

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

“Modulación serotoninérgica de las vías que median la inhibición
presináptica de las fibras aferentes de bajo umbral en la médula
espinal del ratón”

T E S I S

Que presenta:

M. en C. DAVID LEONARDO GARCÍA RAMÍREZ

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

en la especialidad de

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de tesis:

Dr. Jorge Noel Quevedo Durán

Ciudad de México

Junio 2016

A Luz Elena por su enorme apoyo y compañía durante estos años.

A León Mateo por ser mi motivación.

A mis padres Guadalupe Ramírez y Agustín García y a mis hermanos.

A mis compañeros del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado.

Al Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV.

Al Dr. Jorge N. Quevedo Durán por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por todas las enseñanzas tanto en lo académico como en lo personal.

A los doctores Ismael Jiménez, Rodolfo Delgado, Gerardo Rojas Piloni y Carlos Villalón por su colaboración y sus acertadas observaciones en la presente tesis.

Al M. en C. Jorge Calvo y a Alejandro Carapia, por su invaluable participación en este proyecto.

Al Dr. Carlos Villalón por facilitarnos algunos de los fármacos utilizados en el presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio María de Lourdes Martínez, Jonathan Milla, Elvia Mena y Lucía Domínguez por su compañerismo y valiosa contribución a mi desarrollo académico.

Índice

	Página
I. Resumen	13
II. Introducción	17
2.1 Inhibición presináptica y despolarización de las fibras aferentes primarias	17
2.1.1 Despolarización de aferentes primarias.....	17
2.1.2 Relación entre la despolarización de aferentes primarias y la inhibición presináptica.....	20
2.1.3 Despolarización de aferentes primarias producida a través de sinapsis axo-axónicas GABAérgicas.....	22
2.1.4 Organización funcional de la inhibición presináptica.....	24
2.1.5 Despolarización de aferentes primarias durante tareas específicas.....	27
2.1.6 Interneuronas que median la despolarización de fibras aferentes primarias.....	30
2.2 Inhibición presináptica no asociada a la despolarización de aferentes primarias	34
2.3 Monoaminas y modulación de la información sensorial.....	34
2.3.1 Modulación monoaminérgica de las vías nociceptivas.....	35
2.3.2 Modulación monoaminérgica de las propiedades de disparo de las neuronas.....	37
2.3.3 Modulación de los circuitos neuronales que controlan la locomoción.....	38
2.3.4 Modulación monoaminérgica de las vías que median la PAD.....	40
2.3.5 Diversidad de las acciones monoaminérgicas en la médula espinal.....	49
III. Planteamiento del problema, hipótesis y objetivos	53
3.1 Planteamiento del problema.....	53
3.2 Hipótesis.....	54
3.3 Objetivo general.....	55
3.4 Objetivos particulares.....	55
IV. Métodos	56
4.1 Preparación.....	56
4.2 Estimulación y registro.....	56
V. Resultados	60
5.1 Registro de los potenciales extracelulares de campo (EFPs) a distintas profundidades en el cuerno dorsal.....	60
5.2 Potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs) producidos con distintas intensidades de estimulación.....	61

5.3	Efecto de la 5-HT sobre los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral.....	62
5.4	Efectos de la 5-HT sobre el curso temporal de los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs), y sobre los potenciales terminales...	64
5.5	Eficacia de la 5-HT en la depresión los potenciales de raíz dorsal (DRPs).....	65
5.6	Efecto de la 5-HT sobre la excitabilidad de las fibras aferentes de bajo umbral .	67
5.7	Efecto de la 5-HT sobre la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas.....	70
5.8	Efecto de la 5-HT sobre la depresión heterosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes heterónimas.....	75
5.9	Efecto de la 5-HT sobre los componentes monosinápticos de los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) y corrientes postsinápticas excitadoras (EPSCs), producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral en interneuronas del cuerno dorsal.....	78
5.10	Efecto de la 5-HT sobre las propiedades pasivas de las interneuronas del cuerno dorsal activadas por aferentes de bajo umbral.....	82
5.11	Efecto de algunos agonistas de los receptores a 5-HT sobre los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs).....	83
VI.	Discusión	102
6.1	Consideraciones metodológicas.....	103
6.2	La 5-HT reduce la eficacia sináptica de las fibras aferentes y la excitabilidad de las interneuronas que median la PAD.....	104
6.3	Inhibición presináptica y 5-HT.....	110
6.4	Subtipos de receptores a 5-HT implicados en la reducción de la eficacia sináptica en la depresión de los DRPs.....	111
6.5	Efectos diferenciales de la 5-HT sobre los EFPs.....	113
6.6	Sobre la depresión de los componentes de los EFPs de mayor latencia.....	114
VII.	Conclusiones	115
VIII.	Referencias	116

Índice de figuras

	Página
1. Depresión de los EPSPs monosinápticos como consecuencia de una inhibición presináptica	18
2. La depresión de los EPSPs Ia producidos por la estimulación de aferentes flexores ocurre sin cambios en la resistencia de membrana de la motoneurona.....	19
3. Potenciales de raíz dorsal registrados en el gato y en la rana.....	20
4. Registro intracelular de la despolarización de las fibras aferentes primarias (PAD)...	22
5. Sinapsis axo-axónica GABAérgica.....	23
6. Interneurona GABAérgica que establece conexión axoaxónica con fibras aferentes y es activada monosinápticamente por aferentes musculares del grupo I.....	31
7. Tipos de interneuronas gabaérgicas presinápticas (GABApre) que expresan el factor tumoral pancreático (Ptf1a).....	32
8. Efecto de la ablación genética selectiva de las interneuronas responsables de la inhibición presináptica que expresan la enzima GAD2 mediante la aplicación de la toxina diftérica en ratones transgénicos.....	33
9. Localización y papel de los subtipos de receptores a 5-HT en la modulación de los procesos nociceptivos en el cuerno dorsal.....	36
10. Depresión de la amplitud de los EPSPs monosinápticos durante la locomoción.....	39
11. Activación de los núcleos del rafé magnus y obscurus mediante la aplicación de trenes de estímulo con electrodos bipolares.....	41
12. Inhibición selectiva de las acciones sinápticas de las fibras aferentes del grupo II....	44
13. Patrones de despolarización de las fibras aferentes musculares del grupo I.....	45
14. Efectos de la estimulación de los núcleos locus coeruleus y rafé magnus sobre la efectividad sináptica y excitabilidad de las fibras aferentes del grupo II.....	47
15. Arreglo experimental.....	58
16. Potenciales de raíz dorsal (DRPs) y potenciales extracelulares de campo (EFPs) registrados a distintas profundidades en el cuerno dorsal al estimular el nervio tibial (TIB).....	60
17. Potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación eléctrica del nervio tibial a las intensidades indicadas.....	62
18. La serotonina (5-HT) deprime los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRP) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral del nervio mixto Tibial.....	63

19. Curso temporal de los efectos de la 5-HT sobre los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral en el nervio Tibial (TIB), sin cambios en la invasión del potencial de acción en las terminales de las fibras aferentes.....	65
20. La 5-HT modula los potenciales de raíz dorsal (DRPs) y los potenciales extracelulares de campo (EFP) provocados por la estimulación de aferentes de bajo umbral en una manera dependiente de la dosis.....	66
21. La 5-HT no modifica la excitabilidad de las terminales de las fibras aferentes evaluada con la técnica de Wall.....	68
22. Registro en DC de las raíces dorsales en presencia de 5-HT.....	69
23. Protocolo de estimulación pareada para evaluar la depresión homosináptica de los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de fibras aferentes homónimas.....	71
24. Curso temporal de la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas.....	72
25. La 5-HT reduce la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas a través de un efecto a nivel presináptico.....	73
26. La bicuculina no reduce la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas.....	74
27. El faclofen no reduce la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas.....	75
28. Comparación de los cursos temporales de la depresión heterosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes heterónimas y de la depresión homosináptica producida por la estimulación de aferentes homónimas.....	76
29. La 5-HT reduce la depresión heterosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes heterónimas.....	77
30. La bicuculina reduce la depresión heterosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes heterónimas.....	78
31. La 5-HT deprime los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) y los potenciales de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral.....	79
32. La 5-HT deprime el componente monosináptico de las corrientes posinápticas excitadoras (EPSCs) y los potenciales de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral.....	81
33. La 5-HT deprime los EPSPs y las EPSCs monosinápticos sin cambios en las propiedades pasivas de membrana de las interneuronas del cuerno dorsal activadas por aferentes de bajo umbral.....	82

34. El agonista a los receptores 5-HT _{1E} y 1F, deprime los EFPs y los DRPs. El agonista a los receptores 5-HT _{1A} y 7 deprime únicamente los DRPs.....	84
35. El agonista a los receptores 5-HT _{1B} y 1D, zolmitriptan, deprime los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRP) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral.....	85
36. El agonista a los receptores 5-HT _{1B} y 1D, zolmitriptan, deprime los potenciales de raíz dorsal (DRPs) y los potenciales extracelulares de campo (EFPs) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral en una manera dependiente de la concentración.....	87
37. Efecto de la 5-HT y del zolmitriptan sobre el potencial DC registrado en las raíces dorsales.....	88
38. El zolmitriptan reduce la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas a través de la activación de receptores presinápticos 5-HT _{1B} y/o 5-HT _{1D}	89
39. El zolmitriptan reduce la depresión heterosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes heterónimas.....	90
40. El zolmitriptan deprime las corrientes posinápticas excitadoras (EPSCs) monosinápticas y los potenciales de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral.....	91
41. El zolmitriptan deprime las EPSCs monosinápticas sin cambios en las propiedades pasivas de membrana de las neuronas registradas en el cuerno dorsal.....	92
42. La depresión de las EPSCs producida por la 5-HT se debe principalmente a la activación de los receptores 5-HT _{1B/1D}	93
43. El PNU142633, agonista selectivo de los receptores 5-HT _{1D} , no afecta los EFPs ni los DRPs.....	94
44. El CP-93,129, agonista selectivo de los receptores 5-HT _{1B} , deprime los EFPs y DRPs.....	95
45. El agonista 5-HT _{1B} , CP-93,129, reduce la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas.....	96
46. El DOI, agonista de los receptores 5-HT ₂ , deprime los DRPs sin efecto sobre los EFPs, mientras que el antagonista de los receptores 5-HT ₂ , ketanserina, no revierte los efectos de 5-HT.....	98
47. El agonista de los receptores 5-HT ₃ , SR572275, deprime los DRPs sin efecto sobre los EFPs, mientras que el antagonista de los receptores 5-HT ₃ , tropisetron, no revierte los efectos de 5-HT.....	99
48. El agonista de los receptores 5-HT ₄ , SC53116, no tiene efecto sobre los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y los de raíz dorsal (DRPs).....	101

49. Posible localización de los (sub)tipos de receptores a 5-HT en la vía que media la PAD.....	106
50. Resumen de los efectos producidos por los agonistas de los receptores a 5-HT sobre la amplitud de los EFPs y DRPs.....	112

Índice de tablas

	Página
1. Parámetros que definen los patrones de PAD en relación a las vías que producen la PAD y a las vías que inhiben la PAD de las fibras aferentes musculares del grupo Ia y Ib	26
2. Clasificación de los receptores a la 5-HT.....	50
3. Subtipos de receptores monoaminérgicos y sus efectos en las vías de transducción de señales.....	52
4. Agonistas y antagonistas serotoninérgicos empleados en el presente trabajo.....	59

Abreviaturas

5-HT	5-Hidroxitriptamina / serotonina
ACh	<i>Acetylcholine</i> - Acetilcolina
CAP	<i>Compound action potential</i> - Potencial de acción compuesto
CPG	<i>Central pattern generator</i> - Centro generador de patrones
DA	Dopamina
DC	<i>Direct current</i> - Corriente directa
DP	<i>Deep peroneal</i> - Peroneo profundo
DRG	<i>Dorsal root ganglion</i> - Ganglio de raíz dorsal
DRP	<i>Dorsal root potential</i> - Potencial de raíz dorsal
DRR	<i>Dorsal root reflex</i> - Reflejo de raíz dorsal
DT	<i>Diphtheria toxin</i> - Toxina diftérica
E.E.	Error estándar
EFP	<i>Extracellular field potential</i> - Potencial extracelular de campo
ENK	<i>Enkephalin</i> - Encefalina
EPSC	<i>Excitatory postsynaptic current</i> - Corriente postsináptica excitadora
EPSP	<i>Excitatory postsynaptic potential</i> - Potencial postsináptico excitador
FRA	<i>Flexor reflex afferents</i> - Aferentes de reflejo flexor
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAD	<i>Glutamic acid decarboxylase</i> - Descarboxilasa de ácido glutámico
GS	Gastrocnemio - sóleo
ININ	Interneurona inhibidora
IPSC	<i>Inhibitory postsynaptic current</i> - Corriente posináptica inhibidora
LC	Locus Coeruleus
LCR	Líquido cefalorraquídeo
L-DOPA	Levodopa

LGS	Gatrocnemio lateral - sóleo
MLR	<i>Mesencephalic locomotor region</i> - Región locomotora mesencefálica
NA	Noradrenalina / norepinefrina
NPY	Neuropéptido Y
NR	Núcleo rojo
NRm	Núcleo rafé magnus
PAD	<i>Primary afferent depolarization</i> - Despolarización de aferentes primarias
PAF	<i>Primary afferent fiber</i> - Fibra aferente primaria
PBSSt	<i>Posterior biceps and semitendinosus</i> - Bíceps posterior y semitendinoso
PL	Plantaris
PN	<i>Projection neuron</i> - Neurona de proyección
Q	Cuadríceps
Rd	Rafé dorsalis
RF	<i>Reticular formation</i> - Formación reticular
Rp	Rafé pontis
Rpa	Rafé pallidus
Sart	Sartorio
SP	<i>Superficial peroneal</i> - Peroneo superficial
St	Semitendinoso
SU	Sural
TIB	Tibial
Vglut1	<i>Vesicular glutamate transporter 1</i> - Transportador vesicular de glutamato tipo 1
VRP	<i>Ventral root potential</i> - Potencial de raíz ventral
xU	Veces por umbral

I. Resumen

Los sistemas serotoninérgicos supraespinales están involucrados en la modulación de los procesos sensoriales y motrices a nivel espinal. No obstante, la información sobre el papel de la serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) en la regulación de la efectividad sináptica de las fibras aferentes propioceptivas es todavía limitada. Se desconoce si la 5-HT modula la transmisión sináptica de las fibras aferentes musculares y cutáneas de bajo umbral, y las vías neuronales que median la despolarización de aferentes primarias (PAD). El objetivo de la presente tesis fue determinar los efectos de la 5-HT sobre la transmisión sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral y sobre las vías neuronales que median la PAD, e investigar los subtipos de receptores a la 5-HT involucrados. Los experimentos se realizaron en la médula espinal lumbar de ratón neonato (P6), hemiseccionada sagitalmente y con nervios periféricos en continuidad. La PAD fue inferida a partir de los potenciales de raíz dorsal (DRPs) registrados en las raíces dorsales lumbares L₃-L₄ y la transmisión sináptica de las fibras aferentes a partir de cambios en la amplitud del componente monosináptico de los potenciales extracelulares de campo (EFPs), o de los potenciales (EPSPs) y corrientes (EPSCs) postsinápticos excitadores registrados en interneuronas del cuerno dorsal profundo. El efecto de la 5-HT sobre la excitabilidad intraespinal de las fibras aferentes fue estimado mediante la técnica de Wall a través de los cambios en la amplitud de los potenciales antidrómicos producidos por pulsos intraespinales de corriente constante. Para identificar posibles efectos sobre la eficacia sináptica de las fibras aferentes evaluamos el efecto de la 5-HT sobre la depresión homosináptica, mediante el protocolo de estimulación pareada de aferentes homónimas. Para determinar si la 5-HT ejerce algún efecto sobre la inhibición presináptica de las fibras aferentes, asociada a la PAD, utilizamos un protocolo para producir inhibición presináptica mediante la estimulación condicionante de fibras aferentes heterónimas. Observamos que la serotonina deprime significativamente el componente monosináptico de los EFPs y los DRPs producidos por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral, sin modificar la excitabilidad de las mismas. Los DRPs se

deprimieron con un curso temporal más rápido que los EFPs. Asimismo, la 5-HT deprimió significativamente los EPSPs y las EPSCs monosinápticos, sin cambios significativos en las propiedades de membrana de las neuronas registradas. La depresión homosináptica de los EFPs fue reducida significativamente por la 5-HT, lo cual sugiere una disminución de la eficacia sináptica de las fibras aferentes a través de la activación de receptores presinápticos. Además la 5-HT también redujo significativamente la inhibición presináptica sensible a bicuculina, producida por la estimulación de fibras aferentes heterónimas, lo cual concuerda con la reducción de los DRPs. Para dilucidar los subtipos de receptores involucrados en la depresión de la transmisión sináptica y de los DRPs, se examinaron los efectos de algunos agonistas serotoninérgicos. La aplicación de agonistas de los receptores 5-HT_{1B/1D} (zolmitriptan), 5-HT_{1B} (CP-93,129) y 5-HT_{1E/1F} (BRL54443) deprimieron significativamente el componente monosináptico de los EFPs, EPSCs y DRPs. En contraste, el agonista de los receptores 5-HT_{1A/7} (8-OH-DPAT) deprimió significativamente los DRPs sin afectar los EFPs. La depresión de los componentes monosinápticos de los EFPs, EPSPs y EPSCs por la 5-HT, así como la reducción de la depresión homosináptica, sugieren una reducción de la efectividad sináptica de las fibras aferentes a nivel presináptico. La depresión de los EFPs y DRPs por la 5-HT con un curso temporal diferente sugiere la participación de diferentes mecanismos o la activación de diferentes subtipos de receptores, además de posibles efectos postsinápticos. La amplitud de los DRPs se deprime por la 5-HT como consecuencia de una reducción de la transmisión sináptica de las fibras aferentes que los generan, pero además por una acción inhibitoria sobre las vías neuronales que median la PAD, ya que la inhibición presináptica asociada a PAD es revertida por la 5-HT. En apoyo a esta hipótesis, el 8-OH-DPAT deprimió los DRPs, sin afectar los EFPs. En conclusión, la 5-HT reduce la efectividad sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral a través de la activación de los receptores metabotrópicos 5-HT_{1B}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}. La excitabilidad de las interneuronas que median la PAD puede ser modulada, además, por la activación de receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇.

Abstract

Serotonergic systems modulate sensory and motor spinal processing. However, information about the role of serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) in the control of proprioceptive information is still limited. It is not clear how 5-HT modulates low threshold cutaneous and muscle afferent fibers synaptic efficacy and neuronal pathways mediating primary afferent depolarization (PAD). This thesis aimed: i) to investigate the modulatory effects of 5-HT on low threshold afferents synaptic transmission and on neuronal pathways mediating PAD; and ii) to identify the 5-HT receptor subtypes involved in this modulation. Experiments were carried out on the P6-7 sagittally-hemisected mouse lumbar spinal cord with intact nerves for afferent stimulation. Stimulus strength was based on multiples of threshold (xT) of the most excitable fibers recorded from the incoming afferent volley. Peripheral nerves were stimulated at strengths that preferentially recruited myelinated afferents ($\leq 4 xT$). PAD was inferred from dorsal root potentials (DRPs) recorded at L₃-L₄ dorsal roots while monosynaptic responses were recorded in the deep dorsal horn as intraspinal extracellular field potentials (EFPs), as intracellular excitatory postsynaptic currents (EPSCs), or as excitatory postsynaptic potentials (EPSPs). A paired-pulse protocol assessed homosynaptic EFP depression with conditioning - test intervals between 25 ms – 10 s. The effect of 5-HT on the intraspinal excitability of afferent fibers was estimated by means of Wall's technique recording changes in the amplitude of antidromic compound action potentials evoked by constant current intraspinal microstimulation. To determine whether 5-HT modulates PAD-associated presynaptic inhibition, we used a protocol to produce presynaptic inhibition by applying conditioning stimulation to heteronymous afferent fibers, avoiding the interference of the homosynaptic depression. 5-HT significantly depressed the monosynaptic component of EFPs and DRPs evoked by the stimulation of low threshold afferent fibers, with no change in the excitability of the stimulated afferents. DRPs were depressed with a faster time course than EFPs. In addition, 5-HT significantly depressed monosynaptic EPSPs and EPSCs, with no change in the passive properties of recorded interneurons. The homosynaptic depression of EFPs

and DRPs evoked by conditioning stimulation of homonymous afferent fibers was significantly reduced by 5-HT, suggesting a decrease in the afferent fibers synaptic efficacy by the activation of presynaptic receptors. 5-HT also significantly reduced bicuculline-sensitive presynaptic inhibition evoked by the stimulation of heteronymous afferent fibers, which is consistent with DRP reduction. To identify the 5-HT receptor subtypes involved in the depression of synaptic transmission and DRPs, we examined the effects of some 5-HT receptor agonists at concentrations 1-10 μ M. The application of the 5-HT_{1B/1D} (zolmitriptan), 5-HT_{1B} (CP-93,129) and 5-HT_{1E/1F} (BRL54443) receptor agonists significantly depressed the monosynaptic component of EFPs and EPSCs, and DRPs. In contrast, the 5-HT_{1A/7} receptor agonist (8-OH-DPAT) depressed DRPs with no effect on EFPs. The depression of monosynaptic components of EFPs, EPSPs and EPSCs by 5-HT, as well as the reduction of the homosynaptic depression suggests a reduction of afferent fibers synaptic efficacy at a presynaptic level, but we cannot exclude possible postsynaptic effects. The different time course for depression of EFPs and DRPs by 5-HT suggests the contribution of different mechanisms or the activation of different receptors subtypes. Therefore, the reduction of afferent fibers synaptic efficacy by 5-HT is due to the activation of the 5-HT_{1B}, 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} metabotropic receptors. DRPs are depressed as a consequence of the reduction of afferent fibers synaptic transmission, but also of the inhibitory action on the interneuronal pathways mediating PAD, since PAD-associated presynaptic inhibition is reversed by 5-HT. In line with this hypothesis, the 5-HT_{1A/7} receptor agonist, 8-OH-DPAT, depressed DRPs with no change in EFPs. The results of the present thesis led us to conclude that 5-HT reduces low threshold afferent fibers synaptic efficacy by the activation of the 5-HT_{1B}, 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} metabotropic receptors. The excitability of interneurons mediating PAD can be reduced, additionally, by the activation of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors.

II. Introducción

2.1 *Inhibición presináptica y despolarización de las fibras aferentes primarias*

2.1.1 *Despolarización de aferentes primarias*

A nivel espinal, la información sensorial está sujeta a diversos mecanismos que controlan de manera selectiva su paso hacia los circuitos neuronales espinales. Estos mecanismos regulan la efectividad sináptica de las terminales de las fibras aferentes antes de hacer contacto con las neuronas posinápticas, es decir, a nivel presináptico. Uno de estos mecanismos ocurre a través de sinapsis GABAérgicas axoaxónicas provenientes de neuronas GABAérgicas de último orden que se localizan en el cuerno dorsal y en las láminas intermedias de la médula espinal y se le ha denominado *inhibición presináptica* (Eccles et al., 1962 a, b; Jankowska et al., 1981).

En 1957, Frank y Fuortes observaron en la médula espinal del gato anestesiado que los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) producidos por la estimulación de aferentes musculares del grupo Ia, se deprimían al aplicar una estimulación condicionante a las fibras aferentes musculares flexoras del grupo I. La depresión de los EPSPs ocurría sin cambios evidentes en la excitabilidad de la motoneurona registrada. Estos autores propusieron que la depresión de los EPSPs Ia monosinápticos tenía un origen presináptico, siendo la primera evidencia de una inhibición presináptica a nivel espinal.

Posteriormente, Eccles et al. (1961) observaron que a diferencia de la inhibición posináptica clásica, la depresión de los EPSPs monosinápticos producida por la estimulación condicionante de nervios flexores ocurría con un curso temporal prolongado, con intervalos de 5 - 200 ms entre el pulso condicionante y el pulso de

prueba, alcanzando un máximo entre 20 y 30 ms, para después decaer lentamente (Figura 1) (Eccles et al., 1961).

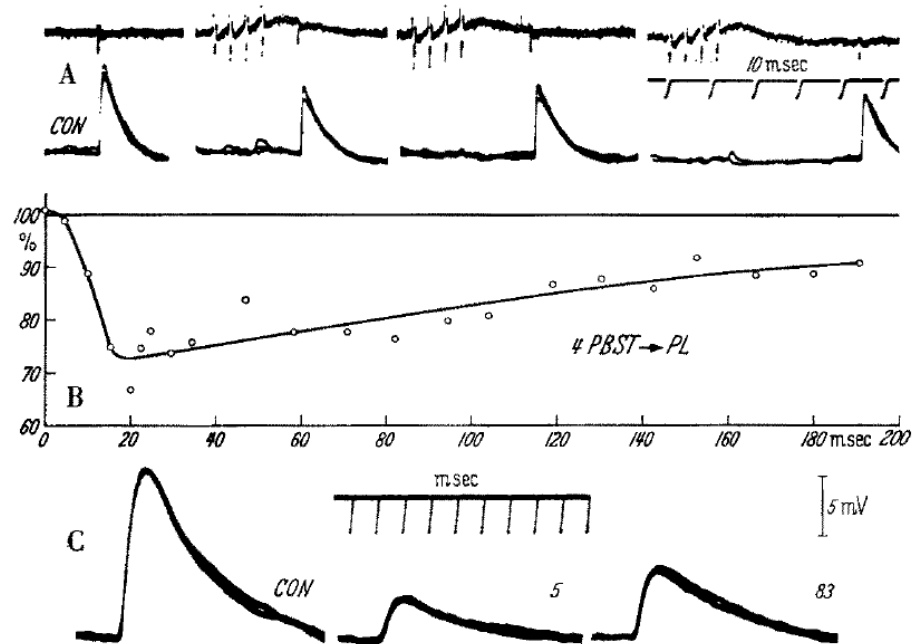


Figura 1. Depresión de los EPSPs monosinápticos como consecuencia de una inhibición presináptica.

A. EPSPs control (CON) registrado en una motoneurona del plantaris (PL). Se puede observar una depresión del EPSP al aplicar una estimulación condicionante al nervio flexor bíceps posterior y semitendinoso (PBSSt). En los trazos superiores se muestran los registros de la salva aferente en el dorso de la médula (positividad hacia arriba) que indican el momento de la aplicación de los pulsos condicionantes y de prueba. **B.** curso temporal de la depresión de los EPSPs (expresada en porcentaje con respecto al control). **C.** depresión de los EPSPs Ia control en otro experimento, a los 5 y 83 ms entre la estimulación condicionante a aferentes flexores del grupo I y el pulso de prueba (Eccles, Eccles y Magni, 1961)

Más tarde, con la finalidad de investigar la existencia de una inhibición posináptica, Eide et al. (1968) estudiaron las propiedades de la membrana de la motoneurona durante la inhibición presináptica mediante la aplicación de pulsos de corriente intracelular. Observaron que la estimulación condicionante de nervios flexores deprimía los EPSPs Ia, sin modificaciones detectables en la amplitud de los pulsos de corriente aplicados (Figura 2), es decir, sin cambios en la resistencia de membrana de la motoneurona. Estos hallazgos les permitieron concluir que la depresión de los EPSPs de las fibras Ia producidos por la estimulación condicionante de nervios flexores era de origen presináptico.

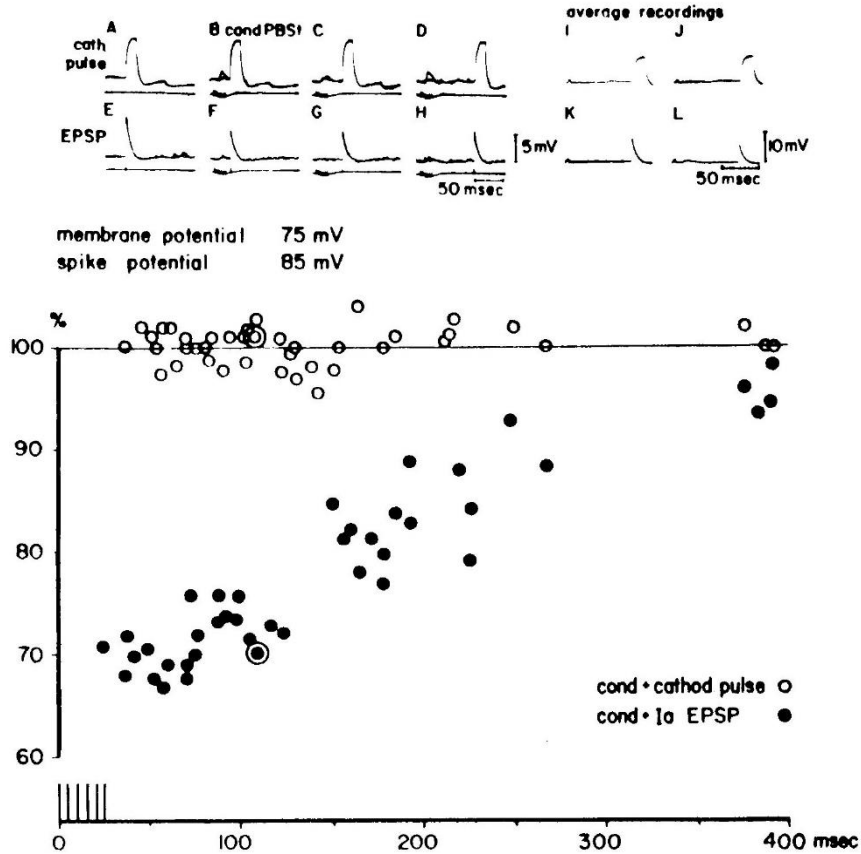


Figura 2. La depresión de los EPSPs Ia producidos por la estimulación de aferentes flexores ocurre sin cambios en la resistencia de membrana de la motoneurona. A-H, trazos superiores, registros intracelulares en una motoneurona del gatrocnemio. *Trazos inferiores,* salva aferente registrada en el dorso de la médula espinal a nivel L7. El nervio PBSt (cond PBSt) se estimuló con una intensidad 2 xU. **A-D,** cambios de potencial producidos por la inyección de un pulso de corriente intracelular, en condiciones control (A) y subsecuentemente a la aplicación de una estimulación condicionante al nervio PBSt (B-D), con diferentes intervalos entre el pulso condicionante y de prueba. **E-H,** EPSPs Ia en condiciones control (E) y posterior a la estimulación condicionante al nervio PBSt (F-H). Nótese la depresión de los EPSPs con la estimulación condicionante del nervio PBSt y la ausencia de efecto en la amplitud de la deflexión de voltaje producida por el pulso de corriente intracelular. **I y K,** registros promedio control. **J y L,** registros promedio después de la estimulación condicionante al nervio PBSt. La gráfica inferior muestra el curso temporal del efecto de la estimulación condicionante del nervio PBSt sobre los EPSPs Ia y sobre el potencial producido por el pulso de corriente inyectado a diferentes intervalos ente el estímulo condicionante y el de prueba. La amplitud de los EPSPs y de las deflexiones de voltaje producidas por el pulso de corriente se expresa como porcentaje de los registros control (Eide et al., 1968).

2.1.2 Relación entre la despolarización de aferentes primarias y la inhibición presináptica

En 1933 Gasser y Graham observaron que al estimular una raíz dorsal se producía un potencial positivo (onda P) de larga duración (200 ms) registrado en la superficie del dorso de la médula espinal. Posteriormente Barron y Matthews (1938) observaron que la estimulación de una raíz dorsal producía un potencial negativo de larga duración (registrado con electrodos bipolares) en la raíz estimulada, así como en las raíces adyacentes (Figura 3). A este potencial le denominaron potencial de raíz dorsal (DRP; dorsal root potential, por sus siglas en inglés). Estos mismos autores postularon que la onda P registrada en la superficie del dorso de la médula espinal era producida por el mismo fenómeno que generaba el potencial de raíz dorsal (DRP) registrado en las raíces dorsales, el cual reflejaba una despolarización intraespinal propagada electrotonicamente de manera antidrómica en las fibras aferentes.

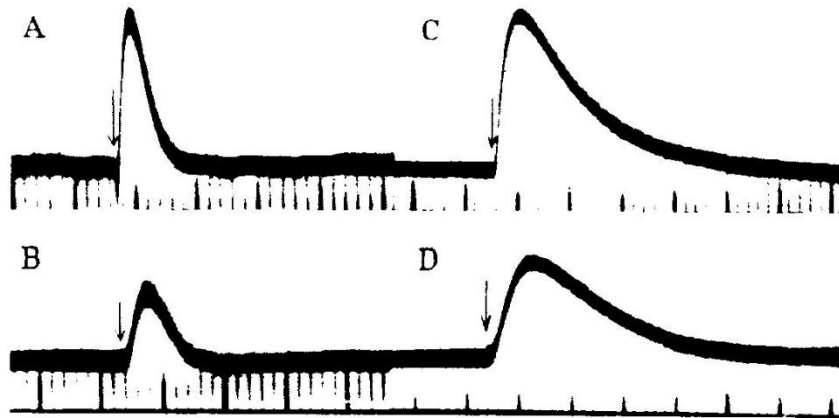


Figura 3. Potenciales de raíz dorsal registrados en el gato y en la rana. A y B, potencial de raíz dorsal registrado en el gato mediante electrodos bipolares colocados a 2.5 y 12 mm de la médula espinal, respectivamente, sobre una raíz dorsal seccionada periféricamente. **A,** estímulo aplicado a una raíz dorsal adyacente ipsilateral. **B,** estímulo aplicado a una raíz dorsal contralateral. **C y D,** potenciales de raíz dorsal registrados en la rana con un abordaje similar. **C,** estímulo aplicado a una raíz dorsal ipsilateral. **D,** estímulo aplicado a una raíz dorsal contralateral (Barrow y Matthews, 1938).

En 1958, Patrick Wall demostró que la estimulación de las raíces dorsales incrementaba la amplitud de los potenciales antidrómicos poblacionales producidos por la estimulación directa de las terminales intraespinales de las fibras aferentes. Puesto que el incremento de los potenciales antidrómicos tenía un curso temporal similar al de los DRPs, este investigador concluyó que el incremento en la amplitud de los potenciales antidrómicos se debía a un incremento en la excitabilidad de las terminales intraespinales de las fibras aferentes. Cuando las fibras se despolarizan su umbral disminuye y su excitabilidad aumenta, por consiguiente un incremento en la excitabilidad de las fibras aferentes producido por la estimulación de las raíces dorsales conduce a la activación de un mayor número de fibras aferentes por la estimulación intraespinal, generando una respuesta antidrómica de mayor amplitud.

Con el advenimiento de las micropipetas de vidrio, la PAD pudo registrarse por primera vez a nivel intraaxonal (Koketsu, 1956; Eccles y Krnjevic, 1959). Se pudo confirmar que la PAD intrafibra ocurre con el mismo curso temporal que los DRPs registrados extracelularmente de manera poblacional (Figura 4). Adicionalmente, Eccles y su grupo de trabajo observaron que el curso temporal de la PAD era similar a la depresión de los EPSPs Ia producida por la estimulación de aferentes flexores, demostrando con estas observaciones que la inhibición presináptica estaba asociada a una despolarización de las fibras aferentes primarias (PAD) (Eccles et al., 1961, 1962), la cual se propaga antidrómicamente y se registra como potenciales negativos en la raíz dorsal (DRPs) a nivel poblacional. Aunque sin ser una demostración fehaciente, estos hallazgos llevaron a proponer que la PAD es la causa de la depresión de los EPSPs, es decir, de la inhibición presináptica, probablemente a través de una reducción de la amplitud del potencial de acción presináptico que invade las terminales de las fibras aferentes, con el consiguiente decremento en la liberación del neurotransmisor excitador.

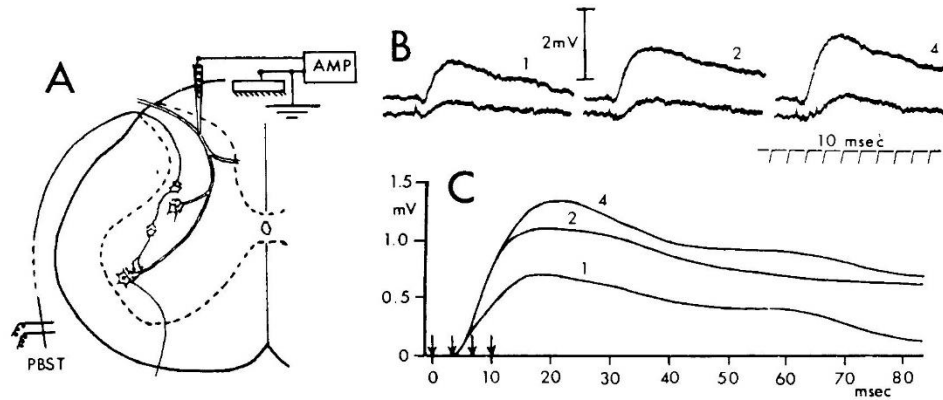


Figura 4. Registro intracelular de la despolarización de las fibras aferentes primarias (PAD). **A**, arreglo experimental. La micropipeta se inserta en una fibra aferente del nervio gatrocnemio a una profundidad de 0.6 mm. **B**, *registros superiores*, cambios de potencial intraaxonal producidos por la estimulación con 1, 2 y 4 pulsos al nervio PBSSt. *Registros inferiores*, lo cambios de potencial producidos de igual manera pero con el electrodo de registro a nivel extraaxonal. **C**, gráfica que muestra los cambios en el potencial transmembrana de una fibra del grupo Ia. Los registros muestran la diferencia entre los potenciales intra y extracelulares, correspondientes a 1, 2 y 4 pulsos de estimulación. Las deflexiones hacia arriba indican una despolarización (Eccles, 1963).

2.1.3 Despolarización de aferentes primarias producida a través de sinapsis axo-axónicas GABAérgicas

En la actualidad existe evidencia histológica y farmacológica de que la inhibición presináptica asociada a la PAD se produce a través de sinapsis axoaxónicas presentes en las terminales de las fibras aferentes (Rudomin y Schmidt, 1999). Esto conduce a una despolarización de las mismas y a una reducción en la liberación del neurotransmisor. Se ha observado que tanto la inhibición presináptica como la PAD se reducen en presencia de los antagonistas a los receptores GABA_A, picrotoxina y bicuculina (Eccles et al., 1962; Schmidt, 1963; Davidoff, 1972; Barker y Nicoll, 1973; Bautista et al., 2010), lo cual sugiere que los efectos están mediados por los receptores GABA_A presentes en las terminales de las fibras aferentes (Figura 5). La activación de receptores GABA_A conlleva a una salida de iones cloruro (Cl⁻), ya que el potencial de equilibrio del Cl⁻ (E_{Cl⁻}) en las terminales aferentes se encuentra a un nivel más despolarizado que el potencial de

membrana. Ello se debe a la acción del cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ que introduce Cl^- al interior de las fibras aferentes manteniendo un E_{Cl^-} de manera tal que al activarse los receptores GABA_A se produce una despolarización (Alvarez-Leefmans et al., 1998). La reducción de la efectividad sináptica, es decir, de la liberación del neurotransmisor (glutamato en las fibras aferentes Ia) se puede deber: (i) a un bloqueo de la invasión del potencial de acción en las terminales por un efecto de cortocircuito producido al reducirse la impedancia de membrana; o (ii) a una reducción en la liberación del neurotransmisor debida a una inactivación parcial de los canales de sodio dependientes de voltaje, conduciendo a una reducción en la amplitud del potencial de acción y a una reducción en la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes del voltaje.

