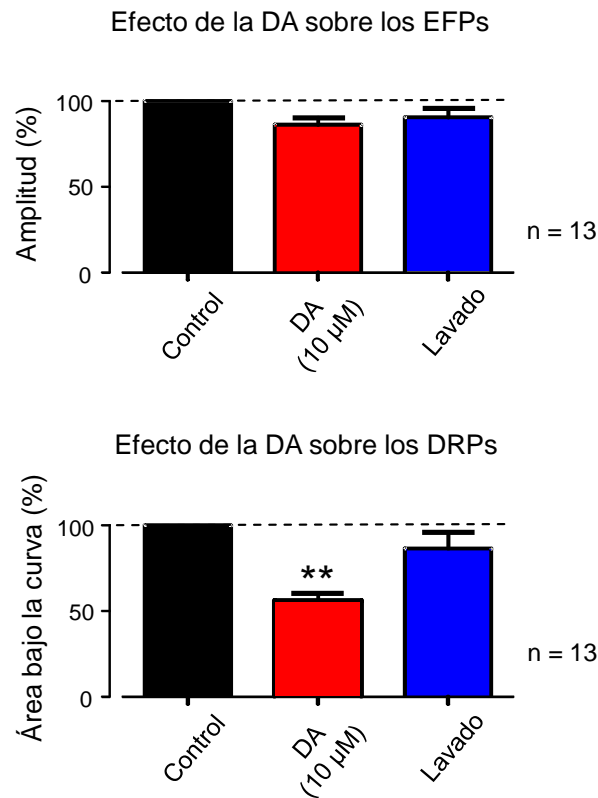
La Figura 25 muestra el efecto de la DA sobre los EFPs y DRPs evocados por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral (2 xU). Se puede notar que a los 8 min de la aplicación de DA 10  $\mu$ M, el componente más rápido de los EFPs (trazo superior) no se ve afectado, mientras que los DRPs (trazo inferior) se deprimieron a un 63% de la amplitud control. En 13 experimentos, la depresión promedio de los DRPs fue de  $55.93\% \pm 4.36$  (E.E.M.) con respecto al valor control (Figura 26). El efecto de la DA fue parcialmente reversible, a un  $87.05\% \pm 3.31$  (E.E.M.) del valor control, después de 20 minutos de lavado.



**Figura 25.** La DA deprime los potenciales de raíz dorsal (DRPs) pero no los potenciales extracelulares de campo (EFPs) evocados por la estimulación de fibras de bajo umbral del nervio tibial (Tib). *Panel superior.* Efecto de la DA sobre los EFPs producidos por la estimulación del nervio Tib con una intensidad de 2 xU, en condiciones control (negro), a los 8 minutos de la aplicación de DA (rojo) y después de 20 minutos del lavado (azul). *Inserto.* Componente monosináptico de los EFPs con una mayor velocidad de barrido. *Panel inferior.* Efecto de la DA sobre los DRPs registrados simultáneamente. Nótese la ausencia de efecto de la DA sobre los EFPs y la marcada depresión sobre los DRPs.



La ausencia de efecto de la DA sobre el componente monosináptico de los EFPs indica que la transmisión sináptica de las fibras aferentes no fue afectada. La depresión de los DRPs puede deberse a un efecto inhibitorio sobre la vía neuronal que media la PAD (ver discusión).

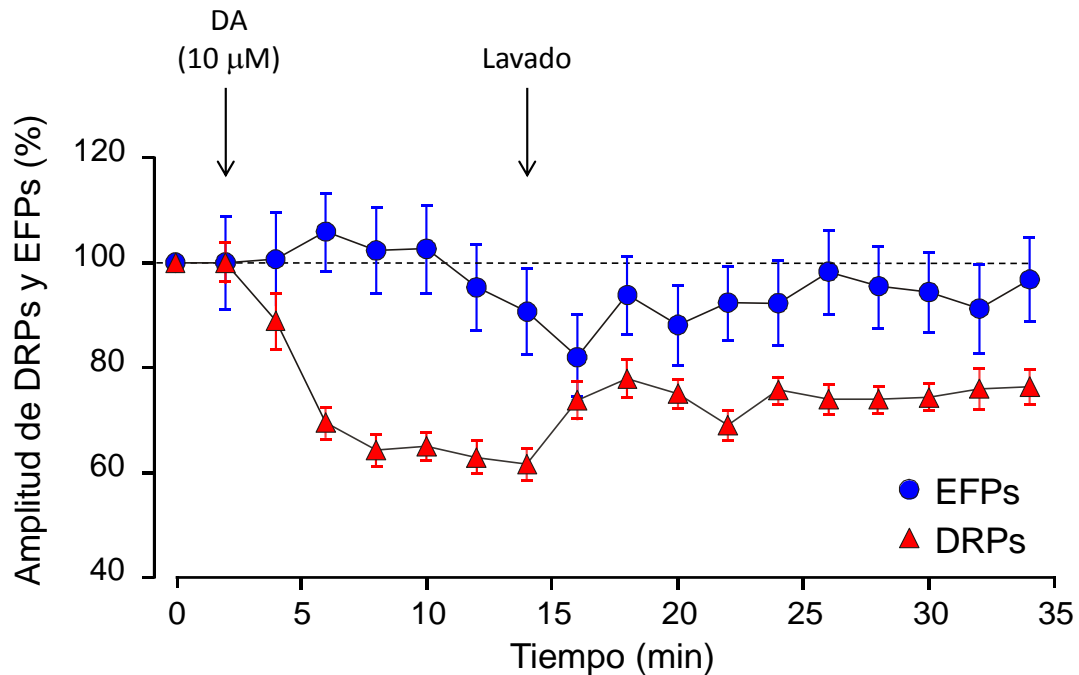


**Figura 26. Resumen de los efectos de la DA sobre los potenciales de raíz dorsal (DRPs) y los potenciales extracelulares de campo (EFPs) evocados por la estimulación de fibras de bajo umbral del nervio tibial (Tib).** Las barras muestran el promedio y el E.E.M. (\*\*) $P < 0.01$ , ANOVA de 1 vía y prueba de Dunnett.  $n = 13$  experimentos.

#### 4. Curso temporal de los efectos de la DA sobre los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral

La Figura 27 ilustra el curso temporal del efecto de la DA (10 μM) sobre los EFPs y los DRPs. Los DRPs (*triángulos rojos*) se deprimieron aproximadamente a los 2 minutos de la aplicación de la DA, alcanzando un máximo (60% con respecto

al control) a los 5 minutos. Los EFPs (*círculos azules*) no fueron afectados significativamente después de 10 minutos de la aplicación de DA.



**Figura 27. Curso temporal de los efectos de la DA sobre los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y los potenciales de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación del nervio tibial (Tib).** Los DRPs (*triángulos rojos*) se deprimieron ~ a los 2 minutos de la aplicación de DA 10 µM, alcanzando un máximo (60% con respecto al control) a los 5 minutos. Los EFPs (*círculos azules*) no fueron afectados después de 10 minutos de la aplicación de la DA. El nervio tibial (Tib) se estimuló con una intensidad 2 xU. Las flechas indican el momento de la aplicación de la DA y el inicio del lavado. Los valores representan el promedio  $\pm$  E.E.M. (n=12 muestras, 1 experimento).

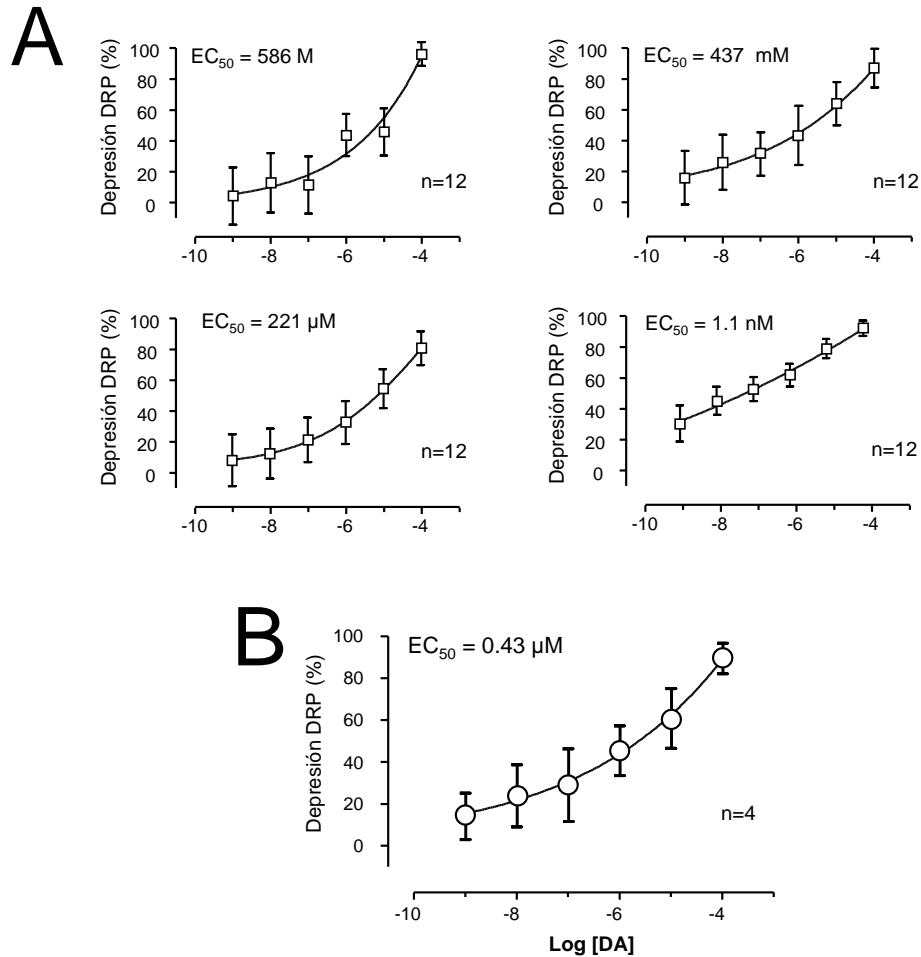
La recuperación incompleta de los DRPs podría sugerir una posible desensibilización de los receptores dopaminérgicos, o un lavado incompleto de la DA. No obstante, en experimentos separados se registraron los EFPs y DRPs durante ciclos consecutivos control-DA-lavado y se observó el mismo efecto depresor de la DA en comparación con el efecto producido por la primera aplicación. La recuperación incompleta del DRPs después de la aplicación de la DA se debe probablemente a una deriva producida por la pérdida progresiva de la succión en el electrodo de registro, y posiblemente en el electrodo de estimulación del nervio tibial, ya que los EFPs también se deprimieron, aunque no

significativamente. Por consiguiente, es probable que en el experimento de la Figura 25 la recuperación incompleta también se deba al mismo fenómeno.

##### *5. Eficacia de la DA en la depresión de los DRPs*

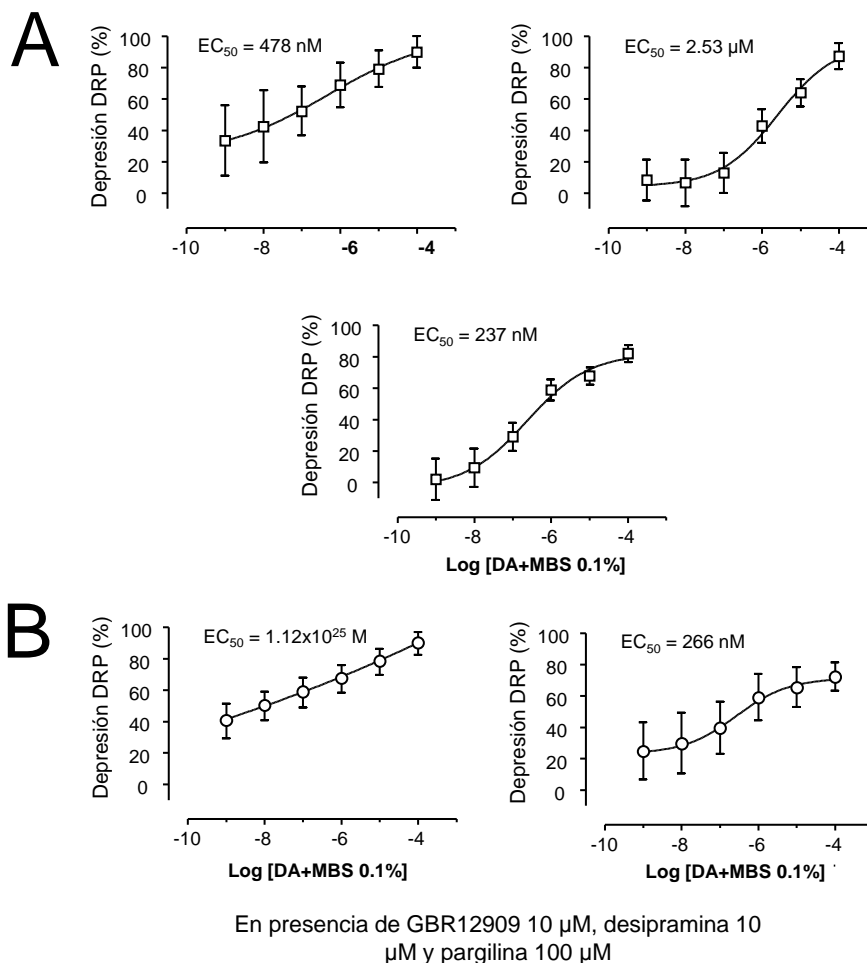
El siguiente objetivo fue determinar la eficacia del efecto biológico de la DA, mediante el cálculo de la  $EC_{50}$  (Figura 28). Para ello, se aplicaron concentraciones crecientes y acumulables (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) de DA. La magnitud del efecto se estimó como el porcentaje del área bajo la curva de los DRPs con respecto al control.