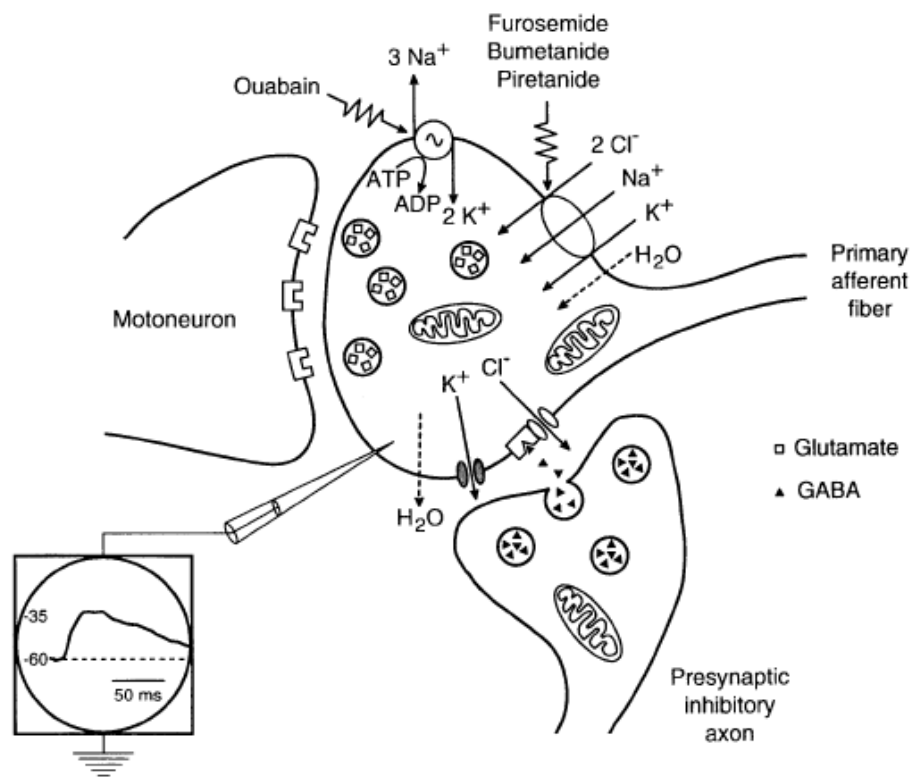


Figura 5. Sinapsis axo-axónica GABAérgica. Representación esquemática del axón de una terminal aferente primaria haciendo contacto sináptico con la dendrita de una motoneurona. A su vez, el axón primario recibe un contacto axoaxónico de una interneurona GABAérgica. La despolarización producida por GABA se registra mediante un microelectrodo insertado en la terminal de la fibra aferente. La despolarización se debe a la salida de iones cloruro (Cl^-). La despolarización activa canales de K^+ con una consecuente salida de K^+ . El gradiente de Cl^- se restablece por la acción del cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$. (Alvarez-Leefmans et al., 1998)

Cuando la PAD se produce por la activación sincrónica de una población de fibras aferentes se induce una despolarización suficiente para alcanzar el umbral de activación de los canales de Na^+ y se disparan potenciales de acción en las terminales de las fibras que son despolarizadas. Estos potenciales de acción son conducidos antidrómicamente hacia las raíces dorsales, y se han denominado reflejos de raíz dorsal o DRRs, por sus siglas en inglés (Barron y Matthews, 1938; Toennies, 1938).

2.1.4 Organización funcional de la inhibición presináptica

Una vez que fue posible registrar la PAD intraaxonalmente en las columnas dorsales, Eccles y Krnjevic (1959) mostraron que no todas las aferentes musculares son afectadas de la misma manera por la estimulación condicionante aplicada a nervios flexores. En efecto, los registros intrafibra de las fibras aferentes del grupo I, que pueden ser del tipo Ia y Ib tomando en cuenta su velocidad de conducción y umbral de activación, revelan la existencia de una selectividad de las vías que median la PAD. Las fibras Ia provienen de los receptores de huso muscular y transmiten al sistema nervioso central información relacionada con la magnitud y la velocidad de los cambios de longitud del músculo; mientras que las fibras Ib que provienen de los órganos tendinosos de Golgi transmiten la información relacionada con la tensión que desarrolla el músculo (Matthews, 1982).

Debido a que las fibras aferentes musculares Ia y Ib transmiten información diferente y proyectan en sitios intraespinales distintos (las fibras Ib no proyectan al cuerno ventral), se propuso que podría haber un control diferencial de sus acciones a nivel espinal. Si ambos tipos de fibras convergen sobre un mismo tipo de interneuronas, como en el caso de algunas interneuronas localizadas en el núcleo intermedio (Czarkowska et al., 1981; Jankowska et al., 1981), un control presináptico podría modular de manera más independiente la información

transmitida por ambos tipos de fibras. Luego entonces, las interneuronas que median la PAD de ambos tipos de fibras podrían ser diferentes, permitiendo así un control presináptico selectivo.

La PAD también puede ser producida por la estimulación de vías descendentes como el núcleo rojo (Hongo et al., 1972; Rudomin et al., 1983), el núcleo vestibular (Cook et al., 1972), la formación reticular bulbar (Carpenter et al., 1963; Lundberg y Vyklicky, 1966), la corteza motora (Lundberg, 1964) y el núcleo del rafé (Proudfit et al., 1980). Esto sugiere que diversas estructuras supraespinales también pueden modular presinápticamente la información sensorial.

Se ha establecido que las fibras aferentes del grupo II y III (Eccles et al., 1961), las fibras aferentes cutáneas, las aferentes del reflejo flexor (Eccles et al., 1962, Lundberg et al., 1964), las aferentes articulares (Quevedo et al., 1993), las aferentes musculares y cutáneas contralaterales (Devanandan et al., 1966), no producen PAD en las fibras Ia, pero inhiben la PAD producida en estas fibras. La inhibición de la PAD de las fibras Ia también se produce por la estimulación del núcleo rojo (Hongo et al., 1972; Rudomin et al., 1983), la formación reticular del tallo cerebral y el tracto piramidal (Rudomin et al., 1983, 1986). Sin embargo, la estimulación del núcleo vestibular produce PAD en las fibras Ia (Cook et al., 1972; Rudomin et al., 1986). En la tabla 1 se muestra un resumen de estos hallazgos.

La organización de la PAD en las fibras del tipo Ib es muy diferente. Este tipo de fibras se despolariza con mayor efectividad mediante la estimulación de aferentes Ib, tanto de músculos flexores como extensores (Eccles et al., 1963, Rudomin et al., 1983; Brink et al., 1984). Las aferente musculares de alto umbral, fibras del grupo I y II, las aferentes articulares (Quevedo et al., 1993), las aferentes cutáneas y diversas vías descendentes, como las vías rubroespinal, corticoespinal, retículo-espinal y vestíbulo-espinal (Lundberg, 1964; Rudomin et al., 1983) también producen un despolarización sobre las fibras Ib. No obstante, el grupo de Rudomin (1983) mostró que en un subgrupo de fibras Ib provenientes del nervio

gastrocnemio, en el cual la PAD inducida por la estimulación de aferentes flexores del grupo I fue inhibida por aferentes cutáneos, la estimulación de la formación reticular bulbar producía PAD. Inicialmente se propuso que se trataba de fibras Ia y que la estimulación del tallo cerebral coactivaba fibras descendentes con conexiones excitadoras sobre las vías que median la PAD. Una investigación más detallada mediante el registro de los cambios de umbral intraespinal producidos en fibras aferentes individuales del nervio PBSt sugirió, en cambio, que las fibras que presentaban estos patrones mixtos de PAD no eran fibras Ia, sino Ib (Rudomin et al., 1986)

Ya que la estimulación de algunas fibras aferentes y vías descendentes no producen PAD por sí mismas en las fibras del grupo Ia, pero sí pueden inhibir la PAD producida por otras vías, se ha propuesto que las acciones inhibitoras tienen lugar en las interneuronas interpuestas en la vía que media la PAD de las fibras Ia (Lundberg et al., 1964; Lundberg y Vicklicky, 1966; Rudomin et al., 1983).

Tipo de fibra	Patrón de PAD	Vías que producen PAD					Vías que inhiben (-) o facilitan (+) la PAD		
		Ia	Ib	II, III	Aferentes cutáneas y articulares	Vía vestíbulo espinal	Aferentes cutáneas y articulares	Vía retículo-espinal. Vía rubro-espinal. Vía córtico-espinal	
Ia	Tipo A	X	X			X	-	-	
Ib	Tipo B		X	X	X	X	+	+	
Ib	Tipo C		X	X		X	-	+	

Tabla 1. Parámetros que definen los patrones de PAD en relación a las vías que producen PAD y a las vías que inhiben la PAD de las fibras aferentes musculares de los grupos Ia y Ib.

Rudomin y su grupo de trabajo (Rudomin et al., 1986) definieron tres patrones de PAD para las fibras aferentes del grupo I. La estimulación de las fibras aferentes del grupo I y las vías vestíbulo espinales producen PAD en las fibras aferentes musculares del grupo Ia, mientras que la estimulación de vías cutáneas, articulares, retículo-espinales, rubro-espinales y córtico-espinales no producen PAD por sí mismas; sin embargo, estas vías pueden inhibir la PAD producida por aferentes del grupo I (Patrón de PAD tipo A; Tabla 1). La estimulación de las vías aferentes del grupo Ib, cutáneas, articulares y de las vías descendentes retículo-espinales, rubro-

espinales y córtico-espinales producen PAD en una subpoblación de fibras del grupo Ib (Patrón de PAD tipo B; tabla 1). Como se ha mencionado anteriormente, existe una población de fibras del grupo Ib en las cuales la estimulación de vías descendentes produce PAD, pero la estimulación de las fibras cutáneas y articulares no producen efecto alguno. No obstante, la estimulación de estas fibras inhiben la PAD producida por la estimulación de aferentes del grupo I (Patrón PAD tipo C; Tabla 1).

La PAD de las fibras aferentes musculares y cutáneas es producida por circuitos espinales muy diferenciados, lo cual resalta su importancia en la regulación de la liberación del neurotransmisor a nivel presináptico. En efecto, se ha demostrado que las acciones de las interneuronas GABAérgicas pueden ser muy selectivas y producirse localmente de manera diferencial, aún en colaterales individuales de una sola fibra aferente (Lomelí et al., 1998).

2.1.5 Despolarización de aferentes primarias durante tareas específicas

Se ha demostrado que la inhibición presináptica asociada a la PAD es modulada de manera importante por los generadores de patrones motrices en mamíferos. Durante la locomoción ficticia ocurren cambios cíclicos de la PAD en las fibras aferentes musculares y cutáneas (Dubuc et al., 1988; Dueñas y Rudomin, 1988; Rossignol et al., 1998). Dueñas y Rudomin (1988) midieron los cambios en la excitabilidad espinal de las aferentes Ia y Ib de músculos extensores durante la locomoción ficticia y encontraron que la PAD de ambos tipos de fibras fue máxima durante la fase flexora del ciclo locomotriz. Como se ha descrito previamente, en ausencia de locomoción ficticia la estimulación de nervios cutáneos facilita la PAD en las fibras Ib (Rudomin et al., 1983). Sin embargo, durante la locomoción ficticia estos efectos se revierten, es decir, la estimulación de los nervios cutáneos inhibe la PAD de las aferentes Ib (Dueñas y Rudomin, 1993). Estos hallazgos son evidencia de que los patrones de PAD de las aferentes musculares no son rígidos

o invariantes, si no que pueden cambiar de acuerdo a la tarea motriz que se este realizando.

Por su parte, Gossard y Rossignol (1990) investigaron la participación de los mecanismos presinápticos en el control de los movimientos locomotrices. En felinos descerebrados estudiaron la modulación de la inhibición presináptica asociada a la PAD, mediante el registro de los DRPs provocados por la estimulación de nervios cutáneos y musculares durante locomoción ficticia inducida mediante la estimulación de la región locomotora mesencefálica (MLR) o por la inyección intravenosa de L-DOPA. Estos autores observaron que los DRPs se modulan cíclicamente con el ritmo de la locomoción ficticia. La amplitud de los DRPs disminuye al inicio de la fase flexora, alcanzando su mínima amplitud al final de la fase flexora, para posteriormente alcanzar una amplitud máxima durante la fase extensora. Estos resultados sugieren que la transmisión en las vías que median la PAD es modulada cíclicamente por la actividad de los circuitos espinales que generan la locomoción.

La inhibición presináptica asociada a la PAD tiene también un papel relevante durante la ejecución de movimientos voluntarios. Seki et al. (2003) demostraron en primates que durante la ejecución de movimientos voluntarios la información aferente cutánea puede ser modulada a nivel presináptico. Se observó que al inicio del movimiento voluntario se produce una reducción de la información cutánea, ejercida probablemente por comandos centrales, la cual podría interferir potencialmente con la eficacia del movimiento voluntario. Algo similar se ha observado en estudios efectuados en humanos. Hultborn et al. (1987) desarrollaron un método para estimar los cambios en la inhibición presináptica de las terminales Ia durante una contracción voluntaria. Primeramente, midieron la facilitación del reflejo H (reflejo de Hoffman) monosináptico Ia heterónimo (aferentes del músculo cuádriceps a las motoneuronas del sóleo). La facilitación heterónima es un indicador del grado de inhibición presináptica ejercida en las fibras Ia responsables de la facilitación. Posteriormente, estimaron la excitabilidad de las interneuronas que

median la inhibición presináptica producida por la estimulación de las aferentes Ia del músculo tibial anterior (estimulación condicionante) sobre las fibras aferentes Ia que producen el reflejo H de prueba (sóleo o cuádriceps), con un intervalo de 40 a 60 ms. La estimulación condicionante de las aferentes Ia flexoras fue producida al aplicar una vibración al tendón del músculo tibial anterior. Observaron que al inicio de una contracción voluntaria, la flexión plantar del pie (contracción gastrocnemio-sóleo), se producía un incremento en la facilitación heterónima del cuádriceps al sóleo, lo cual refleja un decremento en la inhibición presináptica de las terminales Ia del cuádriceps sobre las motoneuronas del sóleo. Por otra parte, durante la misma contracción del músculo gastrocnemio-sóleo se producía un incremento de la inhibición del reflejo H del cuádriceps provocada por la vibración del tendón del músculo tibial anterior, lo cual indica una facilitación de las vías que median la inhibición presináptica de las terminales aferentes homónimas Ia del cuádriceps. Durante la extensión voluntaria de la rodilla (contracción del cuádriceps) se observó un patrón opuesto, es decir, la facilitación heterónima del cuádriceps al sóleo se redujo, la inhibición vibratoria del reflejo H del sóleo se incrementó, mientras que la inhibición vibratoria del reflejo H del cuádriceps disminuyó. Estos resultados sugieren que la inhibición presináptica de las terminales aferentes Ia sobre las motoneuronas de los músculos que se contraen se reduce, permitiendo que la actividad de las fibras Ia contribuya a la excitación de las motoneuronas activadas voluntariamente. Por lo contrario, se produce un incremento en la inhibición presináptica de las fibras Ia hacia las motoneuronas de los músculos no involucrados en la contracción voluntaria. Con base en estas observaciones, los autores concluyeron que el control de la inhibición presináptica de las fibras Ia durante un movimiento se modula con el propósito de favorecer la activación de los músculos involucrados en una tarea motora específica.

2.1.6 Interneuronas que median la despolarización de fibras aferentes primarias

Mediante la técnica de la microestimulación intraespinal es posible activar las interneuronas de último orden para producir una PAD monosináptica, en el gato (Jankowska et al., 1981). Se ha estimado que la latencia mínima para producir PAD es de 0.6 a 0.8 ms (Jankowska et al., 1981), la cual es 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). Estas observaciones han llevado a concluir que la vía más corta para producir PAD comprende al menos dos interneuronas interpuestas, es decir, una latencia trisináptica. Por otra parte, Rudomin et al. (1983) mostraron que la estimulación de aferentes cutáneas puede inhibir la PAD de las fibras Ia producida por la estimulación de las fibras del grupo Ia de músculos flexores, sin afectar la PAD monosináptica producida por la microestimulación intraespinal de las mismas fibras, mientras que la estimulación de la formación reticular bulbar puede inhibir la PAD producida por ambos procedimientos. Estas observaciones sugieren que ambos efectos inhibitorios son ejercidos en dos sitios distintos, probablemente en diferentes interneuronas interpuestas en la vía que media la PAD de las fibras Ia. Debido a que la estimulación de las aferentes cutáneas no parece despolarizar a las fibras Ia (Rudomin et al., 1983), se concluyó que sus acciones inhibitorias son ejercidas a nivel de la primera interneurona en la vía que media la PAD; sin embargo, las fibras retículo-espinales inhiben la interneurona de último orden en la misma vía (Rudomin et al., 1983).

Rudomin et al. (1984) caracterizaron un grupo de interneuronas cuya actividad extracelular espontánea estaba asociada a los DRPs. Sin embargo, no fue posible demostrar si los DRPs eran producidos por las interneuronas registradas o si eran consecuencia de las acciones de otras interneuronas activadas en común. Más recientemente, el grupo de Jankowska (Bannatyne et al., 2009) registraron interneuronas en el núcleo intermedio que expresan la enzima descarboxilasa de ácido glutámico (GAD), es decir, GABAérgicas, y que establecen contactos

axoaxónicos con fibras aferentes que expresan el transportador vesicular de glutamato tipo 1 (VGLut1). El VGLut1 es un marcador específico para fibras aferentes. Las interneuronas GAD+ fueron activadas monosinápticamente por fibras aferentes musculares de bajo umbral (grupo I), y por consiguiente estos autores propusieron que la vía neuronal de la PAD podría estar mediada por al menos una interneurona, y no dos, como se había propuesto previamente (Figura 6).

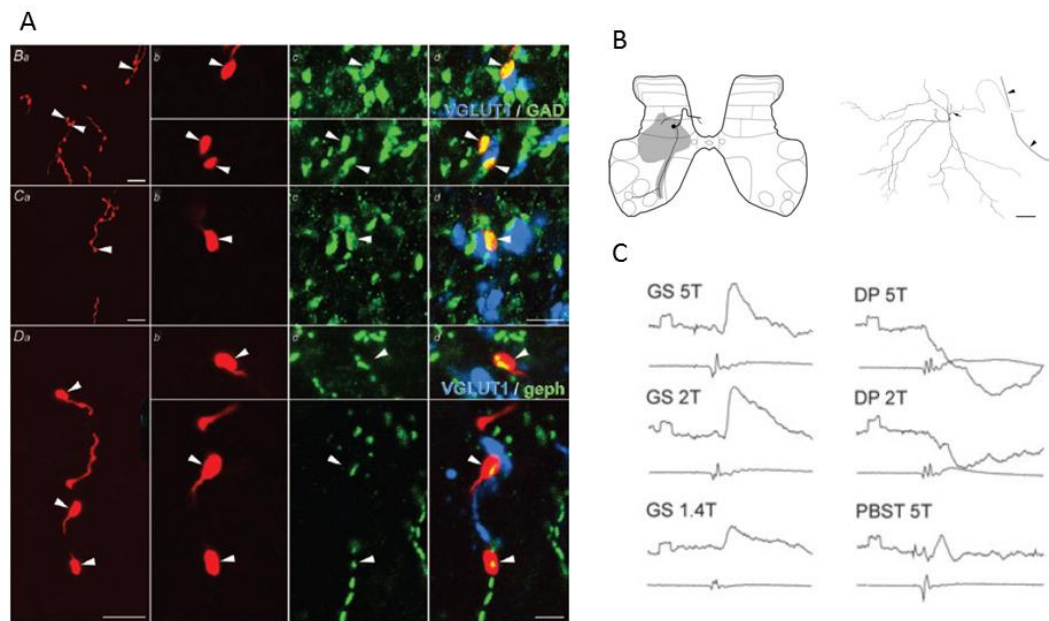


Figura 6. Interneurona GABAérgica que establece conexión axoaxónica con fibras aferentes y es activada monosinápticamente por aferentes musculares del grupo I. **A**, reconstrucción de una interneurona registrada y caracterizada electrofisiológicamente. Las flechas señalan el axón (rojo), las terminales de esta interneurona fueron inmunoreactivas para GAD y gefirina (verde). Las terminales de las fibras aferentes, marcadas con VGLUT1 (azul), reciben conexiones de los axones de la interneurona, sugiriendo contactos axoaxónicos. **B**, localización y reconstrucción de las proyecciones axonales de la interneurona. **C**, registros intracelulares de una interneurona. La interneurona fue excitada por la estimulación de aferentes de los grupos I y II con latencias que corresponden a una sola sinapsis (Bannatyne et al., 2009)

Recientemente, el grupo de Jessell (Betley et al., 2009) identificó un grupo de interneuronas GABAérgicas (GAD65+, también conocida como GAD2) derivadas de los precursores neuronales *dl4*, las cuales establecen contactos sinápticos con terminales de fibras aferentes propioceptivas y cutáneas, positivas a VGLut1. Estas interneuronas expresan el factor tumoral pancreático (Ptf1a) como marcador

específico. Las interneuronas GAD65+ que establecen contactos axoaxónicos con las fibras aferentes cutáneas expresan, además, el transportador de glicina 2 (GlyT2), el neuropéptido Y (NPY) y la encefalina (ENK) (Figura 7).

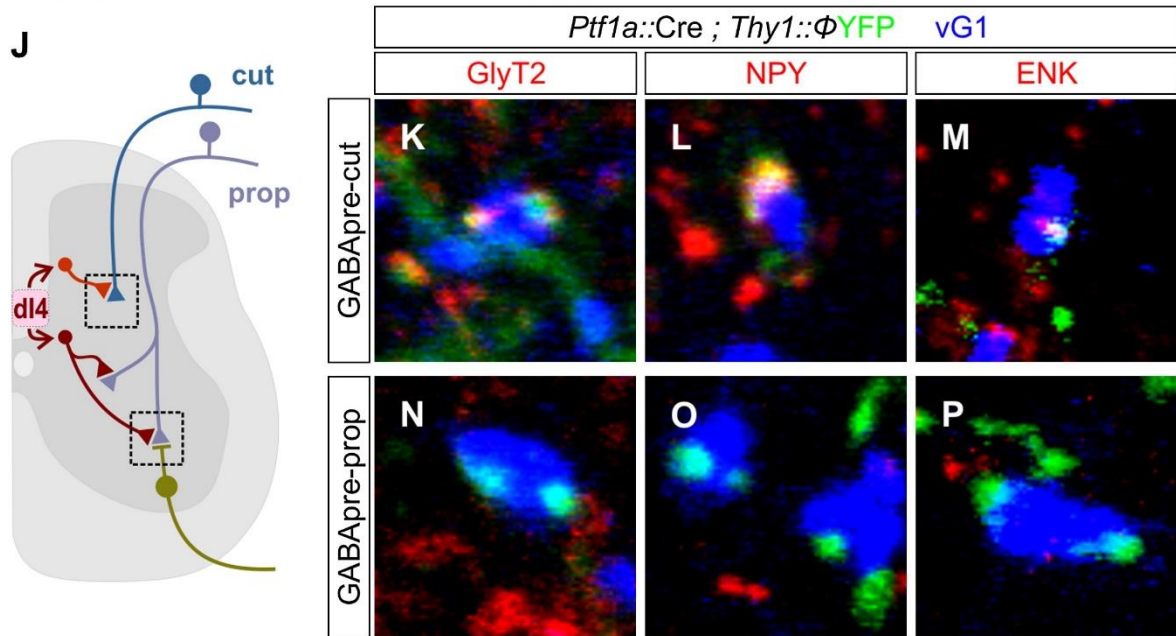


Figura 7. Tipos de interneuronas gabaérgicas presinápticas (GABApre) que expresan el factor tumoral pancreático (Ptf1a). Las interneuronas Ptf1a derivadas del precursor dl4 establecen sinapsis axoaxónicas con terminales de fibras aferentes cutáneas y propioceptivas en el cuerno dorsal. Las neuronas GABApre que hacen contacto con aferentes cutáneas también expresan el transportador a glicina tipo 2 (GlyT2), el neuropéptido Y (NPY) y la encefalina (ENK), mientras que las neuronas GABApre que hacen contacto con las aferentes propioceptivas sólo expresan el Ptf1a (Betley et al., 2009)

Se ha mostrado que la ablación genética selectiva de las interneuronas que expresan la enzima GAD65, en ratones transgénicos GAD2^{cre}, modifica el patrón de los movimientos de alcance de objetos (Fink et al., 2014). En estos animales se produce una oscilación estereotipada de las extremidades anteriores durante movimientos de alcance, por lo que se ha propuesto que uno de los papeles fisiológicos de la inhibición presináptica producida por una despolarización de aferentes primarias es producir una estabilización y un amortiguamiento de los movimientos dirigidos (Figura 8).

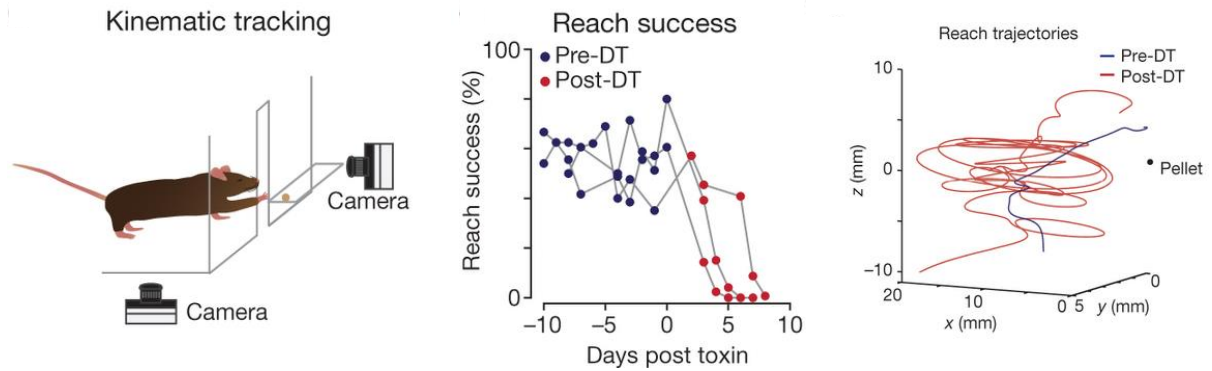


Figura 8. Efecto de la ablación genética selectiva de las interneuronas responsables de la inhibición presináptica que expresan la enzima GAD2 mediante la aplicación de la toxina diftérica en ratones transgénicos. **Izquierda**, protocolo de análisis de la cinemática enfocado a evaluar el movimiento de alcance. Los ratones fueron videograbados por dos cámaras mientras realizan movimientos para obtener alimento. **Centro**, 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. **Derecha**, gráfica con las trayectorias de la pata delantera del ratón mientras ejecuta un movimiento orientado a obtener alimento. El trazo azul corresponde a la condición control. El trazo rojo corresponde al movimiento ejecutado después de la ablación de las interneuronas GAD2, tras la aplicación de la DT (Fink et al., 2014)

Existen otros mecanismos capaces de generar una despolarización de aferentes primarias y que no se encuentran asociadas a la activación de receptores a GABA_A presentes en las terminales de las fibras aferentes. Barron y Matthews (1938) propusieron que la despolarización de las terminales de las fibras aferentes podría deberse a una acumulación de iones de potasio en el espacio extracelular debido a un incremento en la actividad de las interneuronas. Esta hipótesis fue puesta a prueba con la utilización de microelectrodos sensibles a potasio. Se observó que existe un incremento en la concentración extracelular de iones de potasio tras la aplicación de una estimulación tetánica en los nervios periféricos. Los incrementos en la concentración de potasio exhibieron una distribución espacial con concentraciones máximas en el cuerno dorsal y en el núcleo intermedio (Somjen y Lothman, 1974). Jiménez et al. (1984) midieron la PAD producida y los cambios en la concentración de potasio en el mismo sitio producidos por la estimulación de aferentes cutáneos y musculares, no encontrando una correlación directa entre la magnitud de las PAD producida por la estimulación de la aferentes sensoriales y la concentración de iones de potasio acumulada en el sitio de medición. Se han

descrito otros mecanismos capaces de producir una despolarización de aferentes primarias, como son la activación de los receptores a glutamato ionotrópicos, la activación de los receptores TRPV y la activación del receptor ionotrópico 5-HT₃.

2.2 Inhibición presináptica no asociada a la despolarización de aferentes primarias

En la médula espinal existen mecanismos de inhibición presináptica que no están asociados a una despolarización de aferentes primarias. Este tipo de inhibición presináptica puede deberse a una reducción en el flujo de Ca²⁺ o la activación de corrientes de K⁺ producida por la activación de receptores GABA_B presentes en las terminales de las fibras aferentes (Rudomin y Schmidt, 1999). Por ejemplo, la activación de los receptores a adenosina A1 produce una inhibición presináptica en las terminales de las fibras aferentes nociceptivas (Millan, 2002). También se ha demostrado que la activación de los receptores a opiodes μ inhibe la transmisión sináptica de las fibras aferentes A δ y C mediante la inhibición de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo N, reduciendo la liberación del neurotransmisor de las terminales aferentes. De manera similar, los receptores a opiodes δ reducen la transmisión sináptica de las fibras aferentes A β mediante mecanismos presinápticos (Bardoni et al., 2014).

2.3 Monoaminas y modulación de la información sensorial

Los sistemas monoaminérgicos supraespinales (i.e. serotonina, 5-HT; dopamina, DA; y noradrenalina, NA) desempeñan un papel muy importante en la regulación de procesos espinales sensoriales y motrices. En general, a nivel sensorial, las monoaminas tienen un efecto inhibitorio, pero a nivel motriz incrementan la excitabilidad de las interneuronas y motoneuronas implicadas en

procesos motrices. Sin embargo, los efectos dependen del tipo de neurona y del subtipo de receptores presentes.

2.3.1 Modulación monoaminérgica de las vías nociceptivas

A nivel sensorial, los estudios acerca de la modulación serotoninérgica se han enfocado principalmente en la nocicepción. Se ha podido demostrar que la serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) ejerce un efecto inhibitor sobre las neuronas del cuerno dorsal, así como en los reflejos nociceptivos (Gjerstad et al., 1966; Khasabov et al., 1999; López-García et al., 1996; Tjolsen et al., 1991).

Se han estudiado los efectos de las vías descendentes que proyectan desde los núcleos del rafé caudales (magnus, pallidus y obscurus) a la médula espinal. Estas vías serotoninérgicas desempeñan un papel crucial en la modulación del dolor a través de sus proyecciones a las láminas superficiales (láminas I y II de Rexed) del cuerno dorsal. Las fibras serotoninérgicas no establecen conexiones sinápticas como tales, sino que establecen sinapsis “en passant”, de tal manera que la información sensorial es modulada a través de transmisión por volumen (Ridet et al., 1993), o alternativamente a través de la activación de interneuronas inhibitoras locales, incluyendo poblaciones de interneuronas que liberan encefalinas y GABA/glicina. Es decir, estas interneuronas reciben aferencias de vías serotoninérgicas descendentes (Ruda et al., 1986; 1988; Alhaider et al., 1991; Fields et al., 1991; Millan, 1997; Tsuchiya et al., 1999; Dougherty et al., 2005; Yoshimura et al., 2006; Wang et al., 2009; Fukushima et al., 2009).

Es importante señalar que los núcleos del rafé no están constituidos únicamente por poblaciones de neuronas serotoninérgicas, sino también por neuronas que sintetizan acetilcolina, hormona liberadora de tirotropina, GABA, glicina, somatostatina, sustancia P, encefalina, dinorfina, galanina y/o colecistoquinina (Millan, 2002). Un grupo de neuronas serotoninérgicas que proyectan

al cuerno dorsal muestran colocalización de 5-HT con algunos neurotransmisores, principalmente la sustancia P, hormona liberadora de tirotropina, GABA, dinorfina y encefalina, probablemente coadyuvando junto a la 5-HT en la modulación de la nocicepción (Bowker et al., 1982; Hokfelt et al., 2000; Kachidian et al., 1991).

Los efectos de la 5-HT sobre la actividad de las neuronas nociceptivas en el cuerno dorsal son heterogéneos, con acciones tanto inhibitorias como (aunque menos frecuentemente) excitadoras (Millan, 2002). La modulación de la nocicepción por la 5-HT en el cuerno dorsal puede también involucrar mecanismos presinápticos inhibitorios en la liberación del transmisor de las fibras aferentes primarias (Figura 9).

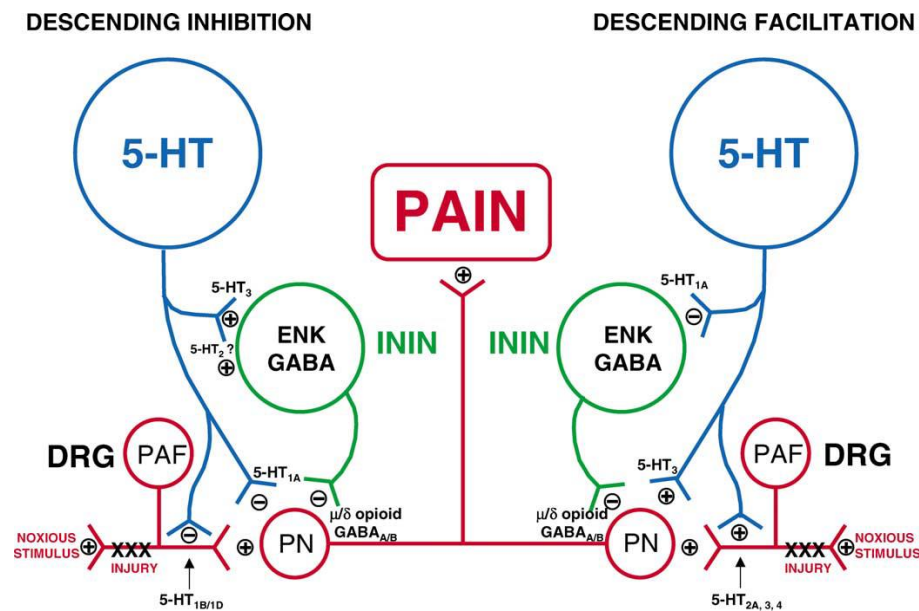


Figura 9. Localización y papel de los subtipos de receptores a 5-HT en la modulación de los procesos nociceptivos en el cuerno dorsal. A la izquierda se indican los mecanismos que median la inhibición descendente. A la derecha se muestran aquellos que median la facilitación descendente. Las acciones se ejercen en las terminales de las fibras aferentes primarias (PAFs), neuronas de proyección (PNs) e interneuronas inhibitorias (ININs). Por claridad, se omitieron las interneuronas excitadoras, cuya modulación puede ser en esencia idéntica a las PNs. De igual manera, se omitieron las acciones de las ININs sobre las terminales de las PAF. La encefalina (ENK) y el GABA se liberan por ININs y son clave en el proceso antinociceptivo. Las ININs reciben aferencias serotoninérgicas en el cuerno dorsal. Note que los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B/1D} suprimen la actividad neuronal, mientras que los receptores 5-HT₂, 5-HT₃ y 5-HT₄ la potencian. Existen otros subtipos de receptores a 5-HT que pueden modular la nocicepción. Abreviaciones: DRG, ganglio de raíz dorsal y 5-HT (Millan, 2002).

Las acciones pre- y postsinápticas de la 5-HT en el cuerno dorsal modulan la respuesta de las interneuronas de proyección activadas por fibras aferentes nociceptivas, y también pueden influir en los procesos de sensibilización ante una estimulación repetitiva de las mismas fibras aferentes (Baranauskas y Nistri, 1998; Doubell et al., 1999; Millan, 1997).

2.3.2 Modulación monoaminérgica de las propiedades de disparo de las neuronas

El cuerno dorsal representa un sitio importante para la integración de la información sensorial a nivel espinal. Las monoaminas liberadas por los sistemas supraespinales serotoninérgicos, noradrenérgicos y dopaminérgicos modulan los sistemas sensoriales espinales. Se han comparado las acciones de la 5-HT, DA, NA y acetilcolina (ACh) sobre los EPSPs producidos por la estimulación de raíces dorsales, así como las propiedades de membrana de las neuronas del cuerno dorsal profundo. En la mayoría de estas neuronas, los EPSPs se deprimieron en presencia de DA, 5-HT y NA. Ninguno de los neurotransmisores modificó las propiedades pasivas de la membrana (Garraway y Hochman, 2001), indicando que los efectos son de origen presináptico. Aunque en este trabajo no quedó claro el tipo de fibras aferentes activadas, se pudo demostrar que no obstante la diversidad de interneuronas que se encuentran en el cuerno dorsal profundo, las monoaminas supraespinales suprimen globalmente la información sensorial excitadora.

Los estudios sobre la participación de la 5-HT en el control motriz se han enfocado en la modulación de las propiedades de disparo de las motoneuronas, particularmente en aquellas relacionadas con la activación de las corrientes persistentes de entrada (Hounsgaard et al., 1989, 1988; Hsiao et al., 1998), así como también en aquellas relacionadas con la inducción y modulación de las conductas motrices, como la locomoción (Viala et al., 1969; Barbeau et al., 1991; Cazalets et al., 1992; Gerin et al., 1995; Kiehn et al., 1996; Cowley et al., 1997; Fyda

et al., 1999). Debido a que las motoneuronas son relativamente accesibles para su registro intracelular, se ha obtenido información relevante acerca de las acciones de la 5-HT a nivel celular en la médula espinal (Takahashi et al., 1990; Wang et al., 1990; Sillar et al., 1994; MacLean et al., 1998). Sin embargo, las motoneuronas comprenden sólo una pequeña fracción de las neuronas espinales, por lo que es necesario estudiar las neuronas que conforman las redes espinales que coordinan la actividad sensoriomotriz a nivel premotoneuronal, incluyendo las interneuronas que median la despolarización de aferentes primarias (PAD) e inhibición presináptica.

2.3.3 Modulación de los circuitos neuronales que controlan la locomoción

Se ha reportado que durante la locomoción ficticia producida por la estimulación de la región locomotora mesencefálica en el gato descerebrado se deprimen los EPSPs monosinápticos (registrados en motoneuronas) y EFPs registrados en el cuerno ventral (Gosgnach et al., 2000). Los EPSPs y los potenciales de campo fueron provocados por la estimulación de nervios musculares ipsilaterales de las extremidades posteriores con intensidades ≤ 2 xU, es decir, con intensidades para activar fibras aferentes del grupo I (Figura 10). Esta depresión de los EPSPs monosinápticos y de los EFPs del grupo I durante la locomoción es consistente con la hipótesis que plantea una regulación tónica presináptica de la transmisión sináptica proveniente de las aferentes del grupo Ia hacia las motoneuronas e interneuronas. Es posible que durante la locomoción se produzca una reducción en la transmisión sináptica de las fibras aferentes que contribuiría a la depresión tónica de los reflejos de estiramiento que ocurren durante el movimiento. La depresión de los EPSPs monosinápticos y de los potenciales de campo del grupo I durante la locomoción se debe probablemente a la liberación de monoaminas producida por la estimulación de la región locomotora mesencefálica (Gosgnach et al., 2000). Asimismo, se ha observado también que después de la aplicación de 5-HT y DA para inducir la locomoción ficticia en el ratón, los DRPs

producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral se deprimen (datos del laboratorio no publicados).

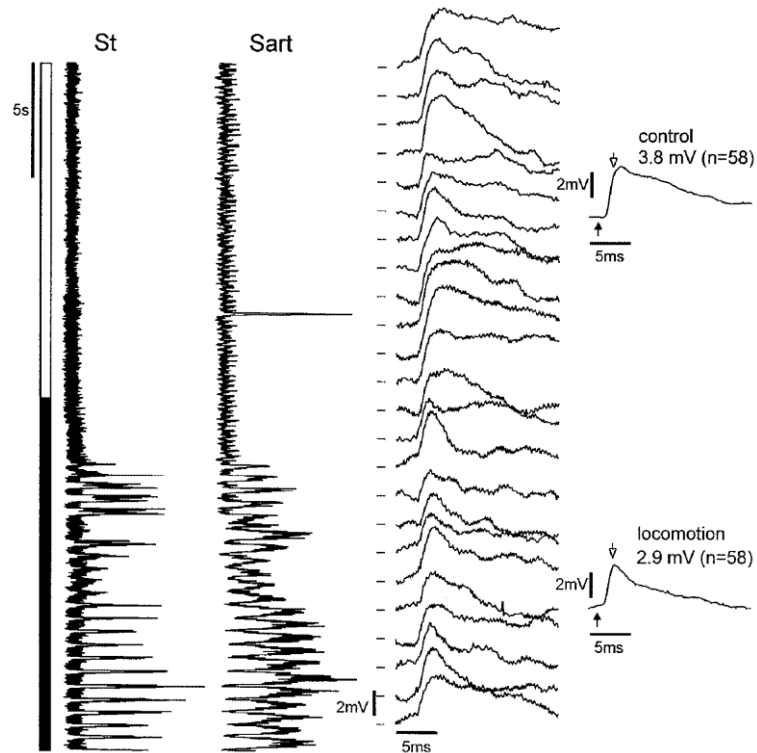


Figura 10. Depresión de la amplitud de los EPSPs monosinápticos durante la locomoción. Los registros orientados verticalmente corresponden a los electroneurogramas rectificadas e integradas de los nervios periféricos St y Sart. La actividad rítmica comienza poco después de la estimulación de la región locomotora mesencefálica (barra oscura), lo cual indica el comienzo de la locomoción. Los trazos de la derecha pertenecen a los EPSPs registrados intracelularmente en una motoneurona LGS al estimular el nervio homónimo ($1.2 \times U$, 4 Hz). En la extrema derecha se muestra el promedio de los EPSPs provocados antes (control) y poco después de iniciado el episodio de locomoción. El EPSP promedio durante la locomoción se deprimió un 26 % con respecto al control. El inicio de la salva aferente (no ilustrada) se indica con una flecha oscura y el punto en el cual se midió la amplitud del EPSP se muestra con una flecha blanca (Gosgnach et al., 2000).

En la actualidad, se han investigado los efectos de la 5-HT en las neuronas HB9, implicadas en la generación del ritmo locomotriz y se ha podido observar que induce oscilaciones rítmicas relacionadas con la activación de canales de Ca^{2+} tipo T (Wilson et al., 2005). Para obtener un mejor entendimiento de la función de la 5-HT a nivel celular es fundamental caracterizar funcionalmente las neuronas involucradas en el procesamiento de la información sensoriomotriz, tanto las

interneuronas locales, como comisurales y de proyección ascendente. Los grupos de Jankowska (Jankowska et al., 1997; 2000) y Willis (Willis et al., 1981; Jordan et al., 1978; 1979) han aportado información relevante al respecto en preparaciones in vivo.