En 4 experimentos realizados (Figura 28A), se puede apreciar que las curvas concentración-respuesta exhiben una forma atípica y no alcanzan una saturación. Además, el análisis con el programa Prisma arrojó valores de  $EC_{50}$  ambiguos o demasiado altos, aunque el 50% de la inhibición ocurrió con una concentración 1  $\mu\text{M}$ . Este comportamiento también se refleja en la curva concentración-respuesta promedio (Figura 28B) (ver discusión).



**Figura 28. La DA deprime los DRPs en una manera dependiente de la concentración. A)** Curvas concentración-respuesta del efecto de la DA sobre el área bajo la curva de los DRPs producidos por la estimulación del nervio tibial con una intensidad 2 xU. La DA se aplicó en concentraciones acumulables de 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM, registrando durante 6 minutos para cada concentración. Cada punto representa el promedio de los últimos 2 minutos previo a una nueva aplicación. Cada punto de la gráfica representa el porcentaje de inhibición de los DRPs respecto al control. La *n* representa el número de muestras (12). **B)** Curva concentración-respuesta que muestra el promedio de los cuatro experimentos. Los valores corresponden al promedio ± E.E.M.

Debido a este comportamiento atípico, se procedió a realizar una nueva determinación de la curva concentración-respuesta para DA en presencia de metabisulfito de sodio al 0.1 % (MBS 0.1 %), con la finalidad de evaluar si un proceso oxidativo de la DA pudiera haber afectado la disponibilidad y por tanto, no se haya alcanzado un nivel de saturación en las curvas a concentraciones altas, ni valores de EC<sub>50</sub> congruentes.



**Figura 29. Efecto del metabisulfito (MBS) de sodio al 0.1 % sobre la eficacia de la DA en la depresión de los DRPs.** **A)** Curvas concentración-respuesta del efecto de la DA, en presencia del antioxidante MBS 0.1 %. En presencia del MBS la DA se aplicó en concentraciones acumulables (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100  $\mu$ M), registrando durante 6 minutos para cada concentración. Cada punto representa el promedio de los últimos 2 minutos previo a una nueva aplicación. Cada punto de la gráfica representa el porcentaje de inhibición de los DRPs respecto al control. La  $n$  representa el número de muestras (12). **B)** Curvas concentración-respuesta que muestra el efecto de la DA en presencia de GBR12909 (10  $\mu$ M), un agente bloqueador del transportador a DA (DAT), desipramina (10  $\mu$ M), un inhibidor del transportador de noradrenalina (NET), y pargilina (100  $\mu$ M), un inhibidor de la monoaminoxidasa B (MAO<sub>B</sub>). Todos los valores corresponden al promedio  $\pm$  E.E.M.

Pudimos observar que la aplicación de DA adicionada con MBS 0.1 % generó una serie de curvas concentración-respuesta con un comportamiento “típico”, permitiendo la determinación de los valores de EC<sub>50</sub> para los efectos de la DA en la depresión de los DRPs, producidos por la estimulación del nervio Tib con una intensidad de 2 xU, en el rango de nanomolar (nM) y micromolar ( $\mu$ M) (Figura

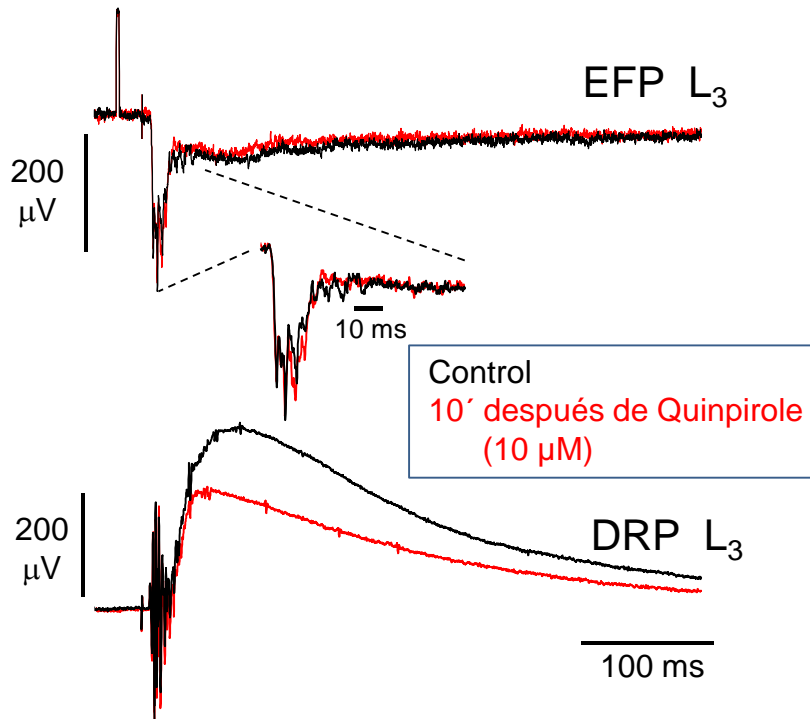
29A). Por lo que concluimos que la causa del comportamiento atípico de las curvas concentración-respuesta iniciales fue la oxidación de la DA.

Adicionalmente, se determinaron las curvas concentración-respuesta para la DA en presencia de GBR12909 (10  $\mu\text{M}$ ), un agente bloqueador del transportador a DA (DAT), desipramina (10  $\mu\text{M}$ ), un inhibidor del transportador de noradrenalina (NET), y pargilina (100  $\mu\text{M}$ ), un inhibidor de la monoaminoxidasa B (MAO<sub>B</sub>), a fin de determinar si alguno de estos elementos se asocia con la alteración en la eficacia de la DA para deprimir los DRPs a distintas concentraciones. No se notó un cambio en la curva concentración-respuesta obtenida (Figura 29B), aunque se requiere un mayor número de muestras para establecer si éste es significativo.

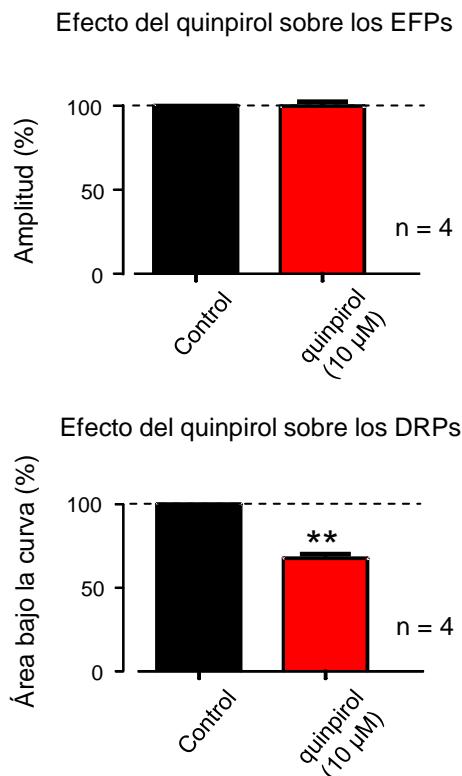
#### *6. Efecto de algunos agonistas de los receptores a DA sobre los EFPs y DRPs*

Con el propósito de determinar los subtipos de receptores implicados en la depresión de los DRPs, se examinó el efecto de algunos agonistas dopaminérgicos. Inicialmente se empleó una concentración 1  $\mu\text{M}$  para todos ellos; no obstante, los efectos fueron marginales. Por esta razón, se procedió a aplicar una concentración 10  $\mu\text{M}$  para cada uno de los agonistas, considerando que se trata de un efecto biológico en una preparación relativamente grande, en donde usualmente se requiere de concentraciones mayores a las pKi.

Posteriormente, tal como se muestra en la Figura 30 se investigó el efecto del agonista de los receptores de la familia D<sub>2</sub>-like, quinpirole, el cual deprimió los DRPs a un 68% con respecto al control. En 4 experimentos, la depresión promedio de los DRPs fue de 67.8%  $\pm$  2.07 (E.E.M.) (Figura 31).



**Figura 30. El agonista de los receptores de la familia D<sub>2</sub>-like deprime los potenciales de raíz dorsal (DRPs) sin efecto sobre los potenciales extracelulares de campo (EFPs).** Efecto del agonista de los receptores de la familia D<sub>2</sub>-like, quinpirole (10 μM), sobre los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de fibras aferentes mielinizadas del nervio Tibial con una intensidad 2 xU. Los DRPs se deprimieron a un 68 % del control, sin efecto sobre el componente monosináptico de los EFPs.



**Figura 31. Resumen de los efectos del agonista  $D_2$ -like, quinpirol, sobre los potenciales de raíz dorsal (DRPs) y los potenciales extracelulares de campo (EFPs) evocados por la estimulación de fibras de bajo umbral del nervio tibial (Tib).** Las barras muestran el promedio y el E.E.M. (\*\*),  $P < 0.001$ , prueba  $t$  de Student pareada.  $n = 4$  experimentos.

En 5 experimentos se investigaron los efectos del agonista de los receptores de la familia  $D_1$ -like, SKF38393, sobre los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral (no ilustrado). Los DRPs se deprimieron un  $17\% \pm 6$  (E.E.M.) y los EFPs se facilitaron un  $1.4\% \pm 2.2$ , de la amplitud control, valores estadísticamente no significativos (prueba  $t$  de Student pareada  $P < 0.001$ ).

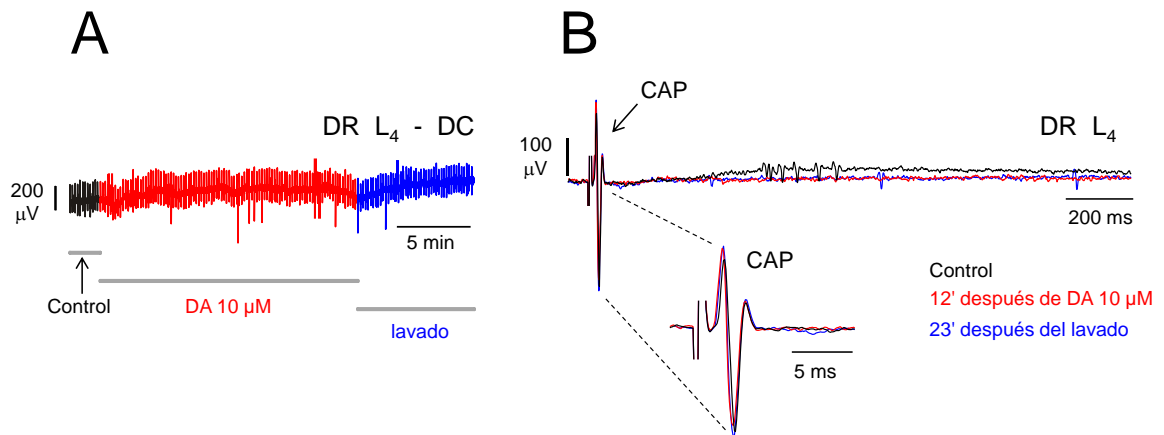
### 7. Efecto de la DA sobre el potencial de DC y la excitabilidad de las fibras aferentes de bajo umbral.

A fin de determinar si la DA modula la excitabilidad de las fibras aferentes de bajo umbral, como se ha reportado para las fibras aferentes de alto umbral



(Oksamitnyĭ & Tamarova, 1987), se examinó el efecto de la DA sobre el potencial DC registrado en las raíces dorsales. En la Figura 32A se puede observar que la aplicación de DA a una concentración 10  $\mu\text{M}$  no produjo cambios sobre el estado de polarización de las fibras.

Adicionalmente, mediante la técnica de Wall (Figura 32B), se observó que la DA no modifica significativamente el componente de mayor velocidad de conducción del potencial de acción compuesto (CAP) antidrómico, producido por la microestimulación intraespinal (500  $\mu\text{s}$ , 3  $\mu\text{A}$ ) con una intensidad submáxima, pero deprime el DRP producido por el mismo estímulo.



**Figura 32. La DA no modifica el potencial DC registrado en las raíces dorsales ni la amplitud del potencial compuesto antidrómico (CAP) producido por la microestimulación intraespinal. A)** Registro continuo del potencial DC en una raíz dorsal en condición control, en presencia de DA y durante el lavado (las deflexiones rápidas corresponden a los DRPs registrados simultáneamente). **B)** CAPs y DRPs producidos por la microestimulación intraespinal con pulsos de 500  $\mu\text{s}$  y 3  $\mu\text{A}$ , con una intensidad submáxima para la generación de los CAPs. Nótese la ausencia de efecto de la DA sobre los CAPs y la depresión de los DRPs producidos por la microestimulación intraespinal.