2.3.4 Modulación monoaminérgica de las vías que median la PAD

Proudfit et al. (1980) observaron que la estimulación del núcleo del rafe magnus (NRm) produce DRPs en la médula espinal lumbrosacra, en los cuales es posible distinguir dos componentes, uno rápido (DRP-1) y otro lento (DRP-2), como se observa en la Figura 11. Con base en las constantes de espacio de estos potenciales, Proudfit et al. (1974) propusieron que el DRP-1 se debe primordialmente a la despolarización de las fibras del grupo I, mientras que el DRP-2 se debe a la despolarización de las fibras aferentes de grupo II. El tiempo de conducción de la vía que genera el DRP-1 no se explica por la activación de una vía serotoninérgica; sin embargo, la aplicación intravenosa de antagonistas serotoninérgicos produjo un incremento marcado en la amplitud del DRP-1, por lo que los autores propusieron que la vía que media el DRP-1 está sujeta a una inhibición tónica serotoninérgica. La latencia del DRP-2 indica que la velocidad de conducción de las fibras que lo generan es de aproximadamente de 2.5 m/s, como se esperaría para las fibras serotoninérgicas.

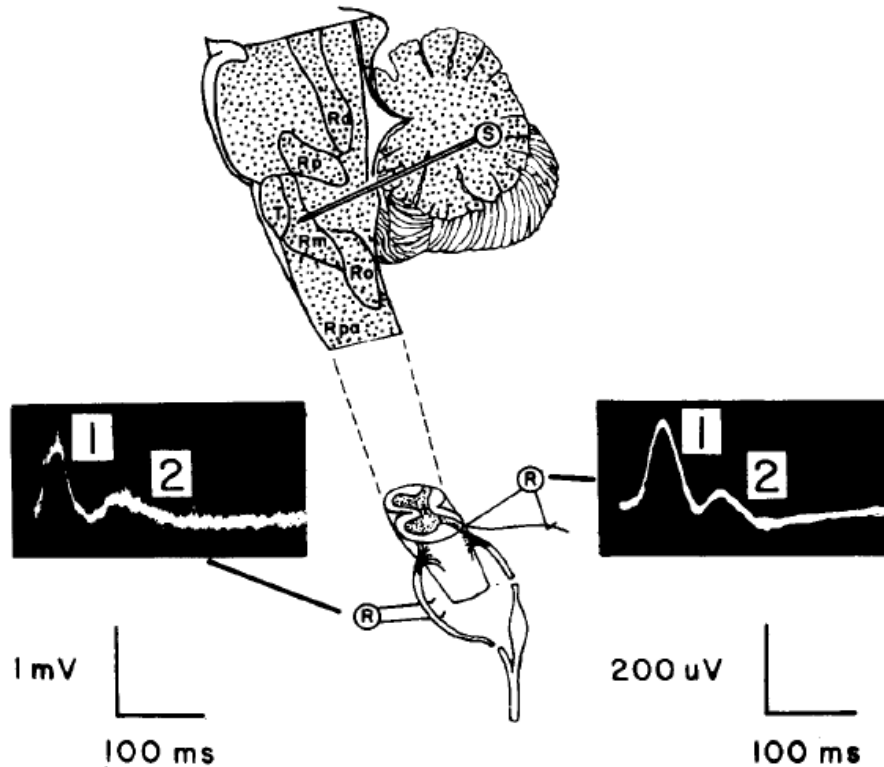


Figura 11. Activación de los núcleos del rafe magnus y obscurus mediante la aplicación de trenes de estímulo con electrodos bipolares. Los registros se realizaron en las raíces ventrales a nivel L7 (panel izquierdo). Los potenciales de raíz ventral de corta y larga latencia se indican como VRP-1 y VRP-2, respectivamente. En el panel derecho se muestra el registro de raíz dorsal a nivel L7 y se pueden observar los DRP-1 y DRP-2 (potenciales de latencia corta y larga). Abreviaciones: R, electrodo de registro; Rd, núcleo rafe dorsalis; Rm, núcleo rafe magnus; Ro, núcleo rafe obscurus; Rp núcleo rafe pontis; Rpa, núcleo rafe pallidus; S, electrodo de estimulación; T, cuerpo trapezoide. (Proudfit et al., 1980).

La aplicación de antagonistas para los receptores 5-HT₂ produjo un bloqueo selectivo del DRP-2. Por consiguiente, con base en el sitio de estimulación, la velocidad de conducción y la respuesta farmacológica, los autores concluyeron que el DRP-2 está mediado por una vía serotoninérgica. Además, el DRP-2 no fue afectado por la aplicación de antagonistas a los receptores GABA_A, lo cual descarta la participación de interneuronas GABAérgicas en dicha vía, aunque este DRP-2 no se pudo bloquear completamente con antagonistas serotoninérgicos.

La modulación monoaminérgica de las acciones sinápticas de las aferentes musculares del grupo II se ha estudiado mediante el análisis de los efectos de las

monoaminas sobre los potenciales de campo y las respuestas monosinápticas en neuronas individuales, tanto en el cuerno dorsal como en la núcleo intermedio. La aplicación local de monoaminas parece afectar la transmisión sináptica de las fibras aferentes de manera no selectiva. Las monoaminas deprimen las respuestas provocadas por la estimulación nociceptiva de la piel, sin afectar prácticamente las respuestas a estímulos inocuos (Bras et al., 1989, 1990).

Mediante registros extracelulares en la médula espinal del gato Jankowska et al. (2000) investigaron los efectos de la aplicación local de 5-HT y NA sobre las respuestas de las interneuronas que median la inhibición recíproca (Ia), las interneuronas que median la inhibición no recíproca (Ib), las interneuronas del núcleo intermedio activadas por aferentes del grupo I y II y sobre las interneuronas del cuerno dorsal activadas por aferentes del grupo II. Tras la aplicación de 5-HT y NA los cuatro tipos de interneuronas exhibieron una facilitación de las respuestas producidas por la estimulación de las fibras aferentes musculares del grupo Ia y Ib, mientras que las respuestas producidas por la estimulación de aferentes musculares del grupo II se deprimieron en la mayoría de las interneuronas, aunque en algunas hubo una facilitación. La aplicación de 5-HT deprimió la respuesta de todas las interneuronas del cuerno dorsal y en una subpoblación de interneuronas del núcleo intermedio, mientras que produjo una facilitación en otra subpoblación de interneuronas en este mismo núcleo. Por su parte, la NA deprimió la respuesta en todas la interneuronas núcleo intermedio y en una fracción de las interneuronas del cuerno dorsal, mientras que en otra fracción de interneuronas del cuerno dorsal se produjo una facilitación. Estos resultados llevaron a estos autores a proponer que la modulación ejercida por la 5-HT y la NA sobre las acciones sinápticas de las aferentes del huso muscular (Ia) y del órgano tendinoso de Golgi (Ib) está relacionada tanto con el tipo de fibras aferentes como con la función de la interneurona.

La efectividad de las acciones inhibitoras de las monoaminas sobre la transmisión sináptica de las aferentes musculares del grupo II depende del sitio de

aplicación. Las acciones sinápticas de las aferentes musculares del grupo II sobre las interneuronas localizadas en el cuerno dorsal (láminas III-IV) se deprimen preferentemente por 5-HT, mientras que las interneuronas que se encuentran en la zona intermedia (láminas V-VI) por NA. Los efectos de algunos agonistas serotoninérgicos son más selectivos como se muestra en la Figura 12 (Jankowska y Riddell, 1998). Esta selectividad laminar de las acciones monoaminérgicas parece ser similar en diferentes segmentos de la médula espinal (Jankowska et al., 1994) y se ha propuesto que existen varios sistemas moduladores monoaminérgicos de las vías que median la PAD en relación al tipo de fibras aferentes y a sus sitios de proyección (Jankowska y Riddell, 1998). Las acciones de los sistemas monoaminérgicos restringidas a láminas específicas de la médula espinal pueden ser capaces de seleccionar diferentes grupos funcionales de neuronas, sin importar el origen de sus aferencias, mientras que las neuronas responsables de la PAD pueden estar involucradas principalmente con la selección de subpoblaciones de neuronas de acuerdo a sus aferencias. Hasta la fecha, se desconocen los subtipos de receptores involucrados en los efectos de las monoaminas en diferentes tipos funcionales de neuronas. Tampoco se sabe si las respuestas de esas neuronas son moduladas pre- o postsinápticamente (Rudomin y Schmidt, 1999).

La estimulación eléctrica de los núcleos supraespinales noradrenérgicos y serotoninérgicos que proyectan a la médula espinal, locus coeruleus y subcoeruleus y núcleo del rafé, deprime las acciones sinápticas de las fibras aferentes del grupo II. Un efecto similar se produce por la aplicación directa de las monoaminas (Figura 12 E y F). La despolarización de las fibras aferentes del grupo II producida por la estimulación de núcleos monoaminérgicos podría deberse a una acción directa de las monoaminas sobre las fibras aferentes. Sin embargo, ya que la PAD producida en las fibras del grupo II es generada por la activación eléctrica de núcleos monoaminérgicos, es muy probable que bajo estas condiciones se haya producido una coactivación de otras vías, y la consecuente liberación de otros neurotransmisores a nivel espinal (Quevedo et al., 1995).

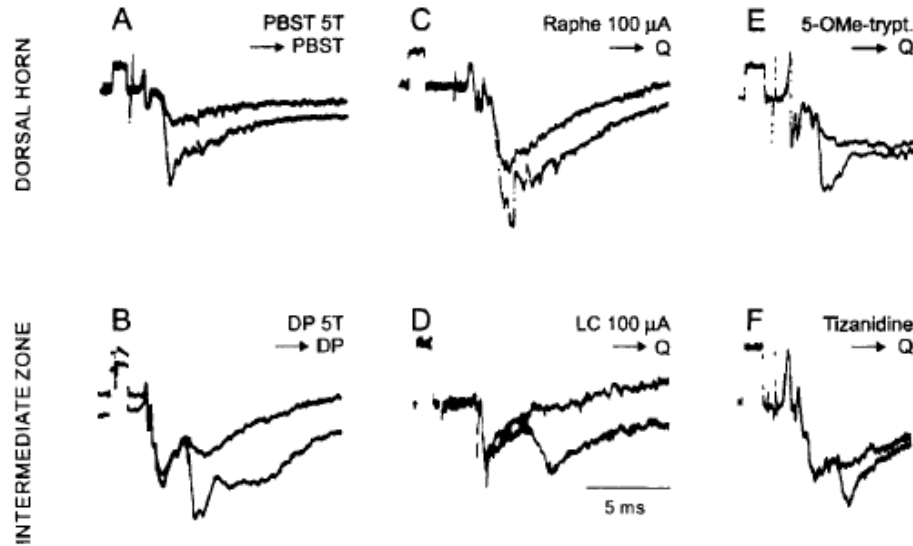


Figura 12. Inhibición selectiva de las acciones sinápticas de las fibras aferentes del grupo II. Cambios en la amplitud de los EFPs producidos por la estimulación de fibras aferentes del grupo II al aplicar una estimulación condicionante a nervios periféricos (A,B), a los núcleos rafé (C) y locus coeruleus (D), y durante la aplicación local del agonista a los receptores 5-HT_{1A}, 1C y 2, 5-methoxytriptamina, y del agonista al receptor a NA α_2 , tizanidina (E,F). *Panel superior*, superposición de los EFPs producidos por la estimulación de las aferentes musculares del grupo II en el cuerno dorsal antes y después de aplicar la estimulación condicionante o de la aplicación de la 5-methoxytriptamina. *Panel inferior*, superposición de los registros control de los EFPs provocados por las aferentes musculares del grupo I (primer componente) y grupo II (segundo componente) antes y después de aplicar la estimulación condicionante, o de la aplicación de la Tizanidina. Nótese que únicamente se deprime el segundo componente correspondiente al grupo II (Jankowska y Riddell, 1988).

Se ha demostrado que la estimulación de las vías rafé-espinales produce PAD en las fibras aferentes musculares de los grupos Ib. Quevedo et al. (1995) estudiaron los efectos de la estimulación del núcleo rafé magnus sobre la PAD de fibras aferentes musculares individuales del grupo I, y observaron que las fibras rafé-espinales de conducción rápida activan a una población de interneuronas espinales que se encuentran localizadas principalmente en el cuerno dorsal. Con base a los patrones de PAD establecidos por Jiménez et al. (1988) (Tabla 1) se pudo observar que la estimulación condicionante del núcleo del rafé magnus y la formación reticular bulbar produce PAD en las fibras con un patrón de PAD tipo B y C (en su mayoría Ib) e inhibe la PAD producida por la estimulación de las aferentes del grupo I en las fibras con un patrón de PAD tipo A (en su mayoría Ia). En general, la estimulación de estos núcleos produjo efectos inhibitorios sobre la PAD de las

fibras Ia y efectos excitadores sobre la PAD de las fibras Ib (Figura 13). Sin embargo, se desconoce si estas acciones se deben a la liberación de 5-HT o a la coliberación de otros neurotransmisores, o si los efectos de la 5-HT son directos sobre las fibras aferentes.

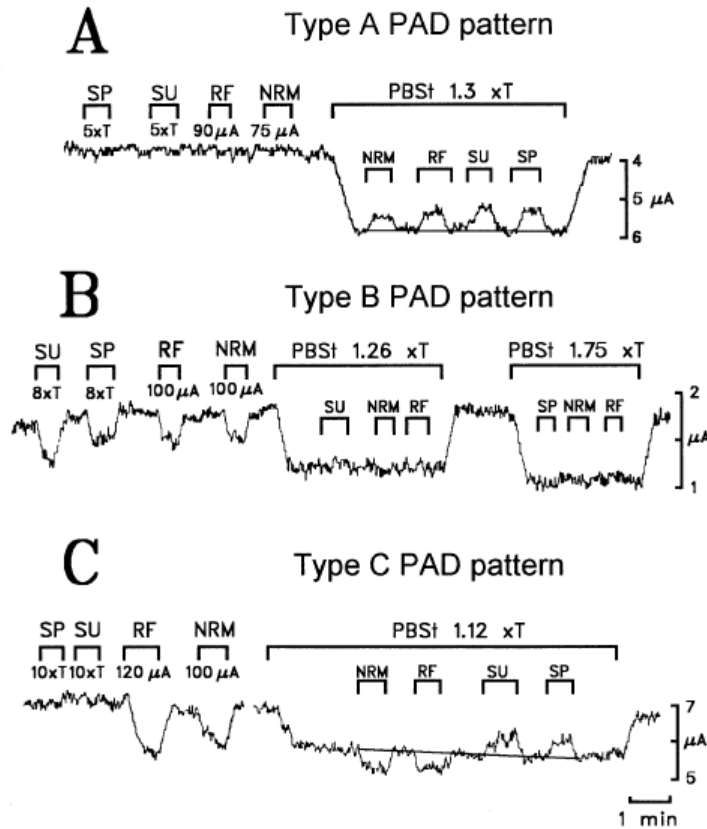


Figura 13. Patrones de despolarización de las fibras aferentes musculares del grupo I. Los registros corresponden a mediciones continuas del umbral intraespinal de tres diferentes fibras aferentes del grupo I provenientes del músculo gastrocnemio, las cuales proyectan en el núcleo intermedio a nivel L6. **A**, la estimulación de los nervios peroneo superficial (SP) y sural (SU), y de la formación reticular bulbar (RF) y el núcleo del rafé magnus (NRM) no tiene efecto en el umbral intraespinal de reposo de la fibra, pero inhibe la PAD producida por la estimulación del nervio bíceps posterior semitendinoso (PBSt). **B**, reducción del umbral de reposo de la fibra en esta fibra por la estimulación de SU, SP, RF y NRM, es decir, todas estas vías producen PAD, la cual se ocluye con la PAD producida por la estimulación del nervio PBSt. **C**, despolarización de la fibra por la estimulación de la RF y del NRM. La PAD producida se suma con la PAD inducida por PBSt. En contraste, la estimulación de los nervios SU y SP no tiene efecto en el umbral intraespinal en reposo, pero inhibe la PAD producida por la estimulación del nervio PBSt. El nervio PBSt se estimuló con tres pulsos a 300 Hz, 35 ms antes del pulso de prueba. La estimulación de los nervios SU y SP se aplicó con pulsos únicos y la estimulación del NRM y de la RF con un tren de 15 pulsos a 400 Hz precediendo el pulso de prueba con un intervalo de 75 ms (Quevedo et al., 1995).

La facilitación de las acciones de las fibras aferentes del grupo I sobre neuronas espinales tras la aplicación iontoforética de 5-HT y NA (Jankowska et al., 2000) ocurre presumiblemente a nivel postsináptico y es consistente con la ausencia de efecto sobre la excitabilidad de las fibras aferentes (Curtis et al., 1983). No obstante, se ha demostrado que la 5-HT deprime el reflejo monosináptico producido por la estimulación de fibras aferentes Ia, probablemente a través de mecanismos presinápticos que no tienen relación con cambios en la polaridad de las fibras aferentes. Crick y Wallis (1991) observaron en la médula espinal hemiseccionada de la rata neonata una depresión de los reflejos monosinápticos y polisinápticos al aplicar 5-HT. Estos efectos parecerían deberse a la activación de receptores presinápticos metabotrópicos, ya que la excitabilidad de las fibras aferentes no cambia en presencia de 5-HT (Curtis et al., 1983).

La estimulación eléctrica de los núcleos locus coeruleus y rafé magnus incrementa la excitabilidad de las terminales aferentes de las fibras del grupo II, es decir, produce una despolarización de las aferentes primarias (PAD), la cual podría ser responsable de la reducción en la transmisión sináptica de estas fibras (Riddell et al., 1993). En contraste, las fibras aferentes del grupo I parecen no ser afectadas por la estimulación de estos mismos núcleos (Riddell et al., 1993), lo cual sugeriría que las monoaminas no afectan la excitabilidad de las fibras aferentes del grupo I (Figura 14).

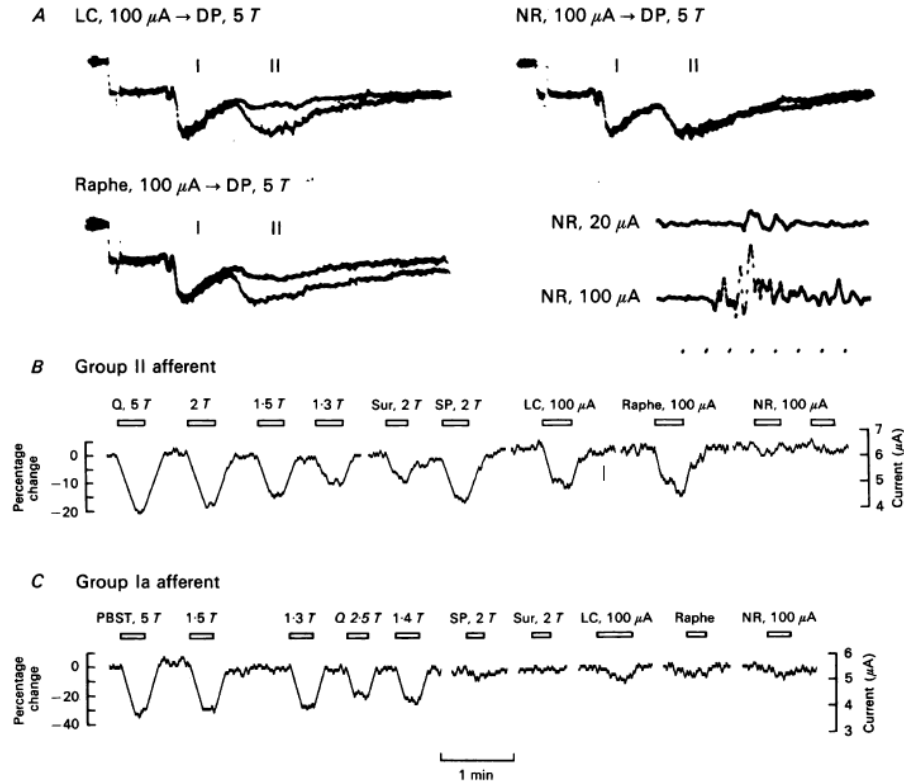


Figura 14. Efectos de la estimulación de los núcleos locus coeruleus y rafé magnus sobre la efectividad sináptica y excitabilidad de las fibras aferentes del grupo II. **A**, EFPs provocados por la estimulación del nervio DP con una intensidad de 5 xU. Los trazos superpuestos representan los registros control (mayor amplitud) y durante la estimulación condicionante (menor amplitud). Los componentes I y II corresponden a los potenciales provocados por las aferentes del grupo I y II respectivamente. Los estímulos condicionantes fueron aplicados en el locus coeruleus (LC), núcleo del rafé (NR) y núcleo rojo, como se indica. Los pulsos de calibración en los registros de potencial de campo son de 200 μ V y 1 ms. **B**, registro continuo de la intensidad de estimulación intraespinal necesaria para producir un potencial de acción antidrómico en una fibra aferente del grupo II del nervio extensor digitorum longus. El umbral periférico es de 3.5 xU, y el tiempo de conducción de 4.8 ms. Las barras indican el periodo durante el cual se aplicó la estimulación condicionante al nervio periférico (el intervalo entre el estímulo condicionante y el de prueba fue de 35 ms) o a las estructuras supraespinales (el intervalo entre el estímulo condicionante y el de prueba fue de 95 ms) a las intensidades indicadas. **C**, registros similares a B, pero pertenecientes a una fibra del grupo Ia del mismo nervio (1.35 xU, 2.9 de tiempo de conducción). Q, cuadríceps; Sur, sural; SP, peroneo superficial; PBSt, bíceps posterior y semitendinoso; LC Locus coeruleus; NR núcleo rojo. Todos los registros son del mismo experimento (Riddell et al., 1993).

Con el objetivo de investigar los receptores a monoaminas involucrados en la depresión de la transmisión sináptica de aferentes musculares del grupo II en la médula espinal del gato, se ha investigado el efecto de la aplicación iontoforética de diversos agonistas y antagonistas a 5-HT y NA sobre los EFPs monosinápticos

producidos por la estimulación de fibras aferentes musculares del grupo II en el núcleo intermedio y en el cuerno dorsal de los segmentos lumbares L₄ y L₅. Los agonistas noradrenérgicos tizanidina, B-HT933 y clonidina deprimieron la transmisión sináptica de las aferentes del grupo II en el núcleo intermedio. Los agonistas serotoninérgicos 8-OH-DPAT, 5-metoxitriptamina, alfa-metil-5-HT, DOI y 2-metil-5-HT deprimieron la transmisión sináptica de estas mismas fibras en el cuerno dorsal. Sin embargo, los EFPs producidos por la estimulación de aferentes del grupo I no sufrieron ningún cambio. Estas observaciones sugieren que la depresión de la transmisión sináptica de las aferentes del grupo II involucra diferentes receptores de membrana dependiendo del nivel dorso-ventral espinal, los receptores α_2 estarían presentes en la zona intermedia y en el cuerno ventral, y los receptores 5-HT_{1A} en el cuerno dorsal (Bras et al., 1990).

Se ha propuesto que la depresión de los EFPs del grupo II se debe a la activación de receptores metabotrópicos 5-HT₁ y 5-HT₇ presentes en las terminales de las fibras aferentes del grupo II, con la consiguiente reducción en su eficacia sináptica (Dougherty et al., 2005), y no a un efecto despolarizante de las monoaminas al activar receptores 5-HT₃. En apoyo a esta hipótesis, se ha observado que la 5-HT deprime las corrientes de Ca²⁺ en neuronas del ganglio de raíz dorsal (Sun y Dale, 1997), lo cual puede conducir a una reducción en la liberación del neurotransmisor.

Se ha reportado que las monoaminas producen una despolarización de las fibras de alto umbral, predominantemente aquellas que codifican la temperatura y nocicepción (Willis, Jr., 1999; Khasabov et al., 1999; Oksamitnyi y Tamarova, 1987). El efecto de la 5-HT parece estar mediado por la activación de receptores ionotrópicos 5-HT₃ (López-García y King, 1996). Hasta la fecha no se han reportado efectos sobre las vías aferentes cutáneas de bajo umbral (Engberg y Ryall, 1966; Fleetwood-Walker et al., 1985; Headley et al., 1978).

2.3.5 *Diversidad de las acciones monoaminérgicas en la médula espinal*

Fisiológicamente, las acciones espinales de la 5-HT se han separado en una depresión de la eficacia sináptica de las fibras aferentes y en una facilitación de la actividad motriz (Jacobs y Fornal 1993). Por ejemplo, se ha observado que la actividad serotoninérgica puede inhibir la información nociceptiva mediante la activación de los receptores 5-HT₁ y 5-HT₃ (Peng et al., 1996; Zelman et al., 1994; Zhang et al., 1995). Por el contrario, la 5-HT induce la actividad motriz (Gerin et al., 1995; Kiehn et al., 1996; Cowley et al., 1997; Fyda et al., 1999) mediante la activación de los receptores serotoninérgicos implicados en la modulación de los circuitos generadores de patrones motrices, o CPGs (Viala et al., 1969; Barbeau et al., 1991; Cazalets et al., 1992; Kiehn et al., 1996; Cowley et al., 1997) e incrementan la excitabilidad de las motoneuronas (Takahashi et al., 1990; Wang et al., 1990; Elliott et al., 1992). Sin embargo, la 5-HT podría tener acciones opuestas a la hipótesis general planteada por Jacobs y Fornal (1993), ya que la estimulación del núcleo gigantocellularis tiene acciones que facilitan la nocicepción (Calejesan et al., 1998; Wei et al., 1999).

Debido a la existencia de múltiples proyecciones serotoninérgicas bulboespinales y a la gran diversidad de tipos y subtipos de receptores a la 5-HT, es poco probable que una sola hipótesis pueda considerar todas las acciones moduladoras de la 5-HT en la médula espinal. Es importante tomar en cuenta tres factores: las distintas regiones del tallo cerebral que proyectan hacia la médula espinal, la diversidad de receptores metabotrópicos a la 5-HT (los cuales tienen diferentes señales de transducción), y la distribución topográfica de los sistemas sensoriales y motrices. En la Tabla 2 (modificada de Villalón y Centurión, 2007), se muestra: (i) que los receptores a la 5-HT han sido clasificados en 7 familias o tipos principales (5-HT₁ a 5-HT₇); (ii) que los receptores 5-HT₁ y 5-HT₂ son heterogéneos (i.e. se subdividen en varios subtipos); (iii) los agonistas y antagonistas para todos los tipos y subtipos de receptores a la 5-HT, así como sus sistemas transduccionales y algunas respuestas funcionales mediadas por cada uno de ellos. Vale la pena

destacar que los únicos receptores ionotrópicos a la 5-HT corresponden al tipo 5-HT₃.

Receptor	Agonista	Antagonista	Transducción	Distribución	Función
5-HT _{1A}	8-OH-DPAT	WAY100635	G _{i/o}	Núcleos del rafe	Hipotensión central
5-HT _{1B}	Sumatriptan CP-93,129 (roedores)	SB224289	G _{i/o}	Vasos sanguíneos craneales	Vasoconstricción
5-HT _{1D}	PNU-109291 PNU-142633	BRL15572	G _{i/o}	Presinapsis neuronales	Autoreceptor
5-HT _{1E}	5-HT>>5-CT BRL54443	Metiotepina (no selectivo)	G _{i/o}	Corteza	Desconocida
5-HT _{1F}	LY344864 LY334370	Metisergida (no selectivo)	G _{i/o}	Sistema nervioso central	(-) Sistema trigeminal
5-HT _{2A}	DOI, DOB α -methyl-5-HT	MDL100907 Ketanserina	G _q	Músculo liso, plaquetas	Contracción, agregación
5-HT _{2B}	DOI, BW723C86 α -methyl-5-HT	SB204741 RS-127445	G _q	Fondo gástrico, endotelio	Contracción, liberación de óxido nítrico
5-HT _{2C}	DOI, Ro 60-0175 α -methyl-5-HT	SB242084 RS-102221	G _q	Plexo coroideo	Producción de LCR
5-HT ₃	mCPP 2-methyl-5-HT	Tropisetron Granisetron Ondasetron	Canales Na ⁺ /K ⁺	Nervios periféricos	(+) Actividad neuronal
5-HT ₄	Renzaprida, BIMU8 ML10302, SC53116	GR 113808 SB204070	G _s	Tracto gastrointestinal, aurícula de humano y cerdo	(+) Actividad neuronal, taquicardia
5-HT _{5A/5B}	5-HT, ergotamine	SB699551	G _{i/o}	Inhibición del Sistema nervioso central ¿?	Desconocida, prejunctional
5-HT ₆	5-MeO-T \geq 5-HT SB357134, SB271046	Ro 630563	G _s	Sistema nervioso central	Memoria
5-HT ₇	5-CT>>5-HT AS-19	SB269970 SB258719	G _s	Sistema nervioso central, músculo liso, aurícula de gato	Ritmo circadiano, relajación, taquicardia

Tabla 2. Clasificación de los receptores a la 5-HT. AS-19, (2S)-(+)-5-(1,3,5-Trimetilpirazol-4-yl)-2-(dimetilamino) tetralin; LCR, líquido cefalorraquídeo; 5-MeOT, 5-metoxitriptamina; 5-CT, 5-carboxamidotriptamina; DOI, 1-(2,5-dimetoxy-4-iodophenil)-2-aminopropane; (-), inhibe; (+), estimula. Modificada de Villalón y Centurión, 2007).

Hochman et al. (2001) han propuesto que los sistemas descendentes serotoninérgicos del tallo cerebral y los múltiples subtipos de receptores son capaces de reconfigurar las redes neuronales en varios estados funcionales. La capacidad de la 5-HT para modular diferencialmente distintos sistemas funcionales se basa en las propiedades de los diversos tipos y subtipos de receptores pre- y postsinápticos presentes en la médula espinal. Los receptores y los canales dependientes al voltaje presentes en la membrana pueden modularse mediante fosforilación y desfosforilación, a través de cascadas de señalización (Hille 1994). La 5-HT interactúa con estos sistemas de transducción mediante varios tipos de receptores metabotrópicos (ver Tabla 2), modificando las propiedades de la membrana y consecuentemente alterando el comportamiento fisiológico de la célula, con la posibilidad de reconfigurar las interacciones con otras células a nivel de una red neuronal (Hille, 1994; Harris-Warrick et al., 1991; Katz et al., 1996).

Ya que los diferentes tipos de receptores metabotrópicos pueden alterar de manera distinta estas vías de transducción, la activación de varios tipos de receptores puede tener consecuencias fisiológicas importantes en la médula espinal. Hochman et al. (2001) plantearon la hipótesis de que los tipos de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G_s (que incrementan las reacciones de fosforilación, i.e. 5-HT_{2,4,6,7}) pertenecen a una red facilitadora y se pueden localizar en las neuronas y sinapsis excitadoras, mientras que los tipos de receptores acoplados a proteínas G_i (que inhiben las reacciones de fosforilación, i.e. 5-HT₁ y 5-HT_{5A}) forman un red depresora y pueden encontrarse en neuronas y sinapsis inhibitoras (Tabla 3); es decir, distintos tipos y subtipos de receptores metabotrópicos estarían involucrados en el control de diferentes estados en la médula espinal.

Monoamina	↑cAMP	↑IP3/DAG	↓cAMP	Ionotrópico
Serotonina	5-HT _{4,6,7}	5-HT _{2A-C}	5-HT _{1A,B,D,E,F y 5}	5-HT ₃
Noradrenalina	β ₁₋₃	α _{1A,B,D}	α _{2A-C}	
Dopamina	D _{1,5}		D _{2,3,4}	

Tabla 3. Subtipos de receptores monoaminérgicos y sus efectos en las vías de transducción de señales.

A nivel espinal, estudios de hibridación *in situ* en neuronas del ganglio de raíz dorsal (DRG) han revelado RNAm para los receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}, 5-HT₄, 5-HT₆ and 5-HT₇ (Nicholson et al., 2005; Kia et al., 1995; Pierce et al., 1996; Gerard et al., 1996; ver también Allen Data Base www.brain-map.org). No obstante, se desconoce si estos receptores se expresan funcionalmente en las terminales de las fibras aferentes. Los receptores a 5-HT descritos en diversas poblaciones de interneuronas del cuerno dorsal y núcleo intermedio abarcan receptores de los tipos 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ y 5-HT₇ (Garraway y Hochman, 2001).

III. Planteamiento del problema, hipótesis y objetivos

3.1 Planteamiento del Problema

La información sensorial muscular y cutánea proveniente de las extremidades en movimiento puede refinar y reforzar conductas motrices, como la marcha y el nado, y puede iniciar, reorganizar o terminar dichas conductas. Es decir, los receptores musculares, cutáneos y articulares son capaces de modular los circuitos neuronales implicados en la locomoción para ajustar los patrones motrices al ambiente y a las demandas biomecánicas de las extremidades para efectuar una locomoción adecuada. Las monoaminas biogénicas están claramente involucradas en la modulación de los sistemas motrices espinales, pero la información sobre su papel en la regulación de la efectividad sináptica de las aferentes cutáneas y musculares es todavía limitada. En particular, no existe una evidencia directa sobre una modulación monoaminérgica de las vías que median la PAD producida por la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral que transmiten la información propioceptiva (grupo I y II) (Quevedo et al., 1995; Ridell et al., 1993). Tampoco se conoce con precisión si los efectos facilitadores o inhibidores de las monoaminas sobre las acciones de estas fibras ocurren a nivel presináptico o postsináptico (Jankowska et al., 1981, 2000). La relación entre la PAD de las fibras aferentes del grupo I y II, y la liberación de monoaminas producida por la estimulación de núcleos monominérgicos permanece incierta (Quevedo et al., 1995; Ridell et al., 1993). En felinos, la estimulación de núcleos monoaminérgicos produce PAD en las fibras del grupo II, mientras que en la médula espinal aislada de roedores las monoaminas inhiben la PAD. No se han reportado efectos de las monoaminas sobre las fibras aferentes cutáneas de bajo umbral ($A\beta$). Adicionalmente, no hay evidencia hasta la fecha de una modulación serotoninérgica sobre las interneuronas que median la despolarización de aferentes primarios.

Surge entonces la pregunta sobre la participación de los sistemas monoaminérgicos supraespinales en la modulación de las vías que median la inhibición presináptica en la médula espinal.

Relevancia del proyecto

Después de una sección espinal se suprime el control inhibitorio supraespinal y se producen alteraciones como la hiperreflexia y la espasticidad. Aunque existen diversos mecanismos que pueden estar implicados en la fisiopatología de estas alteraciones, la inhibición presináptica podría desempeñar un papel relevante. Una disminución en la inhibición presináptica contribuiría a un aumento de la hiperreflexia y la espasticidad. De hecho, en pacientes espásticos como resultado de una lesión espinal se ha observado una reducción de la inhibición presináptica (Calancie et al., 1993; Faist et al., 1994). Por consiguiente, la hiperreflexia y la espasticidad podrían reducirse por mecanismos que incrementen la inhibición presináptica. El investigar los efectos de las monoaminas sobre las vías que median la inhibición presináptica de las aferentes musculares y cutáneas de bajo umbral nos permitirá obtener un panorama más claro sobre el papel de las monoaminas en la modulación de la información sensorial y podría contribuir a explicar la hiperreflexia y la espasticidad. La determinación de los subtipos específicos de receptores a monoaminas involucrados en esta modulación podría ser de utilidad en el desarrollo de estrategias terapéuticas para el control de estas patologías.

3.2 Hipótesis

La 5-HT podría inhibir la despolarización de aferentes primarias (PAD) producida por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral a través de una reducción en la transmisión sináptica de las fibras aferentes y de una inhibición de las interneuronas que median la PAD.

3.3 *Objetivo general*

Determinar los efectos de la 5-HT sobre la transmisión sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral y sobre las vías neuronales que median la PAD.

3.4 *Objetivos particulares*

1. Determinar el efecto de la 5-HT sobre los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral.
2. Investigar mediante la técnica de Wall y a partir de cambios en el potencial DC si la 5-HT modula la excitabilidad de las fibras aferentes de bajo umbral.
3. Analizar el efecto de la 5-HT sobre los potenciales (EPSPs) y las corrientes (EPSCs) monosinápticos registrados en neuronas del cuerno dorsal mediante la técnica de registro en la configuración de célula entera.
4. Explorar el efecto de la 5-HT sobre la depresión homosináptica (Lev-Tov y Pinco, 1992) producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas, como una prueba para demostrar efectos presinápticos de la 5-HT.
5. Estudiar el efecto de la 5-HT sobre las propiedades pasivas de las neuronas registradas (R_m , C_m y τ_m), y sobre los potenciales terminales.
6. Determinar el efecto de diferentes agonistas y antagonistas de los receptores a la 5-HT sobre los EFPs, DRPs y excitabilidad de las fibras aferentes.

IV. Métodos

4.1. Preparación

Los experimentos se realizaron en ratones de 6 días de nacidos y sexo indistinto, los cuales se anestesiaron por inmersión en agua fría durante varios minutos. Los animales se decapitaron y se transfirieron a una cámara con líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial para disección a 5 °C, que contenía (en mM): sacarosa 230, KCl 3, NaH₂PO₄H₂O 1.2, CaCl₂2H₂O 0.5, MgSO₄ 10, NaHCO₃ 25 y D-glucosa 11. El LCR se burbujeó a nivel de saturación con una mezcla de carbógeno (95% O₂ + 5% CO₂). Se expuso la médula espinal lumbosacra manteniendo las raíces dorsales y ventrales en continuidad con el nervio ciático y sus ramificaciones, y se realizó una hemisección sagital de la misma por medio de agujas entomológicas (Figura 15). Las ramificaciones del nervio ciático: Tib (tibial), SU (sural) y peroneo común se disecaron y seccionaron distalmente. La preparación se transfirió a una cámara de 5 ml y se perfundió con un flujo continuo (15-20 ml/min) de LCR para registro a 23 °C, que contenía (en mM): NaCl 125, KCl 2.5, NaH₂PO₄.H₂O 1.25, CaCl₂.2H₂O 2, MgSO₄ 1, NaHCO₃ 26 y D-Glucosa 25; burbujeado con una mezcla de carbógeno (95% O₂ + 5% CO₂) para ajustar el pH a 7.4. La médula espinal se estabilizó con agujas entomológicas manteniendo la superficie seccionada con un ángulo de 45°.

4.2. Estimulación y registro

La PAD fue inferida a partir de los potenciales de raíz dorsal (DRPs) registrados en las raíces lumbares L₃-L₄ mediante electrodos de succión (120 μm de diámetro), los cuales se colocaron “en passant” sobre un filamento pequeño de la raíz (sin seccionar), lo más cercano posible a la médula espinal. Los potenciales extracelulares de campo (EFPs) se registraron entre los segmentos espinales L₃-L₄

mediante micropipetas (1-2 M Ω) llenas con NaCl 2M, las cuales se colocaron a través de la superficie seccionada de la médula espinal con un ángulo de 45°.

El registro intracelular de interneuronas del cuerno dorsal se realizó en la modalidad de célula entera a ciegas, mediante micropipetas llenas con soluciones que contenían (en mM): gluconato de potasio 120, NaCl 10, KCl 10, EGTA 0.2, ATP 4 y GTP 1 o CsF 120, CsCl 10, CsOH 35, EGTA 10, HEPES 10, ATP 4, GTP 1 y QX314 5. Los registros se efectuaron en el modo de control de corriente para registrar los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) y en el modo de control de voltaje para registrar las corrientes posinápticas excitadoras (EPSCs). Se caracterizaron las propiedades pasivas y activas de las neuronas al aplicar pulsos de estimulación gradual en control de corriente y voltaje.

Para su estimulación, los nervios periféricos se colocaron en electrodos bipolares de plata en forma de gancho y embebidos en gel de vaselina para su aislamiento, o a través de electrodos de succión. Se utilizaron pulsos cuadrados de 200 μ s, a una frecuencia de 0.1 Hz y con una intensidad 2-4 veces el valor umbral (2-4 xU) de las fibras más excitables. En las preparaciones neonatas, con estos parámetros de estimulación usualmente se reclutan fibras aferentes musculares del grupo I y II, y fibras aferentes cutáneas A β (Vejsada et al., 1985; Fitzgerald, 1985).

La excitabilidad intraespinal de las fibras aferentes se infirió por medio de la técnica de Wall. Para este propósito, se midieron los cambios en la excitabilidad de las terminales intraespinales de las fibras aferentes primarias al aplicar pulsos de corriente constante de 500 μ s con intensidades de estimulación 10-20 μ A. Los pulsos se aplicaron a través de la misma micropipeta utilizada para registrar los EFPs.

Los EFPs, EPSPs y EPSCs se registraron con un amplificador Axoclamp-2B acoplado a un condicionador de señales Cyber-Amp 320 (Axon Instruments, Molecular Devices, U.S.A.). Los DRPs se registraron con amplificadores acoplados

a DC (A-M systems, U.S.A; filtro pasa bandas DC – 3 KHz). Las señales se capturaron por medio del programa pClamp (v. 10.2, Axon Instruments, Molecular Devices, U.S.A.) y se almacenaron en una PC para su análisis posterior.