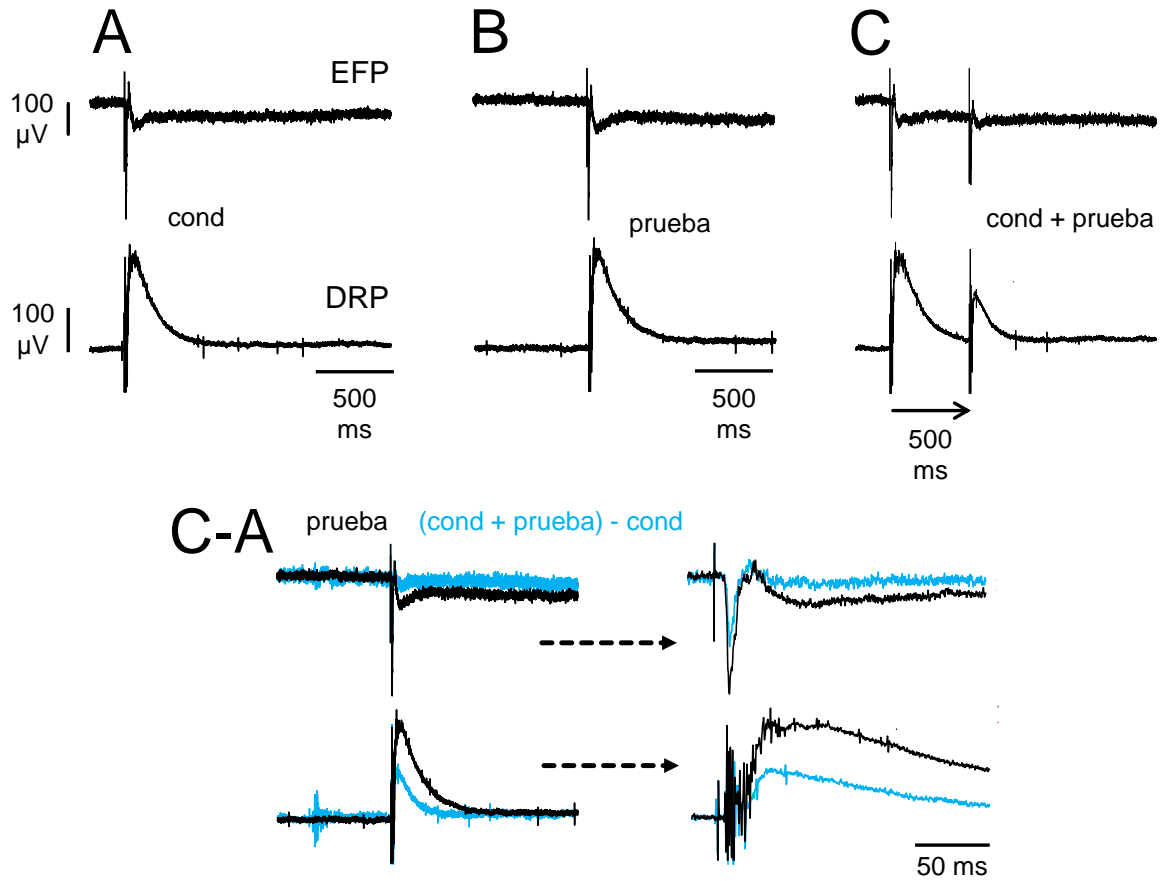
#### 8. Efecto de la DA sobre la depresión homosináptica de los EFPs y DRPs, producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas

Para evaluar de manera indirecta si la DA afecta la eficacia sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral, se investigaron sus efectos sobre la inhibición

prolongada producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas, conocida como depresión homosináptica, que se sabe tiene un origen presináptico (Lev-Tov y Pinco, 1992).

En la Figura 33 se muestran los registros obtenidos con el protocolo de pulsos pareados, en la condición control y para un intervalo de tiempo entre estímulos (IEE) de 500 ms, sobre los EFPs y DRPs producidos por la estimulación del nervio Tib 2 xU. Se muestran los registros producidos por el estímulo condicionante (Figura 33A), por el estímulo de prueba (Figura 33B) y el efecto de la estimulación condicionante sobre el estímulo de prueba con un IEE de 500 ms (Figura 33C). Al sustraer la condición C-A (ver métodos) se puede observar que la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas produjo una depresión de los EFPs y DRPs de  $42.8\% \pm 1.87$  y  $44.12\% \pm 2.31$  (E.E.M.) con respecto al control, respectivamente.

Los valores de depresión de los EFPs y DRPs observados en la condición control, para todos los IEE, se muestran en la Tabla 3. Se puede observar que la depresión homosináptica de los EFPs y DRPs ocurre con un máximo a los 25 ms de intervalo entre el estímulo condicionante y el de prueba, decae paulatinamente y se prolonga hasta los 10 segundos.



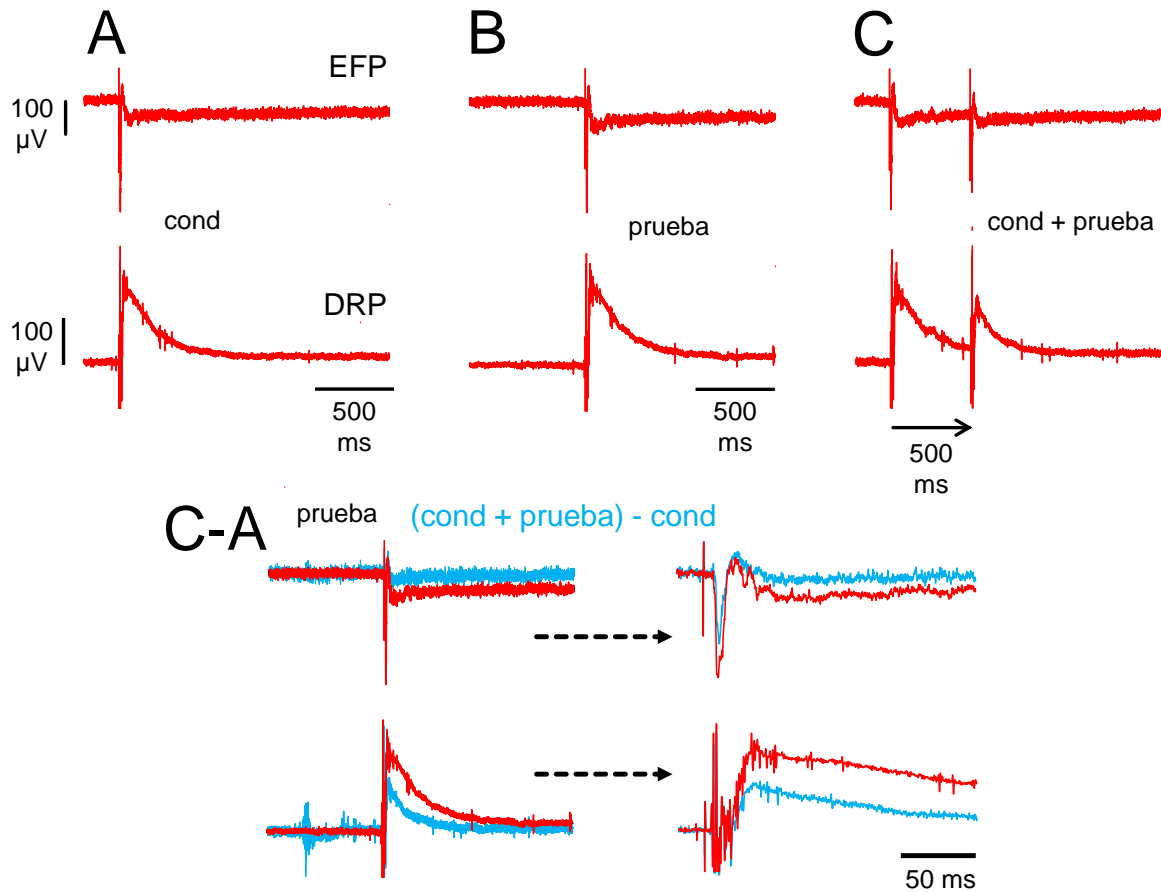
**Figura 33. Depresión homosináptica de los EFPs y DRPs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas. A)** EFPs y los DRPs producidos únicamente por el estímulo condicionante. **B)** EFPs y DRPs producidos únicamente por el estímulo de prueba. **C)** Efecto de la estimulación condicionante sobre el estímulo de prueba a un IEE de 500 ms. En **C-A)** se puede observar el efecto que ejerce el estímulo condicionante sobre la respuesta al estímulo de prueba, tras realizar la sustracción del registro A del registro en C. En el panel derecho de C-A se muestran los registros con una mayor velocidad de barrido.

**Tabla 3. Depresión homosináptica promedio de los EFPs y DRPs, registrados en condición control y tras la aplicación de DA (10  $\mu$ M), en los distintos intervalos de tiempo entre estímulos mostrados.**

IEE	25 ms	50 ms	100 ms	200 ms	500 ms	1 s	2 s	5 s	10 s
<b>EFPs Control</b>	16.0 $\pm$ 0.8	21.5 $\pm$ 1.9	28.8 $\pm$ 1.8	43.4 $\pm$ 1.4	57.2 $\pm$ 1.8	65.1 $\pm$ 1.1	72.5 $\pm$ 1.1	86.9 $\pm$ 1.3	96.6 $\pm$ 0.7
<b>EFPs DA</b>	29.9 $\pm$ 2.7	32.2 $\pm$ 0.8	44.8 $\pm$ 3.2	52.4 $\pm$ 1.9	65.9 $\pm$ 3.1	73.6 $\pm$ 2.1	82.8 $\pm$ 1.9	91.2 $\pm$ 0.9	84.2 $\pm$ 4.2
<b>DRPs Control</b>	10.4 $\pm$ 1.5	10.8 $\pm$ 1.9	19.0 $\pm$ 2.9	32.0 $\pm$ 2.9	55.8 $\pm$ 2.3	58.3 $\pm$ 2.5	70.3 $\pm$ 1.8	85.8 $\pm$ 1.2	94.7 $\pm$ 0.6
<b>DRPs DA</b>	38.2 $\pm$ 3.7	41.6 $\pm$ 4.3	43.4 $\pm$ 3.3	55.0 $\pm$ 2.7	62.0 $\pm$ 2.7	64.1 $\pm$ 2.0	72.8 $\pm$ 1.2	88 $\pm$ 0.6	83.2 $\pm$ 4.4

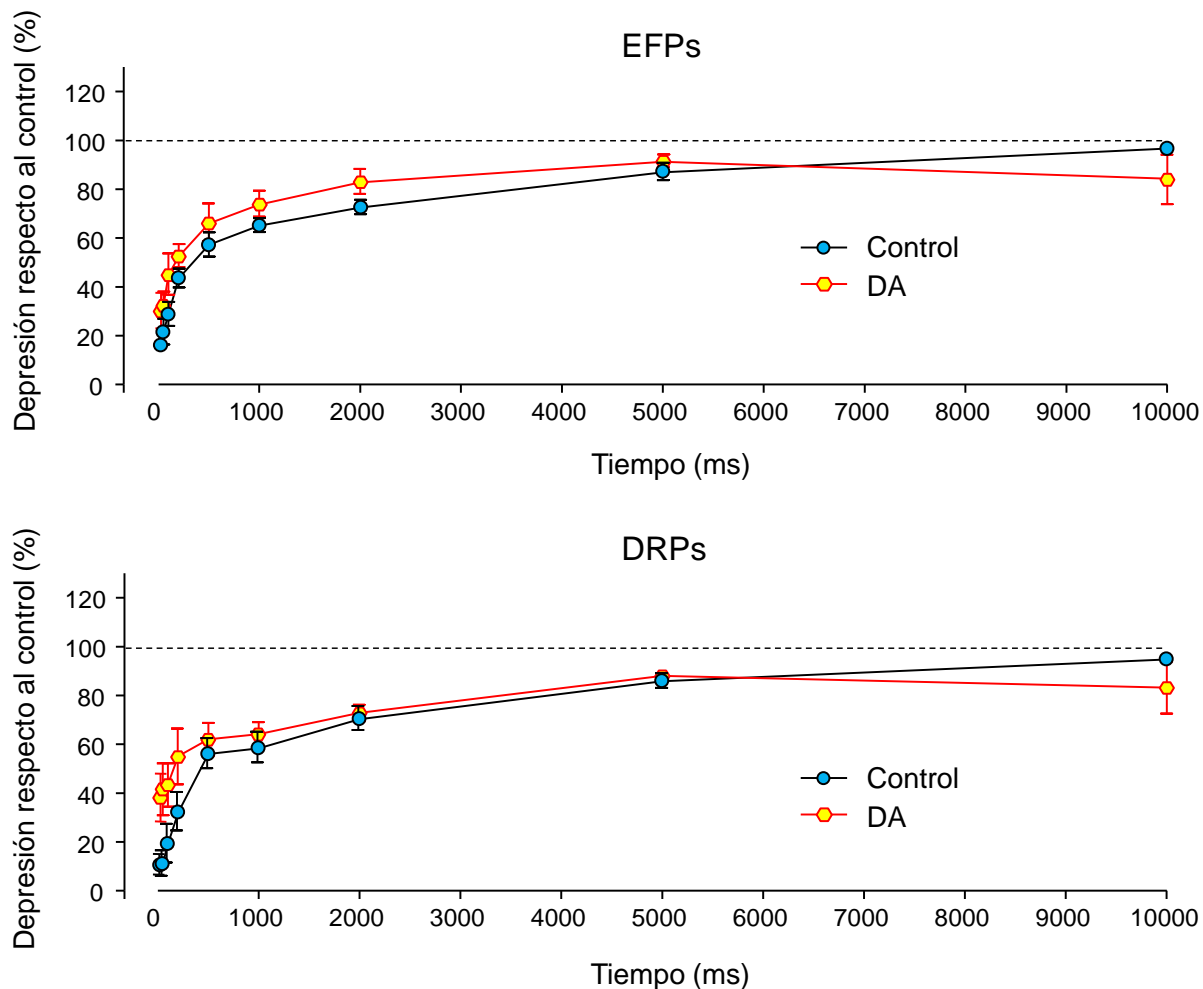
Los valores representan la depresión promedio  $\pm$  E.E.M. del área bajo la curva con respecto al control, determinada para los EFPs y DRPs ( $n = 7$ ) a los intervalos indicados.

Una vez establecido el protocolo para estimar la depresión homosináptica de los EFPs y DRPs en condiciones control, se procedió a investigar los efectos de la DA (10  $\mu$ M) sobre dicha depresión, mediante el mismo protocolo de pulsos pareados, a distintos IEE (Figura 34). Es importante remarcar que en la figura 34 se muestran los EFPs y DRPs en presencia de DA 10  $\mu$ M, es decir, los DRPs ya fueron deprimidos por el efecto de la DA, sin que los EFPs hayan sido afectados (ver Figura 25). En presencia de DA la depresión homosináptica de los EFPs y DRPs fue de  $65.96 \pm 3.15$ , y de  $62.05 \pm 2.72$  (E.E.M.) con respecto al valor control, respectivamente, con un IEE de 500 ms. En la Tabla 3 se muestran los valores de la depresión homosináptica sobre los EFPs y DRPs tras la aplicación de DA, para los diferentes IEE. Al igual que en la condición control, se puede observar que la depresión homosináptica ocurrió con un máximo a las 25 ms de intervalo, decayendo paulatinamente y prolongándose hasta los 10 segundos. Estos resultados indican que la DA no modifica la eficacia sináptica de las fibras aferentes mediante la activación de receptores localizados de forma presináptica (ver discusión).



**Figura 34. Efecto de la DA sobre la depresión homosináptica de los EFPs y DRPs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas.** Mismo formato que la figura anterior. Todos los registros fueron realizados en presencia de DA 10  $\mu$ M. Se puede observar que la DA no afecta la depresión homosináptica, a pesar de la inhibición de los DRPs, previo al protocolo de estimulación pareada.

En la Figura 35 se muestran las gráficas con los datos de la Tabla 3. Se puede observar claramente que el curso temporal y la duración de la depresión homosináptica de los EFPs y DRPs es muy similar en condiciones control y en presencia de la DA. No hubo una diferencia significativa en ambas condiciones (ANOVA de 1 vía y prueba de Dunnet,  $P < 0.01$ ).

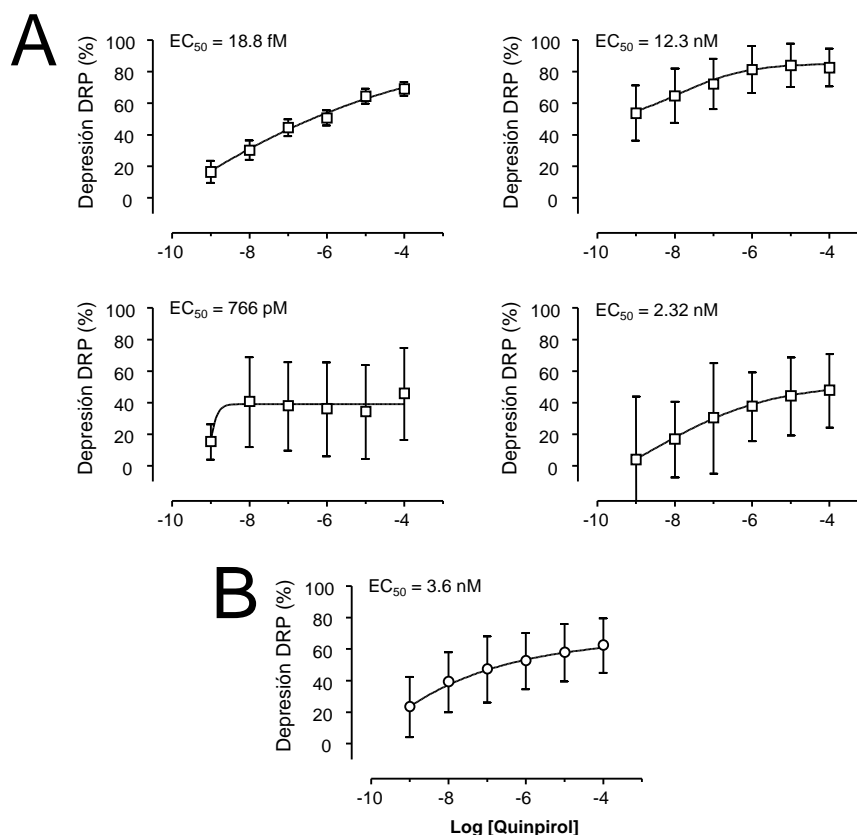


**Figura 35. Curso temporal de la depresión homosináptica de los EFPs y DRPs evocados por la estimulación de fibras aferentes homónimas del nervio Tib 2 xU.** *Panel superior.* Curso temporal de la depresión homosináptica de los EFPs a distintos IEE, en condición control (círculos azules) y en presencia de DA 10  $\mu$ M (círculos amarillos). *Panel inferior.* Ídem panel superior, para el caso de los DRPs. Cada punto representa el promedio  $\pm$  E.E.M. del área bajo de la curva (EFPs y DRPs) en 7 experimentos.

### 9. Eficacia del agonista de los receptores $D_2$ -like (quinpirol), sobre la depresión de los DRPs

Con el propósito de evaluar la eficacia del agonista de los receptores  $D_2$ -like (quinpirol), sobre la depresión de los DRPs producidos por la estimulación del nervio Tib 2 xU, se determinaron las curvas concentración-respuesta y los valores

de  $EC_{50}$  para una  $n = 4$  experimentos (Figura 36). Los valores de  $EC_{50}$  obtenidos fueron ambiguos o estuvieron en el rango picomolar ( $\mu\text{M}$ ) o nanomolar ( $\text{nM}$ ), lo que se atribuye a la elevada afinidad que presenta este agonista por los receptores de la familia  $D_2$ -like.

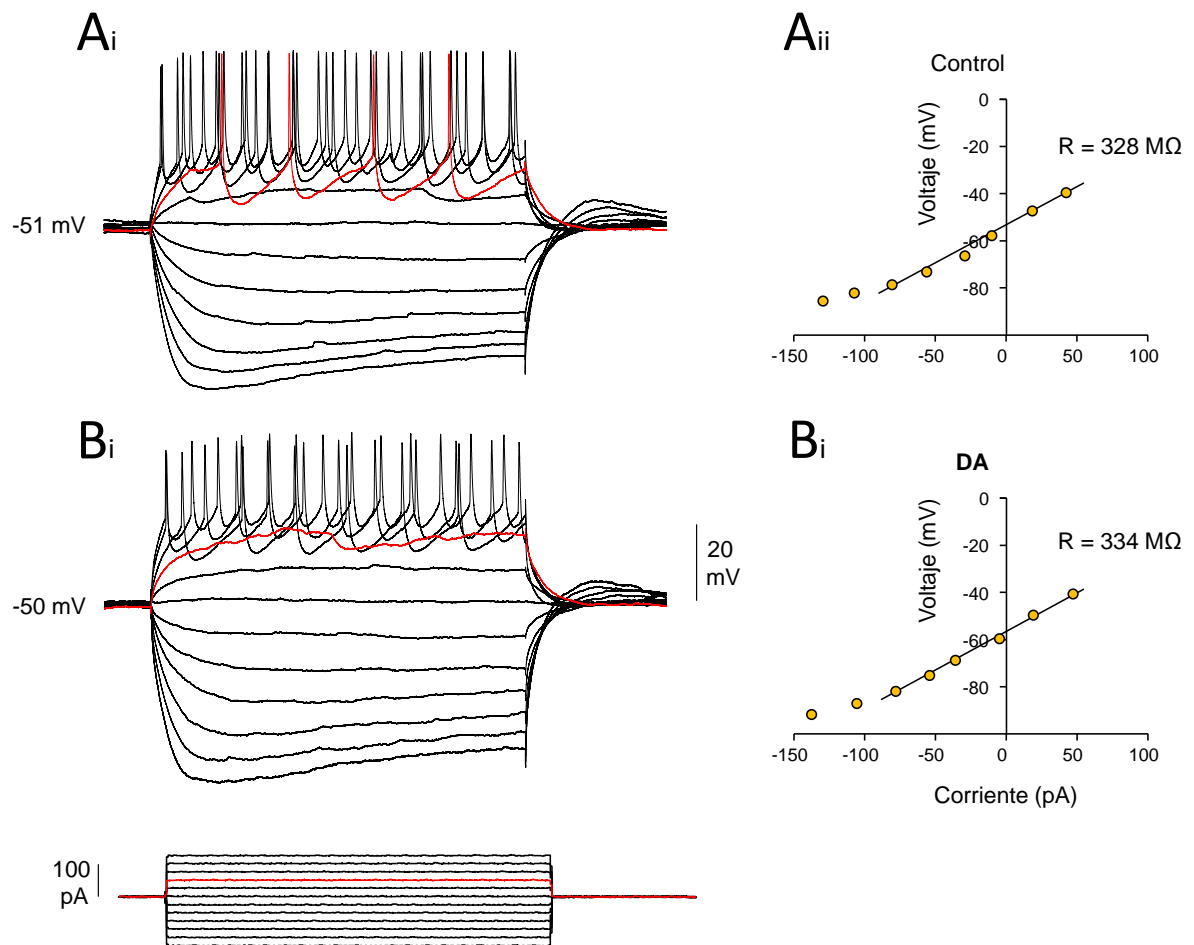


**Figura 36. El quinpirol deprime los DRPs en una manera dependiente de la concentración, de manera similar a la DA. A)** Curvas concentración-respuesta del efecto del quinpirol sobre el área bajo la curva de los DRPs producidos por la estimulación del nervio tibial con una intensidad 2 xU. El quinpirol se aplicó en concentraciones acumulables (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ), registrando durante 6 minutos para cada concentración. Cada punto representa el promedio de los últimos 2 minutos previo a una nueva aplicación. Cada punto de la gráfica representa el porcentaje de inhibición de los DRPs con respecto al control. La  $n$  representa el número de muestras (12). **B)** Curva concentración-respuesta que muestra el promedio de los cuatro experimentos. En este caso se consideró una concentración mínima de quinpirol igual a cero. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  E.E.M.

*10. Efecto de la DA sobre las propiedades de membrana de las interneuronas del cuerno dorsal registradas en la configuración de célula entera*

Las interneuronas del asta dorsal profunda registradas en la modalidad de célula entera, se sometieron a un protocolo de pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante de 1 segundo de duración, para determinar la reobase, la resistencia de entrada ( $R_N$ ), la capacitancia ( $C_m$ ) y la constante de tiempo ( $\tau_m$ ) de membrana. La magnitud de los pulsos de corriente se ajustó para cada neurona registrada. Posteriormente se evaluó el efecto de la DA sobre estas propiedades. La Figura 37 muestra registros representativos de una interneurona con una deflexión del potencial de membrana a pulsos hiperpolarizantes, característico de la corriente  $I_h$ . Con pulsos despolarizantes la interneurona disparó una ráfaga de potenciales de acción, cuya frecuencia fue dependiente de la magnitud de la corriente despolarizante. En la condición control los valores de las propiedades de membrana fueron: potencial de membrana = -51 mV, reobase = 50 pA,  $C_m$  = 508 pF,  $R_N$  = 328 M $\Omega$  y  $\tau_m$  = 190 ms. En presencia de DA 10  $\mu$ M los valores fueron: potencial de membrana = -50 mV, reobase = 75 pA,  $C_m$  = 447 pF,  $R_N$  = 334 M $\Omega$  y  $\tau_m$  = 172 ms. La resistencia en serie no fue compensada.





**Figura 37. Protocolo de pulsos de corriente para evaluar las propiedades de membrana de las interneuronas registradas en la modalidad de célula entera. Ai)** Registro representativo de una interneurona en respuesta a pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante de 1 seg de duración. **Aii)** Curva I-V con ajuste de la parte más lineal para calcular la  $R_m$ . A partir de estos registros también se determinaron la  $C_m$ , la  $\tau_m$  y la reobase (trazos en rojo). **Bi)** y **Bii)** Mismo formato pero en presencia de DA  $10 \mu\text{M}$ . *Panel inferior.* Protocolo de pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante aplicados de  $-100 \text{ pA}$  a  $+200 \text{ pA}$  en pasos de  $50 \text{ pA}$ .