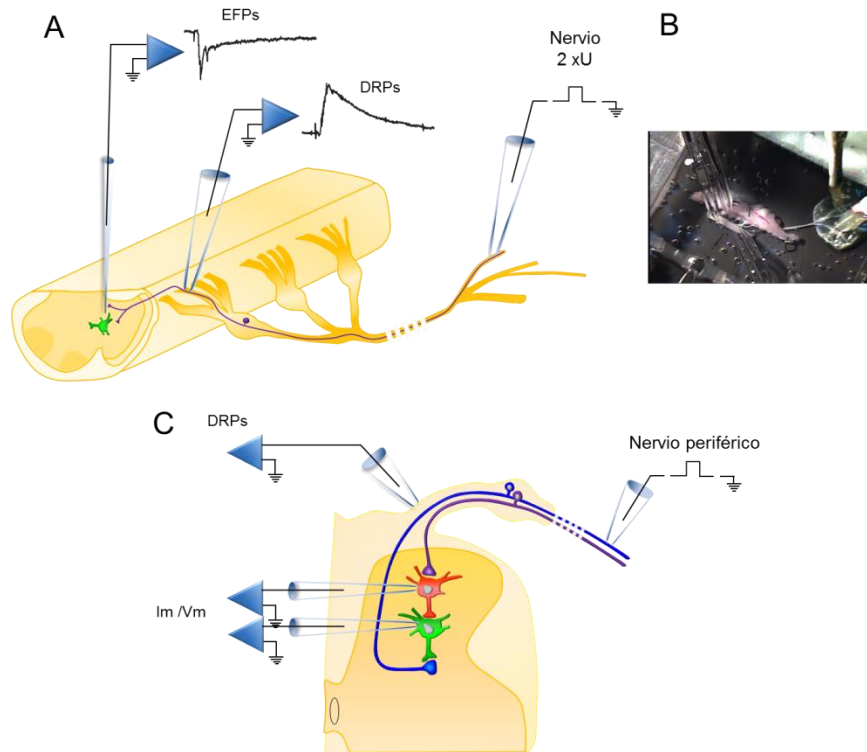


Figura 15. Arreglo experimental. **A**, diagrama de la preparación de la médula espinal hemiseccionada con los nervios periféricos en continuidad con las raíces dorsales. Los potenciales de raíz dorsal (DRPs) se registraron mediante electrodos de succión colocados en la raíz L₃ o L₄ a nivel de la entrada de las fibras aferentes a la médula espinal. Los potenciales extracelulares de campo (EFPs) se registran mediante una micropipeta llena con NaCl 2M, colocada en el cuerno dorsal entre los segmentos espinales L₃-L₄, tomando como referencia el canal central y la superficie de las columnas dorsales. La estimulación de los nervios periféricos se efectúa con un electrodo bipolar de plata en forma de gancho, o con electrodos de succión. Se aplican pulsos cuadrados de 0.2 ms a intensidades 2-4 xU y con una frecuencia de 0.05 Hz. **B**, fotografía de la preparación utilizada. **C**, registro intracelular de interneuronas del cuerno dorsal en la modalidad de célula entera a ciegas mediante micropipetas llenas con soluciones que contienen gluconato de potasio o CsF.

Los fármacos se prepararon en agua destilada a concentraciones de 1-10 mM y se almacenaron a -20°C. Al momento de su utilización las drogas se disolvieron en el LCR de registro para alcanzar las concentraciones deseadas,

usualmente 10 μ M. Para determinar el efecto de algún fármaco se compararon los registros en condiciones control contra los registros obtenidos 6-12 min en presencia del fármaco, y 10-20 minutos después de su lavado. En la Tabla 3 se incluyen los agonistas y antagonistas serotoninérgicos utilizados indicando la acción y la afinidad.

Fármaco	Acción	Afinidad (pKi)	Ki [nM]
8-OH DPAT	Agonista total 5-HT _{1A/7}	9.4	0.3
zolmitriptan	Agonista parcial 5-HT _{1B/1D}	7.7/8.9	19.9/1.2
CP93-129	Agonista total 5-HT _{1B}	7.8	15
PNU142633	Agonista 5-HT _{1D}	6	1000
BRL54443	Agonista total 5-HT _{1e/1F}	8.7/8.9	1.9/1.2
DOI	Agonista 5-HT _{2A/2B/2C}	9.2/8.6/7.7	0.6/2.5/19.9
SR57227	Agonista 5-HT ₃	5.4 (pEC ₅₀)	3981 (EC ₅₀)
SC53116	Agonista total 5-HT ₄	8.1	7.9
ketanserina	Antagonista 5-HT ₂	9.7	0.1
tropisetron	Antagonista 5-HT ₃	8.8	1.5

Tabla 4. Agonistas y antagonistas serotoninérgicos empleados en el presente trabajo.

V. Resultados

5.1. Registro de los potenciales extracelulares de campo (EFPs) a distintas profundidades en el cuerno dorsal.

Con el objetivo de localizar las proyecciones de las fibras aferentes de bajo umbral en el cuerno dorsal de la médula espinal, se registraron los EFPs a distintas profundidades. En la Figura 16 se puede observar que la estimulación del nervio tibial con una intensidad 4 xU produjo DRPs registrados en la raíz dorsal L₃, con un tiempo al pico de 41 ms y una duración de 410 ms.

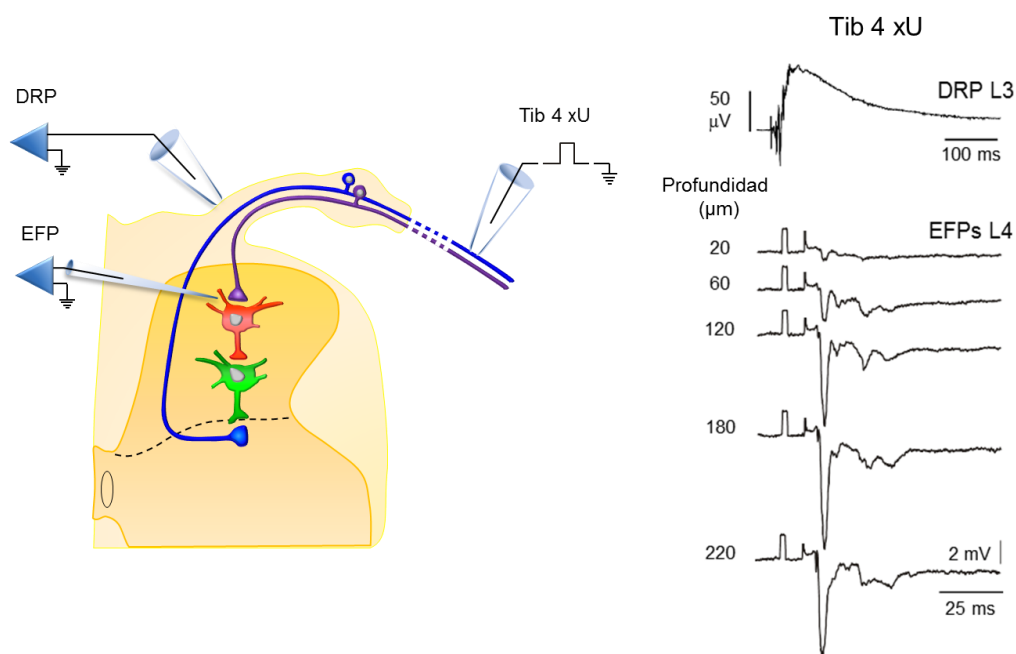


Figura 16. Potenciales de raíz dorsal (DRPs) y potenciales extracelulares de campo (EFPs) registrados a distintas profundidades en el cuerno dorsal al estimular el nervio tibial (TIB). *Panel izquierdo*, esquema del arreglo de electrodos. *Panel superior derecho*, DRP producido por la estimulación del nervio TIB a 4 xU. *Panel inferior derecho*, EFPs registrados a distintas profundidades, como se indica. El componente de latencia más corta y de mayor amplitud fue considerado como monosináptico. Los trazos representan el promedio de 6 muestras (en ésta y en las figuras subsiguientes).

Simultáneamente se registraron los EFPs a nivel L₄ a distintas profundidades. Los EFPs de mayor amplitud se registraron a profundidades de 120-220 μm. El

componente de latencia más corta (2.7 ± 3 n=8) y de mayor amplitud de los EFPs fue considerado como monosináptico y producido por la activación de las fibras aferentes de menor umbral ($2 - 4$ xU) y mayor velocidad de conducción. Los componentes de mayor latencia (6.6 ± 1.6 n=6) podrían deberse a la activación de vías polisinápticas o a la activación de fibras con una menor velocidad de conducción.

5.2. Potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs) producidos con distintas intensidades de estimulación.

Puesto que estamos interesados en estudiar la modulación de las vías que median la PAD producida por las fibras aferentes de bajo umbral, examinamos los EFPs y los DRPs producidos por la estimulación eléctrica del nervio tibial con intensidades crecientes de estimulación (Figura 17). En esta serie de experimentos los EFPs se registraron entre los segmentos L₃ y L₄ a una profundidad de 160 μ m. Se puede observar que el componente monosináptico de los EFPs alcanzó un valor casi máximo con una intensidad 1.6 xU y no cambió significativamente con intensidades de estimulación más altas. Estos resultados sugieren que las aferentes que producen el componente monosináptico de los EFPs se reclutan con intensidades por debajo de 2 xU.

Con respecto a los DRPs registrados en la raíz dorsal L₃, su amplitud se incrementó gradualmente y alcanzó un máximo con una intensidad de 5 xU. El incremento gradual en la amplitud de los DRPs se debe probablemente a la naturaleza polisináptica de las vías que median la PAD. A diferencia de los EFPs, que son una medida indirecta de las corrientes sinápticas en un sitio restringido, los DRPs reflejan la PAD de un número muy grande de terminales aferentes que proyectan profusamente en varios segmentos de la médula espinal y por consiguiente son más susceptibles de una facilitación espacial al incrementar la intensidad de estimulación.

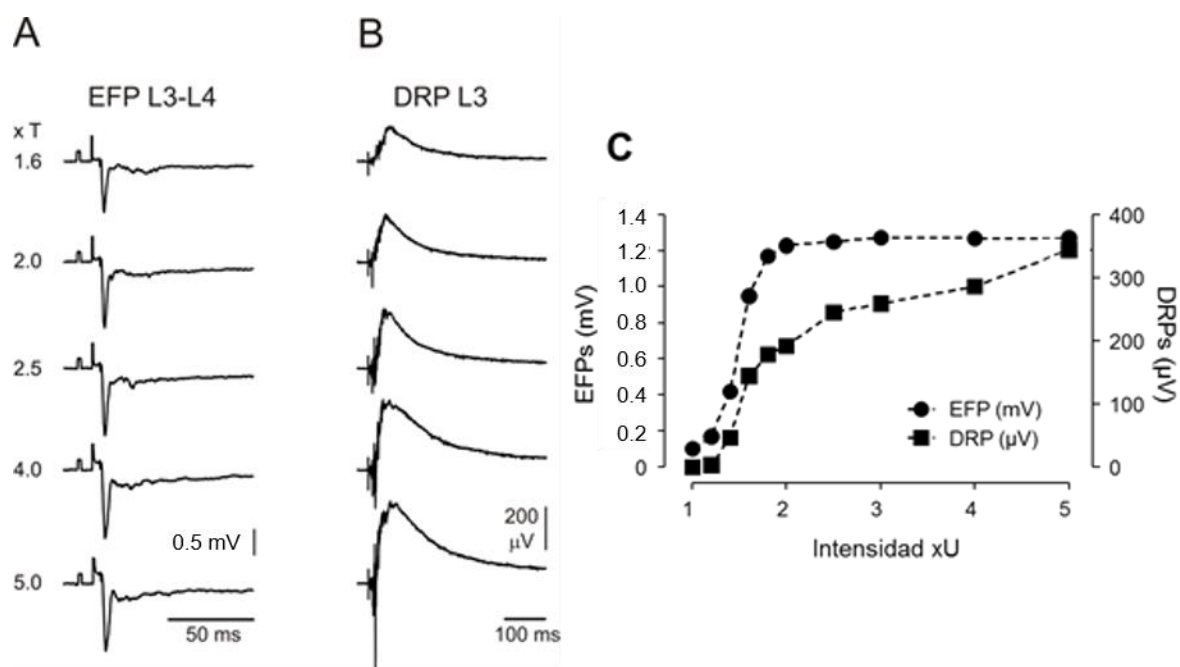


Figura 17. Potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación eléctrica del nervio tibial a las intensidades indicadas. A, EFPs registrados a una profundidad de 160 μm . Nótese como la amplitud del componente monosináptico no cambia con las diferentes intensidades. **B,** DRPs registrados en la raíz dorsal L₃. Su amplitud es máxima a una intensidad 5 xU. **C,** gráfica de la amplitud al pico de los EFPs (círculos) y DRPs (cuadrados) al estimular con intensidades graduadas.

5.3. Efecto de la 5-HT sobre los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral.

El siguiente objetivo fue investigar el efecto de la 5-HT sobre los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral en el nervio tibial (2-4 xU). En la Figura 18A se muestra el efecto de 5-HT (10 μM) sobre la amplitud pico del componente monosináptico de los EFPs y de los DRPs, los cuales se deprimieron 62 y 68 % con respecto al control, respectivamente. Este efecto se revirtió casi completamente 13 minutos después del lavado. Se puede también notar una depresión del segundo componente de los EFPs, probablemente polisináptico, así como del componente lento de duración prolongada. Este último corresponde al campo extracelular de la PAD registrada como un sumidero de corriente en el

cuerno dorsal. En la Figura 18B se muestra el promedio de la depresión del componente monosináptico de los EFPs y DRPs ($59 \pm 19\%$ y $74 \pm 18\%$ con respecto al control; $n=48$ experimentos).

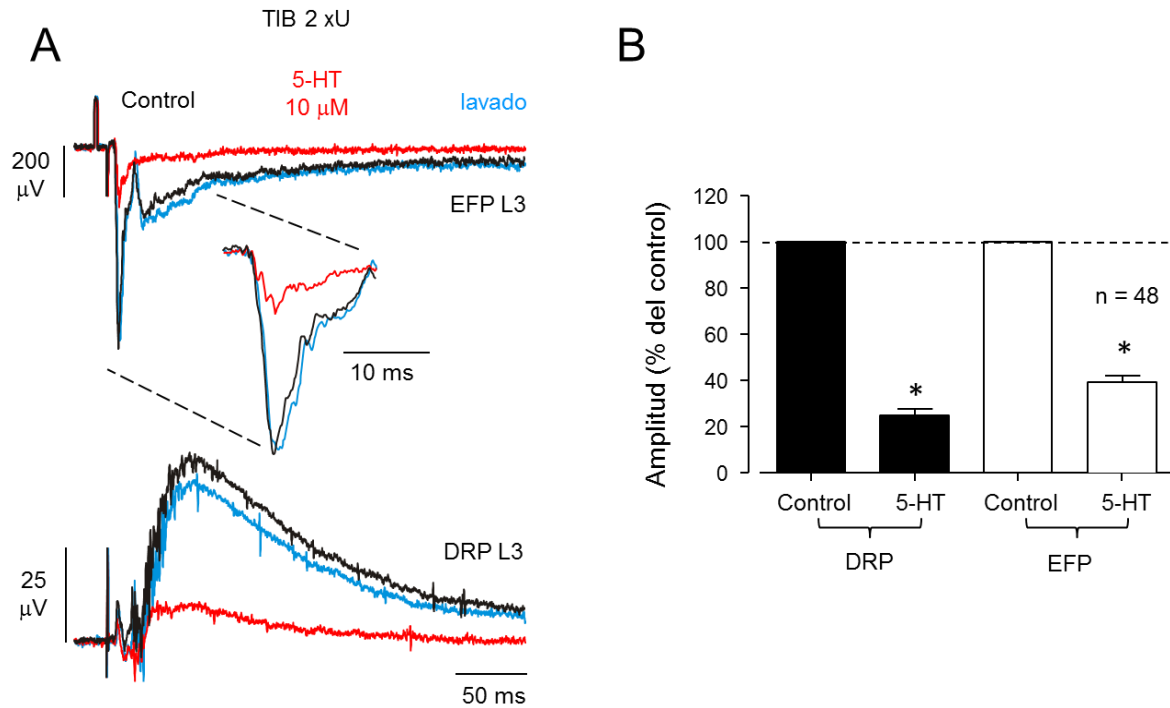


Figura 18. La 5-HT deprime los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRP) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral del nervio mixto Tibial. **A**, EFPs registrados en el cuerno dorsal a nivel L₃-L₄ (*trazos superiores*) y DRPs registrados en la raíz dorsal L₃ (*trazos inferiores*) en condiciones control (negro), seis minutos después de la aplicación de 5-HT (rojo) y trece minutos después del lavado (azul). La 5-HT se aplicó en el medio de perfusión para alcanzar una concentración de 10 μM. El inserto muestra un acercamiento al componente monosináptico de los EFPs. Los EFPs fueron registrados en el cuerno dorsal a una profundidad de 160 μm. **B**, gráfica resumen de los efectos de la 5-HT (10 μM) en los DRPs (barra negra) y en los EFPs (barra blanca) provocados por la estimulación del nervio tibial ($n=48$). Las barras representan la amplitud promedio (\pm D.E.) tras la aplicación de 5-HT con respecto al control (100%). La depresión de los EFPs y DRPs en la presencia de 5-HT fue estadísticamente significativa (*) (Prueba *t* de Student pareado $P < 0.0001$). Hubo una recuperación completa después de lavado.

El componente monosináptico de los EFPs refleja las corrientes transmembrana de las interneuronas de primer orden (ver discusión), por lo que una reducción en la amplitud de este componente sugiere que la 5-HT actúa a nivel presináptico reduciendo la eficacia sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral o en las interneuronas de primer orden. Por su parte, la reducción de la amplitud de

los DRPs puede deberse a la reducción en la eficacia sináptica de las fibras aferentes, pero también a una acción inhibitoria de la 5-HT sobre las interneuronas que median la PAD.

5.4. Efectos de la 5-HT sobre el curso temporal de los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs), y sobre los potenciales terminales

La Figura 19 muestra el curso temporal del efecto de la 5-HT sobre los EFPs y DRPs. Se puede observar que la depresión de los DRPs inició antes que la depresión de los EFPs. Los DRPs se deprimieron un 60% de su valor control sin que los EFPs fueran todavía afectados (Figura 19B). El curso temporal diferente en la depresión de los EFPs y DRPs sugiere que los efectos de la 5-HT ocurren a través de diferentes mecanismos, probablemente por la activación de diferentes (sub)tipos de receptores.

Para investigar si la 5-HT modifica la invasión del potencial de acción de las terminales de las fibras aferentes, analizamos el componente presináptico (potencial terminal) de los potenciales extracelulares de campo (EFPs) registrados en el cuerno dorsal. En la Figura 19A se muestran los EFPs registrados en el cuerno dorsal al estimular el nervio tibial con una intensidad 4 xU. En presencia de 5-HT (10 μ M) la amplitud de los EFPs (Figura 19A, trazos superiores) y de los DRPs (Figura 19A, trazos inferiores) se deprime progresivamente, sin que la amplitud de los potenciales terminales se vea afectada (Figura 19A y B, triángulos amarillos). En 10 experimentos en los cuales se pudo discernir claramente el componente presináptico de los EFPs, observamos que la 5-HT no modifica la amplitud de los potenciales terminales (Figura 19C). Por consiguiente, podemos concluir que la 5-HT deprime los EFPs y DRPs sin modificar la invasión del potencial de acción en las terminales, ni la excitabilidad de las fibras aferentes.

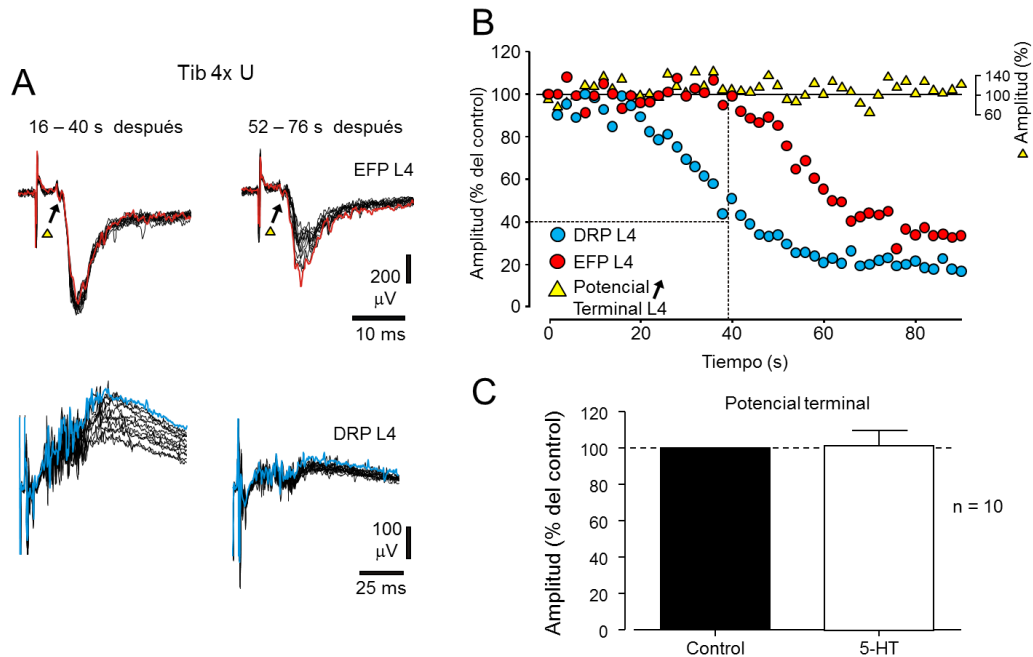


Figura 19. Curso temporal de los efectos de la 5-HT sobre los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral en el nervio Tibial (TIB). **A**, curso temporal de la depresión de los EFPs (*trazos superiores*) y DRPs (*trazos inferiores*) producidos por la estimulación del nervio tibial con una intensidad de 4 xU en presencia de 5-HT (10 μ M). Nótese que el potencial terminal de las fibras aferentes no se ve afectado (triángulos amarillos). **B**, gráfica del curso temporal de los efectos de la 5-HT sobre los EFPs, DRPs y potenciales terminales, correspondientes a los trazos en A, como se indica. La línea punteada vertical indica el inicio de la depresión de los EFPs. La línea punteada horizontal indica el porcentaje de depresión de los DRPs alcanzado al inicio de la depresión de los EFPs. **C**, gráfica resumen de 10 experimentos en los que se midió la amplitud del potencial terminal. No hay cambios significativos en la amplitud del potencial terminal en presencia de 5-HT con respecto al control.

5.5. Eficacia de la 5-HT en la depresión los potenciales de raíz dorsal (DRPs)

Con la finalidad de examinar la eficacia de la 5-HT para ejercer su efecto biológico se calculó la concentración efectiva 50 (EC_{50}), la cual hace referencia a la concentración molar de un agonista capaz de producir el 50% de la respuesta máxima posible por parte del agonista. La 5-HT se aplicó en concentraciones acumulativas de 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μ M y se midió la amplitud pico de los DRPs con respecto a la amplitud control. Considerando el promedio de siete experimentos, se pudo observar que los DRPs producidos por la estimulación de

fibras aferentes de bajo umbral fueron deprimidos por la 5-HT en una manera dependiente de la concentración con una $EC_{50} = 0.61 \mu\text{M}$. Esto sugiere la activación de receptores a 5-HT con una alta afinidad (Figura 20A). La 5-HT tuvo un efecto dual sobre los EFPs: a concentraciones menores a $1 \mu\text{M}$ se produjo una facilitación del componente monosináptico de los EFPs, mientras que a concentraciones mayores a $1 \mu\text{M}$ se produjo una reducción en la amplitud. Esto sugiere que la 5-HT actúa mediante dos mecanismos diferentes, probablemente a través de la activación de dos diferentes tipos de receptores (Figura 20B).

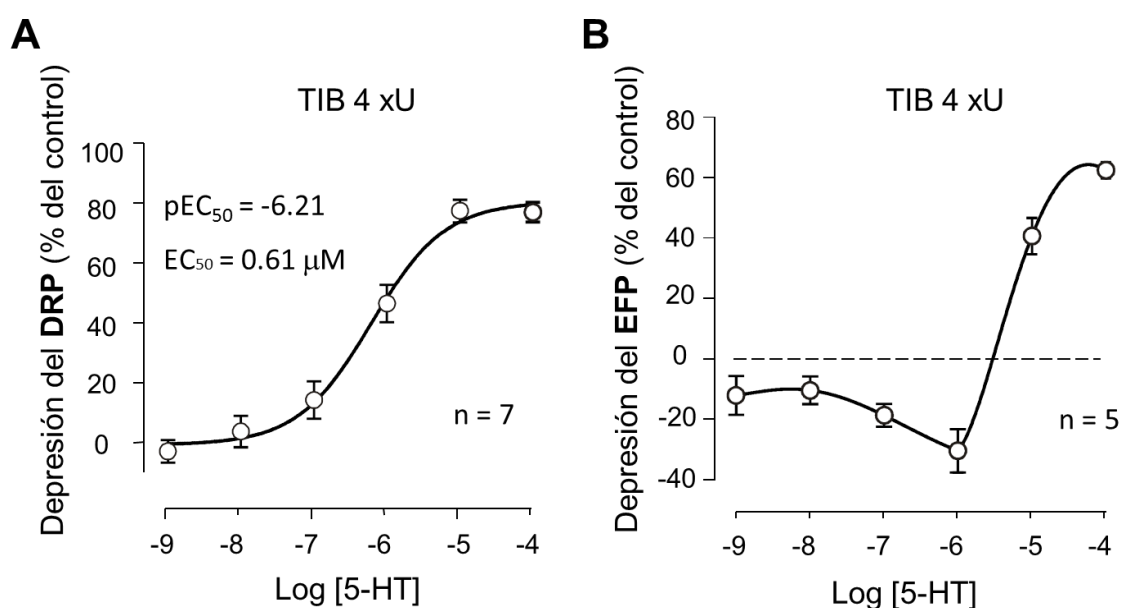


Figura 20. La 5-HT modula los potenciales de raíz dorsal (DRPs) y los potenciales extracelulares de campo (EFP) provocados por la estimulación de aferentes de bajo umbral en una manera dependiente de la concentración. **A** y **B**, curvas concentración-respuesta del efecto de la 5-HT sobre la amplitud pico de los DRPs y EFPs, respectivamente. La 5-HT se aplica a concentraciones acumulativas de 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM . Los DRPs y EFPs se producen por la estimulación del nervio tibial a una intensidad 4 xU. Cada punto en la gráfica representa el porcentaje de inhibición o facilitación de los DRPs y EFPs con respecto al control.

5.6. Efecto de la 5-HT sobre la excitabilidad de las fibras aferentes de bajo umbral

Con el objetivo de determinar si la 5-HT ejerce un efecto directo sobre las fibras aferentes de bajo umbral a través de la modulación de su excitabilidad, utilizamos la técnica de Wall (Wall, 1958). Para este fin, a través de la misma micropipeta utilizada para registrar los EFPs, se aplicó un pulso de corriente (microestimulación intraespinal; μ Estim) de 500 μ s con una intensidad de 11 μ A, el cual produjo un potencial de acción compuesto (CAP) de corta latencia registrado en la raíz dorsal L₄, seguido por un DRP (Figura 21A). Los CAPs de corta latencia se producen por la estimulación intraespinal directa de las terminales de las fibras aferentes de bajo umbral, mientras que el DRP se debe a la activación de las interneuronas que median la PAD, tanto directamente, como a través de la activación ortodrómica de las fibras aferentes. La aplicación de 5-HT (10 μ M) careció de efectos sobre los CAPs de corta latencia, pero deprimió los DRPs producidos por la microestimulación intraespinal en un $67 \pm 9\%$ (n=9) con respecto al control (Figura 21 A y B). Estos resultados indican que las acciones moduladoras de la 5-HT son independientes de los cambios en la excitabilidad de las terminales de las fibras aferentes primarias asociadas con la generación de los EFPs de corta latencia.

A partir de la latencia del CAP registrado en la raíz dorsal podemos inferir que la μ Estim activó fibras aferentes con la velocidad de conducción más alta, es decir, de bajo umbral. Con la finalidad de corroborar el tipo de fibras aferentes activadas antidrómicamente con las intensidades de estimulación utilizadas, se registraron los CAPs en el nervio ciático y en el nervio utilizado para producir los DRPs (Tibial; TIB). Primeramente, observamos que los CAPs registrados en el nervio ciático y en el nervio Tibial exhiben varios componentes, aunque con latencias no muy diferentes. En las preparaciones neonatas o juveniles *in vitro*, las fibras aferentes todavía no están completamente mielinizadas, y a temperatura ambiente, las velocidades de conducción de las fibras aferentes de bajo umbral se separan más que en preparaciones adultas *in vivo*. Lo mismo ocurre con las salvas aferentes producidas por activación ortodrómica. Se puede observar que la amplitud

de los componentes de las salvas antidrómicas registradas en el nervio ciático y en el nervio tibial (Figura 21A) no se modificaron significativamente en presencia de la 5-HT. Estos efectos sugieren que la 5-HT no ejerce acciones directas sobre la polaridad de las fibras aferentes intraespinales ni en los nervios periféricos.

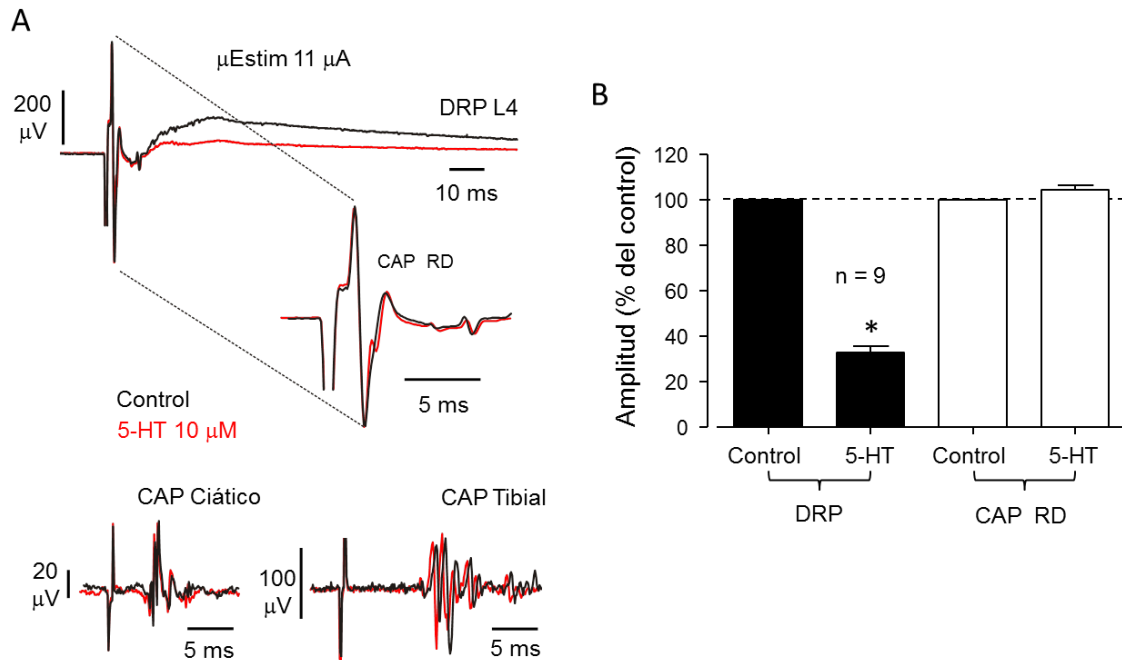


Figura 21. La 5-HT no modifica la excitabilidad de las terminales de las fibras aferentes evaluada con la técnica de Wall. **A**, *trazo superior*, registro del potencial de acción compuesto (CAP) antidrómico en la raíz dorsal y de los DRPs al aplicar una microestimulación intraespinal (μ Estim) de 11 μ A, en condiciones control (negro) y en presencia de 5-HT 10 μ M (rojo). El inserto muestra un acercamiento del componente rápido del CAP producido por la activación antidrómica de las fibras más excitables. *Trazos inferiores*, registro del potencial antidrómico en el nervio ciático (izquierda) y tibial (derecha). La 5-HT deprime los DRPs sin modificar la amplitud de los CAPs antidrómicos. **B**, gráfica resumen de los efectos de la 5-HT sobre los DRPs y CAPs antidrómicos producidos por la μ Estim. La depresión de los DRPs en presencia de 5-HT fue estadísticamente significativa (*) (Prueba *t* de *Student* pareado, $P < 0.001$).

Otro método para determinar si la 5-HT modula la excitabilidad de las fibras aferentes de bajo umbral es mediante los cambios en el potencial de DC registrados en las raíces dorsales en presencia de 5-HT. Observamos que la aplicación de 5-HT (10 μ M) produjo un potencial negativo de DC con respecto al control, es decir, una despolarización (Figura 22 A y C). Esta despolarización se debe probablemente a la acción de la 5-HT sobre receptores ionotrópicos (i.e. 5-HT₃) presentes en las

terminales de las fibras aferentes de alto umbral (A δ y C). De hecho, se sabe que la activación de los receptores 5-HT₃ abre canales catiónicos y, por lo tanto, despolariza la membrana (Derkach et al., 1989). Puesto que el registro del DRP en la raíz dorsal incluye a toda una población de fibras aferentes, no es posible dilucidar con precisión si estos cambios son producidos en las fibras de bajo o alto umbral.

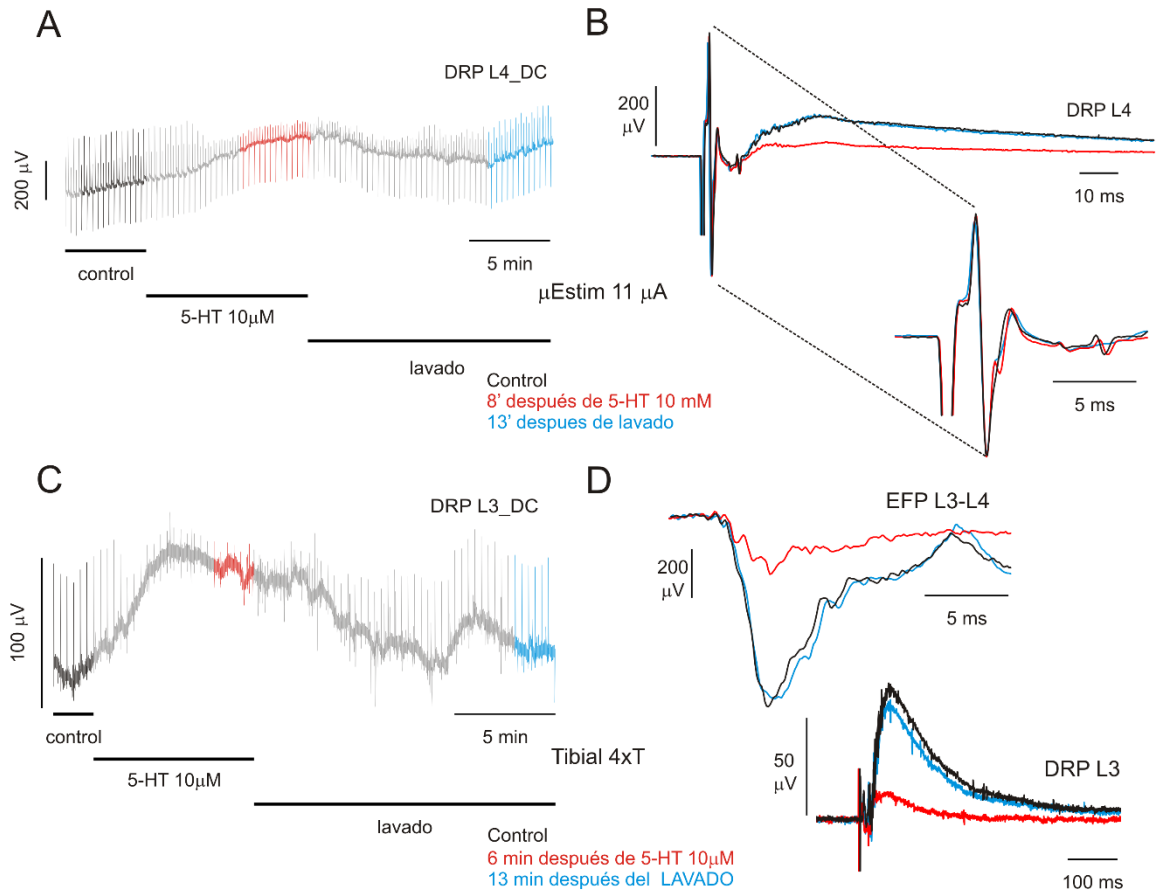


Figura 22. Registro en DC de las raíces dorsales en presencia de 5-HT. A y C, registro continuo de una raíz dorsal en condiciones control, en la presencia de 5-HT y durante el lavado, como se indica. Los artefactos indican la aplicación de los pulsos de $\mu Estim$ (0.1Hz, 500 μs y 11 μA) en A, y de la estimulación del nervio Tib 4 xU en C. **B,** CAPs y DRPs producidos por la $\mu Estim$ en A. Los registros son promedios de las muestras ilustradas en A en el color correspondiente, como se indica en el texto. Nótese que aunque en el registro en DC (A) hay una despolarización de las fibras aferentes en la raíz dorsal, no se observan cambios en la amplitud de los CAPs producidos por la $\mu Estim$. **D,** EFPs y DRPs producidos por la estimulación del nervio Tibial 4 xU. Los registros son promedios de las muestras ilustradas en C en el color correspondiente, como se indica en el texto. Nótese que los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral son deprimidos en la presencia de 5-HT, aunque los CAPs de las fibras de bajo umbral producidos por la $\mu Estim$ (B) no se ven afectados.

Sin embargo, la ausencia de efecto de la 5-HT sobre los potenciales antidrómicos registrados por la activación de las fibras de bajo umbral (Figura 22 B) sugiere que los cambios en los potenciales de DC registrados en la raíz dorsal en presencia de 5-HT podrían deberse a una despolarización de las fibras aferentes de alto umbral.

5.7. Efecto de la 5-HT sobre la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas

Con el objetivo de determinar los efectos de la 5-HT sobre la transmisión sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral, investigamos su efecto 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). Para este fin, utilizamos el protocolo de estimulación pareada (condicionante y de prueba) de fibras aferentes homónimas del nervio tibial con intensidades 2 xU y con intervalos de tiempo variables (25 ms a 10 s) entre ambos estímulos (Figura 23), y se registraron simultáneamente los EFPs y DRPs.

En la Figura 23A-C se muestra el protocolo descrito al aplicar los estímulos condicionante y de prueba con un intervalo de 200 ms. Al restar los registros obtenidos con la aplicación simultánea de los pulsos condicionante y de prueba (Figura 23C) de los registros obtenidos sólo con el pulso condicionante (Figura 23A), se obtienen los registros de los EFPs y DRPs afectados por el estímulo condicionante (Figura 23D, trazo rojo). La superposición con el registro obtenido por el pulso de prueba (trazo negro) permite observar una clara depresión de los EFPs y DRPs.

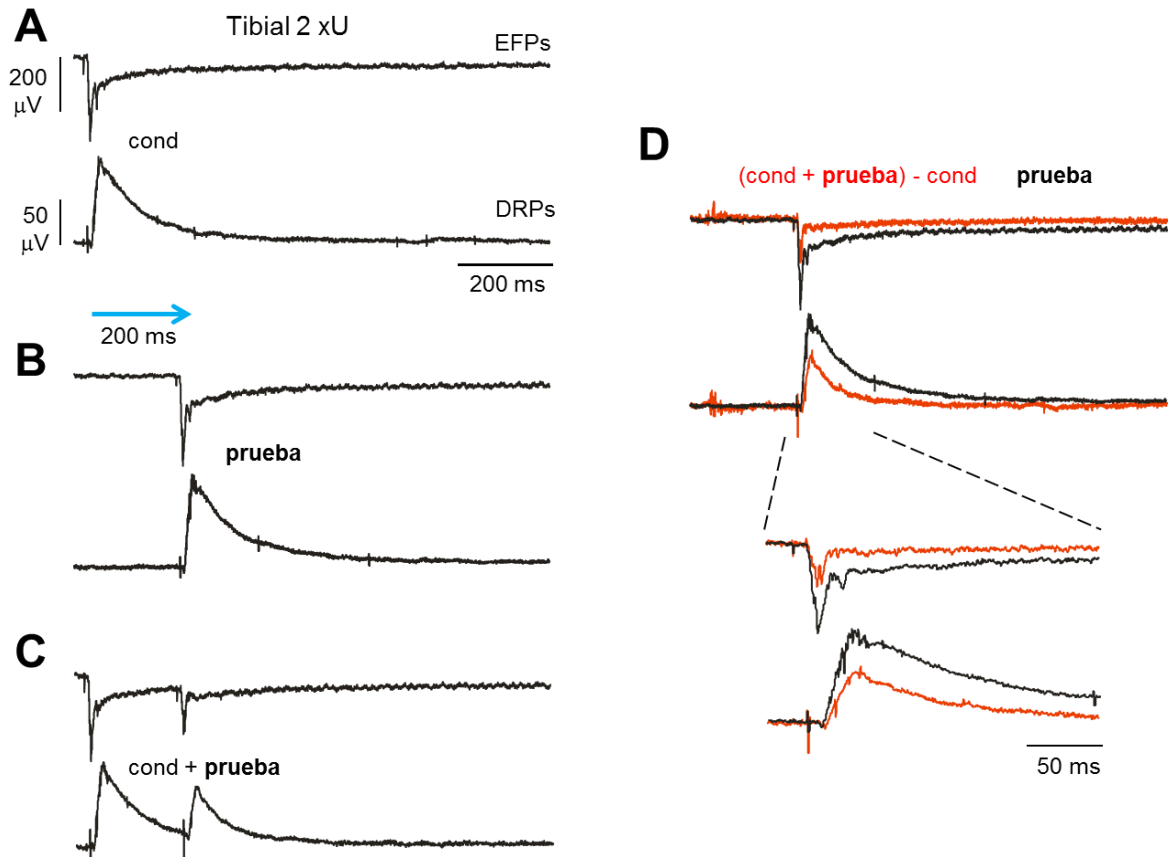


Figura 23. Protocolo de estimulación pareada para evaluar la depresión homosináptica de los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de fibras aferentes homónimas. A-D, EFPs (*trazos superiores*) y DRPs (*trazos inferiores*) producidos por la estimulación del nervio tibial con una intensidad 2 xU. **A**, aplicación del estímulo condicionante. **B**, aplicación del estímulo de prueba. **C**, aplicación simultánea del estímulo condicionante y de prueba con un intervalo de 200 ms. **D**, *trazo rojo*, sustracción de los registros obtenidos en C y A; *trazo negro*, registro obtenido al aplicar sólo el estímulo de prueba. Nótese la depresión de los EFPs y DRPs producida por el estímulo condicionante, la cual se observa más claramente en el acercamiento (abajo).