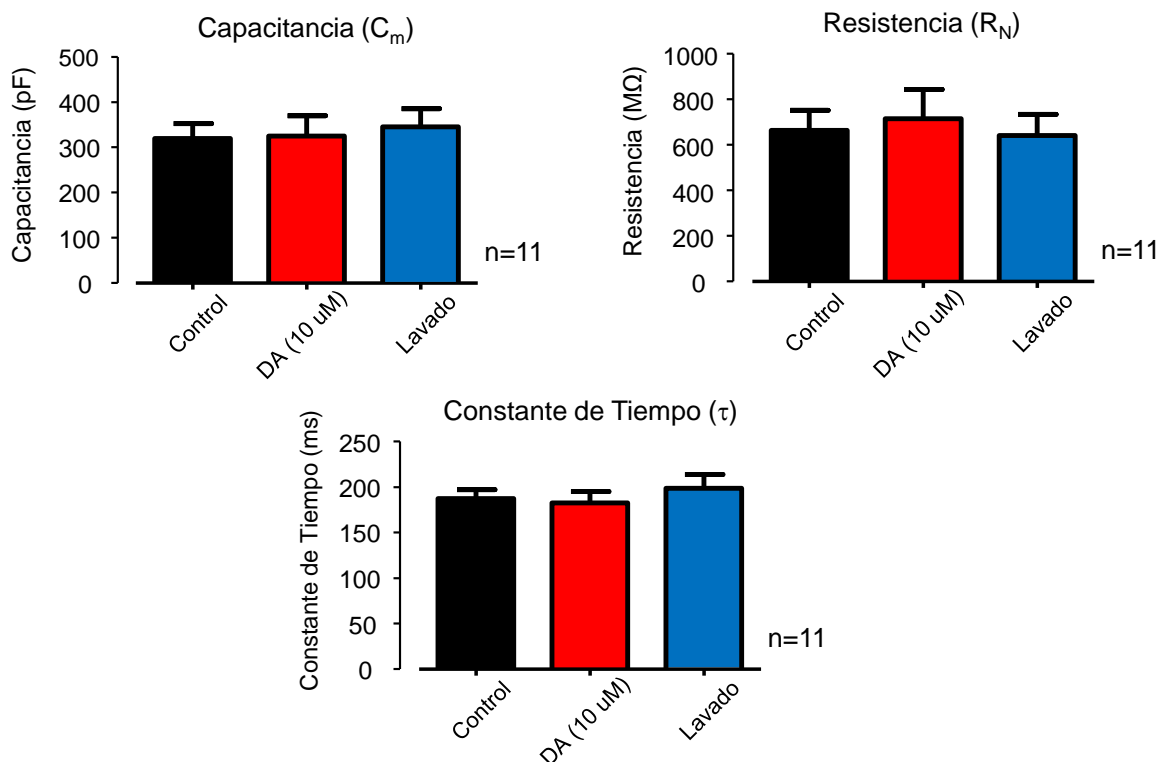
En un total de 10 interneuronas la DA redujo la reobase a un  $83.33\% \pm 16.66$  y la  $\tau_m$  a un  $93.30\% \pm 5.21$  de los valores control, valores estadísticamente no significativos. La  $R_N$  y la  $C_m$  tampoco se vieron afectadas ( $100.21\% \pm 12.85$  y  $107.19\% \pm 9.47$ , respectivamente) (Tabla 4, Figura 38). En general, con estos resultados preliminares, observamos que la DA no produjo cambios significativos

en las propiedades de membrana de las interneuronas registradas en el asta dorsal de la médula espinal.

**Tabla 4. Propiedades de membrana de las interneuronas registradas en el asta dorsal de la médula espinal del ratón, tras la aplicación de DA.**

Reobase (pA)	Resistencia de entrada (MOhms)	Capacitancia de membrana (pF)	Constante de tiempo (ms)
83.33 ± 16.66	100.21 ± 12.85	107.19 ± 9.47	93.30 ± 5.21

Los valores representan el promedio ± E.E.M., respecto a la condición control, para de una n = 10. La reobase se determinó solamente en 3 interneuronas (*t* de Student pareada  $P < 0.001$ ).



**Figura 38. Gráfica que resume los efectos de la DA sobre las propiedades de membrana de interneuronas registradas en el asta dorsal.** Las barras muestran promedios ± E.E.M. La DA no produjo cambios significativos en los parámetros ( $C_m$ ,  $R_N$  y  $\tau$ ) medidos. La reobase no se calculó después del lavado. ANOVA de 1 vía y prueba de Dunnett,  $P < 0.01$ .

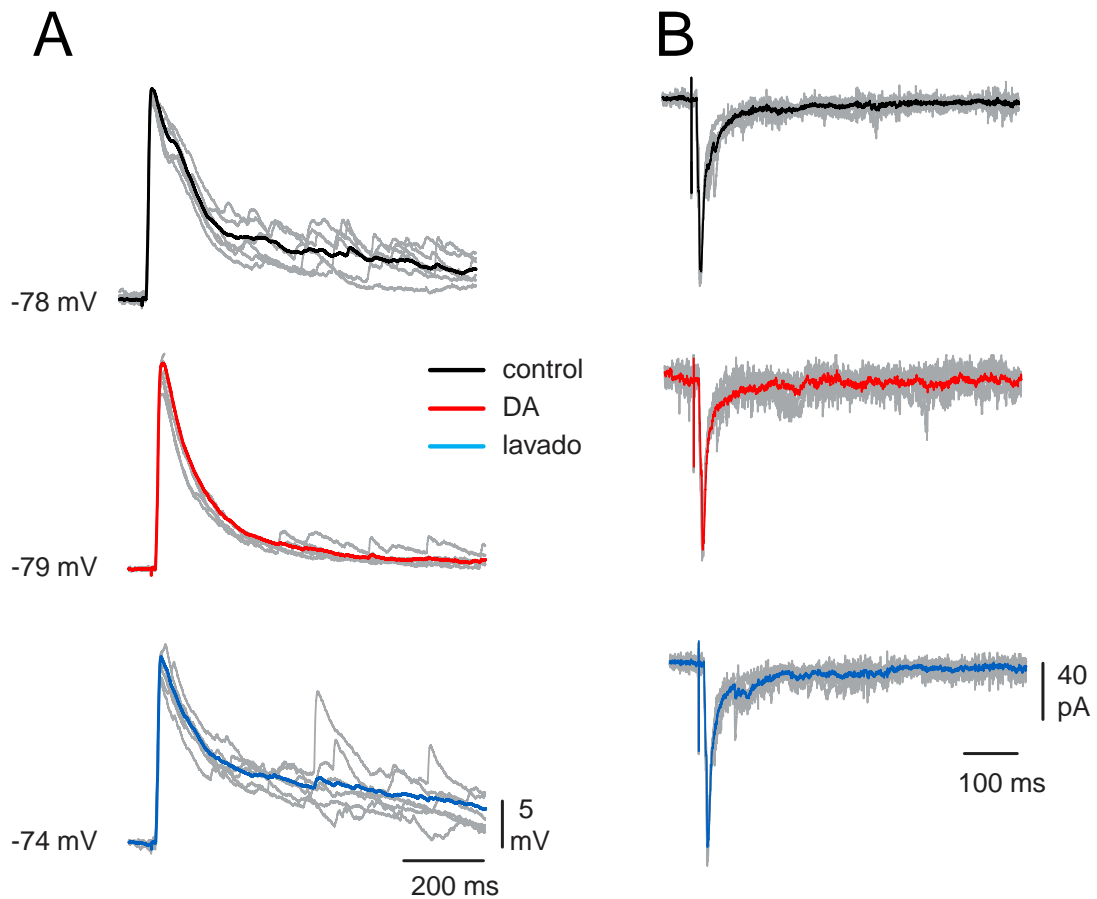
### *11. Efecto de la DA sobre los EPSPs y EPSCs evocados por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral*

Para evaluar los efectos de la DA sobre los EPSPs y EPSCs sólo se tomaron en consideración los casos cuando se utilizó QX-314, o en aquellos que no presentaron potenciales o corrientes de acción. Los EPSPs fueron registrados al potencial de membrana de las neuronas, y las EPSCs con un voltaje de mantenimiento de -80 mV. Los EPSPs fueron medidos en su amplitud al pico y las EPSCs en su área (0-100 ms).

En la Figura 39 se ilustra el efecto de la DA sobre los EPSPs y EPSCs en una interneurona activada monosinápticamente (~ 3 ms a partir de la salva aferente), por la estimulación del nervio tibial con una intensidad 2 xU. En presencia de DA 10  $\mu$ M, el componente monosináptico de los EPSPs no fue afectado (98% del control). Sin embargo, se puede observar que los EPSPs polisinápticos fueron deprimidos por la DA (Figura 39A). Por su parte, el área bajo la curva (0-100 ms) de las EPSCs fueron deprimidas por la DA a un 60% del control (Figura 39B). De un total de 4 interneuronas registradas, 3 mostraron una depresión en la amplitud al pico del componente monosináptico de los EPSPs a un  $93.87\% \pm 14.15$  de la amplitud control (E.E.M.) y 1 de ellas presentó un incremento promedio del 16% con respecto al control. En relación a las EPSCs, en 4 interneuronas la DA produjo una depresión promedio en el área bajo la curva a un  $42.29\% \pm 7.05$  (E.E.M.) del valor control. Los valores promedio de los efectos de la DA sobre los EPSPs y EPSCs, registrados en las interneuronas del asta dorsal (n= 4 experimentos), se muestran en la Tabla 5.

En general, el efecto producido por la DA fue una depresión en las EPSCs producidas por la estimulación del nervio Tib con una intensidad 2 xU, sin que los EPSPs se viesen afectados significativamente, en un total de 4 experimentos realizados. No obstante, estos resultados son aún preliminares, siendo necesario incrementar el número de interneuronas registradas, a fin de obtener una muestra

más representativa. Más aún, investigar los efectos de la DA en interneuronas identificadas funcionalmente.



**Figura 39. Efecto de la DA sobre los EPSPs y EPSCs producidos por la estimulación de aferentes mielinizadas del nervio Tib.** **A) Panel superior.** EPSPs registrados en la condición control. **Panel intermedio.** EPSPs en presencia de DA  $10 \mu\text{M}$ . **Panel inferior.** Recuperación tras 20 min. de lavado. **B)** Mismo formato que en A) para las corrientes sinápticas. Los trazos en gris representan los registros individuales (12) y los trazos en color los promedios. Los EPSPs fueron medidos en su amplitud al pico y las EPSCs en el área de 0-100 ms. La micropipeta de registro contenía QX-314 para bloquear las corrientes rápidas de sodio y evitar los potenciales y las corrientes de acción.

**Tabla 5. Efecto de la DA sobre los EPSPs, EPSCs y DRPs registrados en las interneuronas del asta dorsal de la médula espinal del ratón.**

EPSPs	EPSCs	DRPs
$99.41 \pm 9.74$	$42.29 \pm 7.05$	$40.21 \pm 7.55$

Los valores representan el promedio  $\pm$  E.E.M., respecto a la condición control, para una  $n = 4$  experimentos.

## VI. Discusión

### *Algunas consideraciones metodológicas*

En los experimentos realizados hasta el momento se ha estimulado el nervio mixto tibial, debido a sus dimensiones y a la facilidad para su disección; no obstante, se pretende llevar a cabo experimentos estimulando selectivamente, además, nervios puramente cutáneos y musculares, con la finalidad de identificar si la DA ejerce una modulación diferencial de los EFPs, DRPs, EPSPs y EPSCs dependiente del origen de las fibras aferentes.

El registro de un componente de latencia corta en el potencial de acción compuesto poblacional en la raíz dorsal, al estimular con intensidades  $\leq 2$  xU (Figura 22), nos permite aseverar que en la médula espinal del ratón de 6-7 días posnatales, se activan exclusivamente fibras aferentes de bajo umbral con una velocidad de conducción rápida (musculares de los grupos I y II, y cutáneas A $\beta$ ). Con intensidades  $>4$  xU comienzan a ser notorios los componentes A $\delta$  y C, correspondientes a fibras de mayor umbral de activación y menor velocidad de conducción (Vejsada et al. 1985).

Para localizar los sitios de las proyecciones intraespinales de las fibras aferentes y de sus conexiones monosinápticas se tomaron en consideración los registros de mayor amplitud de los componentes monosinápticos de los EFPs a distintas profundidades (láminas de Rexed IV-VI). Estos sitios fueron también tomados como referencia para la aplicación de la microestimulación intraespinal, mediante la técnica de Wall, para activar antidrómicamente el máximo número de fibras aferentes, así como para registrar las interneuronas que reciben conexiones monosinápticas de las fibras aferentes mielinizadas de bajo umbral.

El incremento en la amplitud de los DRPs con intensidades crecientes de estimulación (Figura 24) puede ser atribuido a la naturaleza polisináptica de las

vías que median la PAD; es decir, el incremento en la amplitud de los DRPs con intensidades de estimulación más altas se debe a la proyección profusa de las fibras aferentes y a la activación de las vías neuronales que median la PAD, las cuales, por su naturaleza polisináptica son susceptibles a una facilitación espacial y temporal.