El mismo protocolo se realizó con intervalos entre 25 ms y 10 s, y se graficó la depresión de los EFPs con respecto al control para cada intervalo utilizado. En la Figura 24 se ilustra el curso temporal de la depresión de los EFPs para 21 experimentos. Se puede observar claramente una depresión prolongada de los EFPs con una duración que va más allá de los 10 s y con un máximo a los 25 ms. Esta depresión es muy similar a la depresión homosináptica descrita para el reflejo monosináptico y los EPSPs monosinápticos registrados en motoneuronas en la rata (Lev-Tov y Pinco, 1992; Li y Burke, 2001, 2002).

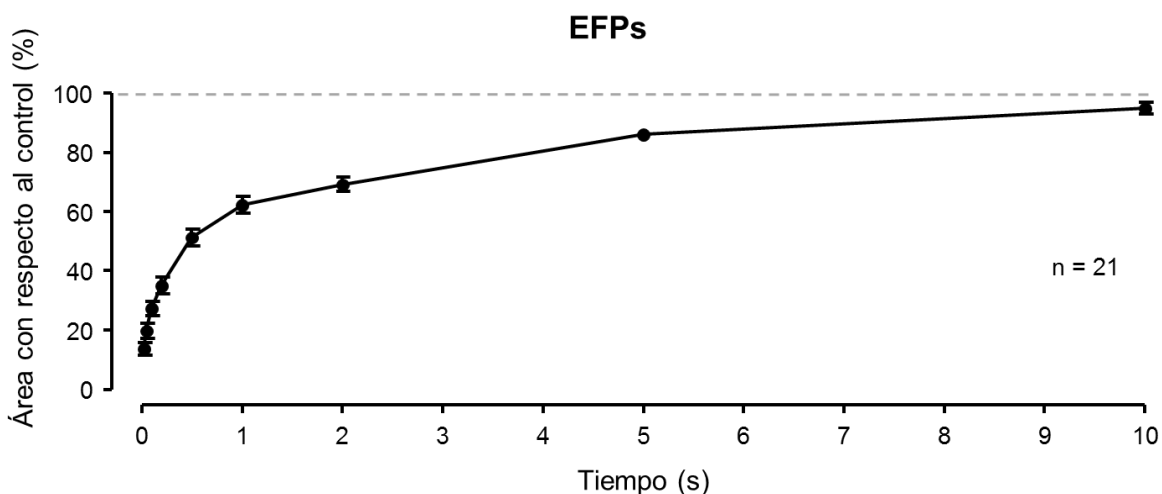


Figura 24. Curso temporal de la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas. Depresión de los EFPs producida por la estimulación del nervio tibial (Tib) con una intensidad 2 xU (promedio de 21 experimentos). Cada punto representa la media \pm E.E. Se utilizó el protocolo de pulsos pareados descrito en la Figura 23 con intervalos entre el estímulo condicionante y de prueba de 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 y 10000 ms.

Se ha demostrado que la depresión homosináptica en la médula espinal tiene un origen presináptico, ya que se reduce al disminuir la concentración de calcio extracelular, y por la acción del agonista a los receptores GABA_B, blaclofen (Lev-Tov y Pinco, 1992). Si la 5-HT ejerciera sus efectos a nivel presináptico, entonces también reduciría la depresión homosináptica. Decidimos entonces utilizar este abordaje como una herramienta adicional para demostrar que la 5-HT reduce la liberación del neurotransmisor de las fibras aferentes.

Utilizando el protocolo descrito previamente, observamos que la aplicación de 5-HT a una concentración 10 μ M reduce la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas. La Figura 25 muestra la gráfica de la depresión de los EFPs con diferentes intervalos entre el pulso condicionante y de prueba en 15 experimentos (rojo). Comparando estos resultados con el curso temporal de la depresión en condiciones control (negro), se puede observar claramente una inhibición de la depresión homosináptica.

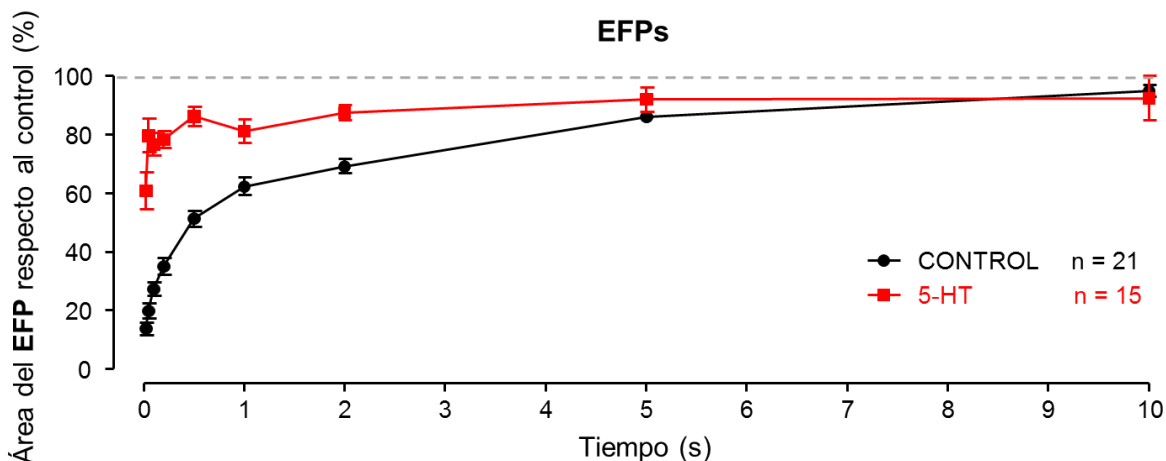


Figura 25. La 5-HT reduce la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas a través de un efecto a nivel presináptico. Mismo formato que la Figura 24. Gráfica promedio del curso temporal de la depresión de los EFPs obtenidos después de la aplicación de 5-HT (rojo) respecto a la amplitud control, en comparación con la gráfica promedio del curso temporal de la depresión de los EFPs en condiciones control (negro; misma gráfica de la Figura 24). Se puede notar una clara reducción de la depresión homosináptica en presencia de 5-HT.

Con el objetivo de comprobar si la depresión homosináptica no es producida por una despolarización de aferentes primarias generadas por la activación de los receptores a GABA_A presentes en las terminales de las fibras aferentes, aplicamos bicuculina 10 μ M. La bicuculina deprimió casi por completo los DRPs sin afectar el componente monosináptico de los EFPs (Figura 26A), es decir, sin alterar la liberación de neurotransmisor de las fibras aferentes. Al efectuar el mismo protocolo de depresión homosináptica en presencia de bicuculina en 7 experimentos (Figura 26B, trazo verde) y comparando los resultados promedio con la respuesta control (Figura 26B, trazo negro), pudimos observar que la bicuculina no redujo la depresión homosináptica. Por consiguiente, podemos concluir que en la depresión homosináptica no participa, al menos de manera importante, una inhibición presináptica de origen GABAérgico asociada a la PAD, es decir, a la activación de los receptores GABA_A.

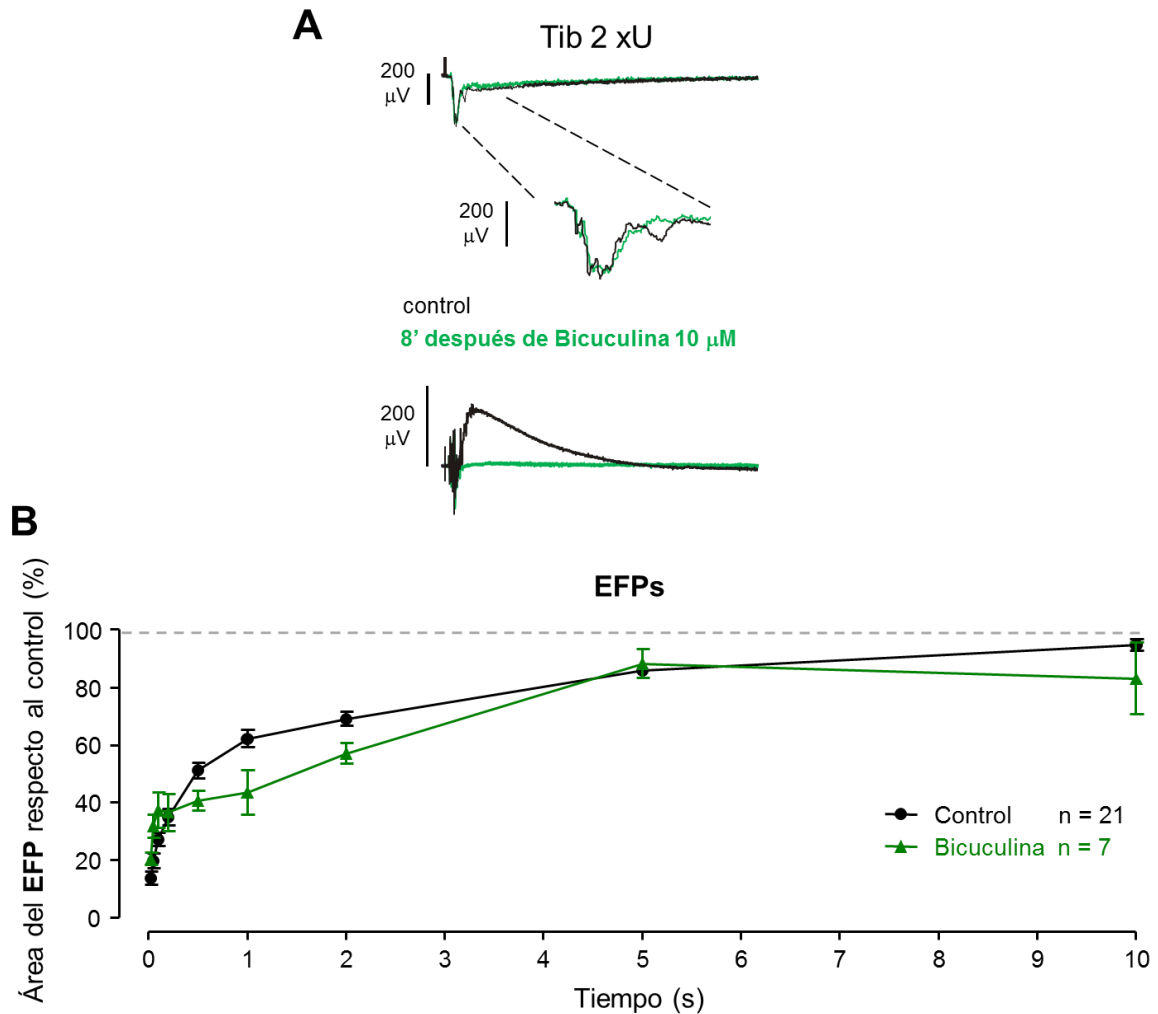


Figura 26. La bicuculina no reduce la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas. Mismo formato que la Figura 24. En negro se muestra la gráfica promedio del curso temporal de la depresión de los EFPs en condiciones control (misma gráfica de la Figura 24). En verde se muestra la gráfica promedio del curso temporal de la depresión de los EFPs obtenidos después de la aplicación de bicuculina, con respecto a la amplitud control. Se puede notar que no hay una reducción significativa de la depresión homosináptica en presencia de bicuculina.

Con la finalidad de determinar la participación de los receptores GABA_B en la depresión homosináptica aplicamos faclofen, un antagonista de los receptores GABA_B. Efectuamos el mismo protocolo de depresión homosináptica en 4 experimentos con intervalos de tiempo entre estímulo condicionante y de prueba de 25 ms a 10 s en presencia de faclofen (Figura 27, trazo verde) y lo comparamos con el promedio en condiciones control (Figura 27, trazo negro). Observamos que la aplicación del faclofen (10 μ M) no reduce la depresión homosináptica. La ausencia

de efecto del faclofen sugiere que los receptores GABA_B no participan en la depresión homosináptica.

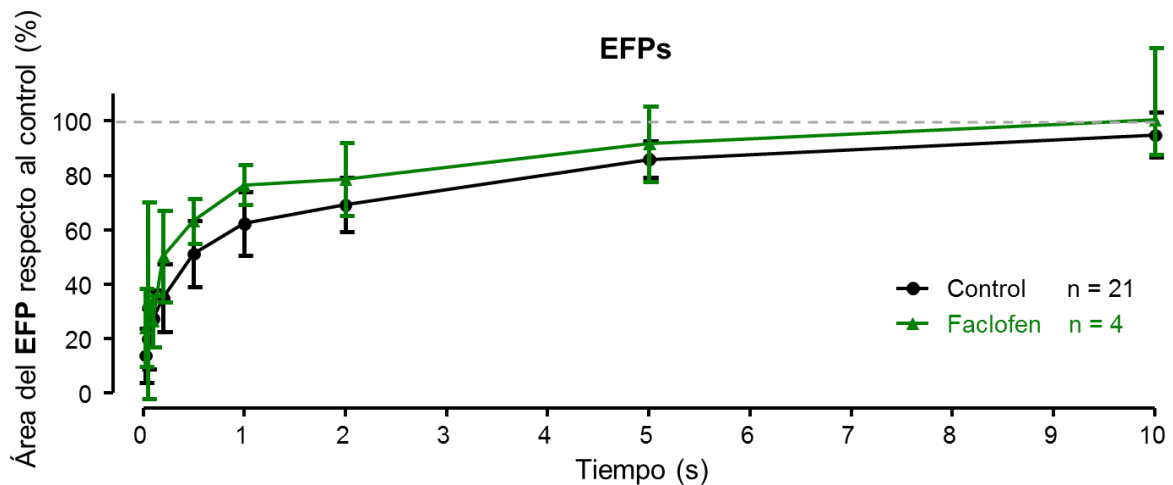


Figura 27. El faclofen no reduce la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas. Mismo formato que la Figura 24. En negro se muestra la gráfica promedio del curso temporal de la depresión de los EFPs en condiciones control (misma gráfica de la Figura 24). En verde se muestra la gráfica promedio del curso temporal de la depresión de los EFPs obtenidos en presencia del faclofen (10 μ M), con respecto a la amplitud control. Se puede notar que no hay una reducción significativa de la depresión homosináptica en presencia de faclofen.

La ausencia de efecto de la bicuculina y del faclofen sobre la depresión homosináptica sugiere que ésta no es de origen GABAérgico y que la reducción en la depresión homosináptica en presencia de 5-HT se debe a la activación de receptores a 5-HT presentes en las terminales de las fibras aferentes primarias de bajo umbral que conduce a una reducción de la eficacia sináptica de las mismas.

5.8. Efecto de la 5-HT sobre la depresión heterosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes heterónimas

Como describimos previamente, la depresión homosináptica es producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas y no es de origen GABAérgico. Nuestro siguiente objetivo fue determinar los efectos de la 5-HT sobre la depresión de los EFPs y DRPs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes

heterónimas. Para este fin, utilizamos el mismo protocolo de estimulación pareada (condicionante y de prueba) de fibras aferentes heterónimas aplicando el estímulo condicionante en la raíz dorsal L₃ y el estímulo de prueba en la raíz dorsal L₄, con intensidades 2 xU y con intervalos de tiempo variables (25 ms a 10 s) entre ambos estímulos.

En la Figura 28 se ilustra el curso temporal de la depresión de los EFPs producida por la estimulación de fibras aferentes heterónimas (depresión heterosináptica) (Figura 28, círculos con línea punteada). Al comparar el curso temporal de la depresión heterosináptica con el de la depresión homosináptica (Figura 28, cuadros con línea continua), se puede observar que la depresión heterosináptica es de menor amplitud y exhibe un curso temporal más corto que la depresión homosináptica.

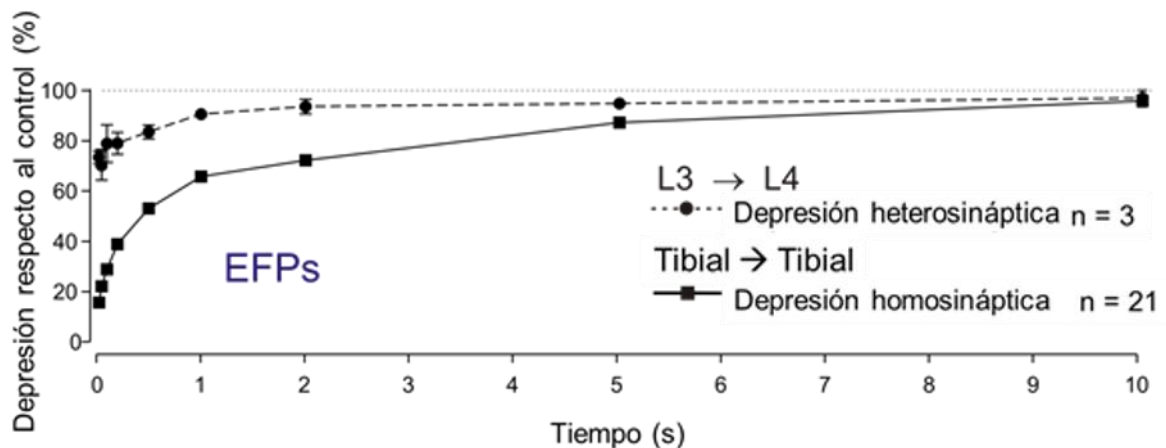


Figura 28. Comparación de los cursos temporales de la depresión heterosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes heterónimas y de la depresión homosináptica producida por la estimulación de aferentes homónimas. Los círculos con línea punteada muestran el curso temporal de la depresión de los EFPs producidos por la estimulación de la raíz dorsal L₄ con una intensidad 2 xU, al aplicar una estimulación condicionante a la raíz dorsal L₃ con una intensidad 2 xU (depresión heterosináptica) (promedio de 3 experimentos). Los cuadros con línea continua corresponden al curso temporal de la depresión de los EFPs producidos por la estimulación del nervio Tibial con una intensidad 2 xU, al aplicar una estimulación condicionante al mismo nervio (depresión homosináptica) (promedio de 21 experimentos). Cada punto representa la media ± E.E. Se utilizó el protocolo de pulsos pareados descrito en la Figura 23 con intervalos entre el estímulo condicionante y de prueba de 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 y 10000 ms.

Al efectuar el protocolo descrito previamente, pudimos observar que la aplicación de 5-HT 10 μ M también reduce la depresión heterosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes heterónimas. La Figura 29 muestra el curso temporal de la depresión heterosináptica de los EFPs con diferentes intervalos entre el pulso condicionante y de prueba. Al comparar el curso temporal de esta gráfica (rojo) con el curso temporal de la depresión heterosináptica en condiciones control (negro), se puede observar claramente una reducción casi completa de la depresión heterosináptica.

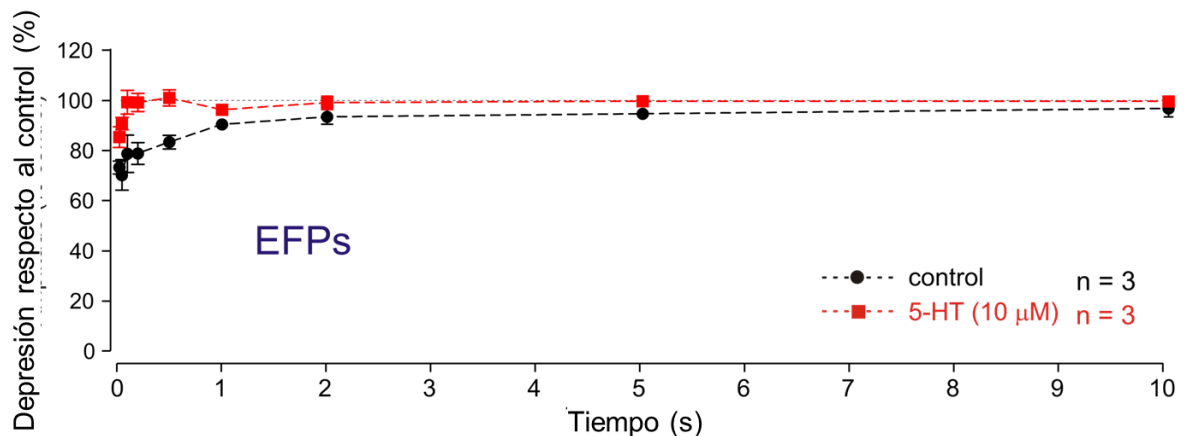


Figura 29. La 5-HT reduce la depresión heterosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes heterónimas. Mismo formato que la Figura 24. En negro se muestra la gráfica del curso temporal de la depresión heterosináptica de los EFPs en condiciones control (n=3; misma gráfica de la Figura 28). En rojo se ilustra la gráfica del curso temporal de la depresión heterosináptica de los EFPs obtenidos después de la aplicación de 5-HT (n=3). Se puede notar una reducción casi completa de la depresión heterosináptica en presencia de 5-HT.

Con el objetivo de identificar el origen de la depresión heterosináptica aplicamos bicuculina 10 μ M para bloquear los receptores a GABA_A. Al efectuar el protocolo de depresión heterosináptica, pudimos observar que la bicuculina 10 μ M reduce la depresión heterosináptica (Figura 30, trazo verde) al comparar con la curva control de la depresión heterosináptica (Figura 30, trazo negro). Estos resultados nos permiten concluir que la depresión heterosináptica se debe a la activación de receptores GABA_A, es decir a una inhibición presináptica asociada a la PAD de origen GABAérgico.

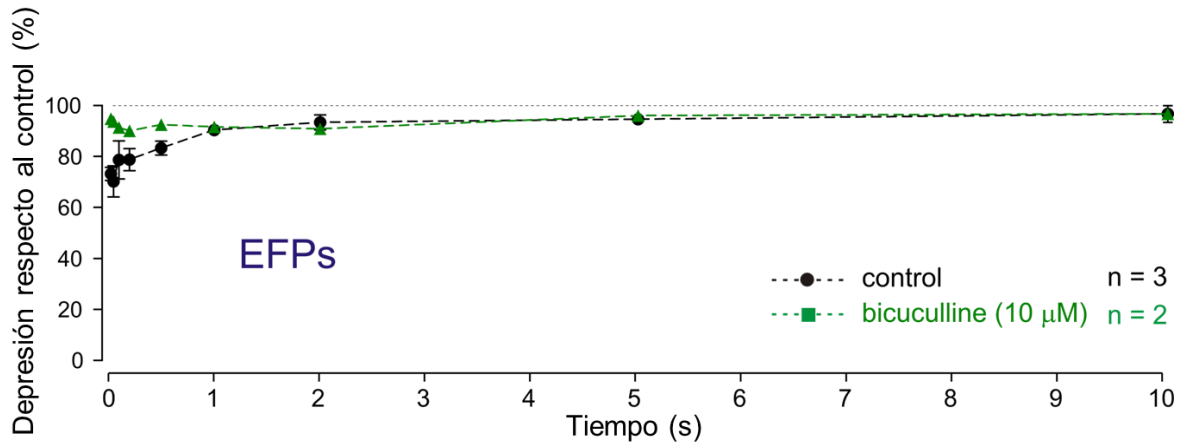


Figura 30. El antagonista de los receptores GABA_A, bicuculina, reduce la depresión heterosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes heterónimas. Mismo formato que la Figura 24. En negro se muestra la gráfica del curso temporal de la depresión heterosináptica de los EFPs en condiciones control (n=3; misma gráfica de la Figura 28). En verde se ilustra la gráfica del curso temporal de la depresión heterosináptica de los EFPs obtenidos en presencia de bicuculina 10 μM (n=2). Se puede notar una reducción de la depresión heterosináptica en presencia de la bicuculina.

De esta manera, la reducción de la depresión heterosináptica en presencia de 5-HT puede deberse a una inhibición de la transmisión sináptica en las fibras aferentes de bajo umbral, o a una acción inhibitoria en las vías que median la PAD producida por las fibras aferentes de bajo umbral (ver discusión).

5.9. Efecto de la 5-HT sobre los componentes monosinápticos de los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) y corrientes postsinápticas excitadoras (EPSCs), producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral en interneuronas del cuerno dorsal

Mediante la técnica de control de corriente se registraron las potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) en interneuronas del cuerno dorsal simultáneamente con los DRPs producidos por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral. En presencia de 5-HT 10 μM, la amplitud pico de los DRPs y del componente monosináptico de los EPSPs registrados en condiciones control (Figura 31A, trazos en negro) se deprimió en un 87 y 86 % con respecto al control,

respectivamente (Figura 31A, trazos en rojo). Este efecto se revirtió diez minutos después del lavado (Figura 31A, trazos en azul). En promedio, la depresión de los DRPs y del componente monosináptico de los EPSPs fue de 89 ± 2 y 95 ± 5 % ($n=5$) con respecto al control, respectivamente (Figura 31B).

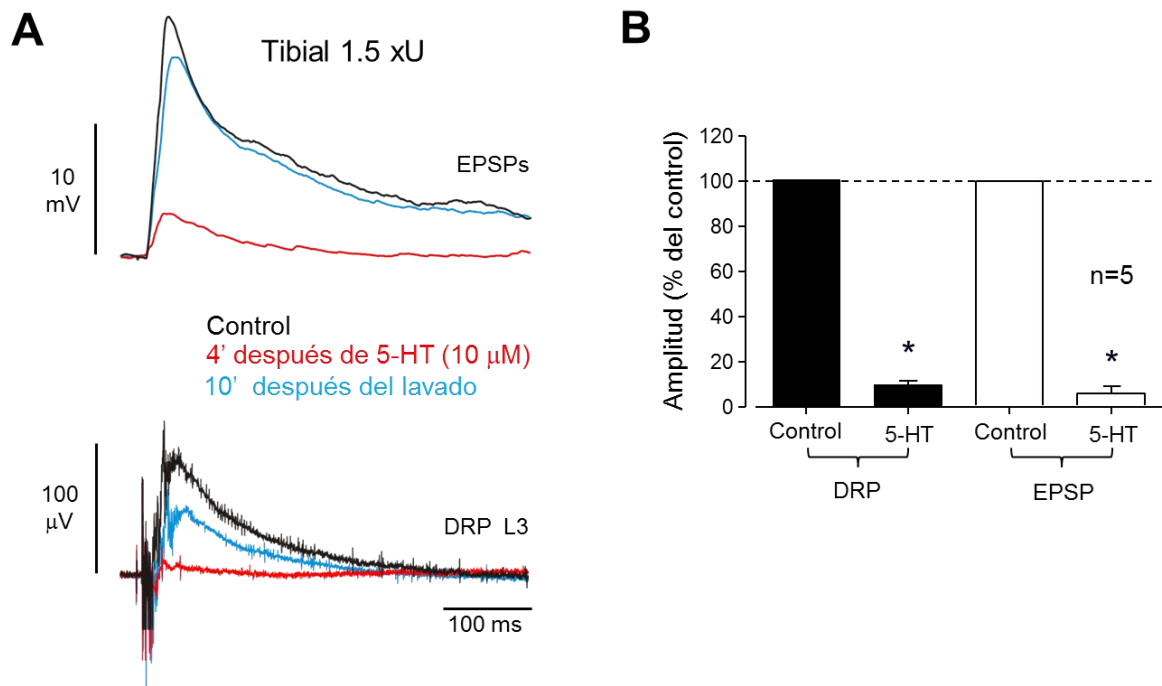


Figura 31. La 5-HT deprime los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) y los potenciales de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral. **A**, registros intracelulares (*panel superior*) y DRPs (*panel inferior*) en condiciones control (negro), en presencia de 5-HT (rojo) y después del lavado (azul). Los EPSPs se registran en interneuronas del cuerno dorsal en la configuración de célula entera. Las interneuronas se activan monosinápticamente por la estimulación del nervio tibial con una intensidad 1.5 xU, como se indica. Los DRPs se registran en la raíz dorsal L₃. **B**, gráficas resumen de los efectos de la 5-HT sobre los DRPs (barras negras) y EPSPs (barras blancas) producidos por la estimulación del nervio tibial. Las barras representan la amplitud promedio (\pm E.E.) con respecto al control (100%). La depresión de los DRPs y EPSPs en presencia de 5-HT es estadísticamente significativa (*) (Prueba *t* de Student pareada, $P < 0.0001$).

En otra serie de experimentos, se registraron los DRPs en la raíz dorsal L₃, L₄ o L₅ y las EPSCs en interneuronas del cuerno dorsal al estimular nervios periféricos con intensidades ≤ 2 xU. En presencia de 5-HT 10 μ M, la amplitud pico de los DRPs y del componente de menor latencia de los EPSCs registrados en condiciones control (Figura 32A, trazo en negro) se deprimió en un 94 y 82 % con

respecto al control, respectivamente (Figura 32A, trazo en rojo). En promedio las EPSCs y los DRPs se deprimieron en un 77 ± 18 y 88 ± 9 % (n=11) con respecto al control, respectivamente (Figura 32C). Este efecto se revirtió parcialmente después del lavado (Figura 32A, trazo en azul). Para determinar si los efectos de la 5-HT ocurren en la sinapsis entre las fibras aferentes y las interneuronas registradas, aislamos el componente monosináptico con mefenesina 1 mM (Figura 32). La mefenesina es un fármaco que se ha utilizado como relajante muscular, pero a nivel espinal inhibe las vías polisinápticas al reducir la excitabilidad de las interneuronas (Farkas et al., 1989). En condiciones control se registraron las EPSCs producidas por la estimulación del nervio sural 2 xU (Figura 32B, trazo en negro). En la Figura 32B (trazo en verde), se puede observar que en presencia de mefenesina 1 mM se suprimen los componentes de mayor latencia de las EPSCs, aislándose el componente monosináptico de las mismas, y se reduce la amplitud del DRP. En promedio la amplitud de las EPSCs y DRPs se redujo 24.27 ± 9.51 y 29.23 ± 7.57 % respecto al control (Figura 32D).

El componente monosináptico de las EPSCs se deprime casi por completo (89 % del valor control) en presencia de 5-HT (Figura 32B, trazo en rojo). En promedio las EPSCs y los DRPs monosinápticos se deprimieron en un 82 ± 20 % y 89 ± 10 % (n=6) con respecto al control, respectivamente, en presencia de mefenesina + 5-HT (Figura 32D).

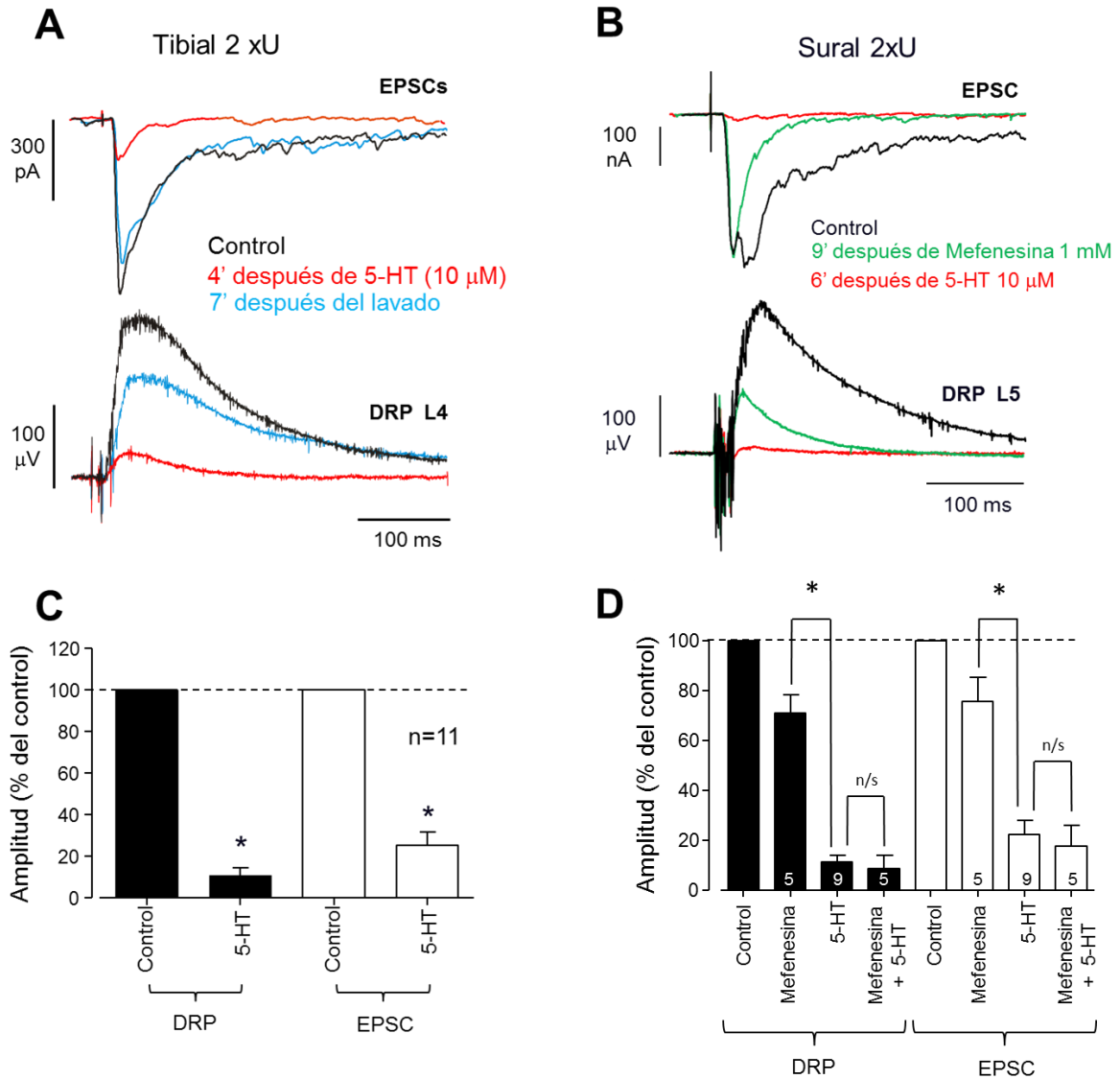
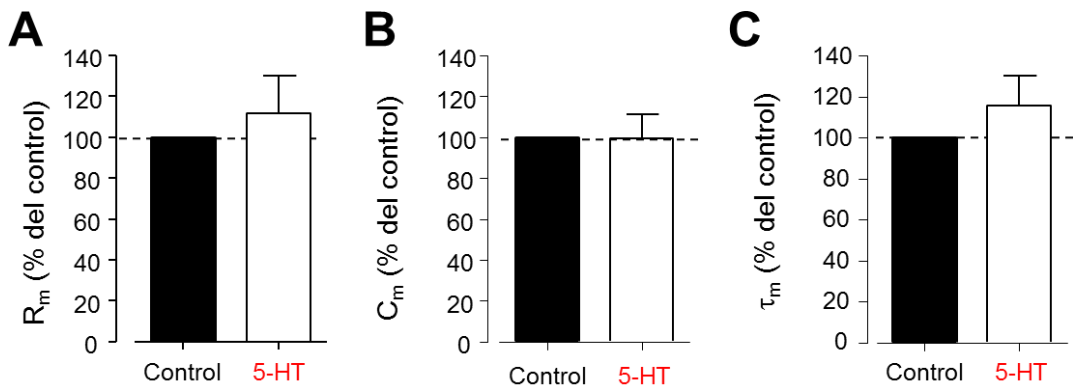


Figura 32. La 5-HT deprime el componente monosináptico de las corrientes posinápticas excitadoras (EPSCs) y los potenciales de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral. A, EPSCs (*panel superior*) y DRPs (*panel inferior*) en condiciones control (negro), en presencia de 5-HT (rojo) y después del lavado (azul). Las EPSCs se registran en interneuronas del cuerno dorsal en la configuración de célula entera y fueron evocadas por la estimulación del nervio tibial con intensidades 2 xU. Los DRPs se registraron en la raíz dorsal L4. **B,** EPSCs (*panel superior*) y DRPs (*panel inferior*) en condiciones control (negro), en presencia de mefenesina (verde) y en presencia de 5-HT y mefenesina (rojo), a las concentraciones indicadas. Nótese que la interneurona se activa monosinápticamente. **C y D,** gráficas resumen de los efectos de la 5-HT sobre los DRPs (barras negras en C y D) y EPSCs (barras blancas en C y D) producidos por la estimulación aferentes de bajo umbral con ≤ 2 xU. Las barras representan la amplitud promedio (\pm E.E.) con respecto al control (100%). La depresión de los DRPs y EPSCs fue estadísticamente significativa (*) (Prueba *t* de Student pareada, $P < 0.0001$).

5.10. Efecto de la 5-HT sobre las propiedades pasivas de las interneuronas del cuerno dorsal activadas por aferentes de bajo umbral

La depresión de los EPSPs y EPSCs monosinápticos producida por la 5-HT ocurrió sin cambios significativos en las propiedades pasivas de membrana de las interneuronas registradas en el cuerno dorsal. En 17 interneuronas la resistencia de membrana (R_m) se incrementó un $11 \pm 18 \%$ con respecto al control (Figura 33A), la capacitancia de membrana (C_m) se redujo un $1 \pm 11 \%$ con respecto al control (Figura 33B) y la τ_m se incrementó un $15 \pm 14 \%$ con respecto al control (Figura 33C). Estos resultados sugieren que la 5-HT no afecta significativamente la excitabilidad de las interneuronas registradas y que la depresión de los EPSPs e IPSCs se debe a una reducción en la eficacia sináptica de las fibras aferentes por la acción de la 5-HT a nivel presináptico.



n = 17

Figura 33. La 5-HT deprime los EPSPs y las EPSCs monosinápticos sin cambios en las propiedades pasivas de membrana de las interneuronas del cuerno dorsal activadas por aferentes de bajo umbral. Gráficas resumen de los efectos de la 5-HT (barras blancas) sobre la resistencia de membrana R_m (A), la capacitancia de membrana C_m (B) y la constante de tiempo de membrana τ_m (C). Las barras representan la amplitud promedio (\pm E.E.) con respecto al control (100%, barras negras). Prueba *t* de Student pareada, $P < 0.0001$.

5.11. Efecto de algunos agonistas de los receptores a 5-HT sobre los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRPs)

Nuestro siguiente objetivo fue examinar el efecto de algunos agonistas de los receptores a la 5-HT con la finalidad de dilucidar cuáles son los subtipos de receptores involucrados en la depresión de los EFPs y DRPs. Se utilizaron concentraciones 1-10 μM .

Algunos agonistas deprimieron los EFPs y los DRPs de manera similar a la 5-HT. Por ejemplo, la aplicación del agonista a los receptores 5-HT_{1E/1F}, BRL54443 (10 μM), produjo una depresión en la amplitud del componente monosináptico de los EFPs y de los DRPs en 28 y 51%, respectivamente, 10 minutos después de su aplicación (Figura 34A). En promedio, el BRL54443 deprimió significativamente el componente monosináptico de los EFPs y DRPs en un $22 \pm 18 \%$ y $16 \pm 5 \%$ (n=16) con respecto al control, respectivamente (Figura 34C). La depresión del componente monosináptico de los EFPs sugiere una reducción de la efectividad sináptica de las fibras aferentes, probablemente por la activación de receptores presinápticos. Sin embargo, no podemos descartar que la reducción en la amplitud de los EFPs también pueda deberse a una reducción en las corrientes de acción en los elementos postsinápticos. Por su parte, los DRPs podrían deprimirse como consecuencia de una reducción en la transmisión sináptica de las fibras aferentes estimuladas, sin descartar una posible modulación inhibitoria en las interneuronas que median la PAD. Como se ilustra en la Figura 34B, la aplicación del agonista de los receptores 5-HT_{1A/7}, 8-OH-DPAT (10 μM), deprimió los DRPs un 30 %, sin efecto sobre la amplitud de los EFPs. En promedio, el 8-OH-DPAT deprimió los DRPs un $30 \pm 3 \%$ (n=14) con respecto al control, sin efecto significativo sobre el componente monosináptico de los EFPs (Figura 34D). Estos resultados sugieren una modulación inhibitoria de la 5-HT a través de la activación de receptores 5-HT_{1A/7} presentes en las interneuronas que median la PAD.

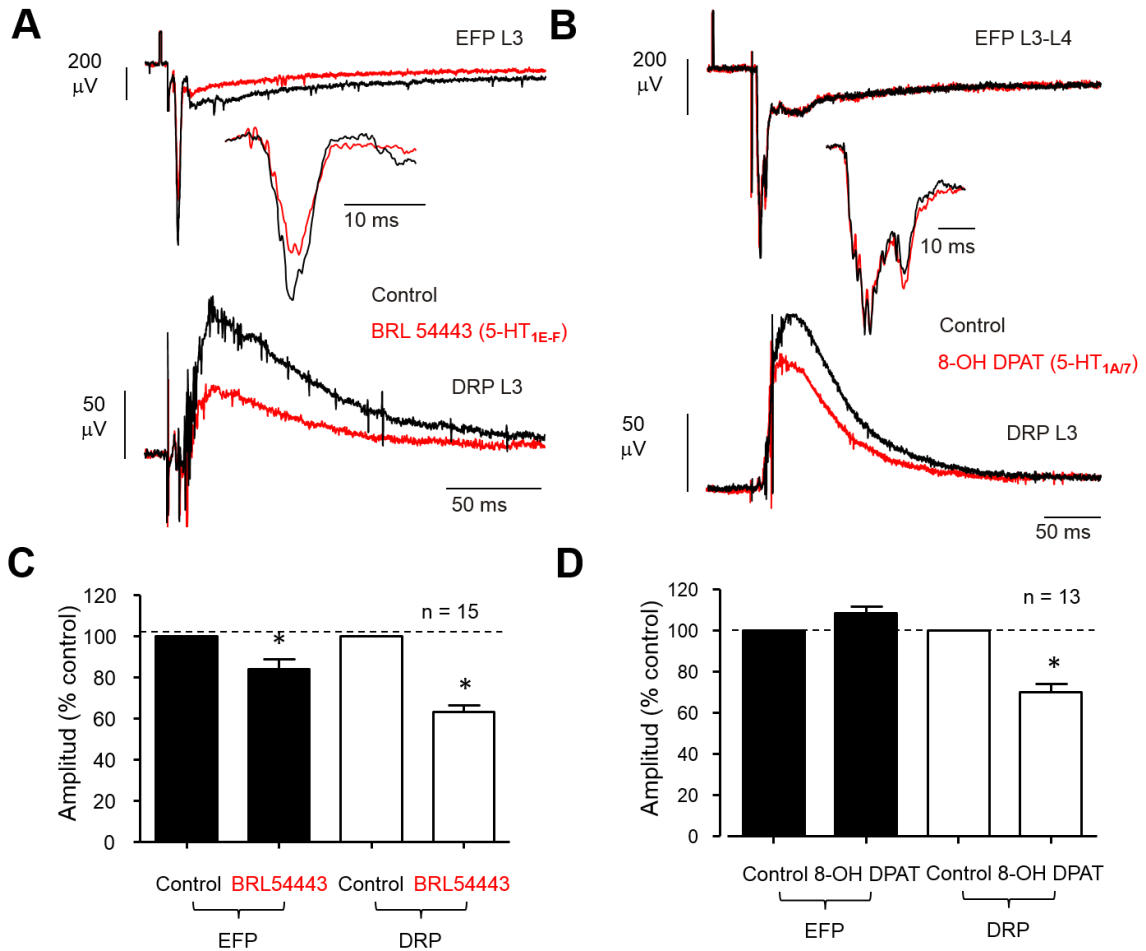


Figura 34. El agonista a los receptores 5-HT_{1E} y _{1F}, deprime los EFPs y los DRPs. El agonista a los receptores 5-HT_{1A} y ₇ deprime únicamente los DRPs. A y B, EFPs registrados en el cuerno dorsal a nivel L₃ (*panel superior*) y DRPs registrados en la raíz dorsal L₃ (*panel inferior*) en condiciones control (negro) y diez minutos después de la aplicación de BRL54443 10 μ M (A, rojo) y 8-OH-DPAT 10 μ M (B, rojo). Los insertos en A y B muestran un acercamiento al componente monosináptico de los EFPs. C, gráfica resumen de los efectos del BRL54443 en los EFPs (barra negra) y en los DRPs (barra blanca) producidos por la estimulación del nervio tibial. Las barras representan el porcentaje de la amplitud promedio (\pm E.E.) con respecto al control tras la aplicación del BRL54443 n=15. Nótese la depresión de los EFPs y DRPs en la presencia de BRL54443. Los efectos de BRL54443 sobre los DRPs y EFPs fueron estadísticamente significativos. D, gráfica resumen (mismo formato que en C) de los efectos del 8-OH-DPAT (n=13). Nótese la depresión significativa de los DRPs en la presencia de 8-OH-DPAT sin efecto significativo en los EFPs (Prueba *t* de *Student* pareada, $P < 0.001$). El nervio tibial se estimuló con una intensidad de 4 xU.

El zolmitriptan, un agonista a los receptores 5-HT_{1B/1D}, (D'Amico et al., 2013; Murray et al., 2011; Kayser et al., 2002), redujo los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral en el nervio Tibial (2 xU) de manera similar

a la 5-HT (Figura 35). En presencia de zolmitriptan 1 μ M, la amplitud de los DRPs y del componente monosináptico de los EFPs registrados en condiciones control (Figura 35A, trazos en negro) se deprimió 35 y 74 %, respectivamente, en el experimento mostrado en la Figura 35A (trazos en verde). El promedio de depresión del componente monosináptico de los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de nervio Tibial 2 xU, fue de 55 ± 5 % y 66 ± 8 % (n=6) con respecto al control (Figura 35B, Tib). La reducción en la amplitud de los EFPs sugiere que la 5-HT actúa a nivel presináptico reduciendo la eficacia sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral tras la activación de los receptores 5-HT_{1B/1D}. La reducción de la amplitud de los DRPs puede deberse a una reducción en la eficacia sináptica de las fibras aferentes, o también a una acción inhibitoria por la activación de los receptores 5-HT_{1B/1D} presentes en las interneuronas que median la PAD.

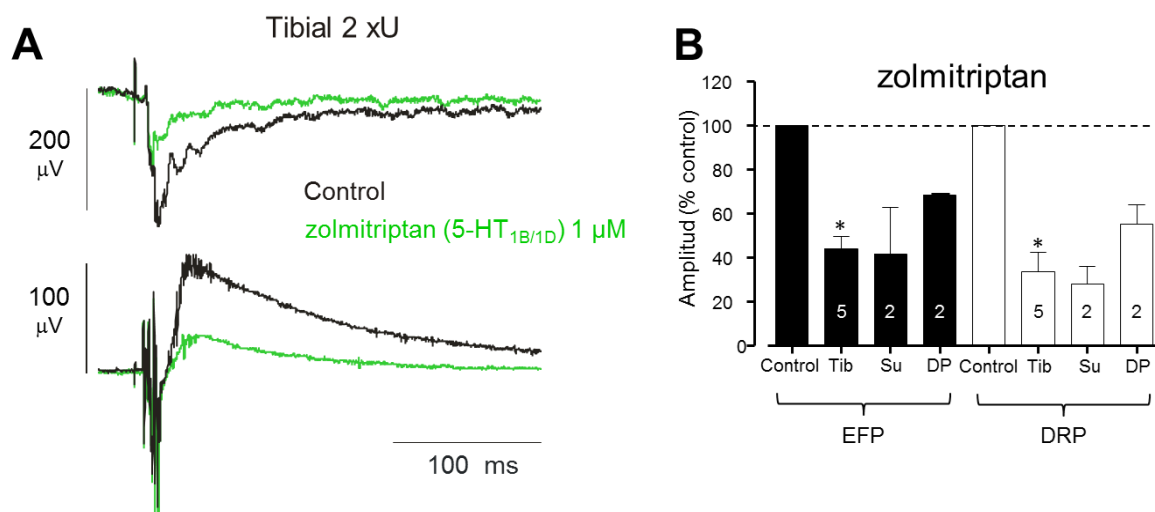


Figura 35. El agonista a los receptores 5-HT_{1B/1D}, zolmitriptan, deprime los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y de raíz dorsal (DRP) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral. A, EFPs registrados en el cuerno dorsal a nivel L₄ (*trazos superiores*) y DRPs registrados en la raíz dorsal L₄ (*trazos inferiores*) en condiciones control (negro) y ocho minutos después de la aplicación de zolmitriptan 1 μ M (verde). **B,** gráfica resumen de los efectos de zolmitriptan (1 μ M) sobre los EFPs (barras negras) y DRPs (barras blancas) producidos por la estimulación de los nervios Tibial (Tib, n=5), Sural (Su, n=2) y Peroneo Profundo (DP, n=2). Las barras representan la amplitud promedio (\pm D.E.) tras la aplicación de zolmitriptan con respecto al control (100%). La depresión de los EFPs y DRPs producidos por la estimulación del nervio tibial en presencia de zolmitriptan fue estadísticamente significativa (*) (Prueba *t* de Student pareada, P<0.001; únicamente para los experimentos cuando se estimuló el nervio Tibial).

Con el objetivo de identificar si el efecto del zolmitriptan es selectivo para fibras musculares o cutáneas, investigamos su efecto sobre los EFPs y DRPs producidos por la estimulación del nervio cutáneo, Sural, y del nervio muscular, Peroneo Profundo (DP). Aunque sólo se realizaron 2 experimentos, nuestros hallazgos indican que el zolmitriptan 10 μM produjo una depresión de los EFPs y DRPs. En promedio, el zolmitriptan redujo los EFPs y DRPs producidos por la estimulación del nervio Sural en un 58 y 71 % ($n=2$) con respecto al control (Figura 35B, Su), y por la estimulación del nervio DP en 31 y 44 % ($n=2$) con respecto al control (Figura 35B, DP).

Con la finalidad de examinar si el zolmitriptan ejerce un efecto dependiente de la concentración similar al efecto producido por la 5-HT, es decir, una depresión de los DRPs y un efecto dual (facilitación y depresión) de los EFPs, se realizaron curvas concentración-respuesta y se calculó la concentración efectiva 50 (EC_{50}). El zolmitriptan se aplicó en concentraciones acumulativas de 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM . Comparando la curva concentración-respuesta del zolmitriptan (Figura 36A, verde) con la obtenida con la 5-HT (Figura 36A, rojo), se puede observar que los DRPs producidos por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral fueron deprimidos por el zolmitriptan en una manera dependiente de la concentración ($\text{EC}_{50} = 0.16 \mu\text{M}$), muy similar a aquella de la 5-HT (0.6 μM). No obstante, el zolmitriptan sólo produjo una depresión de los EFPs, sin el efecto dual que produce 5-HT. Estos hallazgos sugieren que el zolmitriptan actúa mediante un solo mecanismo, o activando solamente un subtipo de receptores, i.e. 5-HT_{1B/1D} (Figura 36B, verde).

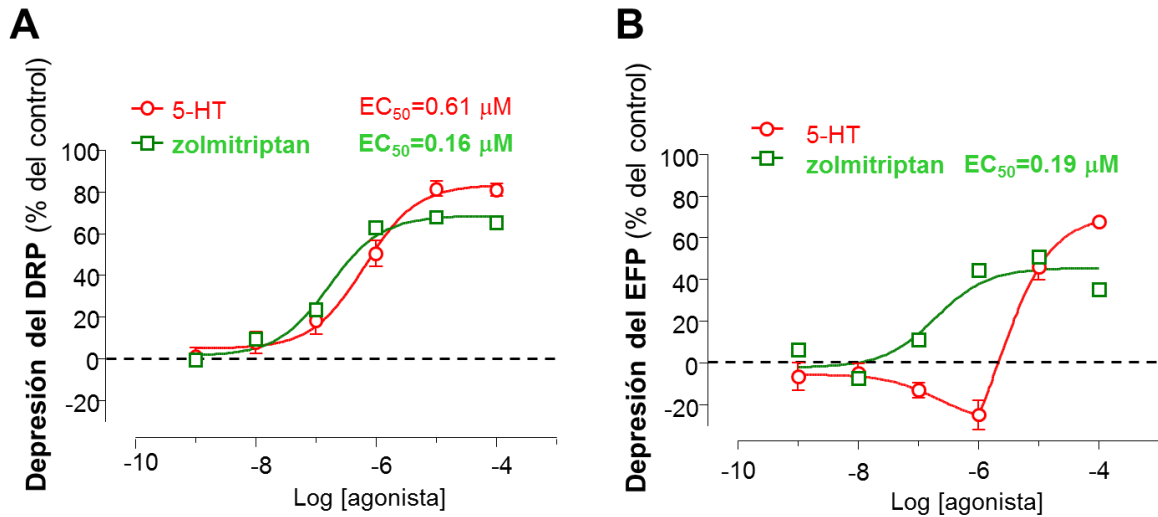


Figura 36. El agonista a los receptores 5-HT_{1B/1D}, zolmitriptan, deprime los potenciales de raíz dorsal (DRPs) y los potenciales extracelulares de campo (EFPs) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral en una manera dependiente de la concentración. Curva concentración-respuesta del efecto de zolmitriptan (verde) y 5-HT (rojo) sobre la amplitud pico de los DRPs (A) y EFPs (B). Los agonistas se aplican a concentraciones acumulativas de 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM . Los DRPs y EFPs se producen por la estimulación del nervio Tibial a una intensidad 4 xU. Cada punto en la gráfica representa el porcentaje de inhibición, o facilitación, de los DRPs y EFPs con respecto al control. A diferencia de la 5-HT, el zolmitriptan solamente deprime los EFPs.

Con el objetivo de determinar si el zolmitriptan modula la excitabilidad de las fibras aferentes, se registró el potencial DC en las raíces dorsales en presencia de zolmitriptan. Observamos que a diferencia de la 5-HT, la aplicación de zolmitriptan 1 μM (Figura 37D) no produce un potencial negativo de DC, es decir, una despolarización (Figura 37C). La ausencia de un cambio en el potencial DC después de la aplicación de zolmitriptan sugiere que la activación de los receptores 5-HT_{1B/1D} no modifica la excitabilidad de las fibras aferentes.

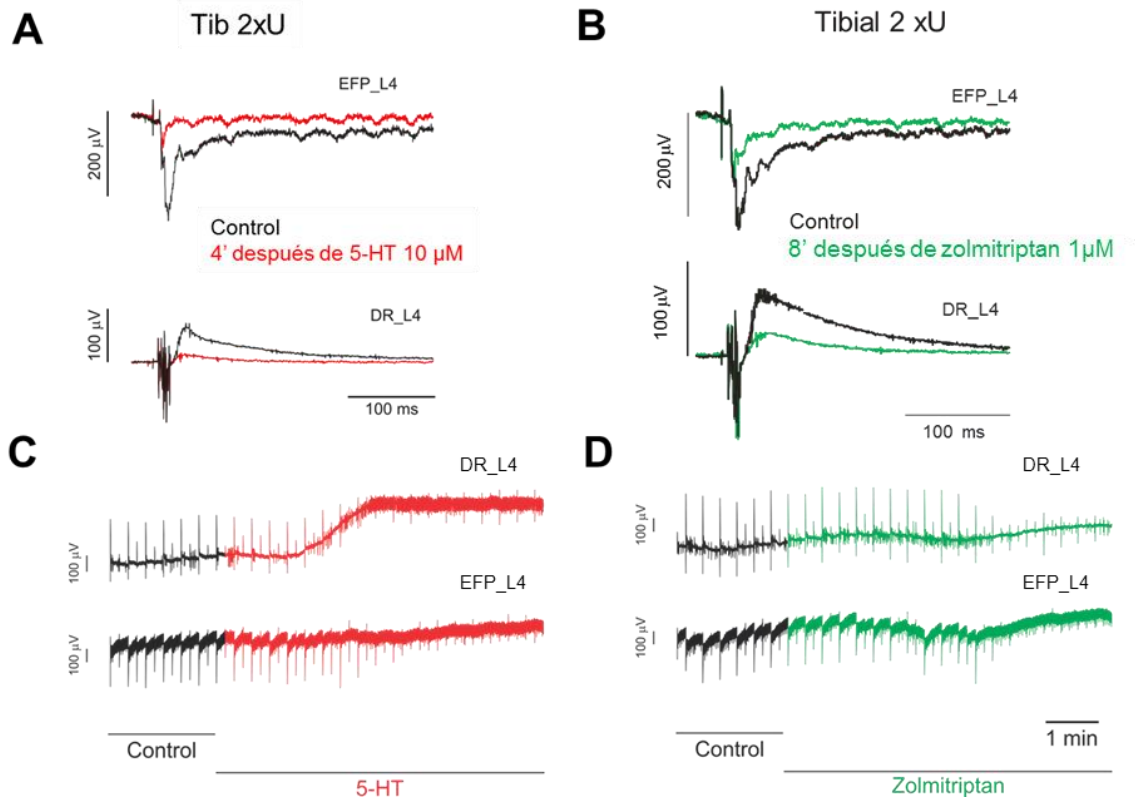


Figura 37. Efecto de la 5-HT y del zolmitriptan sobre el potencial DC registrado en las raíces dorsales. A y B, EFPs (*trazos superiores*) y DRPs (*trazos inferiores*) producidos por la estimulación del nervio Tibial 2 xU, en condiciones control (negro), en presencia de 5-HT 10 μM (rojo) y zolmitriptan 1 μM (verde), respectivamente. Nótese la depresión similar de los EFPs y DRPs producida por ambos fármacos. C y D, registro continuo del potencial DC registrado en una raíz dorsal (DR, *trazos superiores*) y a través de la micropipeta (*trazos inferiores*), en condiciones control (negro), en presencia de 5-HT (rojo) y zolmitriptan (verde), respectivamente. Nótese que la aplicación de 5-HT produce una despolarización de raíz dorsal, la cual no se observa después de la aplicación de zolmitriptan. Las líneas verticales indican los artefactos de estimulación,

Con el objetivo de determinar si la depresión de los EFPs producida por el agonista a los receptores 5-HT_{1B/1D}, zolmitriptan, es de origen presináptico, procedimos a investigar el efecto de este agonista sobre la depresión homosináptica. Para este propósito, registramos las EPSCs en interneuronas del cuerno dorsal profundo producidas por la estimulación del nervio Tibial con intensidades 2 xU. Para estimar la depresión homosináptica utilizamos el protocolo de estimulación pareada aplicando la estimulación condicionante y de prueba a las fibras aferentes homónimas en el nervio tibial con un intervalo de tiempo de 50 ms entre ambos estímulos. Observamos que el zolmitriptan (1 μM) reduce la depresión

homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas. En la Figura 38A se puede observar que las EPSCs producidas por el pulso de prueba (trazo negro) se deprimen un 69 % al aplicar una estimulación condicionante a las fibras aferentes homónimas (trazo azul). La reducción promedio de la amplitud de las EPSCs fue de $59 \pm 6 \%$ ($n=3$) con respecto a la amplitud de las EPSCs producidas por el pulso de prueba (Figura 38B, barra negra). En presencia de zolmitriptan $1 \mu\text{M}$, la amplitud de las EPSCs producidas por el estímulo de prueba (trazo naranja) se reduce un 31 % al aplicar una estimulación condicionante a las fibras aferentes homónimas. La reducción promedio de la amplitud de las EPSCs fue de $35 \pm 7 \%$ ($n=3$) con respecto al pulso de prueba (Figura 38B, barra verde).

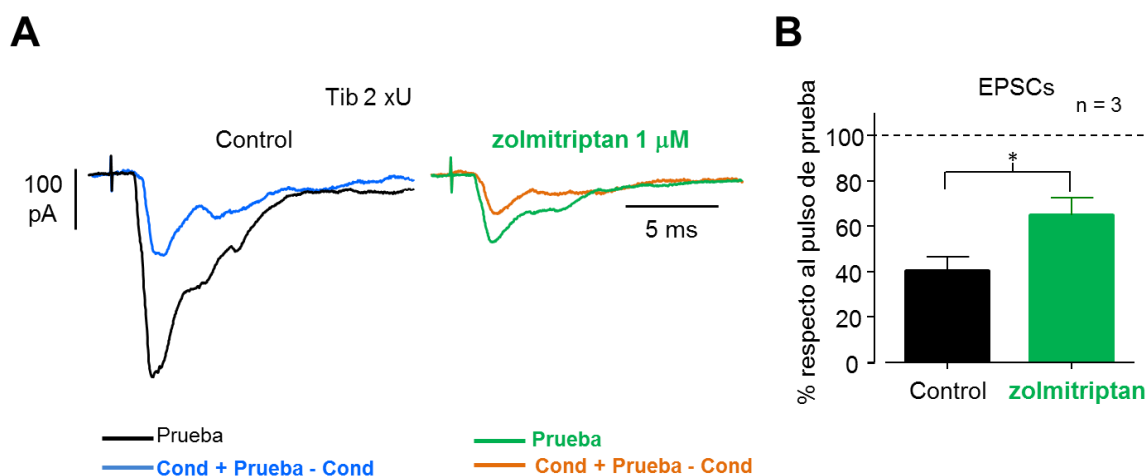


Figura 38. El zolmitriptan reduce la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas a través de la activación de receptores presinápticos 5-HT_{1B/1D}. **A**, EPSCs producidas por el estímulo de prueba en condiciones control (trazo en negro) y en presencia de zolmitriptan $1 \mu\text{M}$ (trazo en verde). Al aplicar una estimulación condicionante a las fibras aferentes homónimas del nervio Tibial en condiciones control (trazo en azul) y en presencia de zolmitriptan $1 \mu\text{M}$ (trazo en naranja), con un intervalo de 50 ms entre el pulso condicionante y de prueba, las EPSCs se deprimen. Nótese que la magnitud de la depresión de las EPSCs es mayor en condiciones control. Las EPSCs se producen por la estimulación del nervio Tibial a una intensidad 2 xU. **B**, gráfica resumen de la depresión homosináptica de las EPSCs producida por la estimulación condicionante de fibras aferentes homónimas en condiciones control (barra negra) y en presencia de zolmitriptan $1 \mu\text{M}$ (barra verde). Las barras representan el porcentaje de la amplitud promedio (\pm E.E.) con respecto al estímulo de prueba ($n=3$). Nótese la reducción en la depresión homosináptica en presencia de zolmitriptan (Prueba *t* de Student pareada, $P<0.001$).

La reducción de la depresión homosináptica producida por el zolmitriptan sugiere que sus efectos ocurren a nivel presináptico, reduciendo la liberación del neurotransmisor en las fibras aferentes de bajo umbral a través de la activación de los receptores 5-HT_{1B} y/o 5-HT_{1D}.

Como describimos previamente, la depresión heterosináptica tiene un origen GABAérgico y es mediada por la activación de los receptores GABA_A. Nuestro siguiente objetivo fue determinar el efecto del zolmitriptan sobre la depresión heterosináptica y compararlo con el efecto producido por la 5-HT. Para este fin, utilizamos el protocolo de estimulación pareada aplicando el estímulo condicionante en la raíz dorsal L₃ y el estímulo de prueba en la raíz dorsal L₄ (aferentes heterónimas) con intensidades 2 xU e intervalos de tiempo variables (25 ms a 10 s) entre ambos estímulos. En la Figura 39 se ilustra el curso temporal de la depresión heterosináptica de los EFPs en condiciones control (círculos negros), en presencia de 5-HT (triángulos rojos) y en presencia de zolmitriptan (cuadros verdes). Se puede observar claramente que de manera similar al efecto de la 5-HT, el zolmitriptan también reduce la depresión heterosináptica.

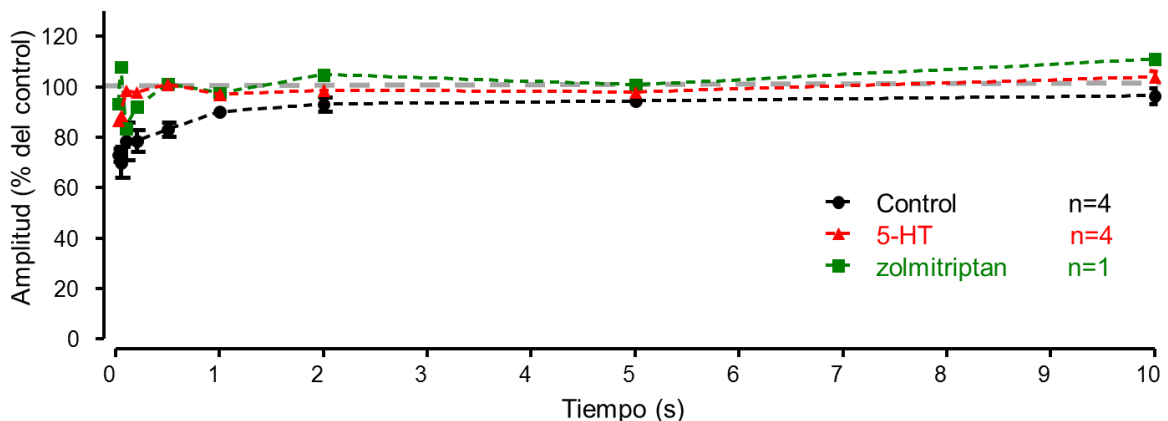


Figura 39. El zolmitriptan reduce la depresión heterosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes heterónimas. Mismo formato que en la Figura 24. Curso temporal de la depresión de los EFPs producidos por la estimulación de la raíz dorsal L₄ al aplicar una estimulación condicionante a fibras aferentes heterónimas en la raíz dorsal L₃. Ambas raíces se estimularon con intensidades 2 xU. Se muestran las gráficas promedio del curso temporal de la depresión heterosináptica de los EFPs en condiciones control (negro), en presencia de 5-HT 10 μM (rojo) y zolmitriptan 1 μM (verde). Se puede notar una clara reducción de la depresión heterosináptica en presencia de zolmitriptan, de manera similar al efecto producido por la 5-HT.

La disminución de la depresión heterosináptica en presencia de 5-HT y zolmitriptan podría deberse a una reducción en la transmisión sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral, o a una acción inhibitoria de la 5-HT en las vías neuronales que median la PAD producida por las fibras aferentes de bajo umbral, a través de la activación de los receptores 5-HT_{1B/1D}. Para investigar los efectos del zolmitriptan en la transmisión sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral, se examinaron los efectos de este fármaco sobre las EPSCs monosinápticas (y simultáneamente sobre los DRPs) registradas en interneuronas del cuerno dorsal al estimular nervios periféricos con intensidades ≤ 2 xU, y sobre las propiedades pasivas de las interneuronas registradas.

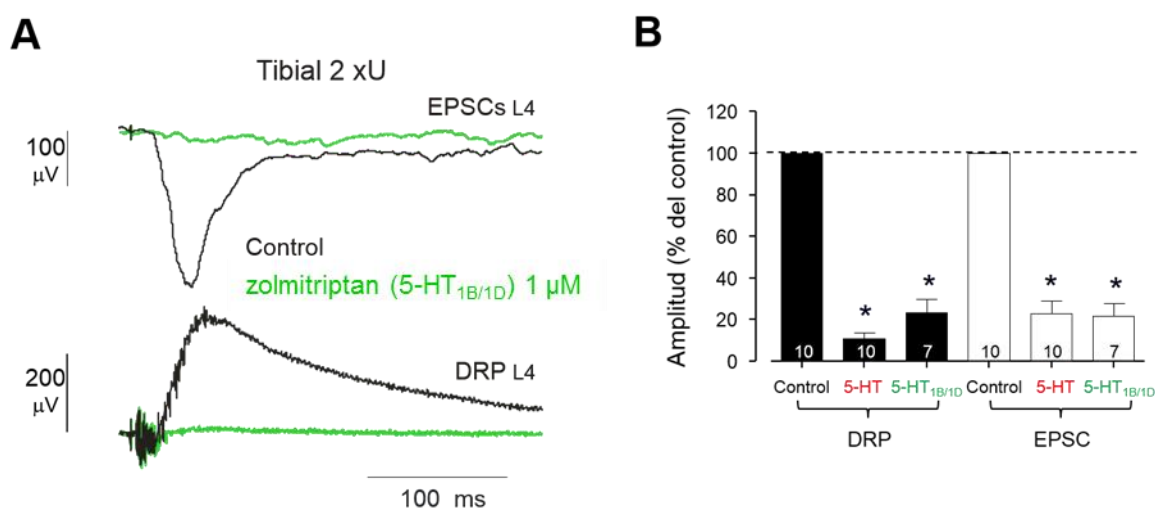


Figura 40. El zolmitriptan deprime las corrientes posinápticas excitadoras (EPSCs) monosinápticas y los potenciales de raíz dorsal (DRPs) producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral. **A**, EPSCs (*panel superior*) y DRPs (*panel inferior*) en condiciones control (negro) y en presencia de zolmitriptan (verde). Las EPSCs se registran en interneuronas del cuerno dorsal en la configuración de célula entera. Las EPSCs se producen por la estimulación del nervio tibial con intensidades ≤ 2 xU. Los DRPs se registran en la raíz dorsal L₄. **B**, gráfica resumen de los efectos de la 5-HT y del zolmitriptan sobre los DRPs (barras negras) y EPSCs (barras blancas) producidos por la estimulación de nervios periféricos con intensidades ≤ 2 xU. Las barras representan la amplitud promedio (\pm E.E.) con respecto al control (100%). La depresión de los DRPs y EPSCs fue estadísticamente significativa (*) (Prueba *t* de Student pareada, $P < 0.0001$).

En la Figura 40 se puede observar que la amplitud del componente monosináptico de las EPSCs y de los DRPs registrados en condiciones control (trazo negro) se deprimió en presencia de zolmitriptan 1 μ M (trazo verde). En

promedio, las EPSCs y los DRPs se deprimieron en un 52 ± 6 y 76 ± 6 % ($n=7$) con respecto al control, respectivamente. Los efectos fueron similares a los producidos por la 5-HT (Figura 40B).

La depresión de las EPSCs producida por el zolmitriptan ocurrió sin cambios significativos en las propiedades pasivas de membrana de las neuronas registradas en el cuerno dorsal. Con respecto a los valores control, la R_m se incrementó un 4 ± 21 % ($n=4$) (Figura 41A), la C_m se redujo 5 ± 16 % ($n=4$) (Figura 41B) y la τ_m aumentó 2 ± 16 % ($n=4$) (Figura 41C). Estos resultados sugieren que la depresión de las EPSCs producida por el zolmitriptan se debe a la activación de receptores 5-HT_{1B/1D} en las terminales de las fibras aferentes de bajo umbral, sin descartar efectos a nivel postsináptico (ver discusión).

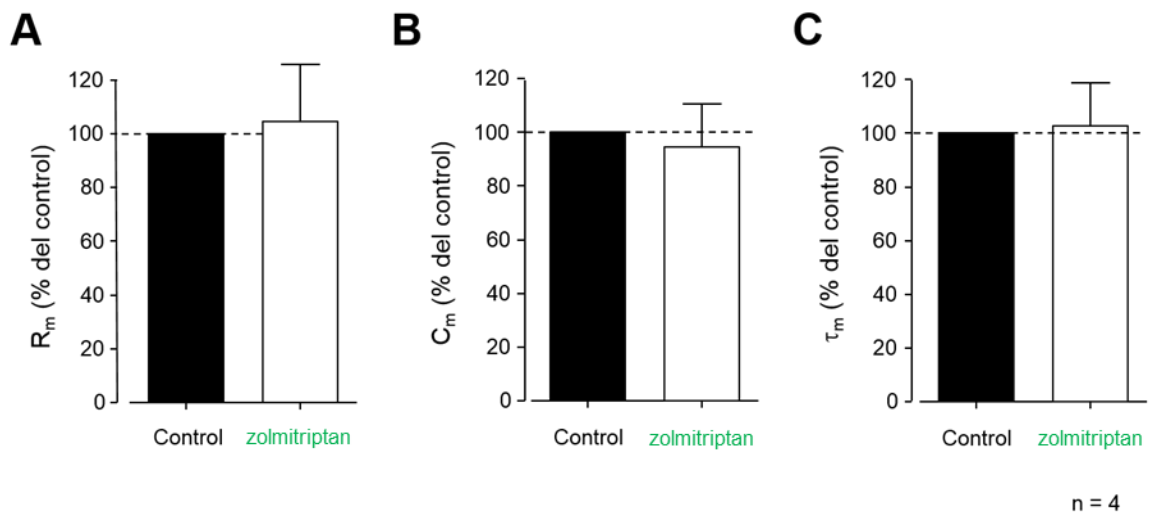


Figura 41. El zolmitriptan deprime las EPSCs monosinápticas sin cambios en las propiedades pasivas de membrana de las neuronas registradas en el cuerno dorsal. Gráficas resumen de los efectos del zolmitriptan 1 μ M (barras blancas) sobre la resistencia de membrana R_m (A), la capacitancia de membrana C_m (B) y la constante de tiempo de membrana τ_m (C). Las barras blancas representan la amplitud promedio (\pm E.E.) con respecto al control (100%, barras negras). Prueba *t* de Student pareada, $P < 0.0001$.

Con el objetivo de determinar si el efecto de la 5-HT sobre la modulación de la eficacia sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral ocurre principalmente a través de la activación de los receptores 5-HT_{1B/1D}, realizamos un protocolo de oclusión. Primeramente se registraron las EPSCs producidas por la estimulación del

nervio Tibial con una intensidad 2 xU (Figura 42A, trazo negro). Enseguida, se aplicó zolmitriptan 1 μ M y la amplitud de las EPSCs se redujo un 68 % con respecto al control (Figura 42A, trazo verde). Posteriormente, en presencia de zolmitriptan 1 μ M, se aplicó 5-HT 10 μ M sin producirse una depresión adicional de las EPSCs (71 % con respecto al control) (Figura 42A, trazo rojo). En promedio, el zolmitriptan deprimió las EPSCs un $69 \pm 1\%$ (Figura 42B, barra verde) con respecto al control. En presencia de zolmitriptan + 5-HT las EPSCs se deprimieron un $76 \pm 10\%$ (Figura 42B, barra roja) con respecto al control. La ausencia de una diferencia significativa entre la depresión producida por zolmitriptan y la producida por zolmitriptan + 5-HT, nos permite concluir que el efecto de la 5-HT sobre la depresión de las EPSCs se debe principalmente a la activación de los receptores 5-HT_{1B/1D}.

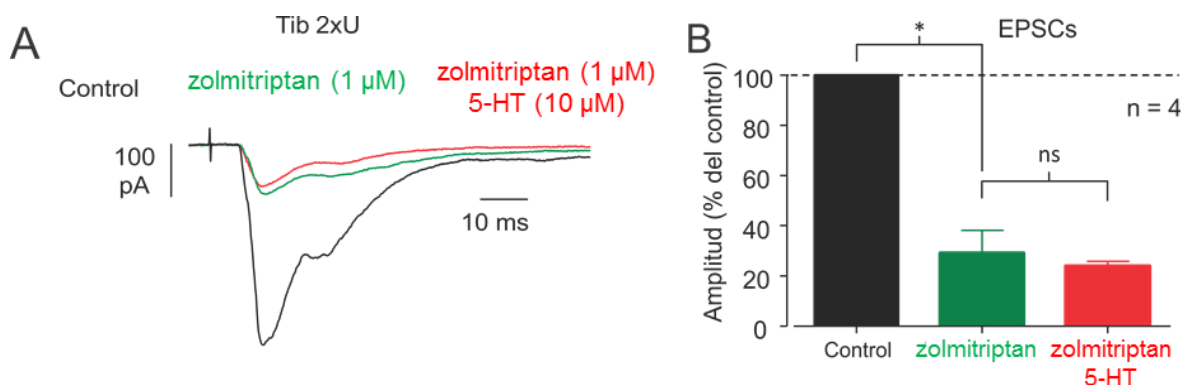


Figura 42. La depresión de las EPSCs producida por la 5-HT se debe principalmente a la activación de los receptores 5-HT_{1B/1D}. **A**, EPSCs producidas por la estimulación del nervio Tibial 2 xU en condiciones control (negro), en presencia de zolmitriptan (verde) y en presencia de zolmitriptan + 5-HT (rojo), a las concentraciones indicadas. Las EPSCs se registraron en interneuronas del cuerno dorsal en la configuración de célula entera. **B**, gráfica resumen de los efectos del zolmitriptan (barra verde) y 5-HT + zolmitriptan (barra roja) sobre las EPSCs producidas por la estimulación de aferentes de bajo umbral, con respecto al control (barra negra). Las barras representan la amplitud promedio (\pm E.E.) con respecto al control (100%). Nótese que la aplicación de 5-HT no modifica de manera significativa la depresión producida por el zolmitriptan (prueba *t* de Student pareada, $P < 0.0001$).

Puesto que el zolmitriptan no es un agonista específico, ya que activa tanto a los receptores 5-HT_{1B} como 5-HT_{1D}, para dilucidar si uno o ambos subtipos de

receptores son los responsables del efecto del zolmitriptan, procedimos a aplicar agonistas específicos para cada uno de subtipos de receptores.

El agonista selectivo de los receptores 5-HT_{1D}, PNU142633 (1 μ M), no afectó los EFPs ni los DRPs producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral en el nervio tibial con una intensidad 2 xU (Figura 43). Por exclusión, estos datos sugieren que los efectos producidos por zolmitriptan se deberían a la activación de los receptores 5-HT_{1B}.

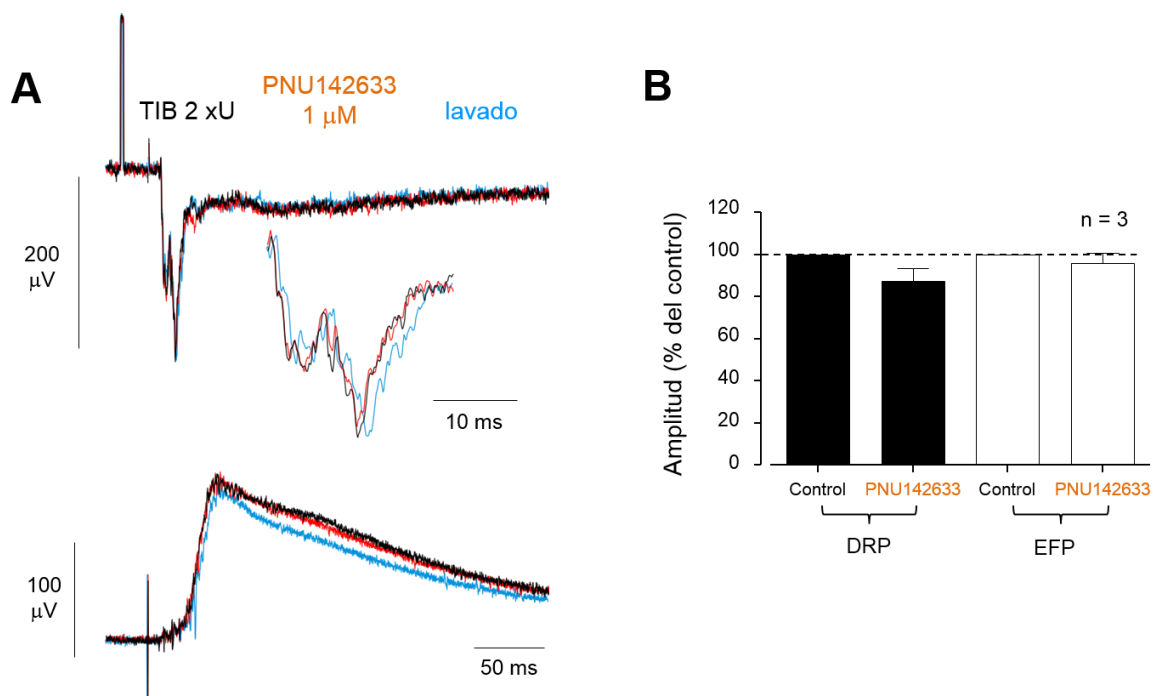


Figura 43. El PNU142633, agonista selectivo de los receptores 5-HT_{1D}, no afecta los EFPs ni los DRPs. **A**, panel superior, EFPs registrados en el cuerno dorsal a nivel L4. Panel inferior, DRPs registrados en la raíz dorsal L₃ en condiciones control (negro), en presencia del PNU142633 1 μ M (rojo) y después de lavado (azul). El inserto muestra un acercamiento a los componentes de menor latencia de los EFPs. **B**, gráfica resumen de los efectos del PNU142633 sobre los DRPs (barras negras) y EFPs (barras blancas) producidos por la estimulación del nervio Tibial. Las barras representan la amplitud promedio (\pm E.E., n=3) tras la aplicación de PNU142633 con respecto al control (100%). El nervio Tibial se estimuló con una intensidad 2 xU. (*) (Prueba *t* de Student pareada, P<0.01).