Con respecto a las fibras aferentes que reciben PAD, es decir, las fibras que son despolarizadas al estimular fibras aferentes de bajo umbral, por analogía con lo que se ha descrito en felinos adultos, se ha considerado que los DRPs producidos por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral se deben a una despolarización de las fibras aferentes cutáneas de bajo umbral, articulares y del grupo Ib. Mientras que los DRPs producidos por la estimulación de nervios musculares se deben a la despolarización de fibras aferentes de los grupos I y II, y en cierto grado de las fibras aferentes cutáneas (Figura 8, Brink et al. 1984; Figura 9, Rudomin et al., 1986).

#### *Efecto de la DA sobre la PAD y la excitabilidad de las fibras aferentes mielinizadas*

La depresión que ejerce la DA sobre los DRPs (Figura 25) sugiere una reducción de la excitabilidad de las interneuronas que median la PAD, o posiblemente una reducción en la liberación del neuromodulador en las interneuronas interpuestas en esta vía. No obstante, la ausencia de efecto de la DA sobre el componente monosináptico de los EFPs (Figura 25) y sobre la amplitud del potencial de acción compuesto, CAP, antidrómico (Figura 32; técnica de Wall) sugiere que la eficacia sináptica (ver abajo) y la excitabilidad de las fibras aferentes mielinizadas de conducción rápida no se vieron afectadas. En apoyo a esta hipótesis, tampoco observamos cambios en los potenciales de DC, lo cual demuestra que no hubo efectos, directos o indirectos, de la DA sobre las terminales de estas fibras (Figura 32).

*La DA no modifica la eficacia sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral*

Se ha descrito que la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas en la médula espinal de roedores tiene un origen presináptico ya que ésta se reduce al disminuir la concentración extracelular de calcio, o por la aplicación del agonista a los receptores GABA<sub>B</sub>, baclofen (Lev-Tov y Pinco, 1992; Li y Burke, 2001, 2002). Se han postulado diversos mecanismos subyacentes a la depresión homosináptica, tales como una desensibilización postsináptica de los receptores a neurotransmisores excitadores, la depleción presináptica de las vesículas de neurotransmisor, o bien, algún otro mecanismo presináptico involucrado en la disminución de la probabilidad de liberación de neurotransmisor dependiente de la disponibilidad de calcio en las terminales sinápticas (Dobrunz y Stevens 1977; Hsu et al 1996; Otis et al 1996; Thies 1965; Westbrook y Jones, 1996).

Nuestros resultados muestran que el curso temporal de la depresión de los EFPs y DRPs (Figuras 33 y 35) producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas es muy similar a la depresión homosináptica del reflejo monosináptico y de los EPSPs monosinápticos registrados en motoneuronas de roedores (Li y Burke, 2001, 2002). Observamos que la DA no cambia significativamente el curso temporal de la depresión homosináptica comparada con la condición control (Figura 34 y 35), lo cual implica que no hubo una modificación de la eficacia sináptica de las fibras aferentes, es decir, no existen receptores a DA localizados en las terminales presinápticas que modifiquen la probabilidad de liberación de neurotransmisor.

En conjunto, la ausencia de una depresión del componente monosináptico de los EFPs producidos por la estimulación de fibras aferentes mielinizadas, sobre la depresión homosináptica de los EFPs y DRPs producida por la estimulación de las mismas fibras, sin cambios en la excitabilidad de las fibras aferentes por la DA, sugiere que no existen receptores presinápticos DA en las terminales aferentes, ni

ocurren cambios indirectos en la excitabilidad de las fibras aferentes de bajo umbral.

*La depresión de los DRPs es mediada por la activación de los receptores a DA de la familia D<sub>2</sub>-like*

Para explicar el comportamiento atípico de las curvas concentración-respuesta a la DA (Figura 28), se plantearon diversas explicaciones al respecto: i) el proceso oxidativo de la DA, ii) la activación de receptores a NA con una afinidad más baja cuando las concentraciones de DA son elevadas, iii) una recaptura excesiva de DA a través de su transportador (DAT), iv) una inactivación acelerada de la DA por la monoaminoxidasa (MAO<sub>B</sub>) y v) la posible activación de diferentes subtipos de receptores D<sub>2</sub>-like (D<sub>2-4</sub>) con diferentes afinidades. Por esta razón, se llevaron a cabo experimentos empleando un agente antioxidante, el metabisulfito de Na<sup>+</sup> (0.1 %), previniendo así la oxidación de la DA y la posible reducción en su disponibilidad. En estas condiciones, los valores EC<sub>50</sub> obtenidos (Figura 29A) resultaron más congruentes con la afinidad de la DA por sus receptores. Esto apunta al proceso oxidativo de la DA como responsable del comportamiento atípico en las curvas concentración-respuesta, debido muy probablemente a una reducción en la disponibilidad de la DA, modificando la concentración efectiva para producir el efecto biológico esperado.

Adicionalmente, los experimentos en los cuales se aplicó DA adicionada con MBS de Na<sup>+</sup> (0.1%), GBR12909 (10 μM) para bloquear el transportador a DA (DAT), desipramina (10 μM) para inhibir el transportador de noradrenalina (NET), y pargilina (100 μM) para inhibir la acción de la monoaminoxidasa B (MAO<sub>B</sub>) (Figura 29B), no mostraron un efecto significativamente diferente al observado en la presencia única de MBS de Na<sup>+</sup> (0.1 %). Si bien no podemos descartar algún posible papel de los bloqueadores del DAT, NET y MAO<sub>B</sub> en la obtención de los valores EC<sub>50</sub>, los resultados obtenidos nos hacen pensar en el proceso oxidativo



de la DA como la causa principal del comportamiento atípico de las curvas para calcular los valores  $EC_{50}$  para DA.

Para el caso del agonista dopaminérgico  $D_2$ -like, quinpirol, la depresión de los DRPs es muy similar a aquella producida por la DA (Figura 30) lo cual sugiere que la depresión de los DRPs está mediada principalmente por la familia de receptores  $D_2$ -like. Esta sugerencia se refuerza con nuestros hallazgos que demuestran que el agonista dopaminérgico  $D_1$ -like, SKF-38393, careció de efectos sobre estos parámetros. No obstante, debemos admitir que el papel específico de los subtipos  $D_2$ ,  $D_3$  y  $D_4$  requerirá de experimentos adicionales que no fueron contemplados en los objetivos planteados en la presente tesis. Las curvas concentración-respuesta para el quinpirol mostraron valores  $EC_{50}$  (Figura 36) acordes con la afinidad de este ligando para los receptores de la familia  $D_2$ -like. Aunque el quinpirol no se oxida, ni es recapturado, ni metabolizado por mecanismos que afectan a la DA, la forma de las curvas concentración-respuesta presentaron una amplia variación, lo cual se podría explicar porque el registro de los DRPs se realiza en un filamento pequeño de una raíz dorsal, que podría contener diferentes tipos de fibras aferentes de un experimento a otro. Se hace necesario realizar más experimentos cerciorándose de una estimación más precisa del umbral de las fibras aferentes, para asegurar que una activación del mismo tipo de fibras que producen PAD, e idealmente registrar la PAD en fibras aferentes individuales identificadas.

*La DA deprime las EPSCs provocadas por la estimulación de fibras aferentes sin cambios en las propiedades de membrana*

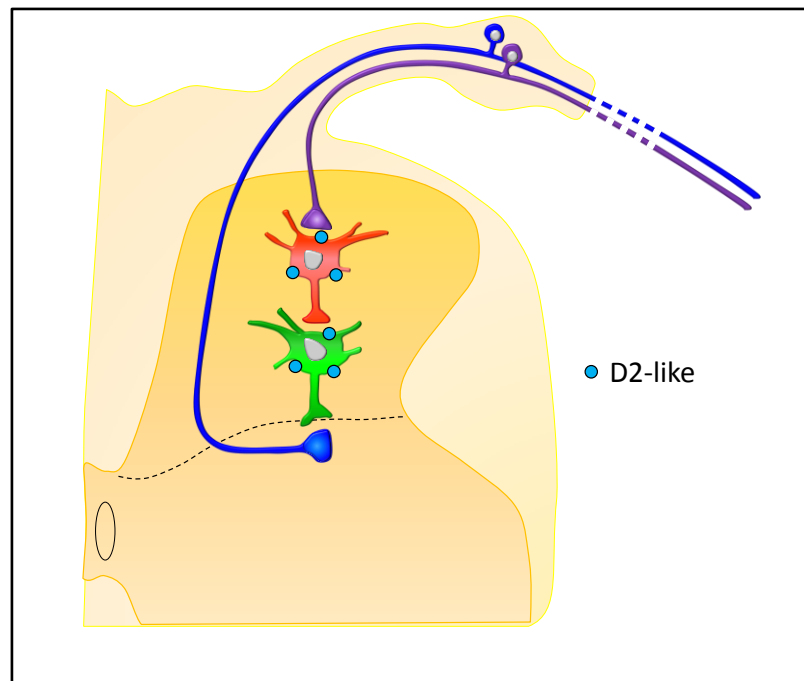
Con la información obtenida a partir de los registros intracelulares de las interneuronas del asta dorsal en la modalidad de célula entera, podemos concluir hasta el momento que la DA no modifica algunas de propiedades de membrana evaluadas, como la  $R_m$  y  $C_m$ , aunque hubo una tendencia no significativa a una disminución en la reobase y la  $\tau_m$  (Figura 37 y Tabla 4). No obstante, resta por

evaluar el efecto de la DA sobre otras propiedades, como son: la frecuencia de disparo, la relación corriente-respuesta, la amplitud y anchura media de la espiga, amplitud de la posthiperpolarización (AHP), entre otras, ya que se ha observado que, para el caso de las motoneuronas, la DA incrementa la excitabilidad intrínseca, a través de un aumento en la frecuencia de las espigas y de una reducción en la amplitud de la hiperpolarización postpotencial de duración media, aunque estos efectos son mediados posiblemente a través de la activación de receptores *D<sub>1</sub>-like* (Han et al, 2007).

Con respecto a las respuestas provocadas por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral (EPSPs y EPSCs) en las interneuronas del asta dorsal, observamos que la amplitud al pico del componente monosináptico de los EPSPs no se afectó por la DA. Sin embargo, los componentes polisinápticos fueron deprimidos (Figura 39A, Tabla 5). Se ha descrito que la fase de ascenso de los EPSPs se debe fundamentalmente a la corriente capacitiva de la membrana y que la amplitud de los EPSPs se ve poco afectada por cambios en la conductancia de membrana postsináptica (Finkel y Redman, 1983). Además, se ha observado que la inhibición postsináptica no modifica la amplitud de los EPSPs registrados en las motoneuronas del gato, pero sí acelera su fase de caída, lo cual sugiere cambios a nivel postsináptico (Hultborn et al., 1987). Por su parte, la inhibición presináptica deprime la amplitud de los EPSPs sin cambios en su curso temporal (Eccles, et al., 1961a). Entonces, con base en los efectos de la DA sobre los EPSPs podemos descartar efectos presinápticos en las terminales de las fibras aferentes estimuladas, como lo sugiere la ausencia de cambios en la depresión homosináptica (Figuras 34 y 35). Por otra parte, el componente monosináptico de las EPSCs evocadas en las mismas interneuronas, se deprimió significativamente en presencia de la DA (Figura 39B, Tabla 5). Es decir, la activación de los receptores a DA de la familia *D<sub>2</sub>-like* produce una inhibición de las conductancias excitadoras que median las EPSCs rápidas, producidas por la activación de receptores AMPA/kainato. Como se ha mencionado con anterioridad, queda por investigarse el efecto del quinpirol con antagonistas selectivos para los subtipos de

receptores  $D_2$ ,  $D_3$  y  $D_4$ . La inhibición de conductancias excitadoras en las interneuronas implicaría una disminución en la excitabilidad de las mismas.

Hasta ahora, nuestros resultados sugieren que la depresión de los DRPs producidos por la DA se debe a la presencia de receptores  $D_2$ -like en las interneuronas que median la PAD (Figura 40), pero no en las terminales aferentes de bajo umbral. Es de suma importancia investigar en animales transgénicos el efecto de la DA, sus agonistas y antagonistas selectivos para los receptores  $D_2$ -like en las interneuronas que median la PAD, en particular en las neuronas que expresan la enzima GAD2 y el factor de transcripción Ptf1a.



**Figura 40. Posible distribución de los receptores de la familia  $D_2$ -like en las interneuronas que median la PAD de las fibras aferentes mielinizadas.** Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que los receptores de la familia  $D_2$ -like se encuentran en las neuronas que median la vía PAD (círculos azules), pero no en las terminales presinápticas de las fibras aferentes que producen la PAD.

## VII. Conclusión

La DA es un neuromodulador importante en la médula espinal y está implicado en diversas funciones sensoriales y motrices, y durante el desarrollo, por lo que es relevante conocer los mecanismos a través de los cuales ejerce su función. En el presente estudio se ha demostrado que la DA ejerce un efecto inhibitorio a nivel postináptico sobre las vías neuronales que median la despolarización de aferentes primarias (PAD), producida por estimulación de las fibras aferentes mielinizadas, a través de la activación de la familia de receptores D<sub>2</sub>-like. Este efecto ocurre muy probablemente por una reducción de la excitabilidad de las interneuronas que median la PAD, sin modificar la eficacia sináptica de las fibras aferentes estimuladas.