En contraste con el PNU142633 (1 μ M), la aplicación del agonista selectivo de los receptores 5-HT_{1B} de roedores, CP-93,129 (1 μ M), produjo una depresión en

la amplitud del componente monosináptico de los EFPs y de los DRPs en un 39 y 67 %, respectivamente (Figura 44A). Estos hallazgos refuerzan el papel de los receptores 5-HT_{1B}. En promedio, este agonista deprimió significativamente los DRPs y el componente monosináptico de los EFPs en un 56 ± 5 y 38 ± 7 % (n=10) con respecto al control, respectivamente (Figura 44B). La depresión del componente monosináptico de los EFPs sugiere una reducción de la efectividad sináptica de las fibras aferentes, probablemente por la activación de receptores presinápticos. Los DRPs podrían deprimirse como consecuencia de una reducción en la transmisión sináptica de las fibras aferentes estimuladas, sin embargo no es posible descartar una modulación inhibitoria sobre las interneuronas que median la PAD.

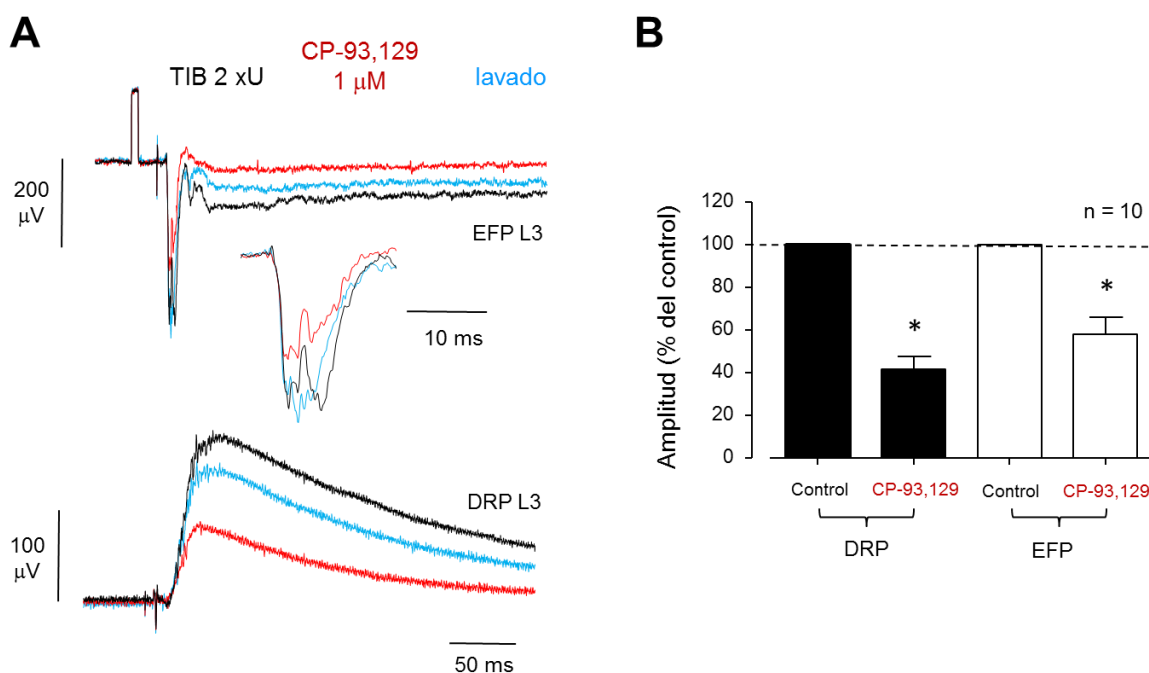


Figura 44. El CP-93,129, agonista selectivo de los receptores 5-HT_{1B}, deprime los EFPs y DRPs. **A**, *panel superior*, EFPs registrados en el cuerno dorsal a nivel L₃. *Panel inferior*, DRPs registrados en la raíz dorsal L₃ en condiciones control (negro), en presencia del CP-93,129 1 μM (rojo) y después de lavado (azul). El inserto muestra un acercamiento a los componentes de menor latencia de los EFPs. **B**, gráfica resumen de los efectos del CP-93,129 sobre los DRPs (barras negras) y EFPs (barras blancas) producidos por la estimulación del nervio Tibial con intensidades 2 xU. Las barras representan la amplitud promedio (\pm E.E., n=10) tras la aplicación del CP-93,129 con respecto al control (100%). Nótese la depresión significativa de los DRPs y EFPs en presencia de CP-93,129. (*) (Prueba *t* de Student pareada, P<0.001).

Como describimos previamente, el zolmitriptan reduce la depresión homosináptica de las EPSCs producidas por la estimulación de fibras aferentes homónimas, lo cual sugiere que actúa a nivel presináptico reduciendo la eficacia sináptica de las fibras aferentes. El siguiente objetivo fue determinar el efecto del agonista a los receptores 5-HT_{1B}, CP-93,129, sobre la depresión homosináptica y compararlo con el efecto producido por la 5-HT. De igual manera que para la 5-HT y el zolmitriptan, utilizamos el protocolo de estimulación pareada para estimar la depresión homosináptica. La Figura 45 muestra el curso temporal de la depresión de los EFPs en condiciones control (círculos negros), en presencia de 5-HT (triángulos rojos) y en presencia de CP-93,129 1 μ M (cuadros verdes). Se puede observar claramente que el CP-93,129, produce también una reducción de la depresión homosináptica, de manera similar al efecto de la 5-HT. Estos hallazgos en su conjunto indican que los receptores 5-HT_{1B} se encuentran presentes en las terminales de las fibras aferentes de bajo umbral reduciendo la eficacia sináptica de las mismas.

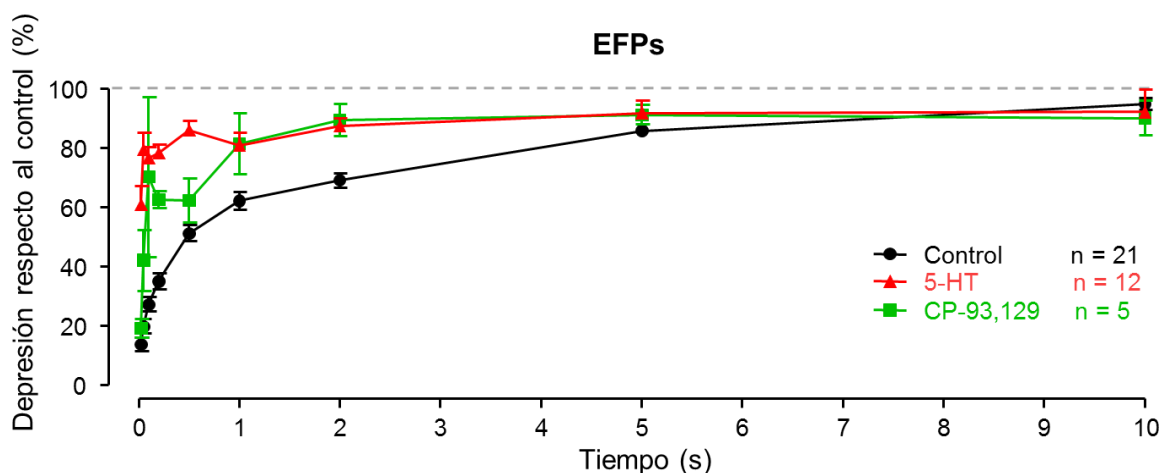


Figura 45. El agonista 5-HT_{1B}, CP-93,129, reduce la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas. Mismo formato que la Figura 24. Curso temporal de la depresión homosináptica de los EFPs producidos por la estimulación del nervio Tibial (2 xU) al aplicar una estimulación condicionante a las fibras aferentes homónimas en el mismo nervio, en condiciones control (negro), en presencia de 5-HT 10 μ M (rojo) y de CP-93,129 1 μ M (verde). Se puede notar una clara reducción de la depresión homosináptica en presencia de CP-93,129 de manera similar a la curva obtenida en presencia de 5-HT.

Debe enfatizarse que durante el transcurso del proyecto también se examinó la participación de los receptores 5-HT₂, 5-HT₃ y 5-HT₄ en la modulación de la transmisión sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral y en las vías que median la PAD. A continuación se resumen los efectos de algunos agonistas y antagonistas. El agonista a los receptores 5-HT₂, DOI (10 µM), deprimió los DRPs (Figura 46A, trazo superior) en un 23%, sin efecto sobre los EFPs (Figura 46A, trazo inferior). En promedio el DOI (10 µM) deprimió de manera significativa la amplitud de los DRPs en un $13 \pm 3\%$ (n=15) respecto al control, sin producir cambios en los EFPs. La aplicación del antagonista a los 5-HT₂, ketanserina (10 µM) (Figura 46B, trazo verde) no revirtió los efectos de la 5-HT (Figura 46B, trazo rojo) sobre el componente monosináptico de los EFPs y los DRPs. Estos resultados descartan la posible participación de los receptores 5-HT₂ en la modulación serotoninérgica de la transmisión sináptica de fibras aferentes de bajo umbral. Posiblemente los receptores 5-HT₂ participen en un modulación inhibitoria de las vías que median la PAD producida por la estimulación de las mismas fibras.

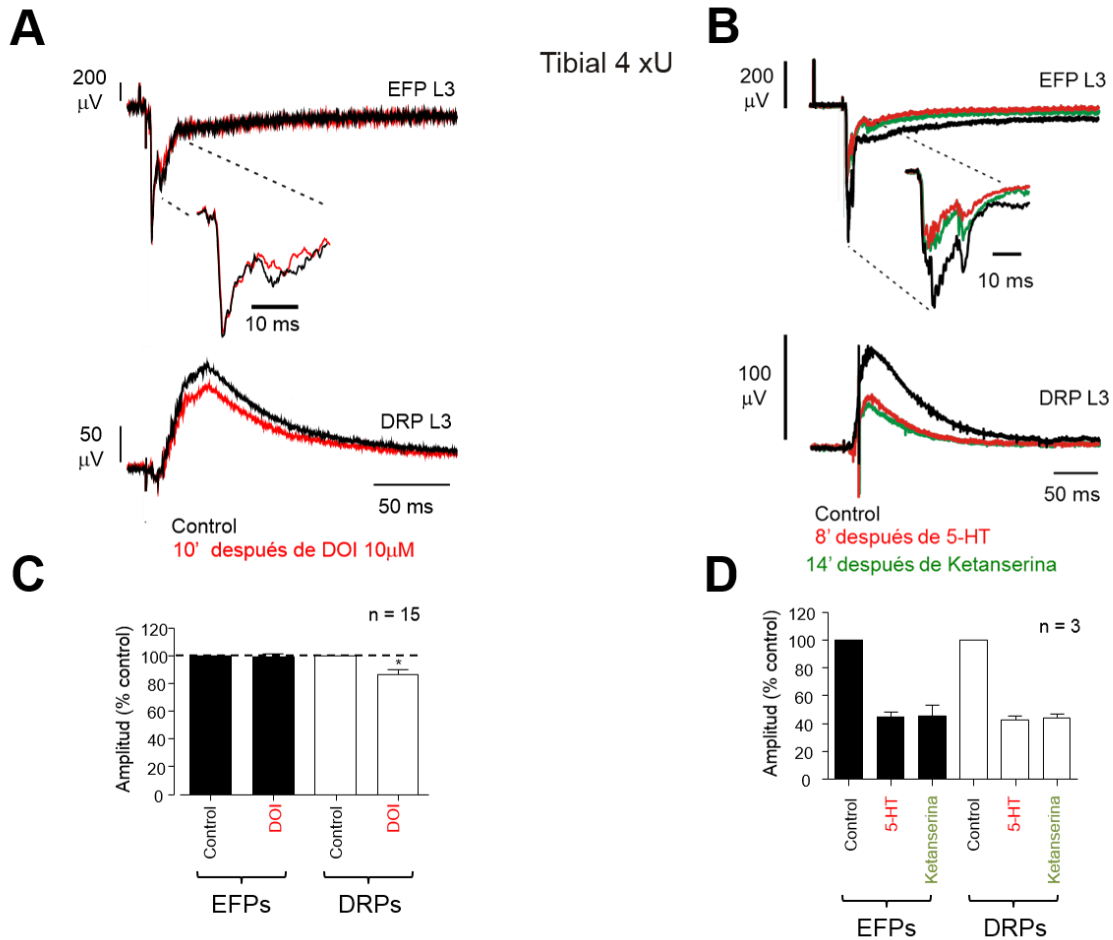


Figura 46. El DOI, agonista de los receptores 5-HT₂, deprime los DRPs sin efecto sobre los EFPs, mientras que el antagonista de los receptores 5-HT₂, ketanserina, no revierte los efectos de 5-HT. **A**, EFPs (*trazos superiores*) y DRPs (*trazos inferiores*) producidos por la estimulación del nervio Tibial 4 xU y registrados en el cuerno dorsal a nivel L₃ y en la raíz dorsal L₃, respectivamente, en condiciones control (negro) y diez minutos después de la aplicación del agonista a los receptores 5-HT₂, DOI 10 μ M (rojo). **B**, mismo formato que en A, ocho minutos después de la aplicación de 5-HT 10 μ M (rojo) y catorce minutos después de la aplicación de ketanserina 10 μ M (verde). Los insertos en A y B muestran un acercamiento al componente monosináptico de los EFPs. **C**, gráfica resumen de los efectos del DOI sobre los EFPs (barras negras) y DRPs (barras blancas) producidos por la estimulación del nervio tibial con una intensidad 4 xU. Las barras representan la amplitud promedio (\pm E.E., n=15) tras la aplicación del DOI con respecto al control (100%). Nótese la depresión moderada, pero significativa, de los DRPs en la presencia de DOI (Prueba *t* de Student pareada, P<0.05). **D**, gráfica resumen de los efectos de la 5-HT y la posterior aplicación de ketanserina sobre los EFPs (barras negras) y DRPs (barras blancas) producidos por la estimulación del nervio Tibial 4 xU. Las barras representan la amplitud promedio (\pm E.E., n=3) tras la aplicación de 5-HT y ketanserina con respecto al control (100%). Nótese que la ketanserina no revierte los efectos producidos por la 5-HT.

El agonista de los receptores 5-HT₃, SR572275 (10 μM), deprimió los DRPs (Figura 47A, trazo inferior) en un 20% sin efecto sobre los EFPs (Figura 47A, trazo superior).

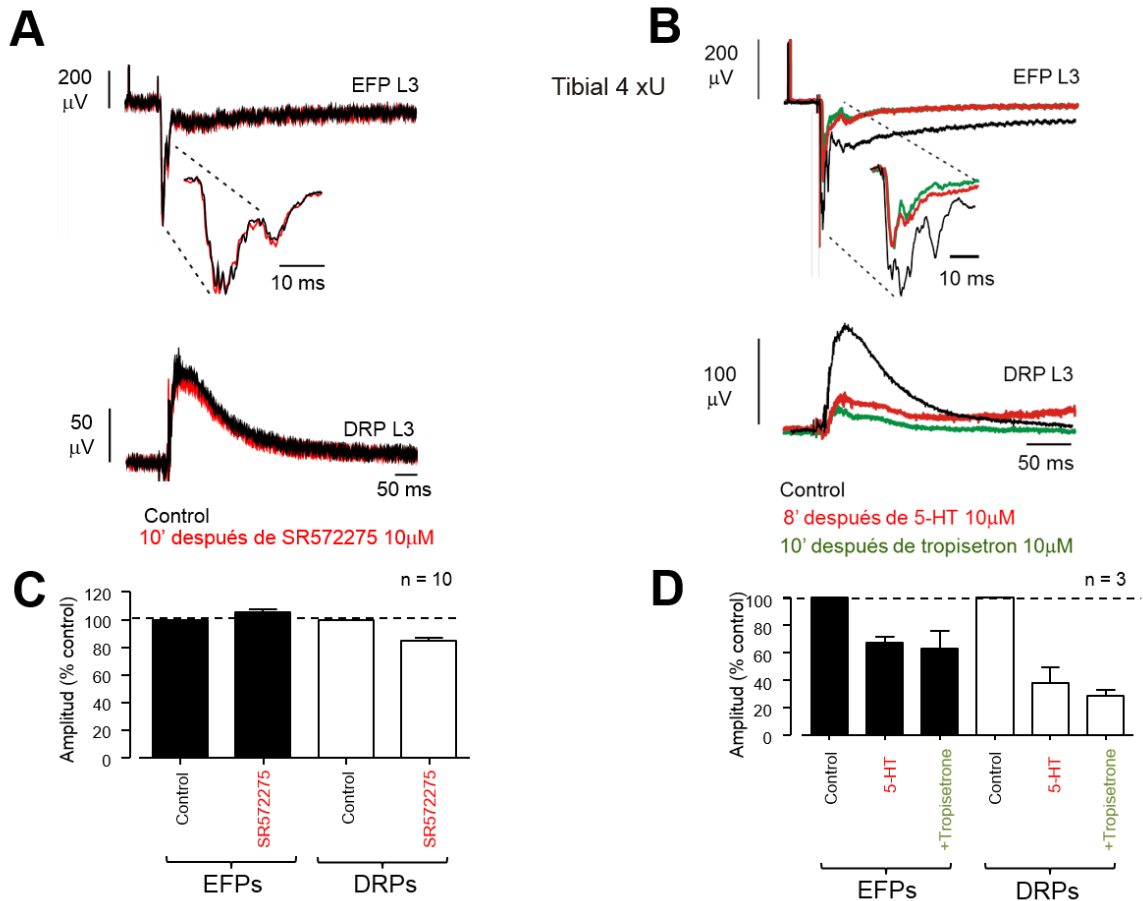


Figura 47. El agonista de los receptores 5-HT₃, SR572275, deprime los DRPs sin efecto sobre los EFPs, mientras que el antagonista de los receptores 5-HT₃, tropisetron, no revierte los efectos de 5-HT. **A**, EFPs (trazos superiores) y DRPs (trazos inferiores) producidos por la estimulación del nervio Tibial 4 xU y registrados en el cuerno dorsal a nivel L₃ y en la raíz dorsal L₃, respectivamente, en condiciones control (negro) y diez minutos después de la aplicación del agonista de los receptores 5-HT₃, SR572275 10 μM (rojo). **B**, mismo formato que en A, ocho minutos después de la aplicación de la 5-HT 10 μM (rojo) y diez minutos después de la aplicación del tropisetron 10 μM (verde). Los insertos en A y B muestran un acercamiento al componente monosináptico de los EFPs. **C**, gráfica resumen de los efectos del SR572275 en los EFPs (barras negras) y DRPs (barras blancas) producidos por la estimulación del nervio Tibial con intensidades 4 xU. Las barras representan la amplitud promedio (± E.E., n=10) tras la aplicación de SR572275 con respecto al control (100%). Nótese la depresión moderada, pero significativa, de los DRPs en la presencia de SR572275 (Prueba *t* de Student pareada, P<0.05). **D**, gráfica resumen de los efectos de la 5-HT y la posterior aplicación de tropisetron sobre los EFPs (barras negras) y en los DRPs (barras blancas) producidos por la estimulación del nervio tibial 4 xU. Las barras representan la amplitud promedio (± E.E., n=3) tras la aplicación de 5-HT y tropisetron con respecto al control (100%). Nótese que el tropisetron no revierte los efectos producidos por la 5-HT.

En promedio, el SR575575 (10 μ M) deprimió la amplitud de los DRPs en un $14 \pm 2\%$ (n=10) con respecto al control, sin cambios en los EFPs (Figura 47C). La aplicación del antagonista de los receptores 5-HT₃, tropisetron 10 μ M (Figura 47B, trazo verde) no revirtió los efectos de la 5-HT (Figura 47B, trazo rojo) sobre los DRPs ni sobre el componente monosináptico de los EFPs. Estos resultados descartan la posible participación de los receptores 5-HT₃ en la modulación serotoninérgica de la transmisión sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral y de las vías neuronales que median la PAD producida por la estimulación de las mismas fibras aferentes.

La aplicación del agonista de los receptores 5-HT₄, SC53116 (10 μ M), no produjo cambios significativos en el componente monosináptico de los EFPs ni en los DRPs (Figura 48A). En promedio, el SC53116 deprimió la amplitud de los DRPs en un 3 % (n=2) respecto al control, sin cambios en los EFPs (Figura 48B). Estos resultados sugieren que los receptores 5-HT₄ no están involucrados en la modulación de la efectividad sináptica de las fibras aferentes, ni de las interneuronas que median la PAD producida por la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral.

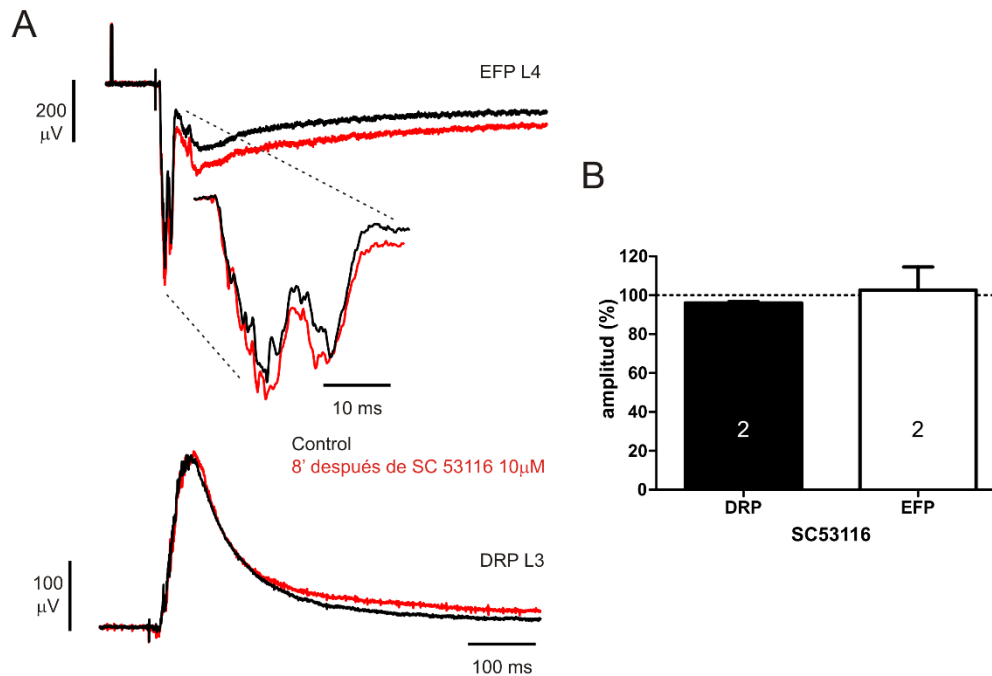


Figura 48. El agonista de los receptores 5-HT₄, SC53116, no tiene efecto sobre los potenciales extracelulares de campo (EFPs) y los de raíz dorsal (DRPs).

A, EFPs (*trazos superiores*) y DRPs (*trazos inferiores*) registrados en el cuerno dorsal a nivel L₄ y en la raíz dorsal L₃, respectivamente, en condiciones control (negro) y ocho minutos después de la aplicación del agonista a los receptores 5-HT₄, SC 53116 (rojo). El inserto muestra un acercamiento al componente monosináptico de los EFPs. **B**, gráfica resumen de los efectos del SC53116 en los DRPs (barra negra) y en los EFPs (barra blanca) provocados por la estimulación del nervio Tibial. Las barras representan la amplitud promedio (n=2) tras la aplicación de SC53116 con respecto al control (100%). El nervio Tibial se estimuló con una intensidad 4 xU. Nótese la ausencia de efecto del SC53116 en la amplitud de los EFPs y DRPs.

VI. Discusión

La información sensorial (cutánea, muscular y articular) provee al sistema nervioso central con una retroalimentación continua proveniente del cuerpo en movimiento para reforzar y refinar patrones motrices específicos, como la locomoción. La información sensorial proveniente de las extremidades en movimiento durante la locomoción puede iniciar, terminar o reconfigurar tareas motrices. Se sabe que el sistema serotoninérgico está involucrado en la modulación de los circuitos neuronales implicados en la locomoción, pero todavía se conoce poco acerca de sus acciones sobre la información propioceptiva transmitida por aferentes cutáneas y musculares mielinizadas.

Los resultados de la presente tesis demuestran que la 5-HT deprime el componente monosináptico de los EFPs, EPSPs y EPSCs, y los DRPs producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral (Figuras 18, 31 y 32). La depresión de los DRPs ocurre con un curso temporal más rápido que la depresión de los EFPs (Figura 19). La curva concentración - efecto biológico de la 5-HT sobre los EFPs muestra un efecto dual (Figura 20), lo cual sugiere que la acción de la 5-HT ocurre por mecanismos diferentes, probablemente a través de la activación de distintos subtipos de receptores. El componente monosináptico de los EFPs se deprime sin cambios en la excitabilidad de las fibras aferentes (Figuras 21 y 22), lo cual sugiere que la 5-HT reduce la eficacia sináptica de las fibras aferentes sin modificaciones en la excitabilidad de sus terminales. La 5-HT reduce la eficacia sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral fundamentalmente a través de la activación del subtipo de receptores 5-HT_{1B} (Figuras 44 y 45), y en menor grado posiblemente a través de la activación de los subtipos 5-HT_{1E/1F} (Figura 34), presentes en las terminales de las fibras aferentes de bajo umbral.

6.1 Consideraciones metodológicas

En la mayoría de los experimentos se registraron los EFPs y DRPs producidos por la estimulación del nervio Tibial, el cual es un nervio mixto, dada la facilidad para su disección. Se efectuaron algunos experimentos para determinar si la 5-HT modula diferencialmente los EFPs y DRPs producidos por la estimulación de nervios cutáneos (Su, sural) y musculares (DP, Peroneo Profundo). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los efectos de la 5-HT, o de algunos agonistas sobre los EFPs, EPSCs o DRPs producidos por la estimulación de dichos nervios (Figura 32 y 35). Estos resultados nos permiten concluir que la 5-HT modula la transmisión sináptica de fibras musculares y cutáneas de manera general, así como las vías que median la PAD producida por la estimulación de ambos tipos de fibras.

Mediante el registro de la salva aferente en el nervio ciático observamos que al estimular el nervio Tibial con intensidades ≤ 4 xU sólo se recluta el componente más rápido del potencial de acción compuesto. Este último corresponde probablemente a las fibras aferentes musculares de los grupo I y II, y cutáneas A β , que hemos considerado como fibras mielinizadas de bajo umbral. Los componentes A δ y C (o III y IV) aparecen con intensidades de estimulación más altas.

La estimulación de fibras aferentes de bajo umbral (fibras que producen PAD) del nervio Tibial generan potenciales poblacionales registrados en las raíces dorsales, o DRPs. Los DRPs corresponden a la despolarización intraespinal propagada antidrómicamente en las fibras aferentes que reciben PAD. Con respecto al tipo de fibras aferentes que reciben PAD producida por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral, hemos supuesto una similitud con la organización de las vías que median la PAD en felinos adultos. En otras palabras, los DRPs producidos por la estimulación de fibras aferentes cutáneas de bajo umbral se deben fundamentalmente a la despolarización de las fibras aferentes cutáneas de bajo umbral, articulares y del grupo Ib. Por su parte, los DRPs producidos por la

estimulación de aferentes musculares se deben a la despolarización de las fibras aferentes de los grupos I y II, y en alguna medida de las fibras aferentes cutáneas (Rudomin y Schmidt, 1999).

Aunque se ha reportado que la estimulación de las fibras aferentes A β pueden producir PAD en las fibras aferentes del grupo C (Rudomin y Schmidt, 1999), a través del procedimiento experimental utilizado no fue posible determinar si el DRP producido por la estimulación de fibras aferentes mielinizadas incluye la despolarización de fibras aferentes no mielinizadas. No obstante, se sabe que la estimulación de las fibras aferentes A β pueden producir PAD sobre las fibras aferentes del grupo C (Rudomin y Schmidt, 1999).

6.2 La 5-HT reduce la eficacia sináptica de las fibras aferentes y la excitabilidad de las interneuronas que median la PAD

La 5-HT activa numerosos tipos y subtipos de receptores metabotrópicos que se acoplan a diversas vías de transducción de señales. También existen canales iónicos de membrana sensibles a ligando y a voltaje que son modulados a través de señales de transducción. Es factible entonces que la 5-HT modifique la función de canales iónicos que controlan la excitabilidad de las neuronas. La mayoría de los subtipos de receptores a 5-HT se expresan en subpoblaciones de fibras aferentes primarias y en neuronas del cuerno dorsal (Millan et al., 2002). Es probable que las acciones moduladoras de la 5-HT ocurran sobre los elementos neuronales en la vía involucrada en la generación de la PAD: i) directamente sobre las fibras aferentes que producen PAD (and EFPs); ii) en las interneuronas que median la PAD; y iii) sobre las fibras que reciben PAD. Un esquema que resume los posibles sitios de acción se muestra en la Figura 49, los cuales se discuten enseguida.

A. Mecanismos presinápticos

La pendiente del componente monosináptico de los EFPs refleja las corrientes postsinápticas transmembranales registradas extracelularmente en un volumen conductor. Por lo tanto, la depresión del componente monosináptico de los EFPs por la 5-HT (Figura 18) sugiere una reducción en la transmisión sináptica de las fibras aferentes, a través de la activación de receptores presinápticos, posiblemente metabotrópicos (sitio 1 en la Figura 49). Esta suposición se apoya en varias evidencias: i) La resistencia de membrana de las neuronas del cuerno dorsal profundo no se ve afectada por la 5-HT (Figura 33; ver Garraway y Hochman et al., 2001). ii) La presencia de receptores presinápticos metabotrópicos en las terminales de las fibras aferentes de bajo umbral (Dougherty et al., 2005; Pierce et al., 1996). iii) El reflejo monosináptico registrado en la raíz ventral se deprime aun cuando la excitabilidad de los motoneuronas se incrementa (Crick and Wallis 1991; Murray et al., 2011). iv) El componente monosináptico de los EFPs se deprime sin cambios en la excitabilidad de las fibras aferentes (Figuras 21 y 22) ni en la invasión del potencial de acción en las terminales aferentes (Figura 19). v) La 5-HT reduce la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral (Figura 25). vi) La 5-HT reduce la amplitud en los EPSPs (Figura 31) y las EPSCs monosinápticos (Figura 32) registrados en interneuronas del cuerno dorsal profundo producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral, sin modificar las propiedades pasivas de membrana de las interneuronas (Figura 33). A continuación se discuten más detalladamente algunas de estas evidencias.

La ausencia de efecto de la 5-HT sobre la amplitud del potencial terminal producido por la estimulación de aferentes de bajo umbral (Figura 19) indica que la invasión del potencial de acción en las terminales axonales presinápticas no fue afectada (Sypert et al., 1980). Ello sugiere que los efectos de la 5-HT son independientes de cambios en la excitabilidad de las terminales, tanto de las fibras aferentes estimuladas. En consecuencia, la depresión de los EFPs monosinápticos de corta latencia por la 5-HT ocurre como resultado de una reducción de la eficacia

sináptica de las fibras aferentes, y/o una reducción en la respuesta de los receptores postsinápticos (p.ej. receptores a glutamato; ver más adelante).

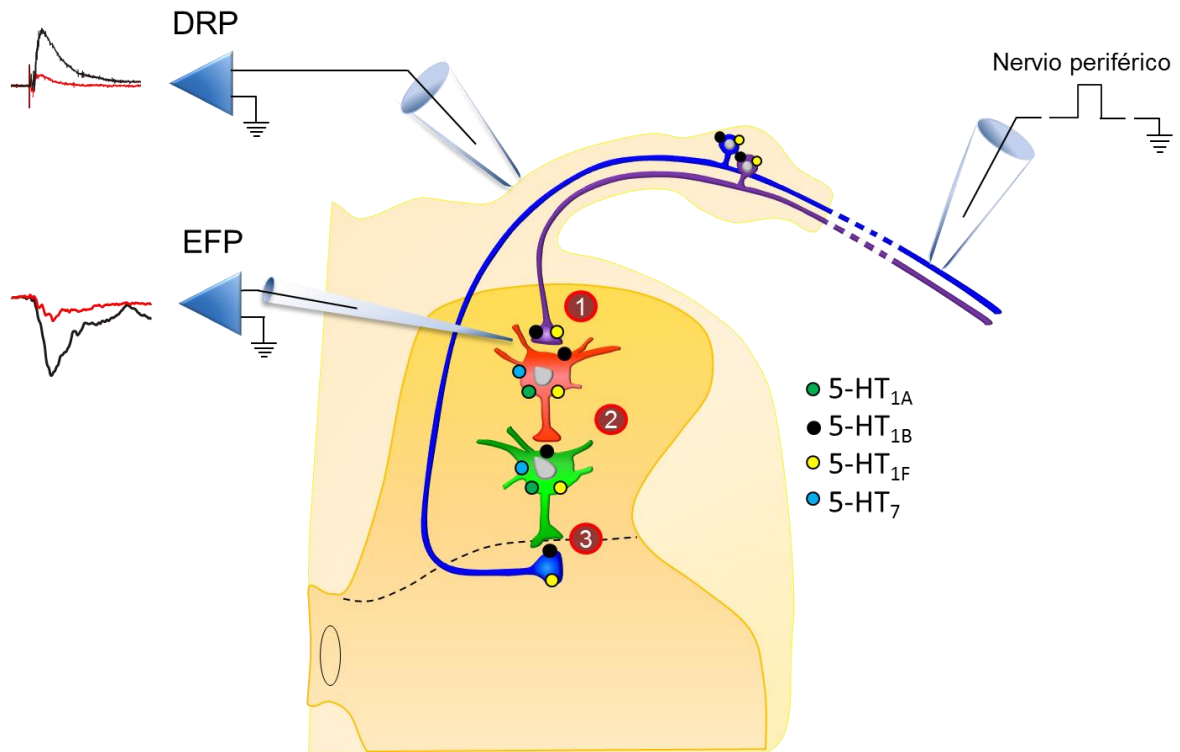


Figura 49. Posible localización de los (sub)tipos de receptores a 5-HT en la vía que media la PAD. 1. La transmisión sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral se reduce por la activación de los receptores metabotrópicos 5-HT_{1B} y 1F. 2. La excitabilidad de las interneuronas que median la PAD se reduce por la activación de los receptores 5-HT_{1A}, 1B, 1F y 7 presentes a nivel postsináptico, y probablemente presináptico a nivel de las terminales axonales de las interneuronas, reduciendo la liberación del neurotransmisor. Para mayor claridad, la vía que media la PAD se representa como una vía con dos interneuronas interpuestas. 3. No se descarta la posibilidad de que la 5-HT pueda ejercer una modulación inhibitoria sobre los receptores GABA_A presentes en las terminales de las fibras aferentes que reciben PAD.

De manera similar, se observó que la 5-HT no afecta los potenciales compuestos antidrómicos registrados con la técnica de Wall (Figuras 21 y 22). Esto excluye una modulación de la eficacia sináptica *via* mecanismos relacionados con cambios en la polarización de las terminales aferentes, como se esperaría, por ejemplo, con la activación directa del receptor ionotrópico 5-HT₃ que se expresa en las fibras aferentes de alto umbral (Khasabov et al., 1999; Conte et al., 2005). Sin

embargo, en presencia de 5-HT observamos una despolarización del potencial de DC registrado en la raíz dorsal (Figura 23) debida probablemente a la despolarización de las fibras aferentes de alto umbral (López-García 1996). Por lo tanto, los efectos de la 5-HT se producen más probablemente *via* la activación de receptores metabotrópicos presentes en las fibras aferentes, o en las interneuronas interpuestas en la vía que media la PAD (ver adelante). De hecho, la aplicación iontoforética de 5-HT no produce cambios en el umbral intraespinal de las fibras aferentes del grupo Ia (Curtis et al., 1983).

La 5-HT reduce la depresión homosináptica producida por la estimulación de fibras aferentes homónimas en el nervio tibial con intensidades 2 xU (Figura 25). Se ha descrito que la depresión homosináptica tiene un origen presináptico; se reduce al disminuir la concentración extracelular de calcio y no está asociada a la PAD de origen GABAérgico (Lev-Tov y Pinco, 1992; Figuras 26 y 27), lo cual es compatible con acciones de la 5-HT a nivel presináptico al reducir la eficacia sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral. Es importante enfatizar que la depresión homosináptica de los EFPs y DRPs observada en el presente trabajo es muy similar a la depresión homosináptica del reflejo monosináptico y de los EPSPs monosinápticos registrados en motoneuronas de roedores (Lev-Tov y Pinco, 1992; Li y Burke, 2001, 2002).

Una evidencia más de los efectos de la 5-HT a nivel presináptico es la depresión de los EPSPs (Figura 31) y las EPSCs (Figura 32) monosinápticos registrados en interneuronas del cuerno dorsal profundo producidos por la estimulación de aferentes de bajo umbral, sin modificaciones en las propiedades pasivas de membrana de las interneuronas.

B. Mecanismos postsinápticos

Aunque la reducción de la eficacia sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral por la 5-HT es evidente, no es posible descartar la participación de mecanismos postsinápticos en las acciones de la 5-HT.

Las fibras aferentes primarias de bajo umbral son glutamatérgicas. Por consiguiente, la inhibición del receptor postsináptico a glutamato afectaría la amplitud de los EFPs. Ya que los receptores del tipo 5-HT₁ están acoplados a proteínas G_i, las cuales reducen la fosforilación de los receptores a glutamato AMPA/Kainato, la activación de estos receptores a nivel postsináptico podría deprimir la amplitud de los EFPs, EPSPs y EPSCs *via* una inhibición del receptor a glutamato. Sin embargo, la 5-HT carece de efectos sobre las corrientes producidas por la activación de los receptores AMPA/kainato (Murase et al., 1990), que se sabe producen el componente rápido de los EPSPs provocados por la estimulación de fibras aferentes (Jahr y Yoshioka, 1985; Konnerth et al., 1990).

Las 5-HT podría también reducir la excitabilidad de las interneuronas interpuestas en la vía que media la PAD (sitio 2, Figura 49). Por ejemplo, se ha descrito que la estimulación del núcleo rafé magnus inhibe la actividad de las interneuronas del cuerno dorsal, presumiblemente a través de la activación de los receptores 5-HT₁ (El Yassir y Fleetwood-Walker, 1990). Adicionalmente, la depresión de los EFPs producidos por la estimulación de aferentes del grupo II en presencia de 5-HT incluye la activación de receptores postsinápticos 5-HT₃ presentes en interneuronas excitadoras (Dougherty et al., 2005).

En la presente tesis observamos que la depresión de los EFPs y DRPs producida por la 5-HT ocurre con cursos temporales diferentes (Figura 19), i.e. la depresión de los DRPs ocurre antes que la de los EFPs. Estos resultados sugieren que la depresión de los DRPs se debe a una acción inhibitoria de la 5-HT sobre las interneuronas que median la PAD, antes de que ocurra una reducción de la eficacia

sináptica de las fibras aferentes (Figura 19), es decir, antes de que la transmisión sináptica de las fibras que producen PAD se vea afectada. De hecho, como se discute más adelante, la 5-HT reduce la depresión heterosináptica de origen GABAérgico presumiblemente a través de acciones a nivel postsináptico sobre las interneuronas que median la PAD (Figura 30).

Otra evidencia que apoya los efectos de la 5-HT a nivel postsináptico es la depresión de los DRPs producida por el agonista de los receptores 5-HT_{1A/7}, 8-OH-DPAT, sin efecto sobre los EFPs (Figura 34), es decir, sin cambios en la transmisión sináptica de las fibras aferentes.

C. *Acciones sobre las fibras aferentes que reciben PAD*

Puesto que la PAD se genera predominantemente por la activación de receptores GABA_A, la 5-HT podría deprimir la PAD a través de una modulación de estos receptores presentes en las fibras aferentes (sitio 3, Figura 49). El receptor GABA_A posee múltiples sitios de fosforilación que pueden ser modulados por la 5-HT (Kittler et al., 2003). Por ejemplo, la activación de los receptores 5-HT_{1B} deprime las corrientes sinápticas mediadas por el receptor GABA_A (Flores-Hernández et al., 2000) y reduce la liberación de GABA (Bramley et al., 2005), lo cual llevaría a una reducción en la amplitud del DRP. Independientemente de una modulación directa del receptor GABA_A por la 5-HT, una modulación sobre las cascadas de señalización que regulan el cotransportador de Cl⁻, NKCC1, podría inhibir la PAD al reducir la fuerza impulsora del Cl⁻. De hecho, se ha descrito que la activación del receptor 5-HT_{2A} incrementa la inhibición postsináptica en motoneuronas *via* una hiperpolarización del potencial de equilibrio del Cl⁻ dependiente del cotransportador KCC2.

6.3 Inhibición presináptica y 5-HT

Se ha descrito que la depresión homosináptica limita la capacidad para responder a altas frecuencias durante el disparo repetitivo de las fibras aferentes (Lev-Tov y Pinco, 1992). Sin embargo, al reducir la depresión homosináptica con el agonista GABA_B, baclofen, o al disminuir la concentración extracelular de calcio, la depresión homosináptica se suprime y se produce una facilitación de las respuestas sinápticas por estimulación con altas frecuencias. Por consiguiente, a pesar de la reducción de la eficacia sináptica por la 5-HT, la reducción de la depresión homosináptica (Figura 24) mejoraría la respuesta a altas frecuencias durante el disparo repetitivo de las fibras aferentes, durante tareas motrices como la locomoción, por ejemplo.

Ya que la depresión heterosináptica se atribuye a la inhibición presináptica relacionada con la PAD de origen GABAérgico (Figura 30), observamos que la 5-HT revierte este tipo de inhibición, es decir, produce una facilitación relativa de la eficacia sináptica (Figura 29). Ello implicaría que la 5-HT podría favorecer una retroalimentación sensorial positiva durante el movimiento, consistente con el efecto facilitador de la 5-HT sobre los circuitos neuronales implicados en conductas motrices. Sin embargo, la facilitación de los EFPs por la 5-HT ($\geq 10 \mu\text{M}$) no se observa por dos razones: i) la depresión de la eficacia sináptica de las fibras aferentes; y ii) el componente monosináptico de los EFPs ocurre antes del inicio del DRP, cuya naturaleza es oligosináptica.

Es importante enfatizar que el protocolo de inhibición heterosináptica se efectúa en presencia de 5-HT, es decir, la eficacia sináptica ya se encuentra reducida. Luego entonces, es muy probable que la reversión de la inhibición heterosináptica se deba a acciones inhibitorias de la 5-HT a nivel postsináptico sobre las interneuronas que median la PAD.

6.4 Subtipos de receptores a 5-HT implicados en la reducción de la eficacia sináptica en la depresión de los DRPs

La depresión del componente monosináptico de los EFPs por el BRL54443 sugiere una reducción en la liberación del transmisor mediada por la activación de receptores metabotrópicos 5-HT_{1E} y _{1F}, es decir, a una reducción en la eficacia sináptica de las fibras aferentes, sin descartar un efecto inhibitor a nivel de las interneuronas que median la PAD (Figura 34). La depresión de los DRPs por la aplicación del agonista de los receptores 5-HT_{1A} y ₇, 8-OH-DPAT, sugiere una modulación serotoninérgica inhibitor a nivel de las interneuronas que median la PAD (Figura 34). La depresión moderada de los DRPs por los agonistas de los receptores 5-HT₂ (DOI) y 5-HT₃ (SR572275) sin afectar los EFPs, sugiere también la participación, aunque menor, de estos tipos de receptores en una modulación inhibitor a nivel de las interneuronas que median la PAD. Sin embargo, la aplicación de los antagonistas de los receptores 5-HT_{3/4} (tropisetron) y 5-HT₂ (ketanserina) no revirtió los efectos de la 5-HT sobre el componente monosináptico de los EFPs y los DRPs. Estos hallazgos ponen en duda la participación de estos receptores en los efectos inhibitor de la 5-HT (Figura 46 y 47). La Figura 50 resume los efectos de los diferentes agonistas serotoninérgicos utilizados en la modulación de la transmisión sináptica de las fibras aferentes de bajo umbral y de las vías que median la PAD producida por la estimulación de las mismas fibras. La Figura 49 resume los posibles sitios de localización de los (sub)tipos de receptores a 5-HT en las fibras aferentes y en la vía neuronal que media la PAD, conforme a los resultados obtenidos tras la aplicación de los diferentes agonistas y antagonistas serotoninérgicos.

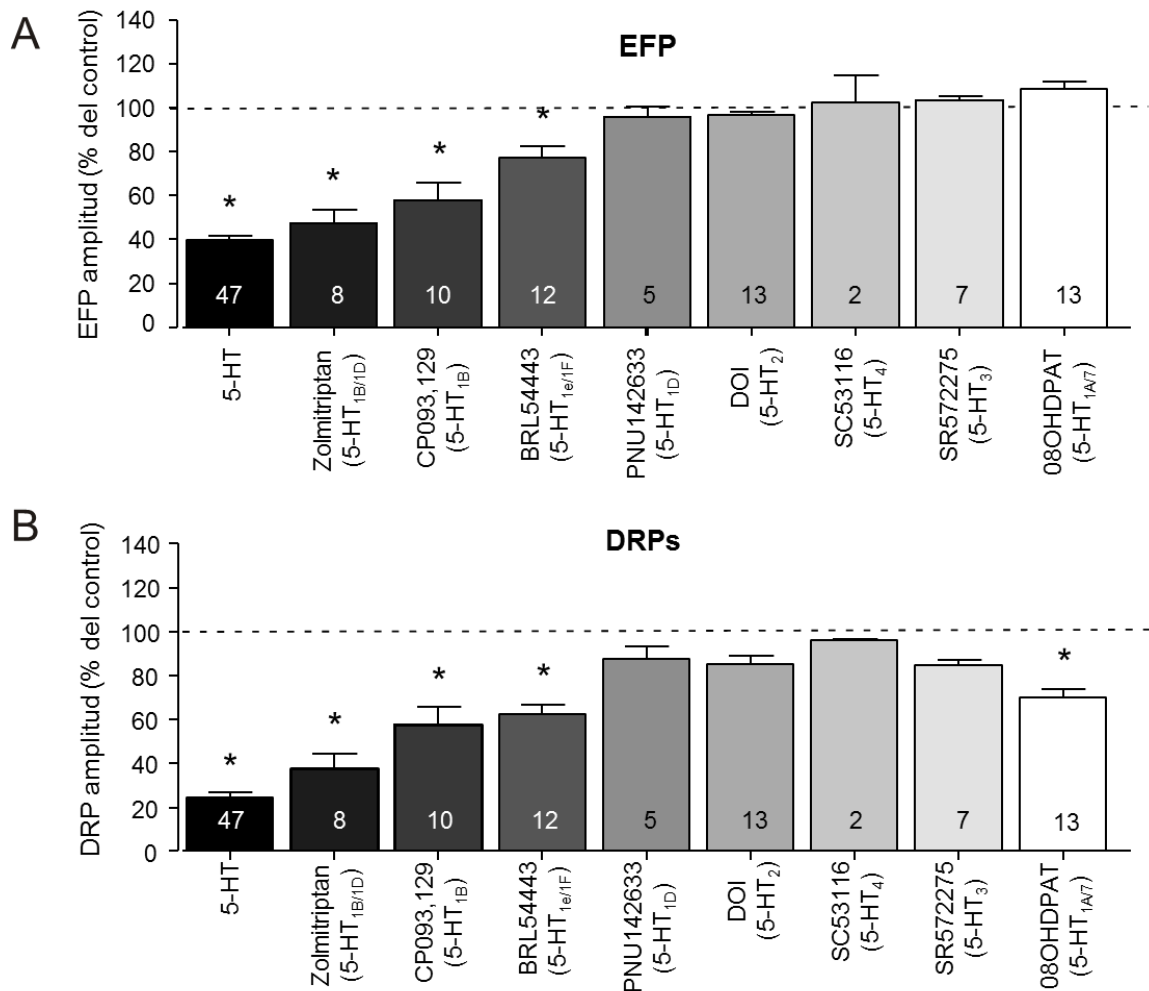


Figura 50. Resumen de los efectos producidos por los agonistas de los receptores a 5-HT sobre la amplitud de los EFPs y DRPs. A y B, efecto de diversos agonistas de los receptores a la 5-HT sobre la amplitud de los EFPs y DRPs, respectivamente, con respecto a los valores control (100%). Los agonistas se aplicaron a una concentración de 1 a 10 μ M. Los agonistas de los receptores 5-HT_{1F} y 5-HT_{1B} deprimen de manera significativa los EFPs (A). Los agonistas de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1E} y 5-HT₇ deprimen los DRPs (B). Sin embargo, la depresión producida por cada agonista fue menor a la producida por la 5-HT. (*) (Prueba *t* de Student pareada, $P < 0.001$); cada grupo experimental se comparo con su propio control.

Puesto que el potencial DC se registró en un filamento de raíz que incluye fibras aferentes de todos los tipos, es muy probable que el cambio de potencial DC se deba a la despolarización de las fibras aferentes de alto umbral (A δ , C, grupos III y IV), que se sabe expresan receptores 5-HT₃ (Zeitz et al., 2002). Resultados similares se obtuvieron al aplicar el agonista de los receptores 5-HT₃, SR572275 (no ilustrados). Por otra parte, la aplicación del agonista de los receptores 5-HT_{1B/1D},

zolmitriptan, el cual reduce la amplitud de los DRPs y EFPs de manera similar a la 5-HT, no produjo cambios en el potencial de DC (Figura 37). Por consiguiente, los cambios negativos de DC registrados en la raíz dorsal se deben probablemente a la presencia de receptores 5-HT₃ en las fibras de alto umbral (A δ y C).

6.5 Efectos diferenciales de la 5-HT sobre los EFPs

La 5-HT, como se observa en la Figura 20, puede también facilitar la transmisión monosináptica a bajas concentraciones ($\leq 1.0 \mu\text{M}$), lo cual sugiere una modulación bi-direccional de la transmisión sináptica en una manera dependiente de la concentración, mediada presumiblemente por (sub)tipos de receptores con diferentes afinidades. Si a concentraciones bajas la 5-HT facilita la transmisión sináptica mientras deprime los DRPs, la consecuencia neta sería una amplificación de las acciones sinápticas con una menor depresión dependiente de la frecuencia *via* la depresión homosináptica. Por consiguiente, la 5-HT puede modificar la información sensorial propioceptiva por al menos tres mecanismos independientes: dos que aumentarían (\downarrow DRP; \uparrow EFP) y uno que reduciría (\downarrow EFP) la transmisión sináptica.

Puesto que la depresión de los EFPs y DRPs puede disociarse temporal y espacialmente, es posible que existan mecanismos fisiológicos para un control independiente de la transmisión sináptica y de la PAD a través de sistemas descendentes o supraespinales. Por ejemplo, la depresión por 5-HT de los EFPs producidos por la estimulación de aferentes musculares de bajo umbral probablemente sea el reflejo de una transmisión sináptica reducida de las fibras Ia a nivel poblacional en el cuerno dorsal profundo. Esto es consistente con las acciones inhibitorias de la 5-HT sobre las aferentes Ia que hacen sinapsis con las motoneuronas (Crick y Wallis, 1991). No obstante, la aplicación iontoforética de 5-HT puede también facilitar la transmisión sináptica de las fibras aferentes musculares del grupo I con las interneuronas del cuerno dorsal (Jankowska et al.,

2000), lo cual coincide con la facilitación que observamos con la 5-HT a bajas concentraciones. Por lo tanto, el control de la actividad de las interneuronas que median la PAD dependería de la intensidad del control serotoninérgico supraespinal y de la presencia de receptores a 5-HT con diversas afinidades (Hochman et al., 2001), como se ha demostrado en las motoneuronas de la tortuga (Cotel et al., 2013).

6.6 Sobre la depresión de los componentes de los EFPs de mayor latencia

En la presente tesis no fue posible discriminar si el componente de mayor latencia de los EFPs (p. ej. Figura 18) es producido por aferentes musculares del grupo II u otras fibras mielinizadas de menor velocidad de conducción. No obstante, la depresión de este componente por la 5-HT (en el caso de la estimulación de nervios musculares) es consistente con la depresión de los EFPs del grupo II en el gato (Jankowska et al., 2000). Puesto que las intensidades de estimulación empleadas en el presente proyecto estuvieron fundamentalmente por debajo del umbral de las fibras de los grupos C/IV, los EFPs de mayor latencia fueron también producidos por la estimulación de fibras de menor umbral. Los EFPs de latencia prolongada y larga duración pueden atribuirse al reclutamiento de vías polisinápticas, o a la activación de receptores NMDA, cinéticamente más lentos (Miller y Woolf, 1996). Sin embargo, es probable que sean también un reflejo del campo extracelular de la PAD, puesto que exhiben un curso temporal similar a los DRPs (Eccles et al., 1962).

VII. Conclusiones

- La 5-HT deprime los potenciales extracelulares de campo monosinápticos (EFPs) y los potenciales de raíz dorsal (DRPs), producidos por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral.
- La depresión de los EFPs sugiere que la 5-HT ejerce sus efectos a nivel presináptico o en las interneuronas de primer orden.
- La 5-HT deprime los EFPs y DRPs sin cambios en el potencial presináptico o en la excitabilidad de las fibras aferentes de bajo umbral.
- La 5-HT suprime la depresión homosináptica producida por la estimulación de aferentes homónimas de bajo umbral.
- La 5-HT deprime el componente monosináptico de los EPSPs y EPSCs producidos por la estimulación de fibras aferentes de bajo umbral en interneuronas del cuerno dorsal, sin cambios en la resistencia de la membrana.
- La 5-HT deprime los DRPs y EFPs presumiblemente por la activación de receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{1F} en las terminales de las fibras aferentes de bajo umbral.
- La 5-HT produce una inhibición de la interneuronas que median la PAD producida por la estimulación de las fibras aferentes de bajo umbral, presumiblemente por la activación de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1F} y 5-HT₇.

Perspectivas a largo plazo

- Identificar mediante técnicas inmunocitoquímicas (GAD65, Ptf, NPY, GlyT2 y ENK) las interneuronas marcadas con neurobiotina o biocitina y verificar si establecen conexiones axoaxónicas con fibras aferentes marcadas con VGlut1.

- Determinar los efectos de la 5-HT sobre las propiedades pasivas y activas de las interneuronas (GAD65+) que median la despolarización de aferentes primarias.
- Identificar farmacológicamente los (sub)tipos de receptores a 5-HT presentes en las interneuronas GAD65+.

VIII. Referencias

1. Alhaider A.A., Lei S.Z., Wilcox G.L. (1991). Spinal 5-HT₃ receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. *J. Neurosci.* 11, 1881-1888.
2. Alvarez-Leefmans F.J., Nani A., Marquez S. (1998). Chloride transport, osmotic balance, and presynaptic inhibition. In: Rudomin P., Romo R., Mendell L. (eds) *Presynaptic inhibition and neural control*. Oxford University Press, New York, pp 50–79.
3. Bannatyne, B. A., Liu, T. T., Hammar, I., Stecina, K., Jankowska, E. and Maxwell, D. J. (2009). Excitatory and inhibitory intermediate zone interneurons in pathways from feline group I and II afferents: differences in axonal projections and input. *J. Physiol.* 587, 379–399.
4. Baranauskas G., Nistri A., (1998). Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. *Prog. Neurobiol.* 54, 349–365.
5. Barbeau H., Rossignol S. (1991). Initiation and modulation of the locomotor pattern in the adult chronic spinal cat by noradrenergic, serotonergic and dopaminergic drugs. *Brain Res.* 546, 250-260.
6. Bardoni R., Tawfik V.L., Wang D., Francois A., Solorzano C., Shuster S.A., Choudhury P., Betelli C., Cassidy C., Smith K., de Nooij J.C., Mennicken F., O'Donnell D., Kieffer B.L., Woodbury C.J., Basbaum A.I., MacDermott A.B., Scherrer G. (2014). Delta opioid receptors presynaptically regulate cutaneous mechanosensory neuron input to the spinal cord dorsal horn. *Neuron* 81, 1312–1327.
7. Barker J.L., Nicoll R.A. (1973). The pharmacology and ionic dependency of amino acid responses in the frog spinal cord. *J. Physiol.* 228, 259–277.
8. Barron D.H., Matthews B.H.C. (1938). The interpretation of potential changes in the spinal cord. *J. Physiol.* 92, 276–321.
9. Bautista W., Aguilar J., Loeza-Alcocer J.M., Delgado-Lezama R. (2010). Pre- and postsynaptic modulation of monosynaptic reflex by GABA_A receptor on turtle spinal cord. *J. Physiol.* 588, 2621-2631.

10. Betley J.N., Wright C., Kawaguchi Y., Erdélyi F., Szabó G., Jessell T. (2009). Stringent specificity in the construction of a GABAergic presynaptic inhibitory circuit. *Cell* 139, 161-174.
11. 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. *Exp. Brain Res.* 76, 27-37.
12. Bras H., Jankowska E., Noga B., Skoog B. (1990). Comparison of Effects of Various Types of NA and 5-HT Agonists on Transmission from Group II Muscle Afferents in the Cat. *Eur. J. Neurosci.* 2, 1029-1039.
13. Brink E., Jankowska E., Skoog B. (1984). Convergence onto interneurons subserving primary afferent depolarization of group I afferents. *J. Neurophysiol.* 51, 432-449.
14. Bowker R. M., Westlund K. N., Sullivan M. C., Wilber J. F., Coulter J. D. (1982). Transmitters of the raphe-spinal complex: immunocytochemical studies. *Peptides* 3, 291-298.
15. Calancie B., Broton J.G., Klose K.J., Traad M., Difini J., and Ayyar D.R. (1993) Evidence that alterations in presynaptic inhibition contribute to segmental hypo- and hyperexcitability after spinal cord injury in man. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Electromyogr. Motor Control* 89, 177-186.
16. Calejesan A.A., Ch'ang M.H., Zhuo M. (1998). Spinal serotonergic receptors mediate facilitation of a nociceptive reflex by subcutaneous formalin injection into the hindpaw in rats. *Brain Res.* 798, 46-54.
17. Carpenter D., Engberg I., Funkenstein H., Lundberg A. (1963). Decerebrate control of reflexes to primary afferents. *Acta Physiol. Scand.* 59, 424-437.
18. Cazalets J.R., Sqalli-Houssaini Y., Clarac F. (1992). Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat, *J. Physiol. (Lond)*, 455, 187-204.
19. Conte D., Legg E.D., McCourt A.C., Silajdzic E., Naggy G.G., Maxwell D.J. (2005). Transmitter content, origins and connections of axons in the spinal cord that possess the serotonin (5-Hydroxytryptamine) 3 receptor. *Neuroscience.* 134, 165-173.

20. Cotel F., Exley R., Cragg S.J., Perrier J.F. (2013). Serotonin spillover onto the axon initial segment of motoneurons induces central fatigue by inhibiting action potential initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 4774-4779.
21. Cook W.A., Cangiano A. (1972). Presynaptic and postsynaptic inhibition of spinal neurons. *J. Neurophysiol.* 35, 389–403.
22. Cowley K.C., Schmidt B.J. (1997). Regional distribution of the locomotor pattern-generating network in the neonatal rat spinal cord. *J. Neurophys.* 77, 247-259.
23. Crick H., Wallis D.I. (1991). Inhibition of reflex responses of neonate rat lumbar spinal cord by 5-hydroxytryptamine. *Br. J. Pharmacol.* 103, 1769-1775.
24. Curtis D.R., Leah J.D., Peet M.J. (1983). Effects of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine on spinal Ia afferent terminations. *Brain Res.* 258, 328-332.
25. Czarkowska J., Jankowska E., Sybirska E. (1981). Common interneurons in reflex pathways from group 1a and 1b afferents of knee flexors and extensors in the cat. *J. Physiol.* 310, 367–380.
26. D'Amico J. M., Yaqing L., Bennett D. J., Gorassini M. A. (2013). Reduction of spinal sensory transmission by facilitation of 5-HT_{1B/1D} receptor in noninjured and spinal cord-injured humans. *J. Neurophysiol.* 109, 1485-1493.
27. Davidoff R.A. (1972). Gamma-aminobutyric acid antagonism and presynaptic inhibition in the frog spinal cord. *Science* 175, 331–333.
28. Devanandan M.S., Eccles R.M., Stenhouse D. (1966). Presynaptic inhibition evoked by muscle contraction. *J. Physiology* 185, 471-485.
29. Doubell T.P., Mannion R.J., Woolf C.J. (1999). The dorsal horn: state-dependent sensory processing, plasticity and the generation of pain. In: Wall, P.D., Melzack, R. (Eds.), *Textbook of Pain*, 4th Edition. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 165–181.
30. Dougherty K.J., Bannatyne B.A., Jankowska E., Krutki P., Maxwell D.J. (2005). Membrane receptors involved in modulation of responses of spinal dorsal horn interneurons evoked by feline group II muscle afferents. *J. Neurosci.* 25, 584-593.

31. Dubuc R., Cabelguen J.M., Rossignol S. (1988). Rhythmic fluctuations of dorsal root potentials and antidromic discharges of single primary afferents during fictive locomotion in the cat. *J. Neurophysiol.* 60, 2014–2036.
32. Dueñas S., Rudomin P. (1988). Excitability changes of ankle extensor group Ia and Ib fibers during fictive locomotion in the cat. *Exp. Brain Res.* 70, 15–25
33. Dueñas S., Rudomin P. (1993). Reversal of the effects of cutaneous afferents on PAD of Ib fibers during fictive locomotion. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19, 225.
34. Eccles J.C., Krnjevic K. (1959). Potential changes recorded inside primary afferent fibres within the spinal cord. *J. Physiol.* 149, 250–273.
35. Eccles J.C., Eccles R.M., and Magni F. (1961). Central inhibitory action attributable to presynaptic depolarization produced by muscle afferent volleys. *J. Physiol. (Paris)* 159, 147-166.
36. Eccles J.C., Kostyuk P.G., and Schmidt R.F. (1962a). Central pathways responsible for depolarization of primary afferent fibres. *J. Physiol. (Paris)* 161, 237-257.
37. Eccles J.C., Schmidt R.F., and Willis W.D. (1962b). Presynaptic inhibition of the spinal monosynaptic reflex pathway. *J Physiol. (Paris)* 161, 282-297.
38. Eccles J.C., Schmidt R.F., Willis WD (1963) Pharmacological studies on presynaptic inhibition. *J. Physiol.* 168, 500–530.
39. Eide E., Jurna I., Lundberg A. (1968). Conductance measurements from motoneurons during presynaptic inhibition. In: Euler C von, Skoglund S, Söderberg U (eds) *Structure and function of inhibitory neuronal mechanisms*. Pergamon Press, Oxford New York, 215–219.
40. Engberg I., Ryall R.W. (1966). The inhibitory action of noradrenaline and other monoamines on spinal neurones. *J. Physiol.* 185, 298-322.
41. El Yassir N., Fleetwood-Walker S.M. (1990). A 5-HT₁-type receptor mediates the antinociceptive effect of nucleus raphe magnus stimulation in the rat. *Brain Res* 523, 92-99.
42. Elliott P., Wallis D.I. (1992). Serotonin and L-norepinephrine as mediators of altered excitability in neonatal rat motoneurons studied *in vitro*. *Neuroscience*, 47, 533-544.

43. Faist M., Mazevet D., Dietz V., and Pierrot-Deseilligny E. (1994). A quantitative assessment of presynaptic inhibition of Ia afferents in spastics. Differences in hemiplegics and paraplegics. *Brain* 117, 1449-1455.
44. Farkas S., Tarnawa I., Berzsényi P. (1989). Effects of some centrally acting muscle relaxants on spinal root potential: a comparative study. *Neuropharmacology* 28, 161-173.
45. Fitzgerald M. (1985). The post-natal development of cutaneous afferent fibre input and receptive field organization in the rat dorsal horn. *J. Physiol.* 364, 1-18.
46. Fields H.L., Heinricher M.M., Mason P., (1991). Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 219–245.
47. Fink A.J., Croce K.R., Huang Z.J., Abbott L.F., Jessell T.M., Azim E. (2014). Presynaptic inhibition of spinal sensory feedback ensures smooth movement. *Nature*, 509, 43–48.
48. Fleetwood-Walker S.M., Mitchell R., Hope P.J., Molony V., Iggo A. (1985) An alpha 2 receptor mediates the selective inhibition by noradrenaline of nociceptive responses of identified dorsal horn neurones. *Brain Res.* 334, 243-254.
49. Frank, K., Fuortes, M.G.F. (1957). Presynaptic and postsynaptic inhibition of monosynaptic reflexes. *Fed. Proc.* 16, 39–40.
50. Fyda D., Jordan L.M. (1999). Role of spinal monoaminergic systems in brainstem-evoked locomotion in the neonatal rat. *Soc. Neurosci. Abst.* 25, 1916.
51. Fukushima T., Ohtsubo T., Tsuda M., Yanagawa Y., Hori Y. (2009). Facilitatory actions of serotonin type 3 receptors on GABAergic inhibitory synaptic transmission in the spinal superficial dorsal horn. *J. Neurophysiol.* 102, 1459-1471.
52. Garraway S.M. and Hochman S. (2001). Modulatory actions of serotonin, norepinephrine, dopamine, and acetylcholine in spinal cord deep dorsal horn neurons. *J. Neurophysiol.* 86, 2183-2194.
53. Gerard C., el Mestikawy S., Lebrand C., Adrien J., Ruat M., Traiffort E., Hamon M., & Martres M.P. (1996). Quantitative RT-PCR distribution of serotonin 5-HT₆ receptor mRNA in the central nervous system of control or 5, 7-dihydroxytryptamine-treated rats. *Synapse* 23, 164-173.

54. Gerin C., Becquet D., Privat A. (1995). Direct evidence for the link between monoaminergic descending pathways and motor activity .1. A study with microdialysis probes implanted in the ventral funiculus of the spinal cord. *Brain Res.* 704, 191-201.
55. Gjerstad J., Tjolsen A., Hole K. (1996). The effect of 5-HT_{1A} receptor stimulation on nociceptive dorsal horn neurones in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 318, 315-321.
56. Gosgnach S., Quevedo J., Fedirchuk B., McCrea D.A. (2000). Depression of group Ia monosynaptic EPSPs in cat hindlimb motoneurons during fictive locomotion. *J. Physiol.* 526, 639-52.
57. Gossard J.P. and Rossignol S. (1990). Phase-dependent modulation of dorsal root potentials evoked by peripheral nerve stimulation during fictive locomotion in the cat. *Brain Res.* 537, 1-13.
58. Harris-Warrick R.M., Marder E. (1991). Modulation of neural networks for behavior. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 39-57.
59. Headley P.M., Duggan A.W., Griersmith B.T. (1978). Selective reduction by noradrenaline and 5-hydroxytryptamine of nociceptive responses of cat dorsal horn neurones. *Brain Res* 145, 185-189.
60. Hille B. (1994). Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* 17, 531- 536.
61. Hochman S., Garraway S.M., Machacek D.W., Shay B.L. (2001). 5-HT receptors and the neuromodulatory control of spinal cord function. In *Motor Neurobiology of the Spinal Cord*. CRC Press, Boca Raton. pp. 47-87.
62. Hokfelt T., Arvidsson U., Culheim S., Milhorn D., Nicholas A. P., Pieribone V., Seroogy K., Ulfhake B., (2000). Multiple messengers in descending serotonin neurons: localization and functional implications. *J. Chem. Neuroanat.* 18, 75-86.
63. Hongo T., Jankowska E., Lundberg A. (1972). The rubrospinal tract. 3. Effects on primary afferent terminals. *Exp. Brain Res.* 15, 39-53.
64. Hounsgaard J., Kiehn O. (1989). Serotonin-induced bistability of turtle motoneurons caused by a nifedipine-sensitive calcium plateau potential. *J. Physiol. (Lond.)* 414, 265-282.

65. Hounsgaard J., Hultborn H., Jespersen B., Kiehn O. (1988). Bistability of alpha-motoneurons in the decerebrate cat and in the acute spinal cat after intravenous 5-hydroxytryptophan. *J. Physiol. (Lond.)* 405, 345-367.
66. Hsiao C.F., Del Negro C.A., Trueblood P.R., Chandler S.H. (1998). Ionic basis for serotonin-induced bistable membrane properties in guinea pig trigeminal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 79, 2847-2856.
67. Hultborn H., Meunier S., Pierrot-Deseilligny E., Shindo M. (1987). Changes in presynaptic inhibition of Ia fibres at the onset of voluntary contraction in man. *J. Physiol.* 389, 757-772.
68. Jacobs B.L., Fornal C.A. (1993). 5-HT and motor control: A hypothesis. *Trends Neurosci.* 16, 346-352.
69. Jahr C.E., and Yoshioka K. (1985). Ia afferent excitation of motoneurons in the *in vitro* newborn rat spinal cord is selectively antagonized by kynurenate. *J. Physiology-London* 370, 515-53.
70. Jankowska E., Szabo Läckberg Z., Dyrehag L.E. (1994). Effects of monoamines on transmission from group II muscle afferents in sacral segments in the cat. *Eur. J. Neurosci.* 6, 1058–1061.
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. *J. Physiol.* 310, 381-402.
72. Jankowska E., McCreary D., Rudomin P., and Sykova E. (1981). Observations on neuronal pathways subserving primary afferent depolarization. *J. Neurophysiol.* 46, 506-516.
73. Jankowska E., Hammar I., Chojnicka B., Heden C.H. (2000). Effects of monoamines on interneurons in four spinal reflex pathways from group I and/or group II muscle afferents. *Eur. J. Neurosci.* 12, 701-714.
74. Jankowska E., Hammar I., Djouhri L., Heden C., Szabo L.Z., Yin X.K. (1997). Modulation of responses of four types of feline ascending tract neurons by serotonin and noradrenaline. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1375-1387.
75. Jankowska E., Riddell J.S. (1998). Neuronal systems involved in modulating synaptic transmission from group II muscle afferents. In: Rudomin P, Romo R, Mendell L (eds) *Presynaptic inhibition and neural control*. Oxford University Press, New York, pp 315–328.

76. Jiménez I., Rudomin P., Solodkin M., Vyklicky L. (1984). Specific and nonspecific mechanisms involved in generation of PAD of group Ia afferents in cat spinal cord. *J. Neurophysiol.* 52, 921–939.
77. Jiménez F., Rudomin P., Solodkin M. (1988). PAD patterns of physiologically identified afferent fibres from the medial gastrocnemius muscle. *Exp. Brain Res.* 71, 643–657.
78. Jordan L.M., Kenshalo D.R., Martin R.F., Haber L.H., Willis W.D. (1979). Two populations of spinothalamic tract neurons with opposite responses to 5-hydroxytryptamine. *Brain Res.* 164, 342-346.
79. Jordan L.M., Kenshalo D.R., Martin R.F., Haber L.H., Willis W.D. (1978). Depression of primate spinothalamic tract neurons by iontophoretic application of 5-hydroxytryptamine. *Pain* 5, 135-142.
80. Kachidian P., Poulat P., Marlier L., Privat A. (1991). Immunohistochemical evidence for the coexistence of substance P, thyrotropin-releasing hormone, GABA, methionine-enkephalin, and leucin-enkephalin in the serotonergic neurons of the caudal raphe nuclei: a dual labeling in the rat. *J. Neurosci. Res.* 30, 521-530.
81. Katz P.S., Frost W.N. (1996). Intrinsic neuromodulation: Altering neuronal circuits from within. *Trends Neurosci.* 19, 54-61.
82. Kayser V., Aubel B., Hamon M., Bourgoin S. (2002). The antimigraine 5-HT_{1B/1D} receptor agonist, sumatriptan, zolmitriptan and dihydroergotamine, attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.* 137, 1287-1297.
83. Koketsu K., Nishi S. (1956). Action potentials of single intrafusal muscle fibres of frogs. *J. Physiol.* 137, 193–209.
84. Khasabov S.G., Lopez-Garcia J.A., Asghar A.U., King A.E. (1999). Modulation of afferent-evoked neurotransmission by 5-HT₃ receptors in young rat dorsal horn neurones in vitro: a putative mechanism of 5-HT₃ induced antinociception. *Br. J. Pharmacol.* 127, 843-852.
85. Konnerth A., Keller B.U., Lev-Tov A. (1990). Patch clamp analysis of excitatory synapses in mammalian spinal cord slices. *Pflugers Arch.* 417, 285-90.
86. Kia H.K., Miquel M.C., McKernan R.M., Laporte A.M., Lombard M.C., Bourgoin S., Hamon M., Vergé D. (1995). Localization of 5-HT₃ receptors in the rat spinal cord: immunohistochemistry and in situ hybridization. *Neuroreport* 6, 257-61.

87. Kiehn O., Kjaerulff O. (1996). Spatiotemporal characteristics of 5-HT and dopamine-induced rhythmic hindlimb activity in the *in vitro* neonatal rat. *J. Neurophysiol.* 75, 1472-1482.
88. Kittler J.T., Moss S.J. (2003). Modulation of GABAA receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition. *Curr. Opin. Neurobiol* 13, 341-347.
89. Lev-Tov A., Pinco M. (1992). *In vitro* studies of prolonged synaptic depression in the neonatal rat spinal cord. *J. Physiol.* 447, 149-169.
90. Li Y., Burke R.E. (2001). Short-term synaptic depression in the neonatal mouse spinal cord. *J. Neurophysiol.* 85, 2047-2062.
91. Li Y., Burke R.E. (2002). Developmental changes in short-term synaptic depression in the neonatal mouse spinal cord. *J. Neurophysiol.* 88, 3218-3231.
92. Lomeli J., Quevedo J., Linares P., and Rudomin P. (1998). Local control of information flow in segmental and ascending collaterals of single afferents. *Nature* 395, 600-604.
93. Lopez-Garcia J.A., King A.E. (1996). Pre- and post-synaptic actions of 5-hydroxytryptamine in the rat lumbar dorsal horn *in vitro*: Implications for somatosensory transmission. *Eur. J. Neurosci.* 8, 2188-2197.
94. Lundberg A. (1964). Supraspinal control of transmission in reflex paths to motoneurons and primary afferents. In: Eccles J., Schadé J.P. (eds) *Physiology of the spinal neurons*. Elsevier, Amsterdam, pp 197–221.
95. Lundberg A., Vyklicky L. (1966). Inhibition of transmission to primary afferents by electrical stimulation of the brain stem. *Arch. Ital. Biol.* 104, 86–97.
96. MacLean J.N., Cowley K.C., Schmidt B.J. (1998). NMDA receptor-mediated oscillatory activity in the neonatal rat spinal cord is serotonin dependent, *J. Neurophysiol.*, 79, 2804-2808.
97. Millan M.J., (1997). The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In: Dickenson, A., Besson, J.M. (Eds.) *The Pharmacology of Pain, Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 130. Springer, Berlin, 385–446.
98. Millan M.J. (2002). Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355-474.
99. Miller B.A., Woolf C.J. (1996). Glutamate-mediated slow synaptic currents in neonatal rat deep dorsal horn neurons *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 76, 1465-1476.

100. Murray K. C., Stephens M. J., Rank M., D'Amico J., Gorassini M. A., Bennett D. J. (2011). Polysynaptic excitatory postsynaptic potentials that trigger spasm after spinal cord injury in rats are inhibited by 5-HT_{1B} and 5-HT_{1F} receptors. *J. Neurophysiol.* 106, 925-943.
101. Nicholson R., Dixon A. K., Spanswick D., Lee K. (2005). Noradrenergic receptor mRNA expression in adult rat superficial dorsal horn and dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience Letters* 380, 316–321.
102. Oksamitnyi V.N., Tamarova Z.A. (1987). Depolarizing action of dopamine on the endings of the primary afferent fibers of an isolated segment of the spinal cord in rat pups. *Neirofiziologiia.* 19, 741-748.
103. Peng Y.B., Lin Q., Willis W.D. (1996). The role of 5-HT₃ receptors in periaqueductal gray-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276, 116-124.
104. Pierce, P. A., Xie, G. X., Levine, J. D., Peroutka, S. J. (1996). 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 70, 553-559.
105. Proudfit H.K., Anderson E.G. (1974). New long latency bulbospinal evoked potentials blocked by serotonin antagonists. *Brain Res.* 65, 542-546.
106. Proudfit H.K., Larson A.A., Anderson E.G. (1980). The role of GABA and serotonin in the mediation of raphe-evoked spinal cord dorsal root potentials. *Brain Res.* 195, 149-165.
107. Quevedo J., Eguibar J.R., Jiménez I., Schmidt R.F., Rudomin P. (1993). Primary afferent depolarization of muscle afferents elicited by stimulation of joint afferents in cats with intact neuraxis and during reversible spinalization. *J. Neurophysiol.* 70, 1899–1910.
108. Quevedo J., Eguibar J.R., Jiménez I., Rudomin P. (1995). Raphe magnus and reticulospinal actions on primary afferent depolarization of group I muscle afferents in the cat. *J. Physiol. (Lond.)* 482, 623-640.
109. Riddell J.S, Jankowska E., Eide E. (1993). Depolarization of group II muscle afferents by stimuli applied in the locus coeruleus and raphe nuclei of the cat. *J Physiol. (Lond.)* 461, 723-741.

110. Ridet J.L., Rajaofetra N., Teilhac J.R., Geffard M., Privat A., (1993). Evidence for nonsynaptic serotonergic and noradrenergic innervation of the rat dorsal horn and possible involvement of neuron glia interaction. *Neuroscience* 52, 143–157.
111. Rossignol S., Beloozerova I.G.J.P., Dubuc R. (1998) Presynaptic mechanisms during locomotion. In: Rudomin P, Romo R, Mendell L (eds) *Presynaptic inhibition and neural control*. Oxford University Press, New York, pp 385–397.
112. Ruda M.A., (1988). Spinal dorsal horn circuitry involved in the brain stem control of nociception. *Prog. Brain Res.* 77, 129–140.
113. Ruda M.A., Bennett G.J., Dubner R. (1986). Neurochemistry and neural circuitry in the dorsal horn. *Prog. Brain Res.* 66, 219–268.
114. 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. *J. Neurophysiol.* 50, 743–769.
115. 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. *J. Neurophysiol.* 56, 987–1006.
116. Rudomin P., Schmidt R.F. (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp. Brain Res.* 129, 1-37.
117. Seki K., Perlmutter S.I., and Fetz E.E. (2003). Sensory input to primate spinal cord is presynaptically inhibited during voluntary movement. *Nat. Neurosci.* 6, 1309-1316.
118. Sillar K.T., Simmers A.J. (1994). 5-HT induces NMDA receptor-mediated intrinsic oscillations in embryonic amphibian spinal neurons. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]* 255, 139-145.
119. Schmidt R.F. (1963). Pharmacological studies on the primary afferent depolarization of the toad spinal cord. *Pflügers Arch.* 277, 325–346.
120. Somjen G.G., Lothman E.W. (1974). Potassium, sustained focal potentials shifts and dorsal root potential of the mammalian spinal cord. *Brain Res.* 69, 153-157.
121. Sun Q.Q., Dale N. (1997). Serotonergic inhibition of the T-type and high voltage-activated Ca²⁺ currents in the primary sensory neurons of *Xenopus* larvae. *J Neurosci.* 17, 6839-6849.

122. Sybert G.W., Munson J.B., Fleshman J.W. (1980). Effect of presynaptic inhibition on axonal potentials, terminal potentials, focal synaptic potentials, and EPSPs in cat spinal cord. *J. Neurophysiol.* 44, 792-803.
123. Takahashi T., Berger A.J. (1990). Direct excitation of rat spinal motoneurons by serotonin. *J. Physiol. (Lond.)* 423, 63-76.
124. Tjolsen A., Berge O.G., Hole K. (1991). Lesions of bulbo-spinal serotonergic or noradrenergic pathways reduce nociception as measured by the formalin test. *Acta Physiol. Scand.* 142, 229-236.
125. Toennies J.F. (1938). Reflex discharge from the spinal cord over the dorsal roots. *J. Neurophysiol.* 1, 378-390.
126. Tsuchiya M., Yamazaki H., Hory Y. (1999). Enkephalinergic neurons express 5-HT₃ receptor in the spinal cord dorsal: single cell RT-PCR analysis. *Neuroreport* 10, 2749-2753.
127. Viala D., Buser P. (1969). The effects of dopa and 5-HTP on rhythmic efferent discharges in hind limb nerves in the rabbit. *Brain Res.* 12, 437-443.
128. Vejsada R., Palecek J., Hnik P., Soukup T. (1985). Postnatal development of conduction velocity and fibre size in the rat tibial nerve. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 3, 583-589.
129. Villalón C. M., Centurión D. (2007). Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 376, 45-63.
130. Wall P. D. (1958). Excitability changes in afferent fibre terminations and their relation to slow potentials. *J. Physiol. (Lond.)* 142, 1-21.
131. Wang M.Y., Dun N.J. (1990). 5-Hydroxytryptamine responses in neonate rat motoneurons *in vitro*. *J. Physiol. (Lond.)* 430, 87-103. 18.
132. Wang Y. Y., Wei Y. Y., Huang J., Wang W., Tamamaki N., Li Y. Q., Wu S. X. (2009). Expression patterns of 5-HT receptor subtypes 1A and 2A on GABAergic neurons within the spinal dorsal horn of GAD67-GFP knock-in mice. *J. Chem. Neuroanat.* 38, 75-81.
133. Wei F., Dubner R., Ren K. (1999). Nucleus reticularis gigantocellularis and nucleus raphe magnus in the brain stem exert opposite effects on behavioral hyperalgesia and spinal Fos protein expression after peripheral inflammation. *Pain* 80, 127-141.

134. Willis W.D. (1981). Effects of peripherally and centrally administered serotonin on primate spinothalamic neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.* 133, 105-123.
135. Willis W.D. Jr. (1999). Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp. Brain Res.* 124, 395-421.
136. Wilson J.M., Hartley R., Maxwell D.J., Todd A.J., Lieberam I., Kaltschmidt J.A., Yoshida Y., Jessell T.M., Brownstone R.M. (2005). Conditional Rhythmicity of Ventral Spinal Interneurons Defined by Expression of the Hb9 Homeodomain Protein. *J. Neurosci.* 25, 5710-5719.
137. Yoshimura M., Furue H. (2006). Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *J. Pharmacol. Sci.* 101, 107-117.
138. Zhang Z.H., Yang S.W., Chen J.Y., Xie Y.F., Qiao J.T., Dafny N. (1995). Interaction of serotonin and norepinephrine in spinal antinociception, *Brain Res. Bull.* 38, 167-171.