### *Perspectivas a largo plazo*

- Incrementar el número de interneuronas registradas para evaluar con mayor precisión si la DA produce cambios en la excitabilidad (propiedades pasivas, incremento en la reobase, desplazamiento de la curva f-I a la izquierda)
- Determinar los subtipos de receptores de la familia D<sub>2</sub>-like (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>) implicados en la depresión de los DRPs y en la modulación de la excitabilidad de las interneuronas del asta dorsal
- Investigar el efecto de la DA sobre la inhibición heterosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral, ya que con el protocolo de depresión homosináptica no fue posible evaluar si hubo una reversión de la inhibición presináptica
- Investigar el efecto de la DA sobre interneuronas que expresan la enzima GAD2 y el factor tumoral pancreático 1a (PTF1a), fenotipo exclusivo de las interneuronas GABAérgicas que median la despolarización de aferentes primarias (PAD).

- Estudiar el efecto de la DA sobre las vías que median la inhibición presináptica en ratones espinalizados.

## VIII. Referencias

1. Adams MM, Hicks AL (2005). Spasticity after spinal cord injury. *Spinal Cord*, 43, 577–586.
2. Alexander SP, Mathie A, Peters JA (2011). *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*, 5th edition. *British Journal of Pharmacology*, Suppl 1:S1-324.
3. Alhaider AA, Lei SZ, Wilcox GL (1991). Spinal 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. *Journal of Neuroscience*, 11, 1881–1888.
4. Alvarez-Leefmans F (1998). Chloride transport, osmotic balance, and presynaptic inhibition. Oxford University Press, 50–79.
5. Andén NE, Fuxe K (1971). A new dopamine hydroxylase inhibitor: effects on the noradrenaline concentration and on the action of L-DOPA in the spinal cord. *British Journal of Pharmacology*, 43, 747–756.
6. Andén NE, Jukes MG, Lundberg A (1966). The effect of DOPA on the spinal cord. 2. A pharmacological analysis. *Acta Physiologica Scandinavica*, 67, 387–397.
7. Andersen PH, Gingrich JA, Bates MD, Dearry A, Falardeau P, Senogles SE, Caron MG (1990). Dopamine receptor subtypes: beyond the D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> classification. *Trends in Pharmacological Sciences*, 11, 231–236.
8. Bautista W, Aguilar J, Loeza-Alcocer JE, Delgado-Lezama R (2010). Pre- and postsynaptic modulation of monosynaptic reflex by GABA<sub>A</sub> receptors on turtle spinal cord. *Journal of Physiology*, 588, 2621–2631.
9. Bardin L, Lavarenne J, Eschalier A (2000). Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain*, 86, 11–18.
10. Barrière G, Mellen N, Cazalets JR (2004). Neuromodulation of the locomotor network by dopamine in the isolated spinal cord of newborn rat. *The European Journal of Neuroscience*, 19, 1325–35.
11. Barron DH, Matthews BH (1938a). Dorsal root reflexes. *Journal of Physiology*, 94, 26–27.

12. Barron DH, Matthews BH (1938b). The interpretation of potential changes in the spinal cord. *Journal of Physiology*, 92, 276–321.
13. Björklund A, Dunnett SB (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences*, 30, 194–202.
14. Björklund A, Skagerberg G (1979). Evidence for a major spinal cord projection from the diencephalic A11 dopamine cell group in the rat using transmitter-specific fluorescent retrograde. *Experimental Brain Research*, 177, 170–175.
15. Blanton MG, Lo Torco JJ, Kriegstein AR (1989). Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Methods*, 30, 203-210.
16. Borgkvist A, Malmlöf T, Feltmann K, Lindskog M, Schilström B (2012). Dopamine in the hippocampus is cleared by the norepinephrine transporter. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 15, 531–540.
17. Bras H, Cavallari P, Jankowska E, McCrea D (1989). Comparison of effects of monoamines on transmission in spinal pathways from group I and II muscle afferents in the cat. *Experimental Brain Research*, 76, 27–37.
18. Brink E, Jankowska E, Skoog B (1984). Convergence onto interneurons subserving primary afferent depolarization of group I afferents. *Journal of Neurophysiology*, 51, 432–449
19. Brooks CM, Fuortes MG (1952). The relation of dorsal and ventral root potentials to reflex activity in mammals. *Journal of Physiology*, 116, 380–394.
20. Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Civelli O (1988). Cloning and expression of a rat D<sub>2</sub> dopamine receptor cDNA. *Nature*, 336, 783–7.
21. Carp JS, Anderson RJ (1982). Dopamine receptor-mediated depression of spinal monosynaptic transmission. *Experimental Brain Research*, 242, 247–254.

22. Carpenter D, Lundberg A, Norrsell U (1963). Primary afferent depolarization evoked from the sensorimotor cortex. *Acta Physiologica Scandinavica*, 59, 126–142.
23. Christie KJ, Whelan PJ (2005). Monoaminergic establishment of rostrocaudal gradients of rhythmicity in the neonatal mouse spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 94, 1554–64.
24. Clemens S, Hochman S (2004). Conversion of the modulatory actions of dopamine on spinal reflexes from depression to facilitation in D<sub>3</sub> receptor knock-out mice. *Journal of Neuroscience*, 24, 11337–11345.
25. Commissiong J, Gentleman S, Neff N (1979). Spinal cord dopaminergic neurons: evidence for an uncrossed nigrospinal pathway. *Neuropharmacology*, 18, 565–568.
26. Commissiong J, Neff N (1979). Current status of dopamine in the mammalian spinal cord. *Biochemical Pharmacology*, 28, 1569–1573.
27. Cook WA, Cangiano A (1972). Presynaptic and postsynaptic inhibition of spinal motoneurons. *Journal of Neurophysiology*, 35, 389–403.
28. Cook WA, Cangiano A, Pompeiano O (1969). Dorsal root potentials in the lumbar cord evoked from the vestibular system. *Archives Italiennes de Biologie*, 107, 275–295.
29. Curtis D, Leah J, Peet M (1983). Effects of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine on spinal Ia afferent terminations. *Experimental Brain Research*, 258, 5–9.
30. Curtis D, Ryall R (1966). Pharmacological studies upon spinal presynaptic fibres. *Experimental Brain Research*, 1, 195–204.
31. Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau Jr. RT, Bates MD, Caron MG (1990). Molecular cloning and expression of the gene for a human D<sub>1</sub> dopamine receptor. *Nature*, 347, 72-76.
32. Deshpande SB, Warnick JE (1988). Temperature-dependence of reflex transmission in the neonatal rat spinal cord, in vitro: influence on strychnine- and bicuculline-sensitive inhibition. *Neuropharmacology*, 27, 1033–1037.



33. Devanandan M, Eccles RM, Yokota T (1965). Depolarization of afferent terminals evoked by muscle stretch. *Journal of Physiology*, 179, 417–429.
34. Devanandan M, Eccles R, Stenhouse D (1966). Presynaptic inhibition evoked by muscle contraction. *Journal of Physiology*, 185, 471–485.
35. Devanandan M, Eccles R, Yokota T (1964). Presynaptic inhibition induced by muscle stretch. *Nature*, 204, 996–998.
36. Dobrunz, L.E., and Stevens, C.F. (1997). Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18, 995–1008.
37. Dubois A, Savasta M, Curet O, Scatton B (1986). Autoradiographic distribution of the D<sub>1</sub> agonist [<sup>3</sup>H]SKF 38393, in the rat brain and spinal cord. Comparison with the distribution of D<sub>2</sub> dopamine receptors. *Neuroscience*, 19, 125–137.
38. Dudel J, Kuffler SW (1960). A second mechanism of inhibition at the crayfish neuromuscular junction. *Nature*, 187, 247–248.
39. Dun FT (1941). The latency and conduction of potentials in the spinal cord of the frog. *Journal of Physiology*, 100, 283–298.
40. Eccles J (1939). The spinal cord and reflex action. *Annual Review of Physiology*, 1, 363–384.
41. Eccles J, Eccles R, Magni F (1961). Central inhibitory action attributable to presynaptic depolarization produced by muscle afferent volleys. *Journal of Physiology*, 159, 147–166.
42. Eccles J, Kostyuk P, Schmidt R (1962). Central pathways responsible for depolarization of primary afferent fibres. *Journal of Physiology*, 161, 237–257.
43. Eccles J, Kozak W, Magni F (1961). Dorsal root reflexes of muscle group I afferent fibres. *Journal of Physiology*, 159, 128–146.
44. Eccles J, Magni F, Willis W (1962). Depolarization of central terminals of group I afferent fibres from muscle. *Journal of Physiology*, 160, 62–93.
45. Eccles J, Schmidt R, Willis W (1962). Presynaptic inhibition of the spinal monosynaptic reflex pathway. *Journal of Physiology*, 161, 282–297.

46. Eccles J, Schmidt R, Willis W (1963). Pharmacological studies on presynaptic inhibition. *Journal of Physiology*, 168, 500–530.
47. Eccles J, Sherrington C (1931). Studies on the flexor reflex. VI. Inhibition. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 109.
48. Eide I, Jurna I, Lundberg A (1968). Conductance measurements from motoneurons during presynaptic inhibition. In *Structure and function of inhibitory neuronal mechanisms*, ed. Von Euler C, Skoglund A, & Soderberg U, Pergamon, New York, 215-219.
49. Engberg I, Ryall R (1966). The inhibitory action of noradrenaline and other monoamines on spinal neurones. *Journal of Physiology*, 185, 298–322.
50. Faist M, Mazevet D, Dietz V, Pierrot-Deseilligny E (1994). A quantitative assessment of presynaptic inhibition of Ia afferents in spastics. *Brain*, 117, 1449–1455
51. Fleetwood-Walker SM (1988). Antinociceptive actions of descending dopaminergic tracts on cat and rat dorsal horn somatosensory neurones. *Journal of Physiology*, 399, 335–348.
52. Fink AJ, Croce KR, Huang ZJ, Abbott LF, Jessell TM, Azim E (2014). Presynaptic inhibition of spinal sensory feedback ensures smooth movement. *Nature*, 509:43–48.
53. Finkel AS, Redman SJ (1983). The synaptic current evoked in cat spinal motoneurons by impulses in single group 1a axons. *Journal of Physiology*, 342, 615–632.
54. Forbes A, Querido A, Whitaker L, Hurxthal L (1928). Electrical studies in mammalian reflexes. *Journal of Physiology*, 85, 432-457.
55. Frank K (1959). Basic mechanisms of synaptic transmission in the central nervous system. *IRE Transactions on Medical Electronics*, ME-6, 2, 85-88
56. Frank K, Fuortes M (1957). Presynaptic and postsynaptic inhibition of monosynaptic reflexes. *Federation Proceedings*, 16, 39–40.
57. Galindo A (1969). GABA-picrotoxin interaction in the mammalian central nervous system. *Experimental Brain Research*, 14, 763–767.

58. Gallagher J, Inokuchi H, Shinnick-Gallagher P (1980). Dopamine depolarisation of mammalian primary afferent neurones. *Nature*, 21, 770–772.
59. García-Ramírez DL, Calvo JR, Hochman S, Quevedo JN (2014). Serotonin, dopamine and noradrenaline adjust actions of myelinated afferents via modulation of presynaptic inhibition in the mouse spinal cord. *PloS One*, 9.
60. Garraway S, Hochman S (2001). Modulatory actions of serotonin, norepinephrine, dopamine, and acetylcholine in spinal cord deep dorsal horn neurons. *Journal of Neurophysiology*, 86, 2183–2194.
61. Gasser H, Graham HT (1933). Potentials produced in the spinal cord by stimulation of dorsal roots. *American Journal of Physiology—Legacy Content*, 103, 303.
62. Gomeza J, Zhang L, Kostenis E, Felder C, Bymaster F, Brodtkin J, Wess J (1999). Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M<sub>4</sub> muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 10483–10488.
63. Gray EG (1962). A morphological basis for pre-synaptic inhibition? *Nature*, 193, 82–83.
64. Grundfest H, Magnes J (1951). Excitability changes in dorsal roots produced by electrotonic effects from adjacent afferent activity. *The American Journal of Physiology*, 164, 502–508.
65. Han P, Nakanishi ST, Tran MA, Whelan PJ (2007). Dopaminergic modulation of spinal neuronal excitability. *Journal of Neuroscience*, 27, 13192–13204.
66. Hochman S, Garraway S, Machacek D, Shay B (2001). 5-HT receptors and the neuromodulatory control of spinal cord function. *Motor Neurobiology of the Spinal Cord*, 47–87.
67. Hsu SF, Augustine GJ, and Jackson MB (1996). Adaptation of Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis in presynaptic terminals. *Neuron* 17, 501–512.

68. Hughes DI, Mackie M, Nagy GG, Riddell JS, Maxwell DJ, Szabo G, Erdelyi F, Veress G, Szucs P, Antal M, Todd AJ (2005). P boutons in lamina IX of the rodent spinal cord express high levels of glutamic acid decarboxylase-65 and originate from cells in deep medial dorsal horn. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9038–9043.
69. Hultborn H, Meunier S, Morin C, Pierrot-Deseilligny E (1987). Assessing changes in presynaptic inhibition of I a fibres: a study in man and the cat. *Journal of Physiology*, 389:729–756
70. Jankowska E, Hammar I (2000). Effects of monoamines on interneurons in four spinal reflex pathways from group I and/or group II muscle afferents. *European Journal of Neuroscience*, 12, 701–7014.
71. Jankowska E., Johannisson T., and Lipski J (1981). Common interneurons in reflex pathways from group Ia and Ib afferents of ankle extensors in the cat. *Journal of Physiology*, 310, 381-402.
72. Jankowska E, McCreia D, Rudomín P, Sykova E (1981). Observations on neuronal pathways subserving primary afferent depolarization. *Journal of Neurophysiology*, 46, 506–516.
73. Jiménez I, Rudomín P, Solodkin M, Vyklický L (1984). Specific and nonspecific mechanisms involved in generation of PAD of group Ia afferents in cat spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 52, 921–940.
74. Jose PA, Eisner GM, Felder RA (2003). Regulation of blood pressure by dopamine receptors. *Nephron. Physiology*, 95, 19–27.
75. Jung EY, Shim I (2011). Differential DAergic Control of D1 and D2 Receptor Agonist Over Locomotor Activity and GABA Level in the Striatum. *Experimental Neurobiology*, 20, 153.
76. Kawamoto K, Otsuguro K, Ishizuka M, Ito S (2012). Inhibitory effects of dopamine on spinal synaptic transmission via dopamine D<sub>1</sub>-like receptors in neonatal rats. *British Journal of Pharmacology*, 166, 788–800.
77. Keibarian JW, Calne DB (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277, 93–96.

78. Kitazawa T, Saito K, Ohga A (1985). Effects of catecholamines on spinal motoneurons and spinal reflex discharges in the isolated spinal cord of the newborn rat. *Developmental Brain Research*, 351, 31–36.
79. Koblinger K, Füzesi T, Ejdrygiewicz J, Krajacic A, Bains JS, Whelan PJ (2014). Characterization of A11 neurons projecting to the spinal cord of mice. *PloS One*, 9.
80. Koketsu K (1956). Intracellular slow potential of dorsal root fibers. *The American Journal of Physiology*, 184, 338–344.
81. Kríz N, Syková E, Vyklický L (1974). Changes of extracellular potassium concentration induced by neuronal activity in the spinal cord of the cat. *Journal of Physiology*, 238, 1–15.
82. Kríz N, Syková E, Vyklický L (1975). Extracellular potassium changes in the spinal cord of the cat and their relation to slow potentials, active transport and impulse transmission. *Journal of Physiology*, 249, 167–182.
83. Lev-Tov A, Pinco M (1992). In vitro studies of prolonged synaptic depression in the neonatal rat spinal cord. *Journal of Physiology*, 447:149-69.
84. Lamotte d' Incamps, Destombes J, Thiesson D, Zytnicki D (1997). Demonstration of axo-axonic contacts on the intraspinal arborization of Ib afferents fibers. *Soc Neurosci Abstr*, 23.
85. Lamotte d' Incamps B, Destombes J, Thiesson D, Hellio R, Lasserre X, Kouchtir-Devanne N, Zytnicki D (1998). Indications for GABA-immunoreactive axo-axonic contacts on the intraspinal arborization of a Ib fiber in cat: a confocal microscope study. *Journal of Neuroscience*, 18, 10030–10036.
86. Levant B, McCarson KE (2001). D<sub>3</sub> dopamine receptors in rat spinal cord: implications for sensory and motor function. *Neuroscience Letters*, 303, 9–12.
87. Li Y, Burke RE (2001). Short-term synaptic depression in the neonatal mouse spinal cord: effects of calcium and temperature. *Journal of Neurophysiology*, 85, 2047–2062.

88. Li Y, Burke RE (2002). Developmental changes in short-term synaptic depression in the neonatal mouse spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 88: 3218–3231.
89. Lloyd D, McIntyre A (1949). On the origins of dorsal root potentials. *The Journal of General Physiology*, 32: 409–443.
90. Lundberg A (1964). Supraspinal control of transmission in reflex paths to motoneurons and primary afferents. In: Eccles J, Schadé JP (eds) *Physiology of the spinal neurons*. Elsevier, Amsterdam, pp 197–221
91. Maxwell DJ, Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1995). Synaptic organization of excitatory and inhibitory boutons associated with spinal neurons which project through the dorsal columns of the cat. *Experimental Brain Research*, 676, 103–112.
92. Maxwell DJ, Riddell JS (1999). Axoaxonic synapses on terminals of group II muscle spindle afferent axons in the spinal cord of the cat. *The European Journal of Neuroscience*, 11, 2151–2159.
93. McCrea DA, Shefchyk SJ, Carlen PL (1990). Large reductions in composite monosynaptic EPSP amplitude following conditioning stimulation are not accounted for by increased postsynaptic conductances in motoneurons. *Neuroscience Letters*, 109, 117–122.
94. Medvedev IO, Ramsey AJ, Masoud ST, Bermejo MK, Urs N, Sotnikova TD, Salahpour A (2013). D<sub>1</sub> Dopamine receptor coupling to PLC $\beta$  regulates forward locomotion in mice. *Journal of Neuroscience*, 33, 18125–18133.
95. Millan M (2002). Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, 66, 355–474.
96. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, 78, 189–225.
97. Monsma FJ, Mahan LC, McVittie LD, Gerfen CR, Sibley DR (1990). Molecular cloning and expression of a D<sub>1</sub> dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 6723–6727.

98. Morón JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA, Hope BT (2002). Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. *Journal of Neuroscience*, 22, 389–395.
99. Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H (2004). Dopamine receptor signaling. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 24, 165–205.
100. Oksamitnyĭ VN, Tamarova ZA (1987). Depolarizing action of dopamine on the endings of the primary afferent fibers of an isolated segment of the spinal cord in rat pups. *Neirofiziologĭia = Neurophysiology*, 19, 741–748.
101. Otis TS, Wu YC, Trussell LO (1996). Delayed clearance of transmitter and the role of glutamate transporters at synapses with multiple release sites. *Journal of Neuroscience*. 16, 1634–1644.
102. Peng YY, Frank E (1989). Activation of GABAA receptors causes presynaptic and postsynaptic inhibition at synapses between muscle spindle afferents and motoneurons in the spinal cord of bullfrogs. *Journal of Neuroscience*, 9, 1516–1522.
103. Pierce JP, Mendell LM (1993). Quantitative ultrastructure of Ia boutons in the ventral horn: scaling and positional relationships. *Journal of Neuroscience*, 13, 4748–4763.
104. Quevedo J, Eguibar JR, Jiménez I, Schmidt RF, Rudomin P (1993). Primary afferent depolarization of muscle afferents elicited by stimulation of joint afferents in cats with intact neuraxis and during reversible spinalization. *Journal of Neurophysiology* 70:1899–1910
105. Ridet JL, Sandillon F, Rajaofetra N, Geffard M, Privat A (1992). Spinal dopaminergic system of the rat: light and electron microscopic study using an antiserum against dopamine, with particular emphasis on synaptic incidence. *Experimental Brain Research*, 598, 233–241.
106. Rondou P, Haegeman G, Van Craenenbroeck K (2010). The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 67, 1971–1986.

107. Rudomín P, Jiménez I, Enriquez M (1991). Effects of stimulation of group I afferents from flexor muscles on heterosynaptic facilitation of monosynaptic reflexes produced by Ia and descending inputs: a test for presynaptic inhibition. *Experimental Brain Research*, 85, 93–102.
108. Rudomin P, Jiménez I, Solodkin M, Dueñas S (1983). Sites of action of segmental and descending control of transmission on pathways mediating PAD of Ia- and Ib-afferent fibers in cat spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 50:743–769
109. Rudomin P, Solodkin M, Jiménez I (1986). PAD and PAH response patterns of group Ia- and Ib-fibers to cutaneous and descending inputs in the cat spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 56:987–1006
110. Rudomín P, Núñez R, Madrid J, Glusman S (1974). Presynaptic modulation of Ia fiber synaptic effectiveness without concurrent postsynaptic inhibitory conductances. *Experimental Brain Research*, 75, 334–339.
111. Rudomín P, Schmidt RF (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Experimental Brain Research*, 129, 1–37.
112. Scatton B, Dubois A, Cudennec A (1984). Autoradiographic localization of dopamine receptors in the spinal cord of the rat using [3H]-N-propylnorapomorphine. *Journal of Neural Transmission*, 59, 251–256.
113. Schmidt R, Sherrington C (1971). Presynaptic inhibition in the vertebrate central nervous system. *Ergebnisse Der Physiologie Reviews of Physiology*, 63, 20–101.
114. Sibley DR (1999). New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39, 313–341.
115. Sibley DR, Monsma FJ (1992). Molecular biology of dopamine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13, 61–69.
116. Skagerberg G, Björklund A (1982). Origin and termination of the diencephalo-spinal dopamine system in the rat. *Experimental Brain Research Bulletin*, 9, 237–244.



117. Skagerberg G, Meister B, Hökfelt T, Lindvall O, Goldstein M, Joh T, Cuellar AC (1988). Studies on dopamine-, tyrosine hydroxylase- and aromatic L-amino acid decarboxylase-containing cells in the rat diencephalon: comparison between formaldehyde-induced histofluorescence and immunofluorescence. *Neuroscience*, 24, 605–20.
118. Skoog B, Noga B (1995). Dopaminergic control of transmission from group II muscle afferents to spinal neurones in the cat and guinea-pig. *Experimental Brain Research*, 105, 39–47.
119. Soghomonian JJ, Martin DL (1998). Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends in Pharmacological Sciences* 19:500–505
120. Sokoloff P, Diaz J, Le Foll B, Guillin O, Leriche L, Bezard E, Gross C (2006). The dopamine D<sub>3</sub> receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 5, 25–43.
121. Spano PF, Govoni S, Trabucchi M (1978). Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, 19, 155–165.
122. Tamae A, Nakatsuka T, Koga K, Kato G, Furue H, Katafuchi T, Yoshimura M (2005). Direct inhibition of substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord by activation of dopamine D<sub>2</sub>-like receptors. *Journal of Physiology*, 568(Pt 1), 243–53.
123. Thies RE (1965). Neuromuscular depression and the apparent depletion of transmitter in mammalian muscle. *Journal of Neurophysiology*, 28, 427–442.
124. Toennies J (1938). Reflex discharge from the spinal cord over the dorsal roots. *Journal of Neurophysiology*, 1, 378.
125. Trachtenberg MC, Pollen DA (1970). Neuroglia: biophysical properties and physiologic function. *Science (New York, N.Y.)*, 167, 1248–1252.
126. Tran AH, Tamura R, Uwano T, Kobayashi T, Katsuki M, Ono T (2005). Dopamine D<sub>1</sub> receptors involved in locomotor activity and accumbens neural responses to prediction of reward associated with place. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102, 2117–2122.
127. Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D<sub>4</sub> receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*, 350(6319), 610–614.
  128. Vejsada R, Paleček J, Hník P, Soukup T (1985). Postnatal development of conduction velocity and fibre size in the rat tibial nerve. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 3, 583–595.
  129. Walker JL (1971). Ion specific liquid ion exchanger microelectrodes. *Analytical Chemistry*, 43, 89A–93a.
  130. Wall P (1958). Excitability changes in afferent fibre terminations and their relation to slow potentials. *Journal of Physiology*, 142, 1–21.
  131. Weil-Fugazza J, Godefroy F (1993). Dorsal and ventral dopaminergic innervation of the spinal cord: functional implications. *Experimental Brain Research Bulletin*, 30, 319–324.
  132. Westbrook, GL, and Jones, MV (1996). The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends in Neuroscience* 19, 96–101.
  133. Willems JL, Buylaert WA, Lefebvre RA, Bogaert MG (1985). Neuronal dopamine receptors on autonomic ganglia and sympathetic nerves and dopamine receptors in the gastrointestinal system. *Pharmacological Reviews*, 37, 165–216.
  134. Wolf ME, Roth RH (1990). Autoreceptor regulation of dopamine synthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 604, 323–343.
  135. Zhu H, Clemens S, Sawchuk M, Hochman S (2007). Distribution of all dopamine receptor subtypes (D<sub>1</sub>–D<sub>5</sub>) in the mouse lumbar spinal cord: A real-time PCR and non-autoradiographic in situ hybridization study. *Neuroscience*, 149(4), 885–897.
  136. Zhu H, Clemens S, Sawchuk M, Hochman S (2008). Unaltered D1, D2, D4, and D5 dopamine receptor mRNA expression and distribution in the spinal

cord of the D<sub>3</sub> receptor knockout mouse. *Journal of Comparative Physiology A*, 194, 957–962.

137. Zimmerman AL, Sawchuk M, Hochman S (2012). Monoaminergic modulation of spinal viscerosympathetic function in the neonatal mouse thoracic spinal cord. *PLoS One*, 7